

奥替拉西钾血药和尿药浓度的测定及其药代动力学和药物蓄积性评价

储妍, 丁黎*, 刘荷英, 于勇, 朱贺, 孙鲁宁

(中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

摘要 本实验建立了人血浆及尿液中奥替拉西钾(potassium oxonate, Oxo)的 LC-MS/MS 测定方法, 研究单次及多次给药替吉奥胶囊(S-1)后, Oxo 在晚期胃癌患者体内的药代动力学特征, 并评价多次给药后 Oxo 在人体内的药物蓄积情况。12 名晚期胃癌患者分别按体表面积(BSA)口服 S-1: 单次给药, 受试者于早餐后给药 60 mg; 多次给药, 连续 28 d, 每天 2 次, 于早餐后给药 60 mg; 晚餐后给药 60 mg ($BSA \geq 1.5 \text{ m}^2$) 或 40 mg ($1.25 \text{ m}^2 < BSA < 1.5 \text{ m}^2$)。采用 LC-MS/MS 法分别测定血浆及尿液中 Oxo 药物浓度, 计算其药代动力学参数, 评价其药代动力学特征和药物蓄积现象。血浆及尿液中 Oxo 测定的线性范围为分别为 2~400 ng/mL, 0.02~10 $\mu\text{g/mL}$ 。单次给药后 c_{max} 为 $(110.5 \pm 100.8) \text{ ng/mL}$, $t_{1/2}$ 为 $(3.4 \pm 1.4) \text{ h}$, t_{max} 为 $(2.2 \pm 0.7) \text{ h}$, 36 h 内有 $(1.7 \pm 1.2)\%$ 的 Oxo 以原型方式从尿中排出; 多次给药后, 稳态平均血药浓度 $c_{\text{ss-av}}$ 为 $(36.89 \pm 29.35) \text{ ng/mL}$, 稳态血药浓度波动度(DF)为 2.4 ± 0.8 , 经统计分析, 多次给药 28 d 后 Oxo 在胃癌患者体内药代动力学特征与单次给药相比并未发生变化, 多次给药后未产生药物蓄积现象。与文献数据对照, Oxo 在中国晚期胃癌患者与国外患者体内的药代动力学参数基本一致。

关键词 奥替拉西钾; 药代动力学; 药物蓄积评价; 固相萃取; LC-MS/MS; 替吉奥胶囊

中图分类号 R917; R969.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)05-0436-07

Determination of potassium oxonate in human plasma and urine and its pharmacokinetics and accumulation evaluation in human

CHU Yan, DING Li*, LIU He-ying, YU Yong, ZHU He, SUN Lu-ning

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract An LC-MS/MS method was established for the determination of potassium oxonate (Oxo) in human plasma and urine, the pharmacokinetics of Oxo was investigated in advanced gastric cancer patients after single and multiple administration of tegafur, gimeracil and oteracil potassium capsule (S-1), and the situation of drug accumulation after multiple administration was evaluated. For multiple administration, 12 gastric cancer patients were treated with S-1 according to the body surface area (BSA) as follows: for single administration, patients were treated with 60 mg S-1 after breakfast; for 28-day consecutive administration, a dose of 60 mg S-1 was treated after breakfast, and the dose of 60 mg after supper for $BSA \geq 1.5 \text{ m}^2$ or 40 mg for $1.25 \text{ m}^2 < BSA < 1.5 \text{ m}^2$ respectively. Then the Oxo concentration in human plasma and urine was determined, and the pharmacokinetic characteristics and drug accumulation were evaluated. The calibration curves of Oxo were linear over the concentration ranges of 2-400 ng/mL in plasma and 0.02-10 $\mu\text{g/mL}$ in urine. After single-dose administration of S-1, $(1.7 \pm 1.2)\%$ of Oxo was excreted in the form of prototype in urine within 36 h. The main pharmacokinetic parameters were as follows: the c_{max} was $(110.5 \pm 100.8) \text{ ng/mL}$, $t_{1/2}$ was $(3.4 \pm 1.4) \text{ h}$, t_{max} was $(2.2 \pm 0.7) \text{ h}$, respectively. For the multiple administration, the $c_{\text{ss-av}}$ and degree of fluctuation (DF) of Oxo were $(110.8 \pm 108.0) \text{ ng/mL}$ and 2.4 ± 0.8 , respectively. In the 28-day consecutive regimen, no significant change in pharmacokinetic characteristics or drug accumulation of Oxo was observed, the safety of that multiple administration of S-1 in clinical application was confirmed. Compared with the data in literatures, the main pharmacokinetic parameters of Oxo in Chinese patients proved to be similar with those in other races.

Key words potassium oxonate; pharmacokinetics; accumulation evaluation; solid phase extraction; LC-MS/MS; tegafur, gimeracil and oteracil potassium capsule

自20世纪60年代以来,5-氟尿嘧啶(5-FU)一直是治疗胃肠道恶性肿瘤的基础药物,但该药存在恶心呕吐、食欲减退及腹泻等胃肠道不良反应。替吉奥胶囊(S-1)是由5-FU的前体药物替加氟(tegafur, FT)和吉美嘧啶(gimeracil, CDHP)、奥替拉西钾(potassium oxonate, Oxo, 结构见图1)组成的复方制剂。与传统的5-FU制剂相比, Oxo能特异性抑制胃肠道黏膜细胞内乳清酸核糖转移酶,从而抑制5-FU在胃肠组织内磷酸化,进而使S-1药毒性明显降低^[1-4]。邹卉瑜等^[5]对单剂量给药S-1后中国癌症患者体内Oxo的药代动力学特性进行了评价,但对多次给药后的药代动力学研究未见报道。此外, Oxo在中国人体内的尿液排泄特征也未见文献报道。研究中国胃癌患者多次给药S-1后Oxo的稳态血药浓度水平、血药浓度波动度、药物体内蓄积情况及尿液排泄情况等药代动力学特征,对于临床安全用药具有十分重要的意义。

Oxo作为一种极性小分子嘧啶类药物,具有色谱保留弱,质谱响应低,介质效应高、稳定性差等特点,这类物质在生物样本中的测定通常比较困难。目前Oxo的尿药浓度及血药浓度测定方法主要采用酶联免疫法^[6]和柱前衍生化结合气相色谱-质谱联用法^[7]或柱前衍生化液相色谱-质谱联用法^[8],但其灵敏度低、操作繁琐费时、引入误差的可能性加大以及衍生化试剂毒性等问题。本实验对Oxo生物样本进行固相萃取后,样品得到纯化,LC-MS/MS分析的介质效应得以消除且检测本底大大降低,从而提高了质谱检测灵敏度,随后仅采用一步脱羧反应处理样品,简化了样品前处理过程,建立的LC-MS/MS法较为简单、灵敏、稳定。同时,应用建立的分析方法对单次及多次给药后Oxo在中国晚期胃癌患者体内的药代动力学特征进行研究,评价多次给药后Oxo在人体内的药物蓄积情况,并与国外文献^[9-11]报道的其他人种癌症患者体内的药代动力学参数进行比较,为临床安全用药提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

替吉奥胶囊(上海旭东海普药业有限公司,批

号:20080923,规格:每粒含FT 20 mg、CDHP 5.8 mg、Oxo 19.6 mg); Oxo标准品(东京化成工业株式会社,纯度大于98%);邻苯二甲酸氢钾(PAP,国药集团化学试剂有限公司);甲醇为色谱纯;其余试剂均为市售分析纯;实验用水为去离子纯净水。

1.2 仪器

Agilent 1200液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(美国Agilent公司),配有气动辅助电喷雾离子化源(ESI)、数据采集及分析软件;PHS-25型pH计(上海精密科学仪器有限公司);1612-1型高速离心机(上海医疗器械集团有限公司);固相萃取小柱(Cleanert PSA, 100 mg/mL, 美国Agela科技公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Extend C₁₈(2.1 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2%甲酸水溶液(B),梯度:0 min, 10% A; 1.3 min, 10% A; 1.6 min, 62% A; 5.6 min, 62% A; 6.0 min, 10% A; 12 min, 10% A;流速:0.3 mL/min;柱温:35 °C。

2.2 质谱条件

多反应离子监测(MRM);气动辅助电喷雾离子化(ESI);监测对象:Oxo脱羧产物 m/z 114.0 → m/z 46.2(0~3 min, 正离子模式),裂解电压90 V,碰撞能量8 eV;邻苯二甲酸氢钾(内标) m/z 165.0 → m/z 77.2(3~12 min, 负离子模式),裂解电压120 V,碰撞能量12 eV;干燥气流量:10 L/min;雾化室压力:344.7 kPa;干燥气温度:350 °C。

2.3 样品处理

采用固相萃取的方法对血浆及尿液样品进行前处理,于酸性条件下对Oxo进行脱羧处理(如图1所示),酸化后采用乙酸乙酯-异丙醇(85:15)提取脱羧产物5-氮尿嘧啶。

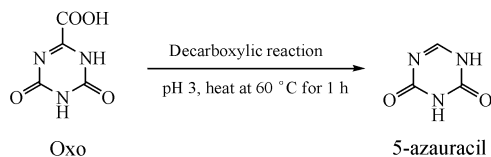


Figure 1 Decarboxylic reaction of potassium oxonate (Oxo)

具体样品前处理步骤分以下两步进行:(1)PSA离子交换固相萃取小柱纯化样品:依次以甲醇1 mL,水1 mL,10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2)1 mL 活化 PSA 离子交换固相萃取小柱;于离心管中精密加入血浆样品1 mL 或尿液样品200 μ L,内标溶液(10 μ g/mL)30 μ L 以及 Tris-HCl 缓冲液1 mL,涡旋混匀,上已活化好的 PSA 离子交换固相萃取小柱;再以 Tris-HCl 缓冲液淋洗1 mL,后用100 mmol/L 磷酸二氢钠-氢氧化钠(pH 11.0)1 mL 洗脱样品,收集洗脱液至10 mL 离心管中。(2)脱羧处理及脱羧产物的提取:于上述洗脱液中加入1 mol/L 盐酸调洗脱液 pH 至3.0,涡旋1 min,放入60 $^{\circ}$ C 水浴中反应1 h 后取出;再加入1 mol/L 盐酸200 μ L,涡旋1 min 后加乙酸乙酯-异丙醇(85:15)3 mL,涡旋、离心,取上清液以氮气吹干,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待测。测定前用水100 μ L 复溶,于16 500 r/min 离心3 min,吸取上清液转移至自动进样器样品管中,进样量5 μ L,进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 药代动力学研究

本实验严格遵守《赫尔辛基宣言》有关伦理准则,实验方案经中国医科大学第一附属医院伦理委员会审议通过,受试者自愿参加实验并签署知情同意书。12名晚期胃癌患者(男性受试者8名、女性受试者4名),体重51~73 kg,年龄36~72岁,体表面积(BSA)1.48~1.90 m^2 ;受试者用药前体温、心率、呼吸、血压等生命体征均正常,实验前所有受试者肝功、肾功、血尿常规、心功能检查均符合实验要求。由于 Oxo 在酸性条件下不稳定^[9],在实验期间受试者于用餐0.5 h 后口服 S-1。

2.4.1 单次给药药代动力学研究 12名晚期胃癌患者,于清晨7:30 统一进食早餐,餐后0.5 h 口服 S-1 60 mg。在给药前及给药后0.5,1,2,3,4,6,8,10,12,14,24,48,60 h 分别采集静脉血约5 mL 于肝素抗凝试管中,分离血浆于-80 $^{\circ}$ C 保存待测。同时,收集给药前及给药后0~2,2~4,4~8,8~12,12~24,24~36,36~48 h 各时间段内所有尿液并记录尿量,然后各取10 mL 于-80 $^{\circ}$ C 保存待测。

2.4.2 多次给药药代动力学研究 12名晚期胃癌患者,在单次给药结束后,按照 BSA 口服 S-1:每天两次,于早餐后给药60 mg;晚餐后给药60 mg (BSA \geq 1.5 m^2) 或 40 mg (1.25 m^2 < BSA < 1.5 m^2),连续服药28 d。在连续给药的第6、7天

早晨给药前;第8、14天早晨给药前及给药后3 h 和晚上给药前及给药后3 h;第28天早晨给药前及给药后0.5,1,2,3,4,6,8,10,12,14,24,48,60 h 分别采集静脉血约5 mL,置肝素抗凝试管中,分离血浆于-80 $^{\circ}$ C 保存待测。

3 结果

3.1 专属性考察

在本实验所采用的色谱条件下,Oxo 的保留时间约为1.2 min,内标保留时间约为6.0 min(图2),Oxo 和内标峰形良好,具有较高的专属性。

3.2 线性范围

取离心管数支,分别精密加入适量的 Oxo 标准液,以氮气流吹干后加入空白血浆1 mL 或空白尿液200 μ L,旋涡混匀,配成含 Oxo 的浓度分别为2,8,30,80,150,250,400 ng/mL 的标准含药血浆,或浓度分别为0.02,0.08,0.3,1,3,6,10 μ g/mL 的标准含药尿液;在每支离心管中精密加入10 μ g/mL 的内标溶液30 μ L,旋涡混匀,按“2.3”项下操作并测定,分别计算 Oxo 的峰面积 A_s 与内标峰面积 A_i 的比值 $f(f=A_s/A_i)$,以峰面积比值 f 对浓度 c 作权重回归分析,血浆中典型的 Oxo 回归方程为 $f=2.705 \times 10^{-3} + 3.393 \times 10^{-3} \times c$ (权重系数 $w=1/c^2$), $r=0.9989$,尿液中典型的 Oxo 回归方程为: $f=3.762 \times 10^{-3} + 0.7676 \times c$ (权重系数 $w=1/c^2$), $r=0.9986$ 。血浆及尿液中 Oxo 分别在2~400 ng/mL,0.02~10 μ g/mL 范围内线性关系良好,最低定量限分别为2 ng/mL 和0.02 μ g/mL。

3.3 精密度与准确度实验

按标准曲线配置方法制备含 Oxo 浓度分别为5,50,350 ng/mL 的标准含药血浆及浓度为0.05,0.8,8.5 μ g/mL 的标准含药尿液,每个浓度各配制5份样品,同时各配制一条随行标准曲线,按“2.3”项操作,并进行 LC-MS/MS 分析,共测定3批样品,计算精密度(批内和批间 RSD)和准确度,结果见表1。

3.4 提取回收率实验

按标准曲线的配制方法制备 Oxo 低、中、高3种浓度的标准含药血浆样品、尿液样品及对照样品,每个浓度各配制5份样品,按“2.3”项操作。计算求得血浆及尿液中内标 PAP 提取回收率分别为(87.0 \pm 5.2)% 及(90.1 \pm 4.7)%。血浆和尿液中 Oxo 的提取回收率见表1,本实验条件下 Oxo 及

其内标 PAP 具有很高的提取效率。

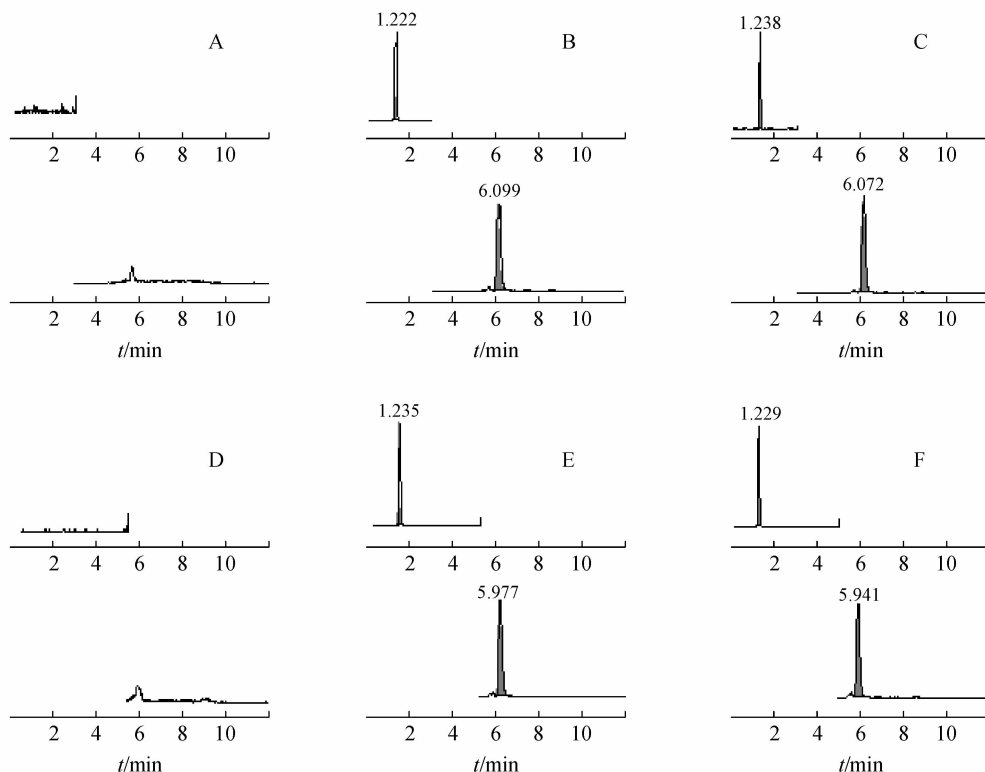


Figure 2 HPLC-MS/MS chromatograms of Oxo in human plasma and urine

A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with Oxo ($t_R = 1.2$ min) and IS (potassium biphthalate, $t_R = 6.0$ min); C: Plasma of volunteer after oral administration of tegafur, gimeracil and oteracil potassium capsule (S-1); D: Blank urine; E: Blank urine spiked with Oxo and IS; F: Urine of volunteer after oral administration of S-1

3.5 基质效应

按文献报道方法^[12-13]考察基质效应(ME),血浆及尿液中内标 PAP 的 ME 平均值分别为(101.3

± 2.0)% 和(100.9 \pm 3.5)%, 血浆和尿液中 Oxo 的 ME 见表 1, 结果表明本实验条件下 Oxo 及其内标 PAP 的测定不受基质效应干扰。

Table 1 Method validation of Oxo in human plasma and urine

Parameter	$c(\text{plasma})/(\text{ng/mL})$			$c(\text{urine})/(\mu\text{g/mL})$		
	5	50	350	0.05	0.8	8.5
Inter-day RSD/%	6.9	5.3	3.9	9.1	4.3	1.9
Intra-day RSD/%	11.7	3.6	4.7	5.8	6.2	3.9
Accuracy/%	100.6 \pm 7.1	96.3 \pm 4.9	97.8 \pm 2.7	96.1 \pm 9.3	105.2 \pm 4.1	94.4 \pm 2.1
Recovery/%	84.3 \pm 7.6	91.3 \pm 6.4	91.5 \pm 5.1	88.0 \pm 4.7	83.6 \pm 4.2	83.3 \pm 3.5
Matrix effect/%	95.2 \pm 5.0	98.4 \pm 2.4	96.8 \pm 2.4	96.4 \pm 2.4	98.8 \pm 1.4	97.2 \pm 2.9

3.6 样本稳定性考察

分别考察了 Oxo 低、中、高 3 种浓度水平的标准含药血浆及尿液样品于进样器中放置 10 h, 室温下放置 8 h, 反复冻融 3 次及 -80°C 冰冻放置 2, 4, 6 个月条件下的稳定性。结果表明 Oxo 血浆及尿液样品稳定性良好。

3.7 药代动力学研究

3.7.1 单、多次给药的药代动力学特征

12 名胃癌患者完成了单次给药的药代动力学研究。在多次给药的药代动力学研究中, 12 名癌症患者中有 3 名未按给药方案完成服药, 故多次给药药代动力学数据来自 9 名患者。12 名受试者单次口服 S-1 胶囊后测得 Oxo 的平均血药浓度-时间曲线和 9 名受试者多次口服 S-1 胶囊后第 28 天 Oxo 的平均血药浓度-时间曲线如图 3 所示, 以单次给药前为 0 h 计, 图 4 反映了胃癌患者在单次给药后(即 0.5, 1,

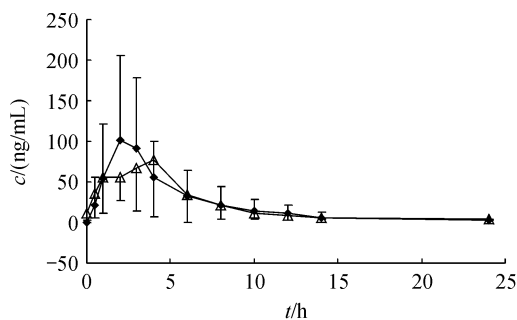
2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 48, 60 h) 及连续给药的第6天(192 h)、第7天(216 h)、第8天(240, 243, 252, 255 h)、第14天(384, 387, 396, 399 h)和第28天(720, 720.5, 721, 722, 723, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 744, 768, 780 h)测得的 Oxo 血药浓度的经时变化过程。采用 DAS 2.0 软件对单次及多次给药后受试者的血药浓度-时间数据进行处理, 所得到的药代动力学参数见表2。结果表明, 在多次给药第6天, Oxo 已达稳态血药浓度, Oxo 的稳态平均血药浓度 c_{ss-av} 为 (36.9 ± 29.4) ng/mL, 稳态血药浓度波动度 (DF) 为 2.4 ± 0.8 。利用 SPSS 11.5 软件对9名受试者多次给药后 Oxo 的药代动力学参数与12名受试者单次给药后的药代动力学参数进行 t 检验分析, 结果见表2。结果表明, 连续给药第28天 Oxo 在胃癌患者体内的主要药代动力学参数与单次给药相比较, 均无显著性差异, 该结果说明多次给药后 Oxo 在胃癌患者体内的药代动力学特征并未发生变化, 从药代动力学特征方面看连续给药28 d 不存在用药风险。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of Oxo after single and 28-day consecutive oral administration of S-1 ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Single administration ($n = 12$)	28-Days consecutive administration ($n = 9$)	P
c_{max}^a / (ng/mL)	110.5 ± 100.8	110.8 ± 108.0	0.994
c_{ss-min} / (ng/mL)	—	10.8 ± 8.5	—
t_{max} / h	2.2 ± 0.7	2.3 ± 1.3	0.805
$t_{1/2}$ / h	3.4 ± 1.4	2.9 ± 0.6	0.963
$MRT_{0-\tau}$ / h	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.6	0.902
CL/F / (L/h)	230.3 ± 208.2	194.7 ± 132.3	0.798
Vd/F / L	102.7 ± 949.9	721.8 ± 425.8	0.533
AUC^b / ($\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$)	496.2 ± 470.8	442.7 ± 352.2	0.779

^a c_{max} represents c_{max}^1 in single administration and c_{ss-max} in 28-day consecutive administration; ^b AUC represents $AUC_{0-\tau}^1$ in single administration and AUC_{ss} in 28-day consecutive administration

3.7.2 多次给药后人体药物蓄积现象评价 9名胃癌患者经连续28 d 给药后 Oxo 的单次给药血药浓度-时间曲线下面积 $AUC_{0-\tau}^1$ 、最高血药浓度 c_{max}^1 、多次给药稳态血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{ss} 、稳态最大血药浓度 c_{ss-max} 见表3。采用公式^[14]: $R_{c_{max}} = c_{ss}^{ss} / c_{max}^1$; $R_{AUC} = AUC_{ss} / AUC_{0-\tau}^1$ 计算连续28 d 多次给药后 Oxo 在9名胃癌患者体内的蓄积常数, 结果见表3。从蓄积常数的平均值来看, 多次给药后 Oxo 在受试者体内似略有蓄积 ($R_{c_{max}}$ 和 R_{AUC} 两种蓄积常数平均值均大于1), 而 SPSS 统计分析结果表明9名受试者单次给药后 Oxo 的 $AUC_{0-\tau}^1$ 、 c_{max}^1 与多次给药后 Oxo 的 AUC_{ss} 、 c_{ss-max} 并无显著性差异; 此



—◆— Single administration ($n = 12$);
—△— 28-Day consecutive administration ($n = 9$)

Figure 3 Mean plasma levels of Oxo after single and multiple oral administration of S-1 ($\bar{x} \pm s$)

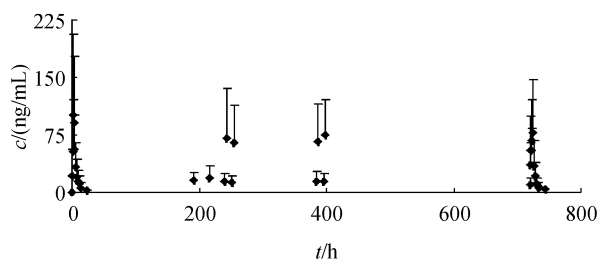


Figure 4 Mean plasma levels of Oxo after 28-day consecutive oral administration of S-1 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

外, 由表3可见胃癌患者体内 Oxo 的 $AUC_{0-\tau}^1$ 、 c_{max}^1 、 AUC_{ss} 、 c_{ss-max} 个体差异均很大。由此可以推测, 虽然本试验求得的 $R_{c_{max}}$ 和 R_{AUC} 两种蓄积常数平均值均大于1, 但该结果主要是由胃癌患者个体差异较大, 而参与实验的患者数量较少所造成, 在这种情况下仅通过计算蓄积常数平均值来推测 Oxo 在患者体内是否有蓄积是不可靠的。更加科学的评价法应该是: 在参考 $R_{c_{max}}$ 和 R_{AUC} 两个参数数值的情况下, 再结合对单次给药和多次给药的另外两对药代动力学参数 AUC_{ss} 与 $AUC_{0-\tau}^1$ 以及 c_{ss-max} 与 c_{max}^1 的差异性统计结果, 来评判药物连续多次给药后在人体内是否有蓄积现象。评判标准如下: (1) 若 AUC_{ss}

与 $AUC_{0-\tau}^1$ 的差异性评价结果是存在差异,且 R_{AUC} 大于 1,则判定药物多次给药后在人体内有蓄积现象;(2)若 AUC_{ss} 与 $AUC_{0-\tau}^1$ 以及 c_{max}^{ss} 与 c_{max}^1 的差异性评价结果是均没有差异,则直接判定药物多次给药后在人体内没有蓄积现象;(3)若 $R_{c_{max}}$ 和 R_{AUC} 均小于 1,则直接判定药物多次给药后在人体内没有蓄积现象;(4)若 AUC_{ss} 与 $AUC_{0-\tau}^1$ 的差异性评价结果是不存在差异,而 c_{max}^{ss} 与 c_{max}^1 的差异性评价结果是

存在差异,且 $R_{c_{max}}$ 和 R_{AUC} 中至少有一对参数大于 1,则无法判定药物多次给药后在人体内是否有蓄积现象,此时需要通过增加受试者例数,重新实验后评价。根据以上评判标准判定连续 28 d 多次给药后 Oxo 在中国胃癌患者体内没有产生蓄积,此结论与文献^[10-11]所报道的 Oxo 在日本、美国癌症患者体内不存在蓄积现象的结果一致。

Table 3 Accumulation constants and relative pharmacokinetic parameters of Oxo after 28-day consecutive administration of S-1 in 9 volunteers

Volunteer	$AUC_{0-\tau}^1 / (\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L})$	$AUC_{ss} / (\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L})$	$c_{max}^1 / (\text{ng}/\text{mL})$	$c_{ss-max} / (\text{ng}/\text{mL})$	R_{AUC}	$R_{c_{max}}$
B	709.4	304.8	217.9	60.78	0.44	0.28
C	88.90	133.9	33.72	29.39	1.51	0.87
D	296.0	204.4	52.12	33.53	0.71	0.64
E	175.5	298.2	33.50	91.42	1.76	2.73
F	74.17	147.6	13.15	26.76	1.99	2.04
I	1 155	1 262	330.3	366.8	1.12	1.11
L	246.6	618.7	54.47	117.3	2.51	2.15
M	363.1	466.1	66.41	91.57	1.32	1.38
N	397.8	549.4	87.82	180.1	1.42	2.05
Mean	496.1	442.7	110.5	110.8	1.39	1.47
SD	470.9	352.2	100.8	108.0	0.64	0.81

3.7.3 Oxo 尿药排泄情况 12 名受试者单次口服 S-1 后,按时间段收集尿液,测定尿液中 Oxo 的浓度,测得 Oxo 的平均尿药排泄百分率-时间曲线(图 5)。

结果表明,晚期胃癌患者单剂量口服 S-1 后有 $(1.7 \pm 1.2)\%$ 的 Oxo 以原型方式从尿中排出,4 ~ 8 h 时间段内 Oxo 尿药排泄速率最大,服药 36 h 后基本排泄完全。

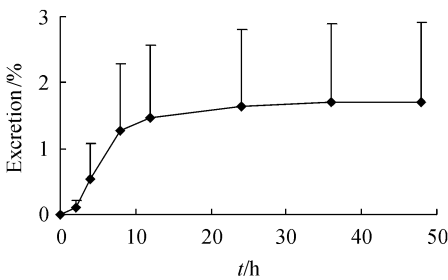


Figure 5 Urinary excretion percentage of Oxo after single oral administration of S-1 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.7.4 Oxo 在中国癌症患者与国外患者体内的主要药代动力学参数比较 已有文献报道,单次及多次给药后 Oxo 在日本、美国癌症患者体内的主要药代动力学参数无明显差异^[10-11],表 4 中列出了文献报道的单剂量口服 S-1 后血浆中 Oxo 在中国受试者^[5]以及日本、美国癌症患者^[9-11]体内的的主要药代动力学参数 t_{max} 、 c_{max} 、 $t_{1/2}$ 和 AUC 。与表 2 结果相比较,表明 Oxo 在中国晚期胃癌患者与国外患者体内的药代动力学参数基本一致。

Table 4 Main pharmacokinetic parameters of Oxo after single administration in Chinese volunteers and those in other different races reported in the literatures

Race	Single administration	$c_{max} / (\text{ng}/\text{mL})$	t_{max} / h	$AUC / (\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L})$	$t_{1/2} / \text{h}$	Literature
Chinese	50 mg ($1.48 \text{ m}^2 < \text{BSA} < 1.90 \text{ m}^2$)	77.4 ± 77.3	2.7 ± 2.6	403.7 ± 333.2	4.7 ± 2.7	[5]
American	30 mg/m ²	58 ± 60	1.8 ± 1.2	232 ± 206	2.9 ± 1.0	[9]
American	60 mg/m ²	100 ± 59	3.0	540 ± 249	3.3 ± 1.7	[10]
	40 mg ($\text{BSA} < 1.25 \text{ m}^2$)					
Japanese	50 mg ($1.25 \text{ m}^2 < \text{BSA} < 1.5 \text{ m}^2$)	78.0 ± 58.2	2.3 ± 1.1	365.7 ± 248.6	3.0 ± 1.4	[11]
	60 mg ($1.5 \text{ m}^2 < \text{BSA}$)					

4 讨论

Oxo 作为嘧啶类小分子物质亲水性较强,在离子源中易形成簇离子,导致其单一气态离子形成的产率低,在质谱中灵敏度不佳;同时,Oxo 在常规的反相色谱柱上保留较弱,峰形较差,不易与生物样品中内源性物质分开,LC-MS/MS 分析时不仅易引起介质效应,且流动相中水相比率较大导致雾化效果较差,使其质谱分析灵敏度进一步降低,因此建立一种化学衍生化方法来提高其 LC-MS/MS 灵敏度非常重要。本文采用固相萃取的方法可以提高 Oxo 的提取回收率,除去血浆及尿液中内源性物质以及 Oxo 的代谢产物 5-氮尿嘧啶^[7],从而改善峰形,减少基质效应以及代谢产物的干扰。另外,Oxo 在酸性条件下不稳定^[9],本文选择在酸性条件下对萃取出的 Oxo 在体外进行脱羧处理,由于反应产物 5-氮尿嘧啶在酸性条件下会继续分解^[7],脱羧反应条件必须严格控制,使 Oxo 完全转化成其脱羧产物 5-氮尿嘧啶(图 1),使样品的稳定性得到提高,同时样品极性降低,色谱保留能力增强,质谱灵敏度增高。

考虑到内标的色谱柱保留较 Oxo 的脱羧产物大很多,故采用梯度洗脱程序。从 0 ~ 1.3 min,流动相中的水相保持在 90% 不变,此时,Oxo 的脱羧产物已完全从色谱柱中洗脱出来;在 1.3 ~ 1.6 min,水相从 90% 迅速减小到 38%,其目的是为了提高流动相的洗脱能力,使内标尽快出峰的同时也能与其周围的干扰峰分开;此后,在 5.6 ~ 6 min 流动相中的水相比例上升到进样的起始阶段,并在 6 ~ 10 min 让该段比例的流动相在色谱柱中平衡 4 min 以便开始分析下一个样品。

12 名受试者单剂量给药 S-1 后, c_{\max}^1 和 AUC_{0-7}^1 的 RSD 分别为 91.2% 和 94.9%;9 名受试者 28 d 多次给药后, $c_{ss-\max}$ 和 AUC_{ss} 的 RSD 分别为 97.5% 和 79.6%。由此可见,Oxo 在不同患者之间存在显著性差异,在多次给药达稳态后,患者体内的 Oxo 血药浓度也有较大波动,这可能与患者的胃排空状态有关,导致胃肠道 pH 的差异^[8]。本实验中为了尽量消除这种影响,受试者于用餐半小时后口服 S-1,增加 Oxo 在体内的生物利用度,从而减轻 5-FU 磷酸化后引起的不良反应。

参考文献

[1] Kouchi Y, Maeda Y, Ohuchida A, et al. Potassium oxonate modu-

lation of 5-fluorouracil-induced myelotoxicity in murine and human colony forming assays of hematopoietic precursor cells [J]. *Toxicol Lett*, 2002, **135**(1/2): 11 - 18.

- [2] Kouchi M, Fujii M, Kanamori N, et al. Effect of gastrectomy on the pharmacokinetics of S-1, an oral fluoropyrimidine, in resectable gastric cancer patients [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007, **60**(5): 693 - 701.
- [3] Van Groeningen CJ, Peters GJ, Schornagel JH, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of oral S-1 in patients with advanced solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 2000, **18**(14): 2 772 - 2 779.
- [4] 刘荷英 (Liu HY), 储妍 (Chu Y), 于勇 (Yu Y), 等. LC-MS/MS 法同时测定人尿液中 5-氟尿嘧啶和吉美嘧啶浓度及其尿药排泄研究 [J]. *药学与临床研究 (Pharm Clin Res)* 2010, **18**(3): 256 - 259.
- [5] 邹卉瑜 (Zou HY), 陈笑艳 (Chen XY), 张逸凡 (Zhang YF), 等. 替吉奥胶囊 (S-1) 在中国癌症患者体内的药代动力学和生物等效性 [J]. *中国临床药理学杂志 (Chin J Clin Pharmacol)*, 2010, **5**(26): 349 - 354.
- [6] Kitamura R, Satoh T, Maeda M, et al. Enzyme immunoassay of potassium oxonate using specific antibody isolated by immunosorbent gel [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1994, **114**(3): 171 - 175.
- [7] Matsushima E, Yoshida K, Kitamura R, et al. Determination of S-1 (combined drug of tegafur), 5-chloro-2, 4-dihydroxypyridine and potassium oxonate and 5-fluorouracil in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 1997, **691**(1): 95 - 104.
- [8] Liu K, Zhong D, Zou H, et al. Determination of tegafur, 5-fluorouracil, gimeracil and oxonic acid in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, **52**(4): 550 - 556.
- [9] Hoff PM, Saad ED, Ajani JA, et al. Phase I study with pharmacokinetics of S-1 on an oral daily schedule for 28 days in patients with solid tumors [J]. *Clin Can Res*, 2003, **9**(1): 134 - 142.
- [10] Cohen SJ, Leichman CG, Yeslow G, et al. Phase I and pharmacokinetic study of once daily oral administration of S-1 in patients with advanced cancer [J]. *Clin Can Res*, 2002, **8**(7): 2 116 - 2 222.
- [11] Hirata K, Horikoshi N, Aiba K, et al. Pharmacokinetic study of S-1, a novel oral fluorouracil antitumor drug [J]. *Clin Can Res*, 1999, **5**(8): 2 000-2 005.
- [12] 黄荻 (Huang D), 丁莉坤 (Ding LK), 丁黎 (Ding L), 等. LC-MS 法测定人血浆中赖诺普利及其在药代动力学中的应用 [J]. *中国药科大学学报 (J China Pharm Univ)*, 2006, **37**(5): 428 - 431.
- [13] 丁莉坤 (Ding LS), 周霞 (Zhou X), 丁黎 (Ding L), 等. 甲磺斯特活性代谢物 M-1 的人体药代动力学 [J]. *中国药科大学学报 (J China Pharm Univ)*, 2007, **38**(2): 153 - 156.
- [14] Meineke I, Gleiter CH. Assessment of drug accumulation in the evaluation of pharmacokinetic data [J]. *J Clin Pharmacol*, 1998, **38**(8): 680 - 684.