

# 两种途径给药后卡铂在雌性大鼠体内的血药浓度测定及药动学研究<sup>Δ</sup>

穆薇<sup>1\*</sup>, 闵婕<sup>2</sup>, 李诗草<sup>1</sup>, 闫涛<sup>1</sup>, 赵军<sup>1</sup>, 张旻<sup>1</sup>, 刘琳娜<sup>1#</sup>(1.第四军医大学唐都医院药剂科, 西安 710038; 2.第四军医大学唐都医院肿瘤科, 西安 710038)

中图分类号 R965.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)22-3087-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.22.17

**摘要** 目的:建立测定卡铂血药浓度的方法,并研究iv与ip给药后卡铂在雌性大鼠体内的药动学。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent TC-C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-水(5:95, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为229 nm,柱温为25 ℃,内标为5-溴尿嘧啶,进样量为20 μL。24只SD大鼠随机分为4组,每组6只,分别iv、ip卡铂20、40 mg/kg。分别于给药前及给药后0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12 h经眼眶取血0.5 mL,测定卡铂的血药浓度,采用DAS 2.0药动学软件计算药动学参数。结果:血浆中卡铂质量浓度线性范围为0.30~60.00 μg/mL( $r=0.999$ ),日内、日间精密度的RSD均小于10%( $n=5$ ),稳定性试验峰面积的RSD<10%( $n=5$ ),方法回收率为98.7%~102.4%( $RSD\leq 6.08\%$ ,  $n=5$ ),提取回收率为83.38%~85.45%( $RSD\leq 5.97\%$ ,  $n=5$ )。雌性大鼠iv卡铂20、40 mg/kg和ip卡铂20、40 mg/kg后的AUC<sub>0-12h</sub>分别为(15.503±4.172)、(23.402±4.266)、(6.716±2.306)、(9.384±2.205) μg·h/mL, AUC<sub>0-∞</sub>分别为(16.424±4.846)、(23.404±4.266)、(6.790±2.378)、(9.765±2.095) μg·h/mL,  $t_{1/2\alpha}$ 分别为(1.246±0.765)、(0.394±0.058)、(0.513±0.156)、(0.884±0.460)h,  $t_{max}$ 分别为(0.700±0.274)、(0.400±0.335)、(0.542±0.368)、(0.833±0.289)h。结论:该方法简便、经济、准确,内标适宜,可用于卡铂在雌性大鼠血浆中的血药浓度测定及药动学研究。

**关键词** 卡铂;高效液相色谱法;血药浓度;大鼠;药动学

## Plasma Concentration Determination of Carboplatin by 2 Administration Routes in Female Rats *in vivo* and Study on the Pharmacokinetics

MU Wei<sup>1</sup>, MIN Jie<sup>2</sup>, LI Shicao<sup>1</sup>, YAN Tao<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, LIU Linna<sup>1</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2.Dept. of Oncology, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To establish a method for the plasma concentration determination of carboplatin, and study the pharmacokinetics of carboplatin in female rats after intravenous injection and intraperitoneal injection. **METHODS:** HPLC was performed on the column of Agilent TC-C<sub>18</sub> with mobile phase of methanol-water (5:95, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength was 229 nm, and column temperature was 25 ℃. The inner standard was 5-bromouracil, and injection volume was 20 μL. 24 SD rats were randomly divided into 4 groups, 6 in each group. The rats were intravenously injected and intraperitoneally injected carboplatin 20, 40 mg/kg respectively. 0.5 mL blood sample was taken from eyes before administration and after administration of 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h. The plasma concentration of carboplatin was determined, and DAS 2.0 was used to calculate the pharmacokinetic parameters. **RESULTS:** The linear range of carboplatin in plasma was 0.30-60.00 μg/mL ( $r=0.999$ ); RSDs of intra-day, inter-day precision were lower than 10% ( $n=5$ ); RSD of peak area in stability test was lower than 10% ( $n=5$ ); method recovery was 98.7%-102.4% ( $RSD\leq 6.08\%$ ,  $n=5$ ), and extraction recovery was 83.38%-85.45% ( $RSD\leq 5.97\%$ ,  $n=5$ ). AUC<sub>0-12h</sub> of carboplatin 20, 40 mg/kg by intravenous injection and intraperitoneal injection in female rats were (15.503±4.172), (23.402±4.266), (6.716±2.306), (9.384±2.205) μg·h/mL; AUC<sub>0-∞</sub> were (16.424±4.846), (23.404±4.266), (6.790±2.378), (9.765±2.095) μg·h/mL;  $t_{1/2\alpha}$  were (1.246±0.765), (0.394±0.058), (0.513±0.156), (0.884±0.460) h; and  $t_{max}$  were (0.700±0.274), (0.400±0.335), (0.542±0.368), (0.833±0.289) h, respectively. **CONCLUSIONS:** The method is simple, economic and accurate, with suitable internal standard, and can be used for the plasma concentration determination of carboplatin in female rats and the pharmacokinetic studies.

**KEYWORDS** Carboplatin; HPLC; Plasma concentration; Rats; Pharmacokinetics

Δ 基金项目:唐都医院科技创新发展基金(No.2015LCYJ016)

\* 药师,硕士研究生。研究方向:药理学。电话:029-84777648。

E-mail:mweiV7@aliyun.com

# 通信作者:副主任药师,硕士生导师,博士。研究方向:药理学。电话:029-84777631。E-mail:liulinna@fmmu.edu.cn

卡铂作为第二代铂类广谱抗肿瘤药,与顺铂比较,具有较低的神经过毒性与肾毒性,其与紫杉醇联用是晚期卵巢癌的标准一线治疗方案<sup>[1-2]</sup>。除了传统的静脉滴注外,临床还将卡铂经腹腔热灌注用于化疗,但目前尚无

指南明确卡铂经腹腔热灌注化疗的给药剂量及剂量-疗效关系。卡铂在体内代谢模型常用二室开放模型,清除率与肾小球滤过率成正比<sup>[3]</sup>。因此,在本研究中,笔者建立测定卡铂在雌性大鼠血浆中血药浓度的方法,并分析卡铂经iv与ip给药后在大鼠体内的药动学特点,为临床开展血药浓度监测、探索剂量-疗效关系与合理用药提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200 高效液相色谱(HPLC)仪,包含G1329A 紫外检测器、G1311A 泵(美国 Agilent 公司);TGL-20MV 离心机(湖南郝西公司);CP225D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);UMV-1 多管漩涡混合器(北京优晟联合科技有限公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

### 1.2 药品与试剂

卡铂对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100322-200101,纯度:99.7%);5-溴尿嘧啶对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:1001006017,纯度:≥98.0%);甲醇为色谱纯;生理盐水(辰欣药业股份有限公司,批号:H37022337,规格:500 mL:4.5 g);其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

清洁级 SD 大鼠 24 只,♀,体质量 200~220 g,购于第四军医大学实验动物中心[合格证号:SCXK(军)2007-007]。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(5:95,V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:229 nm;柱温:25 ℃;进样量:20 μL。

### 2.2 溶液的制备

精密称取卡铂对照品 25 mg,置于 25 mL 棕色量瓶中,生理盐水溶解,定容,混匀即得质量浓度为 1.0 mg/mL 的卡铂贮备液,用生理盐水依次稀释至质量浓度为 3.0、5.0、20.0、50.0、200.0、400.0、600.0 μg/mL 的标准曲线工作液。精密称取 5-溴尿嘧啶对照品(内标)10 mg,置于 25 mL 棕色量瓶中,生理盐水溶解,定容,混匀即得质量浓度为 0.40 mg/mL 的内标贮备液,用时稀释为质量浓度为 50.0 μg/mL 的内标工作液。贮备液与工作液均置于 4 ℃冰箱中保存,备用。

### 2.3 样品处理

精密吸取肝素抗凝血浆样品 200 μL,加入 20 μL 内标工作液,混匀后加入 800 μL 甲醇沉淀,涡旋(3 000 r/min,下同)3 min 后于 4 ℃离心(离心半径为 8.30 cm,

12 000 r/min,下同)10 min。取上清液至 2 mL 的 EP 管中,氮气(N<sub>2</sub>)吹干,加入超纯水 200 μL 复溶,涡旋 3 min 后于 4 ℃离心 10 min,取上清液,进样测定。

### 2.4 系统适用性试验

取空白血浆、卡铂+(内标)+生理盐水、血浆样品(经“2.3”项下方法处理)和给药后血浆样品(经“2.3”项下方法处理),按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,卡铂和内标(5-溴尿嘧啶)均有较高的灵敏度与分离度。卡铂与内标的保留时间为 6.27、14.23 min,分离度均大于 2,色谱图见图 1。

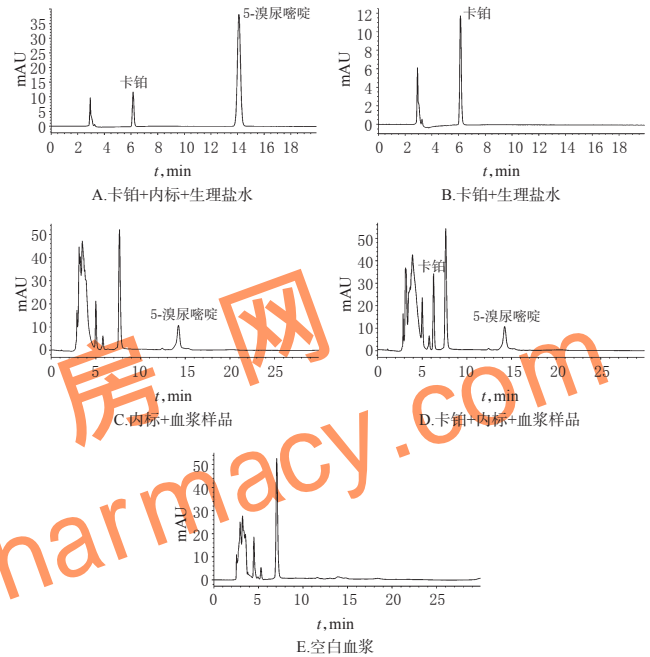


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.5 回归方程与线性范围

精密吸取空白血浆 180 μL,加入卡铂工作液 20 μL,制成卡铂血药浓度为 0.3、0.5、2.5、20、40、60 μg/mL 的标准曲线血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以卡铂血药浓度(μg/mL)为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。结果,回归方程为  $y=0.059x+0.0594$  ( $r=0.9991$ ),表明卡铂血药浓度在 0.3~60 μg/mL 范围内线性关系良好。

### 2.6 检测限与定量下限

取“2.5”项下 0.3 μg/mL 标准曲线血浆样品,逐步稀释,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定 6 次。结果,卡铂在大鼠血浆中的检测限为 0.2 μg/mL (信噪比为 3)、定量下限为 0.3 μg/mL (信噪比为 10)。

### 2.7 精密度试验

精密吸取空白血浆 180 μL,分别加入卡铂工作液 20 μL,制成含卡铂低、中、高质量浓度(0.5、5、40 μg/mL)的血浆质控样品,各 5 份,日内连续进样 3 次,连续进样

3 d。结果,日内精密度试验的RSD分别为5.88%、3.90%、5.30% ( $n=5$ ),日间精密度试验的RSD分别为5.77%、3.54%、5.19% ( $n=5$ )。

## 2.8 稳定性试验

取“2.7”项下卡铂低、中、高质量浓度(0.5、5、40  $\mu\text{g/mL}$ )的血浆质控样品,分别考察其在25  $^{\circ}\text{C}$ 室温放置24 h、4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置7 d、-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱反复融冻3次的稳定性。结果,稳定性试验中峰面积的RSD $<10\%$  ( $n=5$ )。

## 2.9 回收率试验

取“2.7”项下卡铂低、中、高质量浓度(0.5、5、40  $\mu\text{g/mL}$ )的血浆样品各5份,依法处理并测定,得卡铂峰面积 $A_1$ 与内标峰面积 $B_1$ ,标准曲线法计算浓度,所得浓度与实际浓度的比值为方法回收率。取180  $\mu\text{L}$ 空白血浆,加入800  $\mu\text{L}$ 甲醇沉淀,离心10 min并取上清后,加入“2.2”项下低、中、高质量浓度(5.0、50.0、400.0  $\mu\text{g/mL}$ )卡铂工作液20  $\mu\text{L}$ 、内标20  $\mu\text{L}$ , $\text{N}_2$ 吹干后,超纯水复溶,离心10 min后取上清进样,得卡铂峰面积 $A_2$ 与内标峰面积 $B_2$ 。计算卡铂的提取回收率为 $A_2/A_1 \times 100\%$ ,内标的提取回收率为 $B_2/B_1 \times 100\%$ 。结果,方法回收率为98.7%~102.4%,RSD分别为6.08%、4.79%、5.17% ( $n=5$ );提取回收率为83.38%~85.45%,RSD分别为5.14%、4.43%、5.97% ( $n=5$ )。

## 2.10 药动学研究

取24只SD大鼠随机分为4组,每组6只,分别iv卡铂20、40 mg/kg(给药剂量根据临床常用给药剂量换算确定),ip卡铂20、40 mg/kg(给药剂量参考iv剂量确定)。分别于给药前及给药后0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12 h经眼眶取血0.5 mL,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定。按统计矩处理,采用DAS 2.0软件计算药动学参数,结果见表1;使用Excel软件绘制药-时曲线,结果见图2。

表1 ip与iv给药后卡铂在雌性大鼠体内的药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of carboplatin in female rats *in vivo* after intravenous injection and intraperitoneal injection ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

药动学参数	iv		ip	
	20 mg/kg	40 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
$\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	15.503 $\pm$ 4.172	23.402 $\pm$ 4.266	6.716 $\pm$ 2.306	9.384 $\pm$ 2.205
$\text{AUC}_{0-\infty}$ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	16.424 $\pm$ 4.846	23.404 $\pm$ 4.266	6.790 $\pm$ 2.378	9.765 $\pm$ 2.095
$t_{1/2}$ , h	1.246 $\pm$ 0.765	0.394 $\pm$ 0.058	0.513 $\pm$ 0.156	0.884 $\pm$ 0.460
$t_{\text{max}}$ , h	0.700 $\pm$ 0.274	0.400 $\pm$ 0.335	0.542 $\pm$ 0.368	0.833 $\pm$ 0.289
$\text{CLz}$ , $\text{L}\cdot\text{kg/h}$	1.289 $\pm$ 0.306	0.880 $\pm$ 0.177	3.265 $\pm$ 1.170	2.106 $\pm$ 0.402
$V_z$ , $\text{L/kg}$	2.085 $\pm$ 1.131	0.504 $\pm$ 0.150	2.340 $\pm$ 0.888	2.752 $\pm$ 1.721

## 3 讨论

目前,临床上已有大量试验通过考察卡铂按不同AUC给药后的药动学特点<sup>[4]</sup>或比较不同疗程的疗效,以

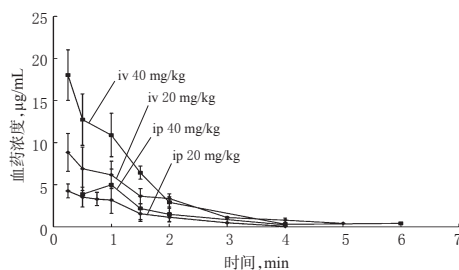


图2 ip与iv给药后卡铂在雌性大鼠体内的药-时曲线  
Fig 2 Carboplatin concentration-time curves in plasma of female rats *in vivo* after intravenous injection and intraperitoneal injection

确定卡铂iv给药的适宜剂量。而对于ip途径而言,尚缺乏探索合适给药剂量的研究。本研究数据处理采用统计矩模型,不依赖隔室模型,以比较卡铂经不同给药方式的药动学参数。结果卡铂iv给药后的AUC约为ip给药的2~3倍,而AUC在一定程度上反映全身毒性反应程度;卡铂经ip给药时血药浓度更为平稳。因此,经由动物实验可推断出ip给药的安全性可能高于iv给药。

卡铂水溶性强,采用有机溶剂萃取并不能将其分离,国外多采用固相萃取法<sup>[6]</sup>、超滤法<sup>[9]</sup>、原子吸收光谱法等测定卡铂的血药浓度,条件要求高且复杂。国内多采用HPLC法测定血清中卡铂浓度,主要有柱前衍生化法<sup>[7]</sup>、蛋白沉淀法与萃取法。由于其水溶性强,使用萃取法进行样品前处理存在困难,文献报道的使用硫酸锌沉淀蛋白、氯仿萃取的方法<sup>[8]</sup>存在乳化现象,无法很好地提取卡铂。对于蛋白沉淀法,多使用高氯酸沉淀、氢氧化钠中和的方法处理样品<sup>[9]</sup>,但使用高氯酸易损伤色谱柱,且峰形不稳、杂峰多,并对血样有稀释作用,使检测限升高。因此,笔者在本研究中比较各种方法,最后选择甲醇作为沉淀剂,样品经振荡、离心、 $\text{N}_2$ 吹干后用等量水复溶进样,该方法避免了稀释作用,经济简便。

对于内标物的选取,有文献报道使用尿苷为内标<sup>[8]</sup>。笔者经预试验发现,血样内源物质对尿苷有干扰,变动流动相比例无法使其分开。经查阅资料,尿苷是内源性物质,在空白血样色谱图相同位置出现色谱峰。由于5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶与卡铂的溶解性相似,后采用5-氟尿嘧啶与5-溴尿嘧啶为内标,在预试验中发现5-氟尿嘧啶出峰时间与待测物卡铂出峰时间相近,变更流动相比例或调节流速均无法达到合适的分离度。因此,最终笔者采用5-溴尿嘧啶这一非内源性物质,其可与待测物完全分开且可获得较高的回收率,保证了测定方法的准确性。本研究建立的HPLC法在血样处理及内标选取上与已有文献具有较大不同,该方法经济、简便,具有较好的回收率与精密度,尤其减少了其他血样处理方法的繁琐过程。以甲醇为沉淀剂,经济、简便,在操作上要注意加

入甲醇后需涡旋振荡,避免卡铂被带入沉淀中。5-溴尿嘧啶需要避光保存,质量浓度为50.0 μg/mL时,具有合适的响应值且不受内源性物质干扰,较尿苷更为适合。

有文献报道,采用SD雌性大鼠在2种剂量下比较卡铂经iv与ip给药后的药动学差异,发现在同等剂量下,ip给药后卡铂的血药浓度明显低于iv给药。而卡铂的毒性与其在血液中的总暴露量有关<sup>[10]</sup>,因此可推断卡铂经ip给药的安全性可能优于经iv给药。本实验在处理经ip给药20 mg/kg的大鼠血样数据时发现并无血药浓度上升阶段,而经ip给药40 mg/kg药时曲线上升段证明存在吸收过程,这可能是剂量不同导致的,对于ip给药的血药浓度变化趋势需要进一步研究。现有对顺铂在不同给药方式下对裸鼠卵巢癌移植瘤生长影响的比较研究<sup>[11]</sup>及不同方案对晚期卵巢癌的临床疗效对比<sup>[12-13]</sup>,可为卡铂的相关研究提供参考。

多数研究表明,增大用药剂量,卡铂 $c_{max}$ 及AUC会增大,而 $t_{1/2\alpha}$ 及 $CL_z$ 未受明显影响,本实验结果符合这一规律。卡铂的药动学参数对临床有重要的指导意义,患者对卡铂的耐受性表现出明显的个体差异<sup>[14]</sup>,这些差异与药动学参数存在相关性。因此,本实验结果表明ip卡铂的血药浓度明显低于iv给药,可能减少卡铂血液毒性,对于目前正应用于临床上的腹腔热灌注方法<sup>[15]</sup>具有参考意义。

#### 参考文献

[1] Mousavi A, Karimi-Zarchi M, Behtash N, et al. The role of intraperitoneal carboplatin as consolidation chemotherapy in women with ovarian carcinoma: report of our experience and systematic review[J]. *Int J Biomed Sci*, 2016, 12(4):120-124.

[2] Ho GY, Woodward N, Coward JI. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies[J]. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 2016, doi:10.1016/j.critrevonc.2016.03.014.

[3] Duffull SB, Robinson BA. Clinical pharmacokinetics and dose optimisation of carboplatin[J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 1997, 33(3):161-183.

[4] 杜春双, 焦建杰, 包乐纹, 等. 卡铂按不同AUC给药对晚

期卵巢上皮癌患者药动学参数的影响[J]. *中国药房*, 2013, 24(28):2637-2641.

[5] Burns RB, Embree L. Validation of high-performance liquid chromatographic assay methods for the analysis of carboplatin in plasma ultrafiltrate[J]. *J Chrom B*, 2000, 744(2):367-376.

[6] Zufia L, Aldaz A, Castellanos C, et al. Simple and rapid determination of carboplatin in plasma by high-performance liquid chromatography. Error pattern and application to clinical pharmacokinetic studies[J]. *J Chrom B*, 2001, 764(2):457-464.

[7] 李苏, 张力, 廖海, 等. HPLC法测定血浆中卡铂的AUC[J]. *中国临床药理学杂志*, 2002, 18(4):294-296.

[8] 杜春双. 卡铂联合紫杉醇对晚期卵巢癌患者的疗效和安全性评价及卡铂药动力学研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2012.

[9] 李杰, 王景萍, 周丽莉, 等. 卡铂血药浓度高效液相色谱分析[J]. *医药论坛杂志*, 2004, 25(20):23-24.

[10] Fotopoulou C. Limitations to the use of carboplatin-based therapy in advanced ovarian cancer[J]. *Euro J Can Suppl*, 2014, 12(2):13-16.

[11] Ye H, Tanenbaum LM, Na YJ, et al. Sustained, low-dose intraperitoneal cisplatin improves treatment outcome in ovarian cancer mouse models[J]. *J Control Release*, 2015, 220(Pt A):358-367.

[12] 林琳, 林安平, 傅亚均, 等. 不同化疗方案对晚期卵巢癌治疗效果的对比[J]. *实用癌症杂志*, 2016, 31(3):437-439.

[13] 范淑英, 王健, 刘芸, 等. 紫杉醇联合卡铂周疗和三周疗法治疗卵巢癌的Meta分析[J]. *解放军医学杂志*, 2016, 41(7):589-597.

[14] Cooke SL, Brenton JD. Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(12):1169-1174.

[15] 柴成梁. 腹腔热灌注化疗治疗卵巢癌有效性和安全性的系统评价[D]. 兰州: 兰州大学, 2013.

(收稿日期:2017-02-03 修回日期:2017-06-09)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅