维普资讯 http://www.cqvip.com

94, 19 (2)

第19卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.19 No.2
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

79~81

高效液相色谱法检测血中表阿霉素的研究

化学教研室 李惠芝 赵 华
中心实验室 邱宗荫 郑 申

R979.1

提 要 用Zorbax C—8柱成功地分离了阿霉素、表阿霉素及其代谢产物。在此基础上建立了用阿霉素作内标物定量测定表阿霉素的分析方法，其最低检测限为2ng/ml，线性范围10—300 ng/ml。

代谢物

关键词 表阿霉素；表阿霉素代谢产物；高效液相色谱法
中图分类号 O657.71

表阿霉素(epirubicin，EPI)是蒽醌环类抗癌抗生素的一个新的衍生物，化学结构与阿霉素(adriamycin，ADM)相似，二者互为C—4′—OH差向异构体。EPI的毒副作用，特别是对心脏的毒性较ADM低。EPI的抗肿瘤疗效优于ADM，对少数ADM不敏感的肿瘤如胰腺癌、直肠癌、头颈部癌和黑色素癌等也有一定疗效。测定用EPI治疗肿瘤患者的血药浓度并对其代谢物进行分析，对制定用药方案、指导合理用药以及对药物进行进一步的研究都有十分重要的意义。

表阿霉素在化学结构上属于糖苷类抗生素，在体内由于糖苷键的水解、醌棍环及其侧键的氢化等，会产生多种代谢产物。由于用药后血药浓度很低，用一般的紫外吸收或荧光分光光度法难以准确测定其血药浓度，高效液相色谱法则是有效的分析方法。近年来，国外有用苯基键合硅胶柱测定血、尿中表阿霉素及其代谢产物[1]，用ODS柱测定心肌组织中表阿霉素及其代谢产物[2]等报告。本文报告了用Zorbax C—8硅胶柱分离阿霉素、表阿霉素及其代谢产物，以及用阿霉素作内标物定量测定表阿霉素的结果。

材料与方法

1. 药品和试剂

阿霉素、表阿霉素及其代谢产物标准品均由Farmitalia Carlo Erba 公司(意大利)提供；甲醇、柠檬酸、磷酸氢二钠、氯仿、盐酸、碳酸氢钠等均为分析纯；水为超纯水。

将阿霉素、表阿霉素及其代谢产物分别溶于甲醇中配成1×10^{-4}mol·L^{-1}贮备液备用。置冰箱中至少可保存一月。用时以甲醇稀释成所需浓度。

2. 仪器与色谱条件

仪器：色谱系统为Waters 510泵、U6K手动进样阀、Waters 470 荧光检测器和810 色谱工作

维普资讯 http://www.cqvip.com

站。岛津RF—540 荧光分光光度计，MiliQ超纯水器，超声振荡器，Model SA720 PH计。

色谱条件：Zorbax C—8硅胶不锈钢分析柱(0.46×15cm)，前置Waters保护性预柱。流动相为甲醇：水：0.1mol·L^{-1}；柠檬酸：0.04mol·L^{-1}；NaH_2PO_4(200:290:9:1, v/v)，用前经过滤并脱气。流速：1 ml·min^{-1}。检测波长：λex 485nm，λem 580nm。柱温：室温。

3、 样品的收集与处理

对用表阿霉素治疗的病人，采静脉血、肝素抗凝，离心，分离出血浆。准确吸取血浆1.0ml，加入内标溶液1μg/ml ADM溶液0.1ml，0.2mol·L^{-1}HCl 0.8ml，调节pH至3。再加氯仿10ml，振摇5min，离心，弃去氯仿相。在水相中加入0.1g $NaHCO_3$使其溶解，调节pH值为8，再加入氯仿10ml，振摇5min，离心，收集氯仿相。通N_2挥去氯仿，然后加甲醇200μl，混匀后取20μl进样。

结果与讨论

1、 色谱分离

阿霉素、表阿霉素及其代谢物标准品混合物的分离结果如图1所示。

用RF-540荧光分光光度计测定EPI甲醇溶液的激发光谱和发射光谱，其λex为475nm，λem为585nm。色谱分离时又用Waters 470荧光检测器对ADM、EPI及其代谢物的色谱峰作停流扫描，考虑到要同时检测几个组份，所以确定最适检测波长为λex485nm，λem580nm。

表1 阿霉素、表阿霉素及其代谢产物

名 称	略 语
epirubicin (表阿霉素)	EPI
adriamycin (阿霉素)	ADM
13(s)-dihydroepirubicin (13(s)-二氢表阿霉素)	E_2
adriamycinone (柔毛霉酮)	A_{1a}
13-dihydroadriamycinone (13-二氢柔毛霉酮)	A_{2a}
7-deoxy-adriamycinnone (7-去氧柔毛霉酮)	dA_{1a}

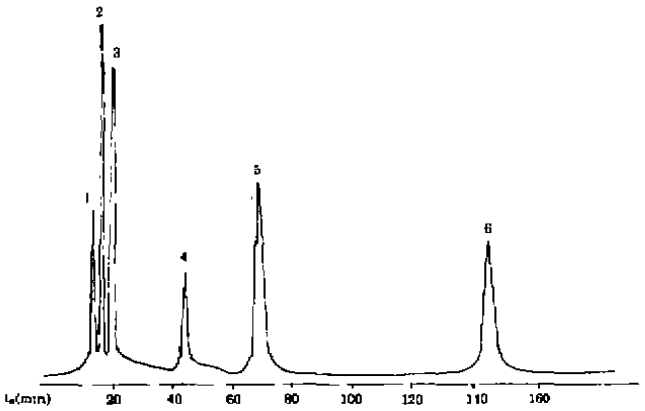


图1 阿霉素、表阿霉素及其代谢产物标准品的色谱图

色谱柱：Zorbax C—8硅胶柱；流动相，甲醇：水：0.1mol·L^{-1}；柠檬酸：0.04mol·L^{-1}；NaH_2PO_4 (200:290:9:1, v/v)；流速：1ml·min^{-1}；检测波长：λex 485nm，λem580nm；柱温、室温。色谱峰：1.E_2，2.ADM，3.EPI，4.A_{2a}，5.A_{1a}，6.dA_{1a}。

代谢物中，E_2是EPI分子中13位羰基氢化的产物，A_{1a}为EPI或ADM糖苷键水解的产物，A_{2a}为E_2糖苷键水解的产物，dA_{1a}为A_{1a}分子中7位去氧的产物。在本文设定的等度洗脱条件下，六种化合物均得到满意的分离。若改用梯度洗脱条件，则分析时间可以缩短。在Zorbax C—8硅胶柱上，EPI与ADM这一对差向异构体得到满意的分离。由此认为，在本文条件下，不仅可用ADM作内标物测定EPI，亦可用EPI作内标物测定ADM。

2、 血浆样品的处理

pH值对血浆中EPI的萃取影响极大。实验表明，在pH值5以下，EPI在氯仿中的溶解度很小，pH5以上，EPI在氯仿中的溶解度随PH值的增加而增大，pH8—9时达到最大值，pH9以上EPI的溶解度又减小。这是由EPI的结构特点所决定的，在低pH环境中，EPI分子

维普资讯 http://www.cqvip.com

中柔毛霉糖环上的氨基带正电荷，分子极性增大，导致在氯仿中溶解性差，而在水中溶解度大；在pH值大于9的碱性环境中，EPI分子中柔毛霉醌环上的酚羟基呈离解状态，也导致其在氯仿中的溶解性差；只有在pH8—9的条件下，EPI分子中的—NH_2及酚型—OH处于未离解状态，在氯仿中溶解性最好。据此，我们设计先在pH3的条件下用氯仿萃取血浆中的杂质成份，这时EPI绝大部份留在水溶液中，然后调节pH至8，用氯仿再次萃取水溶液中的EPI。结果表明，这种处理方法既可使EPI与血浆中的杂质成份很好分离，又保证了EPI有较高的回收率。对于ADM，也有类似的萃取规律。

3. 工作曲线与方法的灵敏度、回收率

分别取1ml不同浓度的EPI标准溶液，各加入内标溶液1μg/ml ADM 0.1ml，然后按前述方法进行提取和测定。结果，EPI峰面积与ADM峰面积之比同EPI含量与ADM含量之比两比值间线性关系良好。线性回归方程式为：$C_{EPI}/C_{ADM}=-0.028+0.379A_{EPI}/A_{ADM}$，$\gamma=0.998$。式中，A为峰面积，$C_{EPI}$和$C_{ADM}$分别为1ml样品中EPI的含量(ng)和加入ADM的量(ng)。线性范围为10—300ng EPI/ml。在讯噪比为2时，最低检测限为2ng/ml。

回收率：在空白血浆中加入EPI使其含量为100ng/ml，然后进行提取和测定，求得回收率平均为80% ($n=5$)。

4. 应用

以本方法对用EPI进行治疗的肝癌患者的血药浓度进行了测定，结果满意。图2 为经门静脉注射EPI给药的肝癌患者，采血测定所得的色谱图。此样品用内标法测得EPI的含量为90ng/ml血浆。

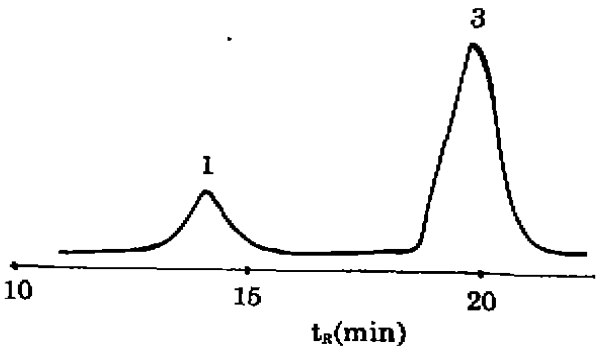


图2 用EPI治疗的患者血药浓度测定色谱图

色谱条件同图1。

色谱峰：1.E_2，2.EPI

参 考 文 献

1 Patricia E.Decsen,et al. Drug Metab.Dispos.1984;12(1):9

2 P.A.Macssen,et al.J.chromatogr. 1988;424:103

(收稿日期 1993-11-17)

THE DETERMINATION OF EPIRUBICIN AND ITS METABOLITES BY HIGHPERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Li Huizhi, et al

Dept.of Chemistry

Adriamycin, epirubicin and its four metabolites were separated by reverse phase high-performance liquid chromatography on a Zorbax C-8 column and detected by fluoresence.A sensitive and specific method for determination of epirubicin in blood has been developed.Adriamycin was used as an internal standard.The detection limit of the method(difined as a singal to noise ratio of 2:1) for epirubicin was 2ng/ml.Standard curves for epirubicin were linear from 10 to 300ng/ml with $\gamma=0.998$.The method has been applied in analysis of the blood level.The recoveries were 80%.

KEY WORDS Epirubicin;Metabolites; High-performance liquid chromatography