

# 高压液相色谱法研究5-氟尿嘧啶及5-氟脱氧尿苷在不同种兔体内的药物动力学<sup>1</sup>

赵斌、赵香兰 (中山医科大学临床药理学教研室, 广州 510037)

**提要** 本文介绍的 HPLC 法操作简便, 特异性强, 可同时测定血中的 5-氟尿嘧啶及其代谢物 5-氟脱氧尿苷。用 16% 异丙醇醋酸乙酯提取, 流动相为水, 流速 2ml/min。该法已用于 5-氟尿嘧啶在新西兰种兔和普通兔体内的药物动力学研究, 两者参数比较结果, A 和  $V_1$  有极显著差异 ( $p < 0.01$ ), B 和  $K_{10}$  有显著差异 ( $p < 0.05$ ), 纯种兔的药物动力学过程较稳定。

**关键词** 5-氟尿嘧啶; 5-氟脱氧尿苷; 高压液相色谱法; 药物动力学

5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 是一种常用的抗癌药物, 在体内可生成多种代谢物, 5-氟脱氧尿苷 (5-fluoro-2'-deoxyuridine, FUdR) 是其中的一种活性代谢物<sup>(1)</sup>。国外报道的高压液相色谱法 (HPLC) 测定 5-FU 及其代谢物<sup>(2-4)</sup>, 其流动相均用缓冲液, 分析过程复杂, 不利于仪器、柱子的保养, 成本高, 测定时需血样量大, 而国内非纯种兔对药物动力学参数是否有干扰未见有报道。本文探讨一种简便检测 5-FU 及 FUdR, 取血样量少, 更适用于临床的方法, 并通过对 5-FU 和 FUdR 的研究, 提出研究药物, 特别是代谢物的药物动力学参数时对纯种兔的必要性。

## 材料与 方法

**药品与试剂** 标准品 5-FU 及 5-溴尿嘧啶 (5-bromouracil, 5-BU 作内标物) 均为上海试剂二厂产品; FUdR 为瑞士 Fluka 公司产品; 5-FU 注射剂为上海第十三制药厂产品; 醋酸乙酯、异丙醇和其它化学试剂均为 AR。试验用水为重蒸馏水 (pH 6.78-7.16)。

**动物** 新西兰兔 6 只 (广东医用动物实验场) ♀♂ 各半, 体重为  $2.88 \pm SD 0.07$  kg; 普通兔 6 只 (中山医科大学动物场), ♀♂ 各半, 体重为  $2.74 \pm 0.18$  kg。

## 仪器和测定条件

1. 仪器 日本 Waters HPLC 系统: U6 K 型进样器; 510 型泵; 490 型可变波长紫外检测器; 802 RN 100  $\mu$ l 微量注射器。XWT-264 型台式自动平衡记录仪 (上海大华仪表厂), Fisher Accumet 825 MP 型 pH 计 (Fisher Scientific Co, USA)。

2. 测定条件 色谱柱为  $\mu$  Bondapak  $C_{18}$  (3.9 mm ID  $\times$  30 cm), 流动相为水 (过滤, 0.45  $\mu$ m 膜, Millipore Co, USA), 流速 2 ml/min; 压力 70 kg/cm<sup>2</sup>; 检测波长 270 nm; 灵敏度 0.05 AUFS; 记录纸速 4 mm/min; 室温

1987年3月2日收稿 1987年11月21日接受

<sup>1</sup>国家自然科学基金资助项目 No 85-248

(22±1℃)下操作。

### 采样与制样

1. 采样 新西兰兔为一组，普通兔为一组，从耳缘静脉快速推注(30 s)5-FU(170 mg/kg)，给药前和给药后2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 60, 90和180 min从另侧耳缘静脉取血，血凝后离心分离(1600×g, 10 min)，吸取血清于试管内，密闭，置-10℃待测。

2. 标准曲线制作 取5-10 μl 5-FU和FUdR标准液，吹干，加0.1 ml兔血清，使成5-FU: 0.05-100 μg/ml血清；FUdR: 0.25-100 μg/ml血清，加入10 μl 5-BU标准液(0.1 mg/ml)，6 ml 16%异丙醇乙酸乙酯溶液，振荡15 min(KS型电动振荡器，270次/min)，离心(2500×g)5 min，取有机层，吹干，残渣用1 ml流动相溶解，过滤(0.45 μm)，进样量50-100 μl。以已知浓度作横坐标，以峰高比作纵坐标绘标准曲线。

数据分析 iv后血药浓度-时间数据在Apple II计算机上拟合，数学模型用最小AIC法识别，并进行药物动力学参数计算<sup>(6)</sup>。

## 结果

色谱行为 图1(B)显示在上述条件下5-FU, 5-BU, FUdR可得到良好的分离效果，保留时间分别为3.7, 7.4, 11.3 min。(A)显示

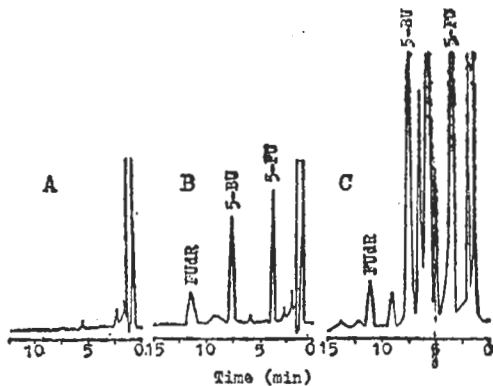


Fig 1. HPLC profile of samples prepared from 0.1-ml sera without (A) or with (B) 5-FU and FUdR at 5 μg/ml, (C) a serum sample collected from a rabbit after single iv 5-FU 170 mg/kg.

空白血清层析图谱中，对应于5-FU, 5-BU, FUdR出峰处的基线较平稳，无干扰。

### 方法评价

1. 线性关系 血清中5-FU 0.05-100 μg/ml; FUdR 0.25-100 μg/ml均具有良好的线性关系，回归方程为5-FU:  $Y = 0.1470 X + 0.2340$  ( $n = 6, r = 0.9983$ ); FUdR:  $Y = 0.04650 X + 0.04434$  ( $n = 6, r = 0.9998$ )。

2. 最低检测浓度 以基线噪音4倍计算最低检测浓度，5-FU: 25 ng/ml, FUdR: 160 ng/ml。

3. 回收率 同标准曲线制作测定，用8种溶液系统作抽提试验，不同加入量(5-100 μg/ml)的萃取回收率的平均值见表1( $n = 8$ )。本文采用16%异丙醇乙酸乙酯溶液作抽提液，以提高代谢物FUdR的检测效果。

Tab 1. Extraction of 5-FU and FUdR by various solvents from 0.1 ml serum.  $n = 8$  (8 observations in eight 0.1-ml samples of one rabbit),  $\bar{x} \pm SD$ .

Solvent	5-FU%	FUdR%
Ethyl acetate (EtAc)	78±8	60±6
5% isopropanol in EtAc	76±9	62±7
10% isopropanol in EtAc	76±7	71±5
16% isopropanol in EtAc	81±7	72±6
20% isopropanol in EtAc	82±5	70±6
25% isopropanol in ether	71±9	58±5
20% <i>n</i> -butyl alcohol in ether	65±10	42±12
20% <i>n</i> -butyl alcohol in EtAc	70±8	69±9

4. 精密度 同标准曲线制作，测定不同浓度的样品。1) 11 d内提取回收同一浓度，测定样品。CV: 5-FU为5.9% ( $0.549 \pm 0.033, n = 4, 2.5 \mu\text{g/ml}$ )和2.7% ( $3.85 \pm 0.10, n = 4, 25 \mu\text{g/ml}$ ); FUdR为2.5% ( $0.150 \pm 0.004, n = 4, 2.5 \mu\text{g/ml}$ )和1.8% ( $1.18 \pm 0.02, n = 4, 25 \mu\text{g/ml}$ )。2) 一批一浓度系列(0.05-100 μg/ml)分散在6 wk内测定结果，CV范围: 5-FU为2.0-8.7%; FUdR为1.8-8.2%，见表2。

药物动力学 兔的血药浓度测定结果显示

Tab 2. Precision of between-days.  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm SD$ 

Concn ( $\mu\text{g/ml}$ )	5-Fluorouracil		5-Fluoro-2'-deoxyuridine	
	Peak height ratio	CV%	Peak height ratio	CV%
100	$14.6\pm 0.3$	2.0	$4.66\pm 0.16$	3.4
50	$7.89\pm 0.32$	4.0	$2.41\pm 0.16$	6.7
25	$4.27\pm 0.18$	4.3	$1.26\pm 0.10$	8.2
10	$2.05\pm 0.09$	4.5	$0.517\pm 0.040$	7.8
5.0	$1.14\pm 0.06$	5.3	$0.276\pm 0.016$	5.7
2.5	$0.572\pm 0.017$	2.9	$0.151\pm 0.007$	4.7
1.0	$0.249\pm 0.017$	6.8	$0.0850\pm 0.0015$	1.8
0.50	$0.131\pm 0.011$	8.7	$0.0454\pm 0.0025$	5.6
0.25	$0.0762\pm 0.0061$	8.0	$0.0266\pm 0.0017$	6.3
0.10	$0.0482\pm 0.0017$	3.5		
0.05	$0.0248\pm 0.0022$	8.7		

血中代谢物对检测没有干扰, 另外, 在 8.7 min 处有一个估计是 5-FU 的另一代谢物峰出现, 待进一步确定。药-时曲线见图 2, 经拟合可知 5-FU 在新西兰兔和普通兔的代谢模式为二室开放模型, 6 只兔药物动力学参数的平均值见表 3, 结果加以比较。

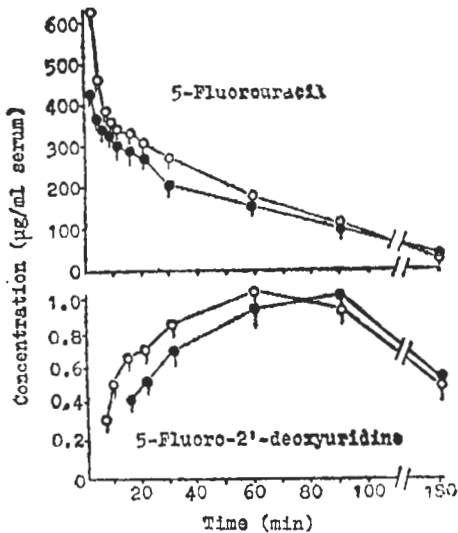


Fig 2. Serum concentration of 5-FU and FUDR in rabbits after iv 5-FU 170 mg/kg.  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm SD$ .  $\circ$  = Hybrid rabbit.  $\bullet$  = New Zealand rabbit.

## 讨 论

本法可同时测定 5-FU 及 FUDR, 与国外报道的 HPLC 法比较<sup>(2-4)</sup>具有下列优点: 1) 采用水作流动相; 2) 仅需 0.1 ml 血清; 3) 每个样本检测仅需 13 min. 而国内报道的

Tab 3. Pharmacokinetics parameters after single iv 5-FU 170 mg/kg.  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm SD$ . \* $p>0.05$ , \*\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.01$

	New Zealand rabbit	Hybrid rabbit <sup>t</sup>
A( $\mu\text{g/ml}$ )	$252\pm 142$	$900\pm 375^{***}$
B( $\mu\text{g/ml}$ )	$310\pm 58$	$406\pm 86^{**}$
$\alpha(\text{min}^{-1})$	$0.4\pm 0.3$	$0.7\pm 0.3^*$
$\beta(\text{min}^{-1}\times 10^3)$	$12\pm 3$	$15\pm 5^*$
$t_{1/2}(\text{min})$	$4\pm 4$	$1.3\pm 0.5^*$
$t_{1/2}(\text{min})$	$59\pm 14$	$53\pm 6^*$
$K_{21}(\text{min}^{-1})$	$0.21\pm 0.18$	$0.20\pm 0.04^*$
$K_{10}(\text{min}^{-1}\times 10^3)$	$22\pm 9$	$39\pm 11^{**}$
$K_{12}(\text{min}^{-1})$	$0.17\pm 0.15$	$0.38\pm 0.23^*$
$CL(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\times 10^3)$	$6.6\pm 1.2$	$5.8\pm 1.1^*$
$AUC(\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1})$	$27\pm 5$	$30\pm 6^*$
$V_1(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	$0.32\pm 0.08$	$0.16\pm 0.06^{***}$

5-FU HPLC 法<sup>(6)</sup>, 未能测出其活性代谢物 FUDR。

5-FU 进入体内后代谢较快, 在新西兰兔血清中, 6 兔均在给药后 15 min 即检出代谢物 FUDR, 第 90 min 出现峰浓度。而普通兔给药后 8 min 时, 其中 3 兔血清中可检出 FUDR, 另 3 兔分别在 15, 20 和 30 min 时血清中才检出代谢物 FUDR。同时, 峰时出现也有差异, 其中 3 兔出现于 60 min, 另 3 兔则出现于 90 min。两种兔代谢方面的差异可能是由于 5-FU 是个高度代谢性的化合物, 其代谢速率与肝脏中某些酶活力有关, 两种兔的药物动力学参数比较, 在统计学上, A 和  $V_1$  有极显著差异

( $p < 0.01$ ),  $B$  和  $K_{10}$  有显著差异 ( $p < 0.05$ )。所以, 在用动物进行药物动力学研究, 尤其是研究药物代谢方面时, 也应考虑到动物种的影响。看来纯种兔的药物动力学过程较稳定。

### 参 考 文 献

- 1 Valeriote F, Santelli G. 5-Fluorouracil. *Pharmacol Ther* 1984; 24 : 107
- 2 Buckpitt AR, Boyd MR. A sensitive method for determination of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine in human plasma by high-pressure liquid chromatography. *Anal*

*Biochem* 1980; 106 : 432

- 3 Gelijkens CF, Deleenheer AP. Reversed-phase liquid chromatography of 5-fluorouracil nucleosides and nucleotides in the presence of quaternary ammonium ions. *J Chromatogr* 1980; 194 : 305
- 4 增池健年、渡边幾代、武本宜教。生体試料中の 5-Fluorouracil とその代謝物の高速液体クロマトグラフィーによる定量法。 *薬学雑誌* 1985; 105 : 1058
- 5 彭 彬、赵香兰。静脉给药的药动学参数计算程序。 *中山医科大学学报* 1987; 8 : 55
- 6 孟 旭、陈兰英。人血浆中 5-氟尿嘧啶的高效液相色谱测定方法。 *中国临床药理学杂志* 1985; 1 : 188

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 May; 9 (3) : 275-278

## Pharmacokinetic studies on 5-fluorouracil and its metabolite in rabbits by high pressure liquid chromatography<sup>1</sup>

ZHAO Bin, ZHAO Xiang-Lan (Department of Clinical Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510037)

**ABSTRACT** A simple and specific HPLC method was developed to determine simultaneously 5-fluorouracil (5-FU) and its metabolite, 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR), in serum. 5-Bromouracil (5-BU) was added as an internal standard before extraction with 16% isopropanol in ethyl acetate. The extracts were then chromatographed using a mobile phase of water at a flow rate of 2 ml/min. Detection was made at 270 nm. The peak height ratios of 5-FU or FUdR to 5-BU were measured. After single iv

doses to rabbits, pharmacokinetic parameters were compared between 6 normal white New Zealand rabbits and 6 hybrid rabbits. The  $A$ ,  $B$ ,  $K_{10}$  and  $V_1$  values were found to be significantly different between these 2 kinds of rabbits.

**KEY WORDS** 5-fluorouracil; 5-fluoro-2'-deoxyuridine; high pressure liquid chromatography; pharmacokinetics

<sup>1</sup>Project supported by National Natural Science Foundation of China, No 85-248