

菌、肠球菌、产气荚膜梭菌数量明显增加,而乳酸杆菌和双歧杆菌明显减少,使肠道内正常菌群的平衡遭到破坏,形成菌群失调。动物还可表现为腹泻、饮食下降、体质量减轻等。肚痛健胃整肠丸由黄柏、桂皮、丁香、陈皮等组成,具有良好的止泻、镇痛等作用。现代药理实验研究表明,黄柏含小檗碱、木兰花碱、黄柏碱、巴马汀等多种生物碱,具有较强的抑菌作用;桂皮含挥发油,主成分为桂皮醛。肉桂水提物腹腔注射,可防止大鼠应激性溃疡,灌胃或腹腔注射也可抑制5-羟色胺引起的大鼠胃溃疡,不仅可以抑制胃液分泌,还可增加胃黏膜血流量。笔者在本实验中采用盐酸林可霉素制备小鼠肠道微生态失调模型,观察肚痛健胃整肠丸对肠道菌群的调节作用。结果表明,肚痛健胃整肠丸可增加肠道微生态失调小鼠体质量;增加肠道微生态失调小鼠模型乳酸杆菌、双歧杆菌数量,减少肠球菌、大肠埃希菌数量。提示肚痛健胃整肠丸具有调节肠道菌群的功效。笔者在本实验中还选择3个不同模型观察肚痛健胃整肠丸对胃黏膜的保护作用,实验结果表明肚痛健胃整肠丸可减轻乙醇和吡啶美辛性大鼠急性胃黏膜损伤,对乙酸诱发大鼠

胃溃疡亦有明显的抑制作用。说明肚痛健胃整肠丸具有保护胃黏膜作用。以上研究结果为肚痛健胃整肠丸临床用于治疗消化系统疾病提供了一定依据。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.05.013

[参考文献]

[1] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:1157-1159.
 [2] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:975-977.
 [3] 韩兆丰,陈兰羽. 痛泻要方抗实验性胃溃疡作用的实验研究[J]. 辽宁中医学院学报,2002,4(4):320-321.
 [4] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:1080-1082.
 [5] 何金木,董明国. 人参胃康片防治胃溃疡药理学研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2008,16(3):182-183.
 [6] 王瑞君,黄雪峰. 抗生素诱导的胃肠道菌群失调动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2006,16(3):146-148.
 [7] 尹军霞,林德荣. 肠道菌群与疾病[J]. 生物学通报,2004,39(3):26-28.

反相高效液相色谱法测定人血浆洛拉曲克浓度*

王广发¹,陈清霞²,刘伟忠³,张嘉杰¹

(1. 南方医科大学药学院,广州 510515;2. 中山大学附属第二医院药学部,广州 510120;3. 广州市脑科医院国家药品临床研究基地,510370)

[摘要] 目的 建立测定人血浆洛拉曲克浓度的反相高效液相色谱法。方法 以 Diamonsil™ C₁₈ 反相柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,流动相为0.03 mol·L⁻¹醋酸铵-甲醇(40:60);流速:0.8 mL·min⁻¹;柱温:40℃;检测波长:233 nm。以乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)为提取剂。结果 洛拉曲克的高、中、低(50.0, 10.0, 1.0 μg·mL⁻¹)3种浓度平均回收率分别为98.72%,97.86%,101.27%,日内、日间差RSD均<7%(n=5);分析方法的检测限为1.0 μg·mL⁻¹;线性范围为1.0~50.0 μg·mL⁻¹。标准曲线方程:Y=1.73X-5.29,r=0.9998(n=8)。结论 该方法灵敏、准确、简单、快速,可用于临床血药浓度监测和药动学研究。

[关键词] 洛拉曲克;血药浓度;色谱法,高效液相,反相

[中图分类号] R979.1;R969 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2010)05-0594-03

Concentration Determination of Nolatrexed in Human Plasma by RP-HPLC

WANG Guang-fa¹, CHEN Qin-xia², LIU Wei-zhong³, ZHANG Jia-jie¹ (1. School of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Base of Drug Clinical Study of Guangzhou Brain Hospital, Guangzhou 510370, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for determining the concentration of nolatrexed in human plasma by RP-HPLC. **Methods** The drug from plasma was analyzed in a RP-HPLC system: C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm); mobile phase consisted of 0.03 mol·L⁻¹ ammonium-methanol(40:60); the flow rate at 0.8 mL·min⁻¹; the detection wavelength at 233 nm. Ethyl acetate and dichloromethane(80:20) were used as extracting solvent. **Results** The average recoveries of nolatrexed in high, middle and low concentrations (50.0, 10.0, 1.0 μg·mL⁻¹) were 98.72%, 97.86% and

101.27%, respectively. The intra-day and inter-day variation (*RSD*) was less than 7% ($n = 5$). The calibration curve of nolatrexed showed good linearity, $r = 0.999\ 8$ ($n = 8$), over the range of 1.0-50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The regression equation was $Y = 1.73X - 5.29$. $r = 0.999\ 8$ ($n = 8$). The minimum detectable concentration of nolatrexed was 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, easy and quick, which can be used for clinical drug monitoring and pharmacokinetics studies.

KEY WORDS Nolatrexed; Plasma concentration; RP-HPLC

洛拉曲克血药浓度的检测方法国内外已有报道,均采用液相色谱-质谱(LC-MS)方法,该法成本太高,不易普及。笔者在本实验中建立了一种用乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)作为提取溶剂的高效液相色谱法,该法简单、快速,可用于测定人血浆洛拉曲克浓度^[1-9]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪[Agilent 1100,包括G1322A在线脱气机、G1315B二极管阵列紫外检测器(DAD)、G1313A自动进样器、G1311A自动调配器、G1316A可调柱温恒温箱和Agilent色谱化学工作站],涡旋混合器(上海医科大学仪器厂),电子分析天平(瑞士SARTORIUS),高速离心机(美国MICRO1224),真空干燥箱(德国MMM-GROUP),超纯水仪(法国MILLIPORE)。

1.2 试剂 盐酸洛拉曲克对照品(本实验室合成,纯度:99.8%,批号:080310,呈淡黄色粉末),内标物 β 萘酚(广州化学试剂厂,含量>98%,批号:081106),甲醇(美国迪马公司,色谱级),醋酸铵(广东台山粤侨试剂有限公司,含量>98%,批号:090206),乙酸乙酯(广州化学试剂厂,含量>99%,批号:090125)、二氯甲烷(广州化学试剂厂,含量>99%,批号:080716),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 对照品与内标溶液的制备 精密称取洛拉曲克10.0 mg,加甲醇溶解并定容至10.0 mL,置于冰箱4℃保存。临用时用甲醇稀释成所需浓度的洛拉曲克对照品溶液。配制浓度为1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ β 萘酚甲醇溶液作为工作内标液。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:美国迪马公司C₁₈钻石色谱

柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.03 mol·L⁻¹醋酸铵-甲醇(40:60);流速:0.8 mL·min⁻¹;柱温:40℃;检测波长:233 nm;灵敏度 AUFS 0.01。

2.2 样品的处理 含药血浆1.0 mL加至10 mL锥形离心管,精确加入1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标液40 μL ,快速振荡数秒。再加入乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)4.0 mL,密塞,旋转振荡2 min,于6 000 r·min⁻¹离心机内离心4 min。吸取上清液置于5 mL锥形离心管,40℃真空干燥。进样前加入甲醇100 μL 快速振荡数秒溶解残渣,吸取15 μL 进样。

2.3 标准曲线的绘制 在9个10 mL具塞锥形离心管中分别加入不同浓度、相同体积洛拉曲克对照品溶液,再加空白血浆1.0 mL,振荡数秒,使血浆药物浓度分别相当于0, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。然后按“2.2”项处理。经高效液相色谱分析,测得洛拉曲克峰面积(A_i)、内标峰面积(A_s),以 A_i/A_s 值(X)为横坐标,以血浆样品所对应各点洛拉曲克浓度(Y)为纵坐标绘制标准曲线。经最小二乘法线性回归,得洛拉曲克1.0~50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准曲线方程为: $Y = 1.73X - 5.29$, $r = 0.999\ 8$ 。当信噪比(S/N)=3时,洛拉曲克检测限可达到0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 回收率及精密度实验 取低、中、高浓度(1.0, 10.0, 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)含药血浆样品,经色谱分析,以峰面积比较,得到的相对提取回收率均>90%。同时在1 d内重复5次和1周内重复5次测定其浓度,计算日内、日间误差及方法回收率。结果表明,该方法符合生物样品分析要求,见表1。

2.5 专属性考察 在本实验条件下,空白血浆、洛拉曲克血浆样品,经高效液相色谱分析法测定,得到色谱图。对色谱图进行分析可知,洛拉曲克和内标物的色谱峰能完全分离,无明显内生杂质峰干扰,可见本方法具有较高的专属性。洛拉曲克和内标物的保留时间分别为4.416和6.665 min。

2.6 样品稳定性实验 按“2.3”项方法分别配制低、中、高浓度(2.0, 10.0, 40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)3组18个样品(双样),分别在室温(25~28℃)放置4 h和-20℃冻存24 h以及-20℃冻存1,3周后分别进行色谱测定,未见冻存样品的药物降解,结果见表2。

[收稿日期] 2009-08-21 [修回日期] 2009-11-16

[基金项目] *广州市粤港关键领域重点突破项目(基金编号:2006Z1-E6021)

[作者简介] 王广发(1974-),男,湖北仙桃人,讲师,在读博士,研究方向:临床药理学。电话:020-62789415, E-mail: wguangfa@fimmu.com。

[通讯作者] 张嘉杰(1967-),男,研究员,博士,研究方向:免疫肿瘤药理学。电话:020-61648548, E-mail: zhangjj@fimmu.com。

表 1 相对回收率与日内、日间精密度

Tab.1 Intra- and inter-day precision and recovery of nolatrexed

n = 5

加入浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内			日间			回收率/ %
	检测值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%	检测值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%	
1.0	1.02 ± 0.26	101.27	3.71	1.06 ± 0.21	103.82	4.37	101.25 ± 4.65
10.0	9.98 ± 1.12	97.86	4.02	9.96 ± 1.14	98.71	5.34	99.88 ± 4.42
50.0	48.93 ± 4.54	98.72	3.53	47.62 ± 4.16	97.46	5.49	98.32 ± 3.17

表 2 洛拉曲克在人血浆中的稳定性

Tab.2 Stability test of nolatrexed

n = 5

加入浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	室温稳定性		冻融稳定性		长期稳定性	
	检测值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%	检测值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%	检测值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%
2.0	2.06 ± 0.12	5.83	2.03 ± 0.14	6.90	2.02 ± 0.11	5.45
10.0	9.97 ± 0.63	6.32	9.96 ± 0.66	6.63	9.98 ± 0.64	6.41
40.0	39.95 ± 2.65	6.63	39.21 ± 2.42	6.17	39.53 ± 2.32	5.87

2.7 样品的质量控制 按“2.3”项方法分别配制低、中、高浓度(2.0, 10.0, 40.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)36 份血浆样品(一式 12 份)置于 -20 °C 冻存备用,此为质控样品。每次检测血样时同时检测质控样品,如果相对回收率均落在 85% ~ 115%,即可认为仪器检测正常,否则须检查整个操作过程以及仪器原因。

3 讨论

笔者在本实验中采用高效液相色谱法,具有操作简单、成本低、精密度和回收率高等特点,结果可靠,适用于化学药物分析和临床药动力学研究。另外在实验过程中笔者曾分别使用乙醚、正己烷、乙酸乙酯和三氯甲烷为提取剂,提取率均未达到要求。而且单采用乙酸乙酯提取时血浆容易出现乳化,后发现乙酸乙酯与二氯甲烷(80 : 20)作提取剂,提取率最高,且避免了血浆乳化。采用此混合提取剂一次提取,后用甲醇定容进行紫外色谱分析,所取血浆仅为 1.0 mL,进样量 15 μL 便达到实验要求,既提高了灵敏度又减少了样品杂质,保证色谱柱能进行大量样品的连续分析。

[DOI] 10.3870/yddb.2010.05.014

[参考文献]

[1] GANGJEE A, JAIN H D, KURUP S. Recent advances in classical and non-classical antifolates as antitumor and antiopportunistic infection agents: Part II [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(2): 205 - 231.

[2] 李亦蕾, 吴曙光. 洛拉曲克对 3 株肿瘤细胞胸苷酸合成酶 mRNA 水平的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2005, 40(24): 1900 - 1903.

[3] MCGUIREL J J, GANESTRARI J G, NAGEL G S. Characterization of the effect of AG337, a novel lipophilic

thymidylate synthase inhibitor, on human head and neck and human leukemia cell lines [J]. *Int J Oncol*, 1999, 15(6): 1245 - 1250.

[4] 赵爱国, 吴曙光. 盐酸洛拉曲克在荷 S180 肉瘤小鼠组织中的分布及对体外培养肝癌细胞株的作用[J]. *肿瘤防治杂志*, 2004, 11(1): 11 - 14.

[5] 赵爱国, 刘叔文, 徐继红, 等. 洛拉曲克在体内外对 SRS-82 细胞株的抗增殖作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23(8): 489 - 492.

[6] LONGO G S, IZZO J, GORLI C K, et al. Characterization and drug sensitivity of four newly established colon adenocarcinoma cell lines to antifolate inhibitors of thymidylate synthase [J]. *Oncol Res*, 2000, 12(8): 309 - 314.

[7] ESTLIN E J, PINKERTON C, LEWIS I J, et al. A phase I study of nolatrexed chloride in children, with advanced cancer [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(1): 11 - 18.

[8] MOK T S, LEUNG T W, LEE S D, et al. A multi-centre randomized phase II study of nolatrexed versus doxorubicin in treatment of Chinese patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999, 44(4): 307 - 311.

[9] 王广发, 张俊艳, 吴少瑜, 等. 盐酸洛拉曲克在小鼠体内的血药浓度和生物利用度测定[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(11): 1993 - 1995.

[10] RAFI I, BODDY A V, CALVETE J A, et al. Preclinical and phase I clinical studies with the nonclassical antifolate thymidylate synthase inhibitor nolatrexed dihydrochloride given by prolonged administration in patients with solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(3): 1131 - 1141.