

用四阶导数光谱法测定 A-OT-Fu 小鼠代谢物的血药浓度

张君仁 王唯红 庞华 程秀民 张传林

(山东医科大学, 济南 250012)

提要 本文采用四阶导数光谱测定了小鼠口服 A-OT-Fu 淀粉液后的主要代谢产物 TFu 和 5-Fu 的血药浓度-时间曲线。当 TFu 和 5-Fu 浓度为 5~50 $\mu\text{g/ml}$ 时, 浓度与 252 nm 和 289 nm 对零轴间的振幅有良好的线性关系。在本测试条件下 TFu 和 5-Fu 的回收率约 95% 以上, 实验结果表明, TFu 和 5-Fu 达到最高血药浓度的时间分别为 1 和 2 h。

关键词 A-OT-Fu; 四阶导数光谱

A-OT-Fu (1-乙酰基-3-邻-甲基苯甲酰基-5-氟尿嘧啶) 又称阿托氟尿嘧啶和癌特灵, 是国内近几年来新研制的一种高效、广谱的抗肿瘤药物⁽¹⁾, 其在体内的主要代谢产物为 TFu (3-邻-甲基苯甲酰基-5-氟尿嘧啶) 和 5-Fu (5-氟尿嘧啶)。本文采用四阶导数光谱法测定了一次给药后在不同间隔时间小鼠血清中 TFu 和 5-Fu 的血药浓度, 并绘制血药浓度-时间曲线, 获得满意结果。与色谱法⁽²⁾比较, 此法操作简单、灵敏度高, 为该药的药效研究, 临床用药、生物利用度及药代动力学参数的测定提供了参考。

实验部分

一. 药品与仪器

A-OT-Fu 及 TFu 由西安制药厂和本校药化教研室提供; 5-Fu 由济南药厂提供; 其它试剂均为分析纯。

小白鼠, 雄, 体重为 20~25 g, 由本校动物中心提供。

PU 8800 全自动紫外可见双光束分光光度计, 波长范围: 210~340 nm, 扫描速度: 10 nm/s, 谱带宽度: 2 nm, 量程: 四阶光谱为 20, 零阶光谱为 2 A, 标尺: 20 nm/cm, 响应时间: 5 s。

二. 实验方法与结果

(一) 标准储备液的配制

分别精密称取 TFu 和 5-Fu 标准品各 50 mg 加甲醇溶解并稀释至 50 ml, 即得 1 mg/ml 的 TFu 和 5-Fu 标准储备液。

(二) TFu, 5-Fu 与空白血清的光谱测定

分别用 TFu 和 5-Fu 的标准储备液稀释至适当的浓度, 按不同比例混合, 按上述测定条件, 测定 TFu, 5-Fu、两者混合物及空白血清的零阶光谱和四阶导数光谱图。结果如图 1~3 所示。

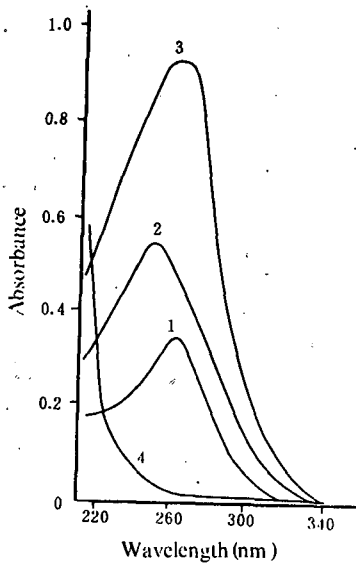


Fig 1. The zero order UV spectra. 1. 5-Fu in methanol ($9 \mu\text{g/ml}$); 2. TFu in methanol ($9 \mu\text{g/ml}$); 3. Mixture of 5-Fu and TFu in methanol (1:1); 4. Blank serum in methanol.

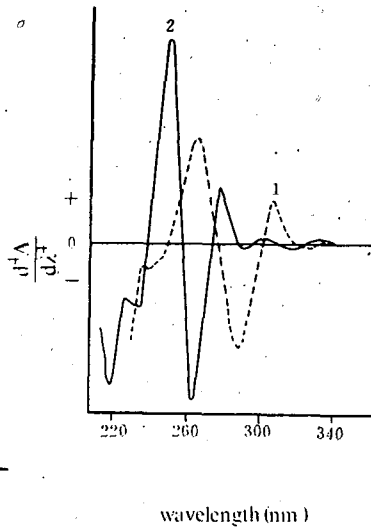


Fig 2. The 4th order derivative UV spectra. 1. 5-Fu in methanol ($9 \mu\text{g/ml}$); 2. TFu in methanol ($9 \mu\text{g/ml}$).

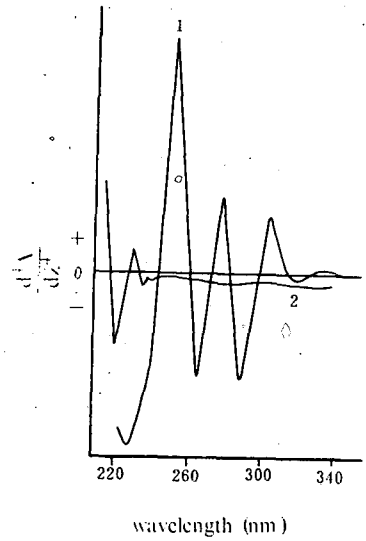


Fig 3. The 4th order derivative UV spectra. 1. Mixture of 5-Fu and TFu in methanol (1:1); 2. Blank serum in methanol.

图 1 所表明 TFu, 5-Fu, 两者混合物和按样品项下处理后的空白血清的零阶光谱, TFu 和 5-Fu 的最大吸收波长分别为 253 ± 1 和 264 ± 1 nm。图 2 表明 TFu 和 5-Fu 的四阶导数光谱。图 3 表明 TFu 和 5-Fu 按 1:1 混合物及按样品项下处理后的空白血清的四阶导数光谱, 在 252 和 289 nm 波长处各有一尖峰, 其振幅较大, 分别为 TFu 和 5-Fu 的定量信息。

(三) 空白血清中 TFu 和 5-Fu 的标准曲线

分别取小鼠空白血清 0.5 ml 置 6 个 10 ml 刻度离心管中, 依次分别精密加 0, 5, 10, 15, 20, 25 μl TFu 和 5-Fu 的标准储备液, 加水至 1 ml, 再分别加 0.1 ml 0.5 mol/L NaH_2PO_4 试液, 依次加乙酸乙酯 6 ml, 在旋涡提取器上提取 3 min, 离心静置。分别取有机层 4 ml, 在 $50 \sim 55^\circ\text{C}$ 用氮气吹干, 加 3 ml 甲醇溶解, 在 210 ~ 340 nm 波长范围内, 按上述测定条件, 以空白液校正仪器, 消除背景干扰, 然后依次测定四阶导数光谱, 在 252 和 289 nm 波长处测定对零轴的振幅 D 值, 以 D 值对浓度 $C \mu\text{g/ml}$ 进行回归处理, 得 TFu 和 5-Fu 的回归方程分别为 $D = 0.982 C - 0.3$ ($n=5, r=0.9998$) 和 $D = 0.194 C - 0.02$ ($n=5, r=0.9994$)。

(四) 回收率测定

在小鼠空白血清中, 分别加不同量 TFu 和 5-Fu 标准品, 按标准曲线项下操作测得回收率结果见表 1。

Tab 1. Recovery of TFu and 5-Fu in blank serum (n=6)

Compound	Determination	Standard added ($\mu\text{g/ml}$)	Found ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Average recovery ($\bar{X} \pm \text{SD}$ %)	CV%
	No.					
5-Fu	1.	5	4.84	96.80	98.14 \pm 1.61	1.64
	2	5	4.78	95.60		
	3	10	9.98	99.80		
	4	10	9.85	98.50		
	5	25	24.72	98.88		
	6	25	24.81	99.24		
TFu	1	10	9.34	93.40	95.68 \pm 1.77	1.85
	2	10	9.47	94.70		
	3	20	19.25	96.25		
	4	20	19.07	95.35		
	5	40	39.48	98.70		
	6	40	38.26	95.65		

(五) 样本测定

取小白鼠 30 只, 随机分为 6 组, 每组 5 只, 除空白对照组以 1.5% 淀粉液灌胃外, 其余 5 组分别按 290 mg/kg 体重的剂量, 以 A-OT-Fu 与 1.5% 淀粉混合液灌胃。在服药后 0.5, 1, 2, 4, 7 h, 分别断头取血, 离心后得血清。分别取不同时间间隔的血清 0.5 ml, 按标准曲线项下操作, 依次测定相应的 D 值 (mm 或格数), 由各自的回归方程计算出服药后不同时间间隔的血药浓度, 并绘制血药浓度—时间曲线, 结果见表 2 和图 4。表 2 中的数据是同时用 90 只小鼠, 重复三次, 共 15 个样本, 每个样本同时测定三次 (n=3), 然后取平均值。

Tab 2. Levels of TFu and 5-Fu in serum at various time after per os of A-OT-Fu (n=3) in mice

Metabolite	Time after administration (h)				
	0.5	1	2	4	7
TFu ($\mu\text{g/ml}$ serum)	43.10	46.25	22.05	8.10	5.56
	45.20	48.55	25.18	8.52	6.12
	44.94	47.87	23.21	7.86	5.32
$\bar{X} \pm \text{SD}$	44.41 \pm 1.02	47.56 \pm 1.11	23.48 \pm 1.58	8.16 \pm 0.51	5.67 \pm 0.58
5-Fu ($\mu\text{g/ml}$ serum)	17.96	19.82	21.56	13.01	5.86
	20.55	21.41	23.16	14.25	6.24
	21.21	22.60	24.92	15.64	6.75
$\bar{X} \pm \text{SD}$	19.91 \pm 1.52	21.28 \pm 1.39	23.21 \pm 1.68	14.30 \pm 1.32	6.28 \pm 0.45

讨论

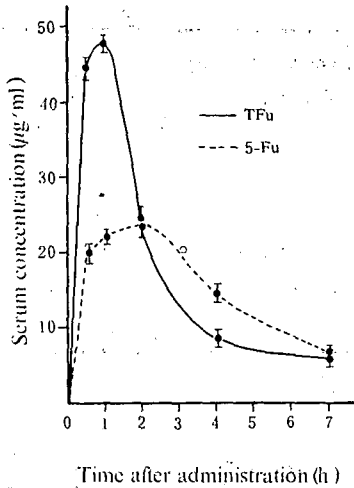


Fig4. Time curves of serum levels of metabolites (TFu and 5-Fu) in ninety mice after *per os* of A-OT-Fu.

由于TFu和5-Fu的零阶光谱最大吸收峰只相差11nm,用二阶或三阶导数光谱很难使两者分开,采用四阶导数光谱得到很好的分离,故本文设计了用四阶导数光谱法测定A-OT-Fu小鼠体内代谢物TFu和5-Fu的血药浓度-时间曲线。此法可用乙酸乙酯一次提取,蒸去溶剂,溶于甲醇的情况下同时测定两种代谢物的血药浓度。其测定结果与高效液相色谱测得达到最高血药浓度的时间和血药浓度-时间曲线的形状一致。

实验表明,在波长252和289nm处空白血清不干扰TFu和5-Fu的测定。由于PU8800分光光度计具有空白自动消除背景干扰之功能,故使本法操作简便、灵敏度高、测定速度快、数据处理简单。

生物样本的影响因素较多,故实验时小鼠的性别、体重、灌药时药物的颗粒大小及剂量、取血的方法、样本的前处理和测定条件等必须一致。

参考文献

1. 赵冰,等: 1-乙酰基-3-邻-甲基苯甲酰基-5-氟尿嘧啶的研究, 山东医科大学学报 1986; 24: 43.
2. 陈翔,等: 反相高效液相色谱法测定癧特灵在小鼠体内的主要代谢产物的血药浓度, 中国医院药学杂志 1987; 7: 294.

DETERMINATION OF TWO MAJOR METABOLITES OF A-OT-FU IN MICE SERUM BY 4TH ORDER DERIVATIVE UV SPECTROPHOTOMETRY

JR Zhang, WH Wang, H Pang, XM Cheng and CL Zhang

(Department of Pharmacy, Shandong Medical University, Jinan 250012)

ABSTRACT A 4th order derivative UV spectrophotometric method was developed for the determination of two major metabolites (TFu and 5-Fu) of A-OT-Fu in mice serum following *per os* of 290 mg/kg of the drug. TFu and 5-Fu were extracted from mice serum by ethyl acetate. The amplitudes of 252 and 289 nm for axle are linear with concentration of TFu and 5-Fu within the range of 5 ~ 50 µg/ml. Under the given experimental condition the recovery of TFu and 5-Fu were over 95%. The maximum concentration of TFu and 5-Fu appeared at 1 h and 2 h respectively after administration.

Key words A-OT-Fu; Four order derivative UV spectrophotometry