

高效液相色谱法测定人血浆中异烟肼和吡嗪酰胺的浓度

赵冠人 马俊 冯端浩 (解放军第309医院药剂科 北京100091)

摘要 目的: 建立以高效液相色谱法测定人血浆中异烟肼及吡嗪酰胺浓度的方法。方法: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液: 甲醇 = 89: 11 (用三乙胺调节 pH 约为6.0) 为流动相, 柱温: 室温, 流速: 0.9 ml · min⁻¹, 检测波长为 254 nm。结果: 异烟肼的线性范围为 0.5 ~ 30 μg · ml⁻¹ ($r=0.9985$), 吡嗪酰胺线性范围为 1 ~ 50 μg · ml⁻¹ ($r=0.9980$), 平均回收率分别为 90.33%, 103.01%。结论: 本法专属性好, 样品处理方法简单, 可用于测定人血浆中异烟肼和吡嗪酰胺的浓度。

关键词 高效液相色谱; 异烟肼; 吡嗪酰胺; 血药浓度

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2012)03-0354-03

Determination of Isoniazid and Pyrazinamide in Human Plasma by HPLC

Zhao Guanren, Ma Jun, Feng Duanhao (Department of Pharmacy, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

ABSTRACT **Objective:** To determine the concentration of isoniazid and pyrazinamide in human plasma by RP-HPLC. **Method:** The HPLC method was carried out on a Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with 0.05 mol · L⁻¹ KH₂PO₄-acetonitrile (89: 11, adjusting pH to 6.0 with triethylamine) as the mobile phase. The flow rate was 0.9 ml · min⁻¹, and the column temperature was ambient with the detection wavelength of 254 nm. **Result:** The linear range of isoniazid was 0.5-30 μg · ml⁻¹ ($r=0.9984$), and that of pyrazinamide was 1-50 μg · ml⁻¹ ($r=0.9981$). The extraction recovery was 90.33% and 103.01%, respectively. **Conclusion:** The method is sensitive, simple and rapid. It can be used in the determination of isoniazid and pyrazinamide in human plasma. **KEY WORDS** HPLC; Isoniazid; Pyrazinamide; Plasma concentration

20 世纪 90 年代以来结核病在全球呈现死灰复燃之势, 据 WHO 2011 年的报告显示, 2010 年中国结核病患者数达到 150 万, 其中新发病例约 100 万, 结核病控制形势不容乐观^[1]。结核病的预防和治疗最基本的手段为针对结核分枝杆菌的联合化疗, 化疗药物的血药浓度过低则达不到结核菌的最低抑菌浓度, 甚至促进结核菌耐药的发生; 过高则可能导致胃肠道反应、肝毒性、神经毒性等不良反应, 导致中断治疗、病程延长和治疗费用的增加^[2]。因此监测抗结核药的血药浓度对于提高结核病治疗效果、减少不良反应具有十分重要的意义。异烟肼 (INH) 和吡嗪酰胺 (PZA) 作为抗结核病的一线药物在临床上应用广泛, 它们相互无交叉耐药, 且由于不同的抗菌机制和协同抗菌作用, 联合应用显著增强临床效果。但这两种抗结核药联合应用时, 受到药物性质及个体差异问题的影响, 尤其是乙酰化酶活性问题, 药动学差异较大, 监测药物浓度非常必要。文献中有不少关于异烟肼衍生物提取分离的报道^[3-5], 由于受到温度、浓度等影响, 衍生物回收率不稳定, 且重复性不好, 在实际工作中测定生物样本容易出现偏差。本研究采用直接蛋白沉淀法提取 INH 和

PZA, 以建立较稳定的测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 液相色谱仪系统 (日本岛津); Centrifuge 5417R 低温离心机 (Eppendorf); VORTEX-5 型漩涡混合仪 (贝林仪器公司); XP 105 微量分析天平 (Mettler Toledo); CyberScan PH 仪 (Eutech 公司)。

1.2 试剂

异烟肼 (中国生物制品检验所提供, 批号: 100578-200401, 含量 100%), 吡嗪酰胺 (中国生物制品检验所提供, 批号: 100178-200403, 含量 100%), 内标: 对乙酰氨基酚 (中国生物制品检验所提供, 批号: 100018-200408, 含量 100%)。

1.3 试剂

甲醇、三乙胺为色谱纯, 三氯乙酸、磷酸二氢钾为分析纯, 水为 Milli-Q 纯水机制备的超纯水。空白血浆来源于本院血库交叉配型剩余血浆及健康体检者剩余血浆。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5

基金项目: 首都临床特色应用研究, 项目编号: Z111107058811070。

通讯作者: 赵冠人 Tel: (010) 66775354 E-mail: yanliqun@sohu.com

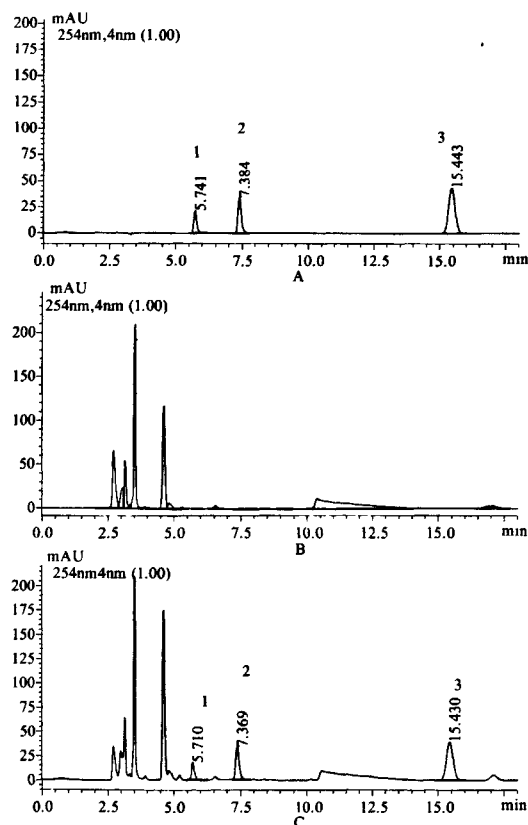
μm),流动相:0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液-甲醇=89:11(用三乙胺调节pH约为6.0);检测波长:254 nm;柱温:室温;流速:0.9 ml·min⁻¹;进样体积:20 μl 。

2.2 血浆样品的处理

取血浆样品0.5 ml,加入内标20 μl ,再加入200 μl 10%三氯醋酸沉淀蛋白,旋涡混合;离心(14 000 r·min⁻¹,13 min)取上清液,进样。

2.3 方法专属性试验

本实验条件下,异烟肼、吡嗪酰胺及内标有对称的色谱峰和良好的分离度,血浆中杂质峰不干扰样品的测定,本方法具有较高的专属性(色谱图见图1)。



A. 对照品溶液 B. 空白血浆 C. 血浆样品 + 内标
1. 异烟肼 2. 吡嗪酰胺 3. 内标

图1 异烟肼、吡嗪酰胺和内标色谱图

2.4 标准曲线与线性范围

分别精密量取20 μl 系列浓度的异烟肼和吡嗪酰胺标准溶液,加入到0.5 ml空白人血浆中,旋涡混匀,制成异烟肼浓度分别为0.480 7, 1.201 7, 3.004 3, 6.008 6, 15.021 5, 30.043 0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$;吡嗪酰胺浓度分别为0.998 0, 1.996 0, 4.990 0, 9.980 0, 24.949 9, 49.899 7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的血浆样品。按“2.3”项下操作,进样测定。以样品与内标峰面积比值(Y)对浓度(C)进行回归计算,结果表明异烟肼在0.5 ~ 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,吡嗪酰胺在1 ~ 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围内线性良好,得回归方程分别为异烟肼:

$Y = 1.877C - 3.468 \times 10^{-3}$, $r = 0.998\ 4$ ($n = 6$) 和吡嗪酰胺: $Y = 0.998C - 7.600 \times 10^{-3}$, $r = 0.998\ 1$ ($n = 6$)。

2.5 精密度和准确度试验

分别于0.5 ml的空白血浆中加入高、中、低3种浓度的异烟肼、吡嗪酰胺对照品溶液20 μl ,混匀,得高、中、低3种不同异烟肼(15.021 5, 6.008 6, 1.201 7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、吡嗪酰胺(24.949 9, 9.980 0, 1.996 0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)浓度的血浆样品,按血浆样品的处理与测定方法操作,依法测定日内与日间(3 d内)精密度, RSD均小于15%。

2.6 异烟肼和吡嗪酰胺稳定性考察

取已知异烟肼、吡嗪酰胺浓度血浆样品数份,分别置室温条件下存放0, 4, 8, 12, 15, 19, 23 h后,按血浆样品的处理与测定方法操作,测定异烟肼和吡嗪酰胺浓度,考察样品放置稳定性。结果血浆样品在室温放置23 h稳定, RSD均小于10%,同时考察了样品在-20℃冰箱中存放1周的稳定性,结果 RSD均小于15%,符合规定。

2.7 回收率试验

分别于0.5 ml的空白血浆中加入高、中、低3种浓度的异烟肼、吡嗪酰胺对照品溶液20 μl ,混匀,得高、中、低3种不同异烟肼、吡嗪酰胺浓度的血浆样品,按血浆样品的处理及测定方法操作,与同等浓度的未经处理的对照品测定结果进行对比,结果异烟肼、吡嗪酰胺及内标平均回收率均大于90%, RSD均小于6%(见表1)。

表1 异烟肼、吡嗪酰胺及内标物的提取回收率测定结果

药物	测定浓度($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	回收率(%)	RSD(%)
异烟肼	1.20	90.22 ± 1.62	1.05
	6.01	90.33 ± 1.13	0.96
	15.20	91.41 ± 5.09	3.55
吡嗪酰胺	2.00	105.60 ± 11.52	5.43
	9.98	101.48 ± 2.58	1.57
	24.95	101.96 ± 2.88	1.14
内标	10.14	93.70 ± 1.38	1.07

2.8 受试者血药浓度的测定

在测定本院35例临床结核患者血药浓度的数据中发现,INH血药浓度在0.62 ~ 23.11 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的范围内,PZA血药浓度在6.83 ~ 42.26 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的范围内(在测定患者血样的同时将高、中、低3个浓度的质控样品同时测定,以验证测定结果的准确性),说明它们都在各自的线性范围内,这种分析方法能够用于抗结核患者血药浓度的常规监测。临床医生通过利用异烟肼和吡嗪酰胺血药浓度监测的结果,可以对结核病患者提供个体化给药,以达到更好

的治疗效果。

3 讨论

异烟肼和吡嗪酰胺在一些常用有机萃取剂中的溶解度很小,萃取率低,因此在样品处理方法上选择了三氯乙酸沉淀法^[6]。通过摸索,本试验中,INH、PZA 的测定方法采用甲醇与磷酸缓冲液作流动相,并选择最佳配比,其中甲醇对 INH 与内源性物质的分离有重要作用,调节 pH 可改变三氯乙酸沉淀试剂色谱吸收峰的出峰时间,消除对样品测定的干扰。且考虑到服药量比较大,血药浓度较高,采用 10% 三氯乙酸沉淀蛋白质后,直接取上清液进样测定,药物损失少,测定方法简单方便,回收率 > 90%,日间和日内 RSD < 15%,符合生物样品分析要求,适用于

临床治疗药物监测及药物动力学研究。

参 考 文 献

- 1 World Health Organization. Global tuberculosis control 2011. 12 [EB/OL]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gthr11_full.pdf, 2011-10-31/2011-11-06
- 2 苏长海,李晖,卢立山,等. 抗结核药物不良反应及其危害[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(2): 176-178
- 3 曾德贵,刘玉琴. 异烟肼人体血药浓度测定及药代动力学研究[J]. 中国药业, 2011, 20(3): 6-7
- 4 许亦鸣,陈冰,王洁,等. 高效液相色谱法测定人血浆中异烟肼及乙酰异烟肼浓度[J]. 中国药房, 2005, 15(13): 1001
- 5 乐江,彭仁琇,刘娟. RP-HPLC 法测定鼠血浆中异烟肼代谢物的含量[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(1): 47
- 6 杨远荣,吴健鸿,张隽,等. 头孢氨苄片的体外释放与人体吸收程度相关性研究[J]. 中国药师, 2010, 13(1): 17-19

(2011-11-12 收稿 2011-12-26 修回)

HPLC 法测定复方氟尿嘧啶注射液含量及有关物质

张迪¹ 郭宏伟¹ 孙宽¹ 孙苓苓¹ 杨锴² 赵春杰² (1. 辽宁省食品药品检验所 沈阳 110023; 2. 沈阳药科大学)

摘 要 目的: 建立测定复方氟尿嘧啶注射液含量及其有关物质的 HPLC 法。方法: 采用 C₁₈ 色谱柱, 以水(0.05 mol·L⁻¹ 磷酸溶液调节 pH 至 3.5)-甲醇(95:5)为流动相, 检测波长为 265 nm。结果: 氟尿嘧啶与其相邻杂质峰能完全分离, 在进样量 0.038 92 ~ 1.946 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.999\ 9$, $n = 6$), 平均回收率为 99.2% (RSD = 0.5%); 最低检出量为 0.8 ng。结论: 本法专属准确, 可用于复方氟尿嘧啶注射液的质量控制。

关键词 复方氟尿嘧啶注射液; 含量测定; 有关物质

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2012)03-0356-03

Determination of Fluorouracil and Related Substances in Compound Fluorouracil Injections

Zhang Di¹, Guo Hongwei¹, Sun Kuan¹, Sun Lingling¹, Yang Cuo², Zhao Chunjie² (1. Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University)

ABSTRACT Objective: To establish a RP-HPLC method for the determination of fluorouracil and its related substances in compound fluorouracil injections. **Method:** The determination was performed by HPLC with C₁₈ column. The mobile phase was water (adjusting pH to 3.5 with 0.05 mol·L⁻¹ phosphoric acid) - methanol (95:5), and the UV detection wavelength was 265 nm. **Result:** Fluorouracil could be completely separated with the other impurities. The linear rang was 0.038 92 ~ 1.946 μg ($r = 0.999\ 9$, $n = 6$), the average recovery was 99.2% (RSD = 0.5%) with the detection limit of 0.8 ng. **Conclusion:** This method is selective and accurate, and suitable for the quality control of compound fluorouracil injections.

KEY WORDS Compound fluorouracil injections; Content determination; Related substances

氟尿嘧啶又名 5-氟尿嘧啶(5-Fu), 是第一个合成的抗代谢药物, 在目前临床上应用最广的抗嘧啶类药物^[1]。为减少药物不良反应, 20 世纪 80 年代研制了复方氟尿嘧啶脂质体注射液, 现名复方氟尿嘧啶注射液。为控制该制剂质量, 本文建立了复方氟尿嘧啶注射液中氟尿嘧啶含量极其有关物质的测定方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(岛津 2010), 复方氟尿嘧啶注

射液(A 企业, 小试样品), 氟尿嘧啶对照品(中国药品生物制品检定所, 100187-200602, 含量: 100.0%), 磷酸(国药集团化学试剂有限公司), 甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2]

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以水(0.05 mol·L⁻¹ 磷酸溶液调节 pH 至 3.5)-甲醇(95:5)为流动相, 流速 1.0 ml·L⁻¹, 检测波长为 265

高效液相色谱法测定人血浆中异烟肼和吡嗪酰胺的浓度

作者: [赵冠人](#), [马俊](#), [冯端浩](#), [Zhao Guanren](#), [Ma Jun](#), [Feng Duanhao](#)
作者单位: [解放军第309医院药剂科 北京 100091](#)
刊名: [中国药师](#) 
英文刊名: [China Pharmacist](#)
年, 卷(期): 2012, 15(3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgys201203025.aspx