

高效液相色谱法测定人血浆中依托泊苷浓度

曹运莉 杜小莉 朱珠* 付强(中国医学科学院-北京协和医学院北京协和医院药剂科 北京 100730)

摘要:目的 建立人血浆中依托泊苷的 HPLC 测定方法。方法 取样本 100 μL 以替尼泊苷为内标,二氯甲烷液液提取,有机相室温下氮气吹干,流动相复溶后加正己烷,振荡离心后取下层进样分析。色谱柱为 Shim-pack CLC-ODS 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水=60:40;流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;激发波长为 240 nm,发射波长为 326 nm。结果 在 0.05 ~ 50 mg \cdot L⁻¹ 内线性良好($r=0.9992$, $n=7$)。低(0.10 mg \cdot L⁻¹)、中(2.00 mg \cdot L⁻¹)、高(30.00 mg \cdot L⁻¹) 3 个浓度质控样品的批内变异(RSD)为 3.07% ~ 6.79%,批间变异(RSD)为 2.19% ~ 5.51%,方法学回收率为 100.15% ~ 103.58%。结论 本方法灵敏度高,简便快捷,为开展依托泊苷的人体药动学研究提供了基础。

关键词: 依托泊苷; 高效液相色谱法; 血浆浓度

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)11-0857-03

HPLC Assay for Determination of Etoposide in Human Plasma

CAO Yun-li, DU Xiao-li, ZHU Zhu*, FU Qiang(Department of Pharmacy, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of etoposide in human plasma. **METHODS** With teniposide as internal standard, 100 μL sample was extracted by dichloromethane. The organic layer was evaporated to dryness under nitrogen stream at room temperature. The residual was reconstituted with mobile phase and n-hexane, then the bottom layer was injected. A Shim-pack CLC-ODS column was selected, and the mobile phase was methanol-H₂O = 60:40 (v/v) at a flow rate of 1 mL \cdot min⁻¹. The excitation wavelength and emission wavelength were 240 nm and 326 nm, respectively. **RESULTS** Good linearity was obtained over the range of 0.05 to 50 mg \cdot L⁻¹ ($r=0.9992$, $n=7$). For the low (0.10 mg \cdot L⁻¹), middle (2.00 mg \cdot L⁻¹) and high (30.00 mg \cdot L⁻¹) concentration check samples, the intra-run RSDs were 3.07% - 6.79%, the inter-run RSDs were 2.19% - 5.51%, and the mean recoveries were 100.15% - 103.58%. **CONCLUSION** The method is sensitive, simple and rapid, thus providing a basis for carrying out pharmacokinetic study of etoposide in human.

KEY WORDS: etoposide; HPLC; plasma concentration

依托泊苷是鬼臼毒素的半合成衍生物,通过干扰拓扑异构酶 II 的功能、抑制 DNA 的合成而发挥抗肿瘤作用。该药临床应用于急性白血病、小细胞肺癌和实体瘤的治疗,也用于一些儿童肿瘤,其毒性主要为剂量限制性骨髓抑制,也会出现恶心、呕吐等^[1]。研究表明,依托泊苷的疗效和毒性与血药浓度有相关性^[2-3],而且其药动学个体间差异大,治疗窗窄,因此临床有必要对其开展治疗药物监测,并在此基础上制定个体化用药方案,以提高疗效和减少不良反应。然而目前国内外有关依托泊苷血药浓度测定的文献较少,且存在取样量较大(0.2 ~ 1.0 mL)、分析时间长或需要特殊的设备等局限^[1-7]。因此,本实验拟建立一种灵敏、快捷和简便的依托泊苷

血药浓度 HPLC 测定方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

依托泊苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100388-200401,97.4%),替尼泊苷注射液(百时美施贵宝公司,批号:9G55683,5 mL:50 mg)。甲醇、二氯甲烷、正己烷均为色谱纯。水为实验室超纯水。

1.2 仪器与色谱条件

高效液相色谱仪 [DGU-3A 在线脱气机,LC-10AD 泵,7725i 进样阀,RF-10A_{XL} 荧光检测器(0.0002 AUFS)],C-R7A plus 色谱记录仪(日本岛

作者简介:曹运莉,女,硕士研究生 研究方向:临床药学 * 通讯作者:朱珠,女,研究员,硕士生导师 研究方向:临床药学与药理学
Tel: (010) 65296537 E-mail: zhuzhu666777888@yahoo.com.cn

津)], Ping - Pong 74580 卧式振荡器(德国 Block Scientific 公司), γ m - 2000 液体混合器(Upwards Biosystem 公司, 中国台湾), Mikro 12 - 24 离心机(Hettich 公司, 德国), Milli - Q RG 超纯水系统(美国 Millipore 公司); Shim-pack CLC-ODS 色谱柱(6 mm \times 150 mm 5 μ m, 日本岛津) 流动相: 甲醇-水 = 60:40 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹ 激发波长 240 nm 发射波长 326 nm 柱温: 室温。

1.3 样品处理

精密吸取待测血浆 100 μ L 置于 1.5 mL 带塞塑料离心试管中, 加入 20 mg \cdot L⁻¹ 替尼泊苷溶液 50 μ L 和二氯甲烷 700 μ L 400 次 \cdot min⁻¹ 振荡 2 min, 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取下层有机相, 室温下氮气吹干; 以 50 μ L 流动相复溶后, 加入正己烷 200 μ L 400 次 \cdot min⁻¹ 振荡 2 min 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 1 min 吸取下层液体 10 μ L 进样分析。当样品浓度较低时, 可增大进样体积至 30 μ L。

1.4 标准曲线和质控样品的制备

精密称取依托泊苷对照品适量, 以甲醇溶解后配制成 1 g \cdot L⁻¹ 的储备液。用空白血浆和依托泊苷储备液, 配制质量浓度为 50.00, 20.00, 10.00, 2.00, 1.00, 0.20, 0.05 mg \cdot L⁻¹ 的血浆标准系列溶液, 分装后于 -60 $^{\circ}$ C 保存备用。按“1.3”项下方法处理, 以依托泊苷浓度为横坐标, 依托泊苷与内标的峰高比为纵坐标, 以 SPSS10.0 统计分析软件进行加权最小二乘法线性回归计算。同法另行配制低(0.10 mg \cdot L⁻¹)、中(2.00 mg \cdot L⁻¹)、高(30.00 mg \cdot L⁻¹) 质量浓度质控样品, 分装后于 -60 $^{\circ}$ C 保存备用。质控样品作为未知样品随同标准曲线测定, 并随机分散于血浆标准样品的每批待测样品中进行测定。

1.5 精密度和准确度

低、中、高质量浓度 3 批质控样品分散在 1 周内测定($n=6$), 计算批间变异; 同批处理低、中、高质量浓度质控样品各 10 份, 计算批内变异。以质控样品测定质量浓度与标示质量浓度的比值计算方法学回收率。

1.6 定量限的精密度和准确度

取质量浓度为 0.05 mg \cdot L⁻¹ 的血浆对照品($n=6$) 按“1.3”项下方法处理, 计算精密度和准确度。

1.7 提取回收率

同批处理低、中、高质量浓度质控样品进样($n=3$), 另行配制相应浓度的对照品溶液不经处理直接进样, 以峰高比计算提取回收率。

1.8 稳定性

将低、中、高质量浓度质控样品($n=3$) 于室温放置 4 h 后按“1.3”处理, 考察其室温放置稳定性; 将低、中、高质量浓度质控样品($n=3$) 按“1.3”方法处理复溶后, 复溶液于室温放置 0、3、6、12、24 和 36 h 进样测定; 低、中、高质量浓度质控样品($n=3$) 连续冻融 3 次后按“1.3”处理, 考察其冻融稳定性; 考察低、中、高质量浓度质控样品($n=3$) 于 -60 $^{\circ}$ C 分别冻存 1、5、8 和 77 d 的稳定性。

1.9 干扰药物实验

配制临床常与依托泊苷合用的药物氟尿嘧啶、氟脲苷、甲氨蝶呤、卡铂、紫杉醇和昂丹司琼溶液, 直接进样, 考察其在本实验条件下是否干扰依托泊苷的测定。

1.10 临床标本收集与测定

收集滋养细胞肿瘤患者静脉输注依托泊苷后约 20 h 的血浆样品, 应用所建立的 HPLC 方法进行测定。给药方案为: 100 mg \cdot m⁻² \cdot d⁻¹, iv 滴注 1 h, 每天 1 次 β 或 5 d 一个疗程, 每隔 17~21 d 重复 1 次。

2 结果

2.1 色谱行为

在“1.2”项色谱条件下, 处理后的空白血浆样品图谱在依托泊苷峰位处背景干净, 无杂峰干扰。依托泊苷和内标替尼泊苷峰峰形尖锐, 与各杂峰分离良好。依托泊苷和内标的保留时间为 4.80 和 8.00 min, 见图 1。

2.2 线性关系和灵敏度

依托泊苷在 0.05 ~ 50.00 mg \cdot L⁻¹ 内线性良好, 线性方程为: $PHR = 0.168 5\rho + 0.000 4$, $r = 0.999 2$, 斜率变异系数为 3.27% ($n=7$)。定量限

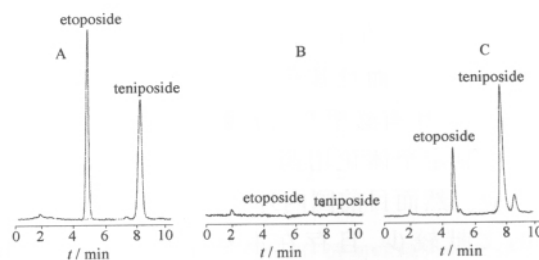


图 1 依托泊苷的 HPLC 图谱

A - 依托泊苷(10 mg \cdot L⁻¹) 和替尼泊苷(20 mg \cdot L⁻¹) 的对照溶液; B - 空白血浆; C - 临床样本(依托泊苷: 3 mg \cdot L⁻¹)

Fig. 1 Chromatograms of etoposide

A - etoposide(10 mg \cdot L⁻¹) and teniposide(20 mg \cdot L⁻¹) standard solutions; B - blank plasma; C - clinical sample(etoposide: 3 mg \cdot L⁻¹)

0.05 mg · L⁻¹ 的方法学回收率为 (100.95 ± 9.86) % ,RSD=9.76% (n=6)。

2.3 精密度和准确度

低、中、高质量浓度质控样品的批内和批间 RSD 均 <10% ,方法学回收率均在 100.15% ~ 103.58% 之间。质控样品和内标的提取回收率均 >70%。

2.4 稳定性

低、中、高质量浓度质控样品 (n=3) 室温放置 4 h 内稳定;质控样品经处理复溶后室温放置 12 h 内稳定;质控样品连续冻融 3 次稳定性好;质控样品于 -60 °C 冻存 8 d 内稳定(浓度变化 <10%)。

2.5 干扰药物实验

氟尿嘧啶、氟脲苷、甲氨蝶呤、卡铂、紫杉醇和昂丹司琼在本实验条件下均不干扰依托泊苷的测定。

2.6 临床样本测定

共收集 13 例女性滋养细胞肿瘤患者年龄为 (30 ± 11) 岁的血浆样品。测定结果表明,患者用药第 1、2 和 3 d 后的平均血药谷质量浓度分别为 1.59 (n=2) ,1.17 (n=8) 和 1.84 mg · L⁻¹ (n=2)。其中一名患者用药第 1、2 和 3 天后的谷质量浓度分别为 1.08、0.95 和 0.84 mg · L⁻¹。

3 讨论

3.1 血浆样品处理方法的选择

血浆样品处理方法有液液提取法和蛋白沉淀法,提取溶剂包括氯仿、二氯甲烷和乙酸乙酯,蛋白沉淀剂包括乙腈、甲醇等^[4-7]。结果表明,乙腈沉淀法、二氯甲烷提取法处理后血浆杂峰较少,由于内标替尼泊苷对乙腈蛋白沉淀法不稳定,因此选择二氯甲烷液液提取法进行血浆样品处理。对血浆和二氯甲烷的不同比例(1:2、1:3、1:4、1:5、1:7、1:9)进行考察,结果发现,依托泊苷和内标的提取率在 1:7 趋于饱和。而对不同振荡速度(200、300、350、400 次 · min⁻¹)和不同振荡时间(2.5、10 min)考察的结果表明,依托泊苷和内标的提取率在 400 次 · min⁻¹ 和 2 min 时趋于饱和。另外还发现复溶后加入正己烷再次提取,可使血浆杂峰减少,分析时间缩短至 13 min,且不影响依托泊苷和内标的提取率。

3.2 流动相甲醇比例的选择

考察了不同比例的甲醇和水(60:40、65:35、70:30)对色谱行为的影响。结果表明,随着甲醇比例增加,依托泊苷和替尼泊苷的保留时间缩短,在 60:40 时,依托泊苷、替尼泊苷和血浆杂峰分离良好。

3.3 依托泊苷的代谢产物

临床样本的 HPLC 图谱中,紧随依托泊苷峰后有一杂峰(*t_R* = 5.34 min),而血浆标准品图谱中无此杂峰。这一现象与文献^[8]结果相同,该文作者提出该杂峰为依托泊苷的顺式异构体。据报道,临床应用的为其反式异构体,它在体内通过不同的代谢途径生成羧酸衍生物、葡萄糖醛酸苷结合物和顺式异构体,前两种代谢物水溶性较强不易被有机溶剂提取,而顺式异构体脂溶性与反式母体药物相似,可被有机溶剂提取。在本实验的二氯甲烷液液提取条件下,其代谢物顺式异构体可与依托泊苷共同被提取、检测,由此可初步推断,患者血样图谱中 *t_R* = 5.34 min 的峰为其顺式异构体。在本实验条件下,依托泊苷的反式与顺式异构体分离良好。

4 结论

本实验建立的人血浆中依托泊苷浓度 HPLC 测定方法具有取样量少、灵敏度高的优点,分析时间短且无需特殊设备。对临床标本的测定表明,本方法能够满足依托泊苷人体药动学研究和临床治疗药物监测的需要,具有较好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Etoposide. Micromedex Healthcare Series [DB/OL]. America. 2009 [2010-7-4].
- [2] MINAMI H, SHIMOKATA K, SAKA H, *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of a 14-day infusion of etoposide in patients with lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1993, 11(8): 1602-1608.
- [3] MILLER A A, TOLLEY E A, NIELL H B. Therapeutic drug monitoring of 21-Day Oral Etoposide in patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(7): 1705-1710.
- [4] HERSH M R, LUDDEN T M. High-performance liquid chromatographic assay for etoposide in human plasma[J]. *J Pharm Sci*, 1986, 75(8): 815-817.
- [5] GE Y Q, ZHANG Y Q, LU G C, *et al.* Simultaneous determination of cisplatin and etoposide in plasma and tissue by HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2003, 23(2): 87-90.
- [6] ZHOU R, FROSTVIK-STOLT M, LILJEMARK E. Determination of etoposide in human plasma and leukemic cells by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 757(1): 135-141.
- [7] CHEN C L, UCKUN F M. Highly sensitive liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (LC-MS) method for the determination of etoposide levels in human serum and plasma[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 744(1): 91-98.
- [8] HOLTHUIS J J. Etoposide and teniposide. Bioanalysis, metabolism and clinical pharmacokinetics[J]. *Pharm Weekbl Sci*, 1988, 10(3): 101-116.

(收稿日期:2010-11-23)