

# RP-HPLC法测定大鼠血浆中洛铂的浓度<sup>Δ</sup>

刘 剑<sup>1\*</sup>, 徐韶东<sup>2</sup>, 张志清<sup>1</sup>, 杨秀岭<sup>1</sup>, 亢泽坤<sup>1</sup>(1.河北医科大学第二医院, 石家庄 050000; 2.河北医科大学药学院, 石家庄 050011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4246-02  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.08

**摘要** 目的:建立测定大鼠血浆中洛铂血药浓度的方法。方法:取10只大鼠尾静脉注射洛铂10.64 mg/kg后即刻取血分离血浆,采用反相高效液相色谱法测定血药浓度。色谱柱为Diamonsil™ C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-水(13.5:86.5),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。结果:洛铂的保留时间为5.13 min;其检测质量浓度的线性范围为0.5~80.0 μg/ml( $r=0.999\ 9$ ),定量限为0.5 μg/ml,方法回收率为(96.61±4.04)%~(107.9±6.76)%,日内RSD为2.43%~5.43%( $n=5$ ),日间RSD为2.39%~8.93%( $n=5$ );平均血药浓度为(67.43±10.45) μg/ml。结论:本方法操作简便、准确、灵敏度高,可用于大鼠血浆中洛铂的血药浓度测定。

**关键词** 反相高效液相色谱法;洛铂;血药浓度;大鼠

## Determination of Lobaplatin Concentration in Plasma of Rats by RP-HPLC

LIU Jian<sup>1</sup>, XU Shao-dong<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-qing<sup>1</sup>, YANG Xiu-ling<sup>1</sup>, KANG Ze-kun<sup>1</sup>(1.The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of lobaplatin concentration in plasma of rats. METHODS: Blood sample was collected from 10 rats after i.v. injection of lobaplatin 10.64 mg/kg via tail vein (and then plasma sample was separated); RP-HPLC method was adopted to determine the plasma concentration of lobaplatin. Diamonsil™ C<sub>18</sub> column was used with mobile phase consisted of acetonitrile-water (13.5:86.5) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 35 ℃. The injection volume was 20 μl. RESULTS: The retention time of lobaplatin was 5.13 min; the linear range of lobaplatin were 0.5-80.0 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ). The limit of quantification was 0.5 μg/ml. The methodology recovery were (96.61±4.04)%-(107.9±6.76)%; the RSD of intra-day were 2.43%-5.43% ( $n=5$ ), and the RSD of inter-day were 2.39%-8.93% ( $n=5$ ), respectively. The average blood drug concentration is (67.43±10.45) μg/ml. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate with high sensitivity. It is fitted for the determination of lobaplatin concentration in plasma of rats.

**KEY WORDS** RP-HPLC; Lobaplatin; Plasma concentration; Rats

洛铂(Lobaplatin, LBP)为第3代铂类抗肿瘤药物,2005年经国家食品药品监督管理局批准作为国家一类新药上市,主要用于治疗晚期乳腺癌、小细胞肺癌和慢性粒细胞白血病<sup>[1]</sup>。据研究<sup>[2]</sup>表明,洛铂与第1代铂类抗肿瘤药物顺铂、第2代铂类抗肿瘤药物卡铂相当,而且与顺铂没有交叉耐药性;区别于第1、2代铂类抗肿瘤药物的是,洛铂具有多项新的优势,如稳定性好、抗癌活性强、抗癌谱广、不良反应轻等特点,因此受到临床医学工作者和广大患者的认可。但是洛铂在人体内药动学研究的文献资料很少,目前尚未发现利用大鼠进行前期研究的文献报道。故本实验建立测定大鼠血浆中洛铂的药物浓度的反相高效液相色谱法(RP-HPLC),为洛铂在大鼠体内以及人体内的药动学研究提供方法学参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HPLC系统,包括Waters-515高压泵、7725i进样阀、486紫外检测器、Empower Application操作平台(美国Waters公司);CPA2250电子天平(德国Sartorius公司);MDF-u2086S低温冰箱(日本三洋公司);XW-80A涡旋混合器(上海精科实业有限公司)。

<sup>Δ</sup> 基金项目:河北省2011年医学科学研究重点课题项目(No.20110069)

\* 主管药师,硕士。研究方向:药物体内相互作用。电话:0311-66002882。E-mail:ljhaiyang@aliyun.com

### 1.2 药品与试剂

注射用洛铂(海南长安国际制药有限公司,批号:20110901,规格:每支50 mg);洛铂对照品(河北医科大学第二医院药理基地制备,批号:20120312,纯度:98.24%);乙腈(天津市康科德科技有限公司,色谱纯,批号:101203)。

### 1.3 动物

健康Wistar大鼠,清洁级,♂,体质量(300±10)g,由河北省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(冀)2008-1-003。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil™ C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(13.5:86.5, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:35 ℃;进样量:20 μl。

### 2.2 对照品溶液的配制

精密称量20 mg洛铂对照品,置于25 ml量瓶中,加水至刻度并摇匀,得800 μg/ml的洛铂贮备液;分别精密量取洛铂贮备液适量,稀释制成质量浓度为400、200、100、50、25、10、5 μg/ml的洛铂对照品溶液。

### 2.3 血浆样品处理

2.3.1 空白血浆:大鼠眼眶取血,将所得的空白血浆,置于涂有1%肝素的离心管中,10 000 r/min(离心半径13.5 cm,下同)离心2 min,吸取上清液,贮存于-40 ℃的冰箱中,备用。

2.3.2 血浆样品:将冷冻血浆样品室温自然解冻,取血浆样品

200  $\mu\text{l}$ , 置于3 ml离心管中, 加入乙腈600  $\mu\text{l}$ , 涡旋混合1 min, 10 000 r/min离心10 min; 取上清液600  $\mu\text{l}$ , 置于2 ml尖底试管中, 在水浴37  $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干, 残余物用50  $\mu\text{l}$ 水溶解, 10 000 r/min离心2 min, 取上清液, 备用。

#### 2.4 专属性试验

取对照品溶液直接进样测定, 取空白血浆、空白血浆+对照品、血浆样品, 按“2.3”项下方法处理后, 进样测定。结果显示, 血浆中内源性物质不干扰洛铂的测定, 洛铂的保留时间为5.13 min。色谱图见图1。

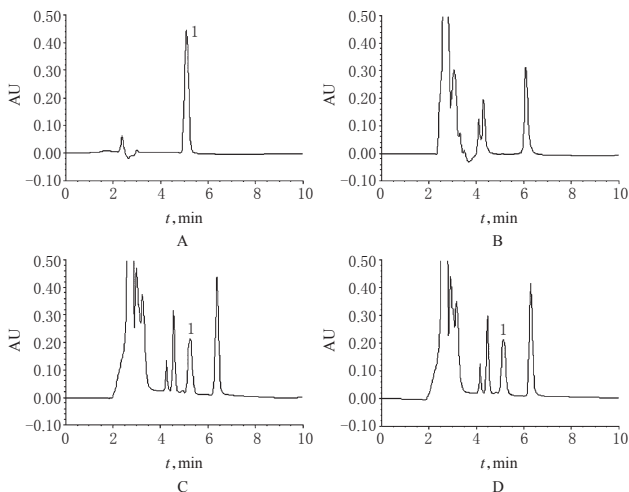


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 空白血浆; C. 空白血浆+对照品; D. 血浆样品; 1. 洛铂

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. blank plasma; C. blank plasma+substance control; D. plasma sample; 1. lobaplatin

#### 2.5 标准曲线的制备

分别精密量取“2.2”项下不同质量浓度的对照品溶液20  $\mu\text{l}$ , 置于3 ml离心管中, 加入空白血浆180  $\mu\text{l}$ , 制成质量浓度分别为0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆样品, 按“2.3.2”项下方法处理后, 进样测定。以洛铂峰面积( $y$ )对洛铂质量浓度( $c$ )进行线性回归, 得回归方程为 $y=30\ 541c-5\ 497.1$  ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明, 洛铂检测质量浓度的线性范围为0.5~80.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 定量限为0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

#### 2.6 方法回收率试验

分别取质量浓度为10、100、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液20  $\mu\text{l}$ , 各5份, 配制成1、10、40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算洛铂实测浓度, 并与配制浓度进行比较, 计算方法回收率, 结果见表1。

#### 2.7 精密度试验

分别制备质量浓度为1、10、40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆样品, 各5份, 按“2.3.2”项下方法处理后, 于同日内测定5次, 考察日内精密度; 连续5 d制备上述3种质量浓度的血浆样品, 各1份, 按“2.3.2”项下方法处理后, 进样测定, 考察日间精密度。结果显示, 各质量浓度血浆样品的日内RSD分别为2.43%、5.43%、4.03% ( $n=5$ ), 日间RSD分别为2.46%、8.93%、2.39% ( $n=5$ )。

#### 2.8 稳定性试验

制备质量浓度为10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆样品, 分别于-40  $^{\circ}\text{C}$ 低温保存5 d、反复冻融3次以及常温下放置0、1、2、3、4 h, 按“2.3.2”项下方法处理后, 进样测定, 考察血浆样品的稳定性。结果, 血浆样品在-40  $^{\circ}\text{C}$ 低温保存5 d、反复冻融3次以及常温下放置0、1、2、3、4 h后, 其RSD均小于5% ( $n=5$ ), 表明血浆样品的稳定性较好。

表1 回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

加入量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	测得量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
1	1.145	114.50	$107.9 \pm 6.76$	6.27
	1.151	115.10		
	1.012	101.20		
	1.014	101.40		
	1.072	107.20		
10	9.910	99.10	$98.07 \pm 3.32$	3.39
	9.364	93.64		
	9.774	97.74		
	9.709	97.09		
	10.280	102.80		
40	40.260	100.60	$96.61 \pm 4.04$	4.18
	36.860	92.15		
	40.470	101.2		
	37.730	94.32		
	37.920	94.80		

#### 2.9 血药浓度测定

制备相应质量浓度的洛铂溶液(精密称取注射用洛铂50 mg溶于5 ml蒸馏水中制得10 mg/ml的洛铂溶液)。取大鼠10只, 正常饮食进水, 称体质量, 根据文献<sup>[9]</sup>推算大鼠给药剂量为洛铂10.64 mg/kg, 用1 ml注射器尾静脉注射洛铂溶液, 均在给药后即刻由眼底静脉丛取血0.5 ml, 置于涂有肝素的离心管中, 10 000 r/min离心2 min, 吸取上清液即为血浆样品。将每只大鼠的血浆样品按“2.3.2”项下方法处理后, 分别进样测定。结果, 10只大鼠血浆样品中洛铂的血药浓度分别为65.18、62.16、71.52、58.60、77.55、59.73、47.55、77.62、78.62、75.76  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 平均血药浓度为( $67.43 \pm 10.45$ )  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

#### 3 讨论

相关资料显示<sup>[4]</sup>, 当流动相为乙腈-水(4:96), 其他色谱条件与本实验同时测定人体内洛铂血药浓度, 色谱峰出现时间较长, 约25 min左右, 给实验的进行带来一定的难度。经过笔者反复实验, 通过改变色谱条件降低流动相极性, 将流动相成分配比改为乙腈-水(13.5:86.5), 结果得到的峰峰形良好, 并与血浆内源性物质分离完全, 保留时间为5.13 min, 大大缩短了分析周期, 有利于实验的进行。

据文献<sup>[4]</sup>报道, 在血浆样品处理时, 可以使用甲醇沉淀蛋白。但笔者在实验过程中发现, 使用甲醇沉淀蛋白效果较差, 且不利于色谱柱的保护。考虑流动相中含有乙腈, 所以在预实验中拟定使用乙腈处理血浆样品; 在正式实验中确定使用乙腈处理血浆样品, 结果表明蛋白沉淀较完全, 有利于样品的测定和色谱柱的保护。

本实验结果表明, 建立的方法准确、简便、灵敏度高, 可用于大鼠血浆中洛铂的血药浓度测定。

#### 参考文献

- [1] 张伦. 铂类抗癌药物市场分析[J]. 中国药房, 2003, 14(3): 140.
- [2] 杨柳青, 秦叔逵. 第3代铂类药物洛铂的研究新进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(12): 1 134.
- [3] 黄继汉, 黄晓辉, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1 069.
- [4] 史健, 袁志芳, 刘伟娜, 等. 国产注射用洛铂在恶性肿瘤患者体内药动学的研究[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(24): 1 888.

(收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-02-21)