

高效液相色谱法测定腹腔热灌注化疗后腹腔液及血浆的顺铂浓度

彭雪婷¹, 李康², 袁达伟², 张鑫², 王璇², 王田田², 张琼驰², 闫融^{2*}, 潘士印^{3*}

(1. 西安交通大学医学部, 西安 710061; 2. 西安交通大学第一附属医院肿瘤外科, 西安 710061;

3. 陕西省眼科研究所, 陕西省眼科学重点实验室, 西安市第一医院, 西安 710002)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定腹腔热灌注化疗后腹腔液及血浆顺铂浓度。方法: 采用高效液相色谱法测定腹腔热灌注化疗完成后血浆和腹腔液中的顺铂浓度, 即经二乙基二硫代氨基甲酸钠络合衍生化后用流动相溶解的产物 $\text{Pt}(\text{DDTC})_2$ 的浓度。色谱柱为 Hypersil-ODS₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈 (30:70), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C。结果: 顺铂的血浆检测线性范围为 0.1~1.5 μg · mL⁻¹ ($r^2=0.9997$), 平均回收率 99.6% ($n=6$); 顺铂的腹腔液检测线性范围为 2~25 μg · mL⁻¹ ($r^2=0.9988$), 平均回收率 100.7% ($n=6$), 最低检测浓度均为 0.1 μg · mL⁻¹。利用已建立的方法, 本研究还对 5 位行腹腔热灌注化疗的患者进行了血浆及腹腔液顺铂药物浓度检测。发现腹腔热灌注化疗结束后顺铂平均吸收率 98.38%。结论: 本法是一种准确有效的检测方法, 适用于腹腔热灌注化疗后血浆及腹腔液顺铂药物浓度监测和药动学研究, 为后续设计针对化疗药物浓度监测的临床实验提供了技术基础。

关键词: 高效液相色谱法; 腹腔热灌注; 顺铂; 血药浓度; 腹腔液药物浓度

中图分类号: R 913

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2020)03-0470-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.03.10

High-performance liquid chromatography-based determination of human plasma and ascites cisplatin levels after hyperthermic intraperitoneal perfusion chemotherapy

PENG Xue-ting¹, LI Kang², YUAN Da-wei², ZHANG Xin², WANG Xuan²,
WANG Tian-tian², ZHANG Qiong-chi², YAN Rong^{2*}, PAN Shi-yin^{3*}

(1. Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, China; 2. Department of Surgical Oncology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Shaanxi Institute of Ophthalmology, Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology, Xi'an No.1 Hospital, Xi'an 710002, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC methodss for determining human plasma and ascites concentrations of cisplatin (DDP) after hyperthermic intraperitoneal perfusion chemotherapy (HIPEC). **Methods:** DDP was extracted

* 通信作者 潘士印 17709185290; E-mail: panshiyin@163.com

闫融 15929326887; E-mail: ronresearch@xjtu.edu.cn

第一作者 Tel:(029)85323265; E-mail: pengxt1995@163.com

from the human plasma and ascites DDP and reacted with sodium diethyldithiocarbamate (DDTC). The product Pt (DDTC)₂ extracted by acetonitrile ether was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) with the mobile phase of water and acetonitrile at the ratio of 30:70 and the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The separation was performed on a Hypersil-ODS₂ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with column temperature at 25 °C. The derivatives of DDP were detected at the wavelength of 254 nm. **Results:** The linear ranges of DDP were 0.1–1.5 μg·mL⁻¹ for plasma ($r^2=0.9997$) and 2–25 μg·mL⁻¹ for ascites ($r^2=0.9988$). The average recoveries of DDP were 99.6% for plasma ($n=6$) and 100.7% for ascites ($n=6$). The minimum concentration detectable was 0.1 μg·mL⁻¹. Using the established methods, plasma and peritoneal fluid concentrations of cisplatin were detected in 5 patients undergoing HIPEC. It was found that the average absorption rate of cisplatin was 98.38% after HIPEC. **Conclusion:** The method is accurate and effective for determining plasma and ascites DDP levels after HIPEC and it can be used in pharmacokinetic study and concentration monitoring of DDP. It provided a technical basis for the subsequent design of clinical trials for monitoring the concentration of DDP.

Keywords: high-performance liquid chromatography; hyperthermic intraperitoneal perfusion chemotherapy; cisplatin; plasma drug concentration; ascites drug concentration

恶性胸腹腔积液的治疗已成为肿瘤科的难题之一^[1]。腹腔热灌注化疗 (hyperthermic intraperitoneal perfusion chemotherapy, HIPEC) 作为一种新的物理治疗方法,在预防和治疗恶性肿瘤腹膜转移方面具有良好的疗效^[2]。将含有化疗药物的灌注液通过热灌注仪的精准恒温 (43 ± 0.5) °C、循环灌注、充盈到腹腔,并维持一定时间,达到治疗肿瘤腹膜种植转移,适合于胸腔、腹腔恶性积液患者。腹腔灌注化疗可促使化疗药物经毛细血管直接作用于肿瘤病灶部位,延长药物与肿瘤接触的时间,从而提高疗效。

顺铂 (cisplatin, DDP) 具有广谱抗肿瘤作用,是一种细胞周期非特异性药物。因其水溶性更好,灌注药物的选择以顺铂最为常见。有研究表明腹腔热灌注治疗可增加肿瘤细胞膜通透程度,提高肿瘤细胞内药物浓度,促进 DNA 与铂类药物结合,抑制胞内 DNA 修复^[3]。HIPEC 因个体化差异导致腹腔内药物的浓度是静脉给药血中浓度高峰的 2.5~8 倍^[4],使药物能在腹腔内长久保持高浓度,但同时增加了 DDP 不良反应如恶心、血小板减少、关节肌肉痛、肾功能不全、听力下降、心功能不全、过敏等的发生率。既往研究报道显示,DDP 在人体内的药动学参数差异较大^[5-6]。因此,通过动态监测血药浓度,以剂量-血药浓度关系来调整剂量,使血药浓度长时期维持在有效浓度范围之内,可以提高顺铂的药物治疗效果和减轻毒性作用^[7]。

本研究以 DDP 为例,介绍一种适用于临床的腹

腔液及血浆药物浓度测定方法,为监测 HIPEC 药物浓度及后续药代动力学研究提供依据。

1 仪器和器材

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪。包括 SPD-M10AVP 紫外检测器,Chromato-Solution 色谱数据工作站软件。国华 SK-1 快速混匀器;Eppendorf 5425 型台式离心机;泰斯特 DK-98-1 型电热恒温水浴锅;良平 FA2104 电子分析天平 (精度为 0.0001 g);旌派 QP-DCY-12S 水浴氮吹仪。

1.2 药物和试剂

DDP 对照品 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司,铂含量 65%);二乙基二硫代氨基甲酸铂 ((diethyldi-thiocarbamate, DDTC), Sigma 公司,含量 99%);氯化钠、氢氧化钠、甲醇、乙腈等均为国产分析纯试剂,重蒸馏水自制。

2 检测方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil-ODS₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为水-乙腈 (30:70),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 254 nm,柱温为 25 °C。

2.2 溶液配制

2.2.1 标准溶液 准确称取 DDP 对照品 10 mg,加生理盐水逐步稀释至 50 mL,制成 200 μg·mL⁻¹ 的标准溶液。

2.2.2 氢氧化钠溶液 准确称取氢氧化钠 0.06 g,加

重蒸馏水溶解并逐步稀释至 15 mL,制成 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液。

2.2.3 DDTC 溶液 准确称取 DDTC 0.04 g,加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 4 mL,制成 1% (*v/v*) DDTC 溶液,用于与血浆与腹腔液中的游离铂衍生化反应。

2.3 样品处理

采集血浆及腹腔液样本后于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中保存,分析前室温融化。

2.3.1 血浆样品 取血浆 500 μL ,置于 10.0 mL 具塞试管中,加入 500 μL 甲醇沉淀蛋白,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,沉淀蛋白。取上清 500 μL 至具塞试管中,加入新配制 1% DDTC 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 100 μL ,振摇混匀 1 min,后置于 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min 衍生化反应。水浴结束后取出冷却,此时 DDTC 与 DDP 反应形成稳定的不溶于水的 DDP 衍生物,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,弃去上清液,保留沉淀物, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴氮气吹干。后加入乙腈溶液 100 μL ,振摇混匀 1 min,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上清液 20 μL 进样 3 次。

2.3.2 腹腔液样品处理 取腹腔液 500 μL ,置于 10.0 mL 具塞试管中,加入 500 μL 甲醇沉淀蛋白,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,沉淀蛋白。取上清 500 μL 至具塞试管中,加入新配制 1% (*v/v*) DDTC 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 100 μL ,振摇混匀 1 min,后置于 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min 衍生化反应。水浴结束后取出冷却,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,弃去上清液,保留沉淀物, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水浴氮气吹干。后加入乙腈溶液 400 μL ,振摇混匀 1 min,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上清液 20 μL 进样 3 次。

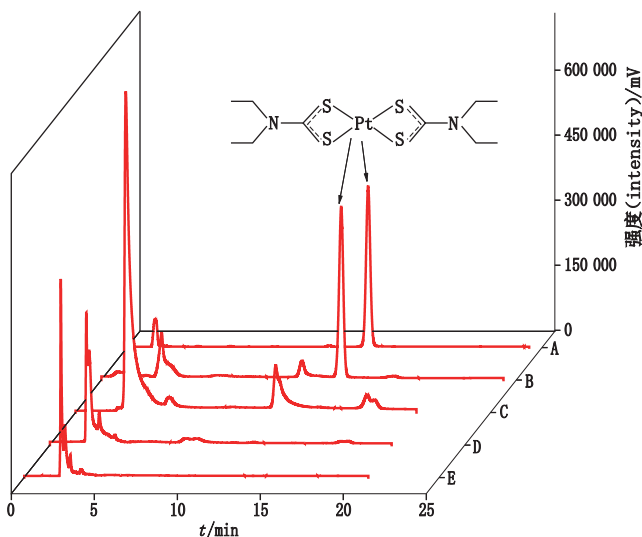
2.4 系统适应性试验

按“2.1”项下色谱条件分析样品,血浆中 DDP 的保留时间为 14.65 min,血浆内源性杂质对测定无干扰,腹腔液中 DDP 保留时间为 14.75 min,腹腔液中内源性杂质对测定无干扰。详见图 1。

2.5 线性关系考察

取“2.2.1”下标准溶液适量,分别加入生理盐水制成 0.1、0.2、0.5、0.8、1.0、1.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DDP 系列工作液 1,用于测定血浆标准曲线;同法制备 2.5、5、7.5、10、15、20、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DDP 系列工作液 2,用于测定腹腔液标准曲线。取 2 个系列工作液各 500 μL ,分别加入 1% (*v/v*) DDTC 溶液 100 μL ,按照“2.3”样品处理进行 HPLC 测定。以峰面积 *Y* 对相应

的质量浓度 *X* 进行回归,分别得到 DDP 血浆和腹腔液标准曲线:



A. 加药血浆 (plasma with DDP) B. 加药腹腔液 (ascites with DDP)
C. DDTC 的氢氧化钠溶液 (DDTC in NaOH solution) D. 空白腹腔液
(blank ascites solution) E. 空白血浆 (blank plasma)

图 1 高效液相色谱

Fig.1 HPLC

$$Y=1.349 \times 10^6 X - 2.197 \times 10^4 \quad r^2=0.9997$$

$$Y=3.207 \times 10^5 X + 4.091 \times 10^5 \quad r^2=0.9988$$

血浆 DDP 检测浓度范围在 $0.1 \sim 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,腹腔液 DDP 检测浓度范围在 $2 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之内线性关系良好,DDP 血浆及腹腔液样品定量下限均为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 精密度试验

取 1 mL 空白血浆、腹腔液各 1 份,分别加入适量 DDP 标准液配制成 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的模拟加药血浆、腹腔液样品,按“2.3”处理后,连续进样 5 次, $\text{RSD}=1.7\%$ (血浆) ($n=5$), $\text{RSD}=0.98\%$ (腹腔液) ($n=5$),结果表明,仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取 1 mL 空白血浆、腹腔液各 6 份,分别加入适量 DDP 标准液配制成 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的模拟加药血浆、腹腔液样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,测得血浆样品 DDP 平均含量为 $(20.08 \pm 0.26) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{RSD}=1.4\%$ ($n=6$);腹腔液样品 DDP 平均含量为 $(20.03 \pm 0.19) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{RSD}=1.1\%$ ($n=6$),表明试验重复性良好。

2.8 稳定性试验

取 1 mL 空白血浆、腹腔液各 15 份,每份分别加

入适量 DDP 标准液配制成 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的模拟加药血浆、腹腔液样品,按“2.3”项下方法处理后分别分为 3 组,组 A: 室温放置 1、2、4、6 h 后进行稳定性分析;组 B: $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存 24 h 后解冻进行冻融稳定性分析;组 C: 分 3 d 进样进行重复性试验。试验结果如表 1 所示,提示样品稳定性良好。

2.9 回收率试验

取 $500 \mu\text{L}$ 空白血浆和空白腹腔液各 9 份,分组 3 组,3 管为 1 组,每组分别加入适量 DDP 标准液配制成 0.2 、 0.8 、 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DDP 血浆系列工作液和 2.5 、 10 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DDP 腹腔液系列工作液,“2.3”项下方法处理。计算日内、日间的回收率及精密度,见表 2。

结果显示,血浆 DDP 平均回收率 99.6% ($n=6$), DDP 腹腔液平均回收率 100.7% ($n=6$),说明此方法对血浆及腹腔液 DDP 检测损失量小,回收率高。

表 1 DDP 血浆及腹腔液稳定性试验

Tab. 1 The unified stability tests of DDP in plasma and ascites

分组 (group)	RSD/%, ($n=5$)	
	模拟加药血浆 (DDP in simulated plasma)	模拟加药腹腔液 (DDP in simulated ascites)
A	2.3	1.8
B	2.7	2.5
C	1.6	2.4

表 2 DDP 血浆及腹腔液浓度测定回收率 ($n=3$)

Tab. 2 The precision and recoveries of DDP in plasma and ascites

样品 (sample)	加入量 (added) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测定量 (measured) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		平均回收率 (average recovery) /%		RSD/%	
		日内 (intra-day)	日间 (inter-day)	日内 (intra-day)	日间 (inter-day)	日内 (intra-day)	日间 (inter-day)
血浆 (plasma)	0.2	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	101.0	101.2	2.6	6.2
	0.8	0.78 ± 0.02	0.77 ± 0.02	97.8	96.8	2.6	2.4
	1.5	1.51 ± 0.01	1.51 ± 0.01	100.4	100.6	0.5	0.60
腹腔液 (ascites)	2.5	2.41 ± 0.02	2.40 ± 0.02	96.6	96.2	0.6	0.65
	10	10.43 ± 0.22	10.43 ± 0.14	104.3	104.3	2.1	1.3
	25	25.39 ± 0.11	25.28 ± 0.11	101.6	101.1	0.45	0.42

2.10 样品检测

利用已建立的方法,对在我院行 HIPEC 的 5 位卵巢癌或卵巢癌腹腔转移患者进行血浆及腹腔液 DDP 药物浓度检测。DDP 用量根据体表面积参照静脉化疗用量,首次灌注采用 DDP 60 mg,将化疗药溶于加有 $1\ 500\sim 4\ 000 \text{ mL}$ 生理盐水的灌注袋中混匀预热后进行灌注。灌注速度 $400 \text{ min} \cdot \text{mL}^{-1}$,灌注温度

(43 ± 0.5) $^\circ\text{C}$,灌注时间 60 min。HIPEC 开始时及结束后取腹腔液进行检测。因 DDP 在体内代谢呈双相性,半衰期 25~49 min 表示游离铂的血浆清除率^[4],故在 HIPEC 50 min 后取外周静脉血检测其药物浓度,按上述样本处理并进样分析,患者临床资料及检测结果见表 3。

表 3 患者临床资料及检测结果

Tab. 3 Patients clinical data and test results

序号 (No.)	年龄 (age)	BMI / ($\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$)	灌注量 (perfusion) / mL	灌注开始 (at the beginning of perfusion)		灌注结束 (at the end of perfusion)	
				腹腔液 DDP 浓度 (DDP concentration in ascites) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	腹腔液 DDP 浓度 (DDP concentration in ascites) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	血浆 DDP 浓度 (DDP concentration in plasma) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
1	56	21.08	6 000	10.00	0.16	0.10	
2	62	22.96	3 500	17.14	0.28	0.28	
3	58	23.65	4 000	15.00	0.25	0.19	
4	60	21.35	3 500	17.14	0.36	0.24	
5	64	22.14	5 000	12.00	0.19	0.13	

2.11 HIPEC 后不良反应监测

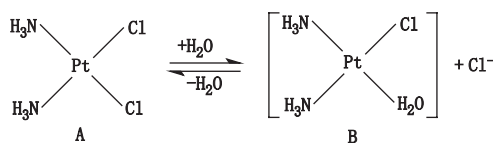
HIPEC 期间患者生命体征无明显异常,除暂时性发热、腹胀、腹痛外无其他不适。HIPEC 后复查肝肾功能未发现明显异常,一名患者出现便秘,对症处理后缓解,以上患者均未出现骨髓抑制、腹泻、恶心呕吐等不良反应;均无腹腔包裹性积液、腹腔感染、粘连性肠梗阻等并发症出现。

3 讨论

美国国家癌症研究所将恶性腹水定义为含有癌细胞的腹腔积液,是腹腔恶性肿瘤或腹腔转移瘤晚期的常见并发症。恶性腹水是晚期卵巢癌高致死率的重要原因之一^[8]。腹水所致的腹痛、腹胀、呼吸困难等症状是导致患者死亡的原因之一,如何控制和消除恶性腹水对于改善患者生活质量有着重要意义。

HIPEC 是将大容量含有化疗药的灌注液加热到一定温度,循环灌注于患者腹腔内,维持一段时间,通过热化疗的增敏作用以及灌注液的冲刷作用,有效杀灭和清除腹腔内癌细胞及微小病灶,可有效地治疗肿瘤腹腔播散和预防腹部恶性肿瘤术后复发。腹腔中区域高浓度化疗药通过直接扩散渗透,起杀灭肿瘤细胞的作用,但其穿透力有限,故主要针对 2 mm 以下的微小病灶;同时热疗中的 43 °C 控温,可直接杀灭癌细胞^[9]。

DDP 属于具有细胞毒性的细胞周期非特异性药物,通过抑制癌细胞 DNA 复制过程^[10],损伤细胞膜结构来达到广谱的抗肿瘤作用,广泛应用于 HIPEC 中的单药化疗及联合用药化疗。DDP 进入体内后广泛地与各种组织蛋白或其他成分结合,约有 90% 的总铂与血浆蛋白结合,然而 DDP 本身结合较差,只有当其转化为水合型分子之后这种蛋白结合才能广泛进行,反应过程如图 2 所示。由于 DDP 及体内代谢物和蛋白结合后则丧失其细胞毒作用,因此测定血浆中的游离总铂水平更有意义^[11]。



A. DDP B. 水合型 DDP (DDP hydrate)

图 2 生物体液中 DDP 的亲核取代反应

Fig. 2 Nucleophilic substitution of cisplatin in biological fluids

腹腔热灌注化疗作为一种新兴疗法,目前尚未有统一的治疗标准和规范,例如美国 NCCN 指南虽

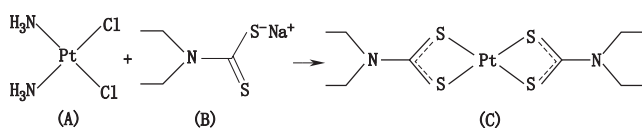
然将以 DDP 为基础的同时放化疗列为宫颈癌的标准治疗方案,但对 DDP 的用法并没有进行统一,在被其作为证据的临床试验中,既有每 3 周给药 1 次^[12],也有每周给药 1 次^[13]。灌注温度从 42 °C 至 45 °C 均有报道,灌注时间 30~120 min 不等,DDP 用于 HIPEC 时剂量为 50~80 m²·kg⁻¹,当疗程剂量在按体重 2.5 kg·mg⁻¹ 以下,骨髓抑制发生率 10%~20%,当剂量在 3 kg·mg⁻¹ 以上,发生率 40% 左右^[4]。到底哪种给药方式更好,目前并没有明确的结论。这些因素都将对 DDP 在人体内的药代动力学产生一定的影响。

目前药化动力学研究证实,由于“腹膜-血浆屏障”的作用,腹腔给药后腹腔内药物浓度明显高于外周血药浓度,且大部分化疗药经肝代谢,以无毒形式进入体循环。相比于全身静脉化疗,HIPEC 既降低外周血药物浓度,又增加局部组织药物浓度,从而降低了化疗药物的全身毒副反应,具有明显的药代动力学优势,能更好地发挥药物的局部抗肿瘤作用^[14-15]。由于灌注技术及灌注方法没有统一标准,且 DDP 用药范围较为宽泛,结论也相差较大。本研究通过对 5 例高精度 HIPEC 的卵巢癌患者进行研究,发现 HIPEC 结束后血浆的药物浓度较低,腹腔液 DDP 平均吸收率 98.38%。本实验通过建立高效液相色谱法测定 DDP 血液及腹腔液药物浓度的技术方法,为药代动力学研究提供方法学依据。

目前铂类药物浓度检测方法主要有分光光度法、荧光法、无火焰原子吸收光谱法、高效液相色谱法及以纳米粒子为载体的比色法。分光光度法操作虽简便,但由于临床中血药浓度较低,此法不宜测定,且灵敏度较低;无火焰原子吸收光谱法通过待测元素的基态原子蒸汽对其特征谱线的吸收进行定性定量分析,目前国外应用较多,但因仪器较贵,样品处理烦琐的原因,国内应用较少;纳米粒子已广泛应用于各种生物样本的检测,但由于测定方法烦琐及价格较高的原因,国内应用较少。本实验采用高效液相色谱法测定 DDP 的药物浓度,简单易操作,更易于测量微量浓度样品,适用于临床上快速检测药物浓度及药代动力学测定。

本实验不同于以往实验的关键点在于血浆及腹腔液的预处理。由于铂类物质无紫外吸收,必须利用铂的亲电性以及配基的不稳定性在生物样品中与衍化剂反应形成衍生物,最常用的衍生试剂 DDTC,

是一种金属螯合剂,它可以与铂类药物在碱性条件下形成稳定的螯合物,其螯合物在 254 nm 处有最大吸收波长,酸性环境则使反应逆向进行,其反应过程如图 3 所示。



A. DDP B. DDTC C. Pt(DDTC)₂

图 3 DDP 与 DDTC 的螯合反应

Fig. 3 Chelation of DDP with DDTC

本实验的另一个创新点在于络合物的提取。提取溶剂的选择可从极性、沸点、与水的互溶性、比重、毒性等几个方面加以考虑。由于 DDTC 络合物可溶于三氯甲烷、乙醚等有机溶剂,而不溶于乙醚等有机溶剂中的特点,故萃取剂应选择有机溶剂。Augey 采取氯仿提取^[16],但在白赛曦^[17]实验过程中发现氯仿提取较易乳化,而且有机层位于试管下层,吸取较为困难。乙醚常作为高效液相色谱法中的萃取剂^[18],但在我们预实验中发现,用乙醚做萃取剂,分层快,虽无乳化现象,但乙醚挥发较快,直接用 DDTC 络合物的乙醚溶液进样,常会出现溶剂提前挥干的现象。并且在色谱分析时,萃取剂作为溶剂会在色谱图中出现溶剂峰,可能会对络合物出峰产生一定影响。综上,乙腈相比于乙醚挥发较慢,且能溶解 DDTC 络合物,不能溶解 DDTC,在色谱分析中也不会出现溶剂峰,本实验选取乙腈作为萃取剂,通过氮吹样品后溶解的方法制备色谱分析样品。因腹腔液 DDP 浓度高于血浆 DDP 浓度,在本实验中,2.5~25 μg·mL⁻¹ 体系用 100 μL 乙腈提取存在提取不完全的问题,故增加为 400 μL。

同时,本试验用目标分析物标准品的外标法,与已报道的将样品衍生化处理,采用氯化镍作为内标的内标法定量检测^[19-20]进行了比较。虽然内标法定量在色谱分析时可以减少样品提取过程中的操作误差,但作为内标物的氯化镍与血浆中物质结合能力也很强,实际上血浆中游离的氯化镍与 DDTC 可发生衍生化反应,而这种衍生化反应产物的含量会因实验操作过程中的多种干扰因素而难以控制,也就是内标物的含量不能保持稳定,增加了检测误差,此种方法值得商榷。与内标法相比,将样品衍生化处理采用外标法定量,避免了血浆内源性杂质和外源性杂质的干扰,减少了样品处理操作步骤,缩短了样品处理时间,

相对提高了检测灵敏度,为临床检测血浆及腹腔液 DDP 药物浓度提供了方法学依据。

本实验通过建立高效液相色谱法,对首次行 HIPEC 的患者外周血及腹腔液游离铂浓度进行检测,检测步骤简便易行,准确可靠,为临床进行药代动力学检测提供新的方法学依据。但 DDP 在肾脏、肝脏及肿瘤组织等局部的吸收、分布、代谢规律,多次灌注以及两药联用时药物之间作用对药代动力学的影响,以及不同温度、不同流速、不同给药剂量、不同灌注时间对药代动力学影响等问题有待进一步的临床研究。

参考文献

- [1] 田欣,张振勇,吴丽娜,等. 洛铂腔内灌注治疗恶性胸腹腔积液的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(8): 740
TIAN X, ZHANG ZY, WU LN, *et al.* Clinical observation of lobaplatin used for intracavitary instillation on malignant pleuroperitoneal cavity hydrops[J]. *Chin Clin Oncol*, 2013, 18(8): 740
- [2] BA MC, LONG H, ZHANG XL, *et al.* Laparoscopic hyperthermic intraperitoneal perfusion chemotherapy for patients with malignant ascites secondary to unresectable gastric cancer[J]. *Laparoendosc Adv Surg Tech A*, 2016, 26(1): 32
- [3] 康欢荣,蒋建,杜楠. 腔内热灌注联合贝伐珠单抗治疗恶性胸腹腔积液的疗效观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(4): 350
KANG HR, JIANG J, DU N. Clinical observation of lobaplatin used for intracavitary instillation on malignant pleuroperitoneal cavity hydrops[J]. *Chin Clin Oncol*, 2014, 19(4): 350
- [4] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 879
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 879
- [5] LI J, CHEN R, JI M, *et al.* Cisplatin-based chronotherapy for advanced non-small cell lung cancer patients: a randomized controlled study and its pharmacokinetics analysis[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76(3): 651
- [6] GOBINDA S, CURRAN GL, SARKARIA JN, *et al.* Peptide carrier-mediated non-covalent delivery of unmodified cisplatin, methotrexate and other agents via intravenous route to the brain[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97655
- [7] 宋卫峰,王雷,蔡讯,等. 5-氟尿嘧啶血药浓度预测卡培他滨联合顺铂一线治疗晚期胃癌的疗效和安全性的单中心临床研究[J]. 肿瘤, 2013, 33(9): 795
SONG WF, WANG L, CAI X, *et al.* Single-center clinical study of 5-fluorouracil concentration predicting the efficacy and safety of capecitabine combined with cisplatin in first-line treatment of advanced gastric cancer[J]. *Tumor*, 2013, 33(9): 795
- [8] MATTE I, LANE D, BACHVAROV D, *et al.* Role of malignant ascites on human mesothelial cells and their gene expression profiles[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 288

- [9] BA MC, CUI SZ, LIN SQ, *et al.* Chemotherapy with laparoscope-assisted continuous circulatory hyperthermic intraperitoneal perfusion for malignant ascites [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16 (15): 1901
- [10] CASHIN PH, EHRSSON H, WALLIN I, *et al.* Pharmacokinetics of cisplatin during hyperthermic intraperitoneal treatment of peritoneal carcinomatosis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2013, 69 (3): 533
- [11] KARASAWA T, SIBRIAN-VAZQUEZ M, STRONGIN RM, *et al.* Identification of cisplatin-binding proteins using agarose conjugates of platinum compounds [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (6): 662
- [12] MONK BJ, SILL MW, MCMEEKIN DS, *et al.* Phase III trial of four cisplatin-containing doublet combinations in stage *ivb*, recurrent, or persistent cervical carcinoma: a gynecologic oncology group study [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27 (28): 4649
- [13] ROSE PG, ALI S, WATKINS E, *et al.* Long-term follow-up of a randomized trial comparing concurrent single agent cisplatin, cisplatin-based combination chemotherapy, or hydroxyurea during pelvic irradiation for locally advanced cervical cancer: a gynecologic oncology group study [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25 (19): 2804
- [14] BABA T, CONVERY PA, MASTUMURA N, *et al.* Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ovarian cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 28 (2): 209
- [15] KRYCZEK I, LIU S, ROH M, *et al.* Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells [J]. *Intern J Cancer*, 2012, 130 (1): 29
- [16] AUGEY V, COCIGLIO M, GALTIER M, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of cis-dichloro-diammineplatinum (II) in plasma ultrafiltrate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1995, 13 (9): 1173
- [17] 白赛曦. 胃癌腹腔热灌注化疗的药代动力学初步探讨及治疗恶性腹水的临床疗效观察 [D]. 广州: 广州医科大学, 2013
- BAI SX. Hyperthermic Intraperitoneal Perfusion Chemotherapy of Gastric Cancer: Pharmacokinetics and Clinical Efficacy in Treatment of Malignant Ascites [D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2013
- [18] 谭伟, 于晶峰, 杨晓野, 等. HPLC 法测定兔血浆中吡喹酮的不同前处理方法比较 [J]. *畜牧与兽医*, 2015, 47 (2): 81
- TAN W, YU JF, YANG XY, *et al.* Comparison of different pretreatment methods for determination of praziquantel in rabbit plasma by HPLC [J]. *Animal Husb Veter Med*, 2015, 47 (2): 81
- [19] TANG C, LI C, TANG C, *et al.* Quantitative determination of platinum derived from cisplatin in human plasma ultrafiltrate using derivatization with diethyldithiocarbamate and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2013, 5 (24): 7117
- [20] TORO C, ALFONSO, LEDEZMA GF, *et al.* Determination of liposomal cisplatin by high-performance liquid chromatography and its application in pharmacokinetic studies [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54 (6): 1016

(本文于 2019 年 12 月 5 日修改回)