

反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中 9-硝基喜树碱浓度

张春燕¹, 李玉珍¹, 陈碧², 张海英¹, 李长龄^{*} (1. 北京大学人民医院药剂科, 北京 100044; 2. 北京大学药学院药理系, 北京 100083)

摘要: **目的** 建立一种简单、快速测定 9-硝基喜树碱血药浓度的反相高效液相色谱法。 **方法** 血浆样品加喜树碱作内标, 用正己烷-二氯甲烷-异丙醇(100:50:5)提取, 氮气吹干, 残渣用流动相溶解进样。 **色谱条件:** 分析柱为 C₁₈ 反相柱, 流动相为 3% 甲酸溶液-乙腈(体积比 65:35), 流速为 2.0 mL · min⁻¹, 在紫外检测波长 370 nm 处进行检测。 **结果** 9-硝基喜树碱及内标

作者简介: 张春燕, 女, 1973, 主管药师, 1997 年毕业于北京医科大学。 联系电话: 68314422 - 5752(5749)

*** 通讯作者,** 李长龄, 北京大学药学院药理系

在5min内完全分离,检测限为 $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,在 $25\sim 1600\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, $r=0.9996$,低、中、高浓度的回收率、日间及日内精密度均符合方法学要求。结论 本法简便、快速、稳定、重现性好,适用于9-硝基喜树碱临床前药动力学研究。

关键词:反相高效液相色谱法;9-硝基喜树碱;血浆

中图分类号:R969.11 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)06-0500-03

Determination of 9-nitrocamptothecin in rat plasma by reversed phase high performance liquid chromatography

ZHANG Chun-yan¹, LI Yu-zhen¹, CHEN Bi², ZHANG Hai-ying¹, LI Chang-ling^{2*} (1. Department of Pharmacy, People's Hospital, Pekin University, Beijing 100044, China; 2. Department of Pharmacology, School of pharmacology, Pekin University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE A simple and rapid reversed phase high performance liquid chromatographic method was developed for determination of 9-nitrocamptothecin. **METHOD** The samples added camptothecin as an internal standard, were extracted with n-hexane-dichloromethane-dimethyl carbionl (100:50:5), dried by N_2 , the residue was dissolved in the mobile phase and $50\mu\text{L}$ of solution was injected into the chromatographic system. The mobile phase was 3% formic acid solution; $\text{CH}_3\text{CN} = 65:35$ (v/v), the detect wavelength was 370 nm. **RESULT** The retention time of 9-nitrocamptothecin and the internal standard were 4.9 min and 4.2 min respectively, the detect limit was $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, the linear range was between $25\sim 1600\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $r=0.9996$. The average recovery was 102.1%, the intra-day and inter-day RSDs were 5.0% and 5.0%, respectively. **CONCLUSION** It is a simple, rapid and stable method for determination of 9-nitrocamptothecin in plasma.

KEY WORDS: reversed-phase high performance liquid chromatography; 9-nitrocamptothecin; plasma

喜树碱是从喜树中提取得到的一种细胞毒素生物碱,喜树碱与其类似物是一类重要的抗癌药物,它们通过抑制DNA拓扑异构酶,导致DNA断裂,最终造成细胞凋亡。喜树碱早已作为抗癌药物用于临床治疗,但由于毒性大,应用受到一定限制。近年来,为提高疗效,减少不良反应,已合成许多喜树碱衍生物,其中9-硝基喜树碱因其良好的抗肿瘤活性,现已进入早期临床研究阶段。

国外已有文献报道,用反相高效液相色谱法测定9-硝基喜树碱的血药浓度,但所需加入血容量大(0.5 mL)^[1],此外还有人将9-硝基喜树碱还原为9-氨基喜树碱后,再用反相高效液相色谱法荧光检测法对其定量,样品处理方法繁琐且复杂^[2]。为简便、准确、快速地测定9-硝基喜树碱的血药浓度,本实验建立了测定大鼠血浆中9-硝基喜树碱浓度的反相高效液相色谱法,适用于9-硝基喜树碱临床前药代动力学研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪:WatersTM600-2487 紫外检测系统, MILLENNIUM³² 操作平台(Waters公司);医用离心机:LD-2A型(北京医用离心机厂);快速液体混合器:G-560E(Scientific industries, INC)。

1.2 药品与试剂

9-硝基喜树碱对照品(齐鲁药厂);喜树碱(齐鲁药厂);乙腈(色谱纯,英国Fisher公司);蒸馏水:自制四级截流水。其他化学试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 血浆中9-硝基喜树碱测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Symmetry Shield C_{18} ($5\mu\text{m}$, $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$)柱;流动相:3% 甲酸溶液-乙腈 = $65:35$ (v/v);流速: $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长:370 nm;柱温 25°C ;内标:喜树碱。

2.1.2 标准溶液配制 精密称取9-硝基喜树碱对照品适量,加甲醇溶解,于量瓶中定溶,配制浓度为 $64\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液,使用前稀释为 $6.4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准液。

精密称取内标喜树碱适量,加甲醇溶解,于量瓶中定溶,配制浓度为 $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液,使用前稀释为 $0.4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准液。

2.1.3 样品制备方法 取血浆样品 0.2 mL 加入内标液($0.4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $50\mu\text{L}$,混匀,加入 $200\mu\text{L}$ $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_3PO_4 溶液,加入正己烷-二氯甲烷-异丙醇($100:50:5$) 3 mL ,漩涡混合2min,离心 10 min ($3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),弃去上层液,转移下层有机相于另一离心管中,于 40°C 水浴中氮气吹干,残渣加入 $100\mu\text{L}$ 流动相溶解,取 $50\mu\text{L}$ 进行HPLC色谱分析。

2.1.4 标准曲线的制作 精密量取9-硝基喜树碱标准液,用大鼠血浆以倍比稀释法依次稀释成浓度为25, 50, 100, 200, 400, 800, $1600\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的含药血浆。取上述浓度含药血浆 0.2 mL ,按“2.1.3”项下操作,以测得9-硝基喜树碱峰面积与内标峰面积比(Y)对浓度(X)进行线性回归,线性方程为 $Y=0.01096+3.8764X$,相关系数 $r=0.9996$,9-硝基喜树碱在 $25\sim 1600\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的相关性,检测限为 $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。9-硝基喜树碱及内标保留时间分别为4.9min和4.2 min,见图1。

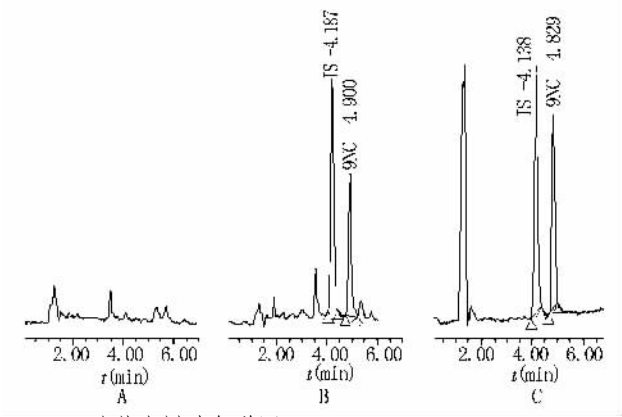


图1 9-硝基喜树碱色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 9-nitrocamptothecin

A 空白血浆 B 标准溶液 C 血浆样品

A blank plasma B standard solution C plasma sample

2.1.5 回收率实验 (1)提取回收率:分别配制浓度为 50, 200,800 ng · mL⁻¹低、中、高三种浓度血浆样品各 5 份,按“2.1.3”项下操作,以提取后色谱峰面积与未提取直接进样获得色谱峰面积之比,考察样品提取回收率。3 种浓度下提取回收率分别为 101.68%,97.01%,93.40%。(2)方法回收率:分别配制浓度为 50,200,800 ng · mL⁻¹低、中、高三种浓度血浆样品各 5 份,按“2.1.3”项下操作,测定 9-硝基喜树碱浓度,以实测浓度与加入浓度之比乘以 100% 计算方法回收率,结果见表 1。

表1 血浆中 9-硝基喜树碱方法回收率(mean ± s, n = 5)

Tab 1 Method recovery of 9-nitrocamptothecin(mean ± s, n = 5)

Added (ng · mL ⁻¹)	Found (ng · mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)
50.0	51.6 ± 3.6	103.6	7.0
200.0	204.2 ± 7.5	102.1	3.7
800.0	804.2 ± 33.9	100.5	4.2

2.1.6 精密度实验 分别配制浓度为 50,200,800 ng · mL⁻¹低、中、高三种浓度血浆样品各 5 份,按“2.1.3”项下操作,测定日内及日间 RSD,结果见表 2。

表2 血浆中 9-硝基喜树碱精密度(mean ± s, n = 5)

Tab 2 Intra- and inter-day analytical precision of 9-nitrocamptothecin(mean ± s, n = 5)

Added (ng · mL ⁻¹)	Intra-day precision		Inter-day precision	
	Found (ng · mL ⁻¹)	RSD (%)	Found (ng · mL ⁻¹)	RSD (%)
50.0	51.6 ± 3.6	7.0	52.1 ± 3.4	6.5
200.0	204.2 ± 7.5	3.7	199.4 ± 7.9	4.0
800.0	804.2 ± 33.9	4.2	809.1 ± 34.9	4.3

2.2 样品测定

2 只 SD 大鼠按 5mg · kg⁻¹剂量灌胃给予 9-硝基喜树碱后,在不同时间点取血,测定其血药浓度,结果见表 3。

表3 2 只 SD 大鼠按 5mg · kg⁻¹剂量灌胃给予 9-硝基喜树碱后血药浓度

Tab 3 The plasma concentrations of 9- nitrocamptothecin after ig (5mg · kg⁻¹) administration to two SD rats

时间(min)	浓度(ng · mL ⁻¹)	
0	0	0
5	230.0	320.0
10	1090.0	1500.0
15	1360.0	1650.0
30	1170.0	1190.0
60	490.0	540.0
90	470.0	360.0
120	370.0	340.0
180	280.0	170.0
240	220.0	150.0
360	34.0	67.0

3 讨论

本法中 9-硝基喜树碱与内标分离很好,保留时间短是本法的特点之一,分别为 4.2 min 及 4.9 min,两峰之间无杂峰,在 5min 内完全分离,这样与文献报道的方法比可以大大缩短进样时间^[3]。另外,实验中发现柱压对两药的保留时间影响较大,因此应使柱压保持在一定的范围内。该法采用液-液萃取,比文献报道的固相萃取法^[1]及还原转化法^[2]操作步骤少,因此该法简单、快速、适用于 9-硝基喜树碱临床前药代动力学研究。

参考文献

[1] Schoemaker NE, Rosing H, Jansen S, *et al.* Determination of 9-nitrocamptothecin and its metabolite 9-aminocamptothecin in human plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection[1]. J Chromatogr B,2002, 775:231.

[2] Hin HR, Harris NJ, Natelson EA, *et al.* Pharmacokinetics of the *in vivo* and *in vitro* conversion of 9-nitro-20(s)-camptothecin to 9-amino-20(s)-camptothecin in humans, dogs, and mice [J]. Cancer Res,1999,54:3096.

[3] 李柯,钟大放. 高效液相色谱法测定大鼠组织及血浆中 9-硝基喜树碱含量[J]. 药学报 2003,38(2):124.

收稿日期:2004-06-16