

表 1 样品含量测定结果($n=3$)

批号	平均含量(%)
0901402	103.82
0901409	103.10
0901410	103.31

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取青藤碱对照品、阴性对照品及样品溶液在 200~400 nm 进行 UV 扫描,结果显示青藤碱在 220 nm 及 264 nm 处均有较大吸收。经进一步选择 220 nm、264 nm 为检测波长进行试验对比,发现 264 nm 处阴性样品干扰吸收较小,故最后确定 264 nm 为检测波长。

3.2 流动相的选择^[7]

《卫生部药品标准》中药成方制剂第 17 册中收录的正清风痛宁注射液质量标准含量测定中规定流动相为甲醇-乙二胺(1 000:0.1)^[8],本试验采用流动相为乙腈-0.78% 磷酸二氢钠溶液(12:88)。用上述两种流动相对同一供试液进行液相色谱分析,表明采用甲醇-乙二胺(1 000:0.1)为流动相,青藤碱峰保留时间太短,大约为 3.5 min。采用乙腈-0.78% 磷酸二氢钠溶液(12:88)为流动相,青藤碱峰保留时

间大约为 12 min,理论塔板数高,与有关物质及杂质的分离度高,乙腈-0.78% 磷酸二氢钠溶液(12:88)混合液 pH 在色谱柱工作 pH 范围内,故选择乙腈-0.78% 磷酸二氢钠溶液(12:88)为流动相。

参 考 文 献

- 1 黄海萍,李文莉. 正清风痛宁片含量测定方法改进[J]. 中国药师,2010,10(2):142-144
- 2 何晓艳,钟庆元. 正清风痛宁缓释片中盐酸青藤碱的含量测定[J]. 华夏医药,2007,2(1):27-29
- 3 何洪德,李文莉. 正清风痛宁中青藤碱的含量测定[J]. 湖南中医药导报,1999,5(6):37-38
- 4 何法霖,柏冬,郑玉胜,等. HPLC 法测定青参胶囊中青藤碱的含量[J]. 世界中医药,2010,(3):220-221
- 5 邱财荣,李新田,林昱,等. HPLC 法测定乌藤镇痛胶囊中的青藤碱含量[J]. 药学实践杂志,2010,28(1):40-42
- 6 柯薇. HPLC 法测定风湿圣药胶囊中青藤碱的含量[J]. 中医药导报,2010,(1):68-69
- 7 郭玉岩,李敏,史磊,等. HPLC 法测定盐酸青藤碱外敷散中盐酸青藤碱含量[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(11):42-43
- 8 卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂. 第 17 册. 1998. 60 (2011-02-01 收稿 2011-05-31 修回)

Rp-HPLC 法测定人血浆中吡嗪酰胺的浓度

鲁虹¹ 陈豪² 毛艳梅¹ 曾建国¹ 刘芳群¹ [1. 长沙市中心医院药剂科临床药学室 长沙 410004;2. 沃特世科技(上海)有限公司]

摘 要 目的:建立以反相高效液相色谱法测定人血浆中吡嗪酰胺血药浓度的方法。方法:采用 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 乙酸铵-乙腈(91:9),流速为 1.0 ml·min⁻¹,检测波长为 268 nm,柱温为 25℃,采用蛋白沉淀法处理血浆样品。结果:吡嗪酰胺血浆浓度在 1.645~105.28 μg·ml⁻¹($r=0.9995$)范围内线性关系良好,低、中、高三种浓度的平均相对回收率分别为(85.70±0.75)%,(99.53±2.82)%,(98.93±0.62)%,日内、日间 RSD 均小于 10%。结论:本方法简便、快速、准确、灵敏度高,可用于吡嗪酰胺血药浓度测定和人体药动学研究。

关键词 吡嗪酰胺;反相高效液相色谱法;血药浓度

中图分类号:R969.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2011)09-1295-03

Determination of Pyrazinamide in Human Plasma by Rp-HPLC

Lu Hong¹, Chen Hao², Mao Yanmei¹, Zeng Jianguo¹, Liu Fangqun¹ (1. Department of Pharmacy of Changsha Center Hospital, Changsha, 410004, China; 2. Waters Technology Company of Shanghai)

ABSTRACT **Objective:** To establish a Rp-HPLC method for the determination of pyrazinamide in human plasma. **Method:** The HPLC separation was achieved on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of 0.05 mol·L⁻¹ ammonium acetate-acetonitrile (91:9). The detection wavelength was 268 nm, flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and column temperature was 25℃. The protein precipitation method was used to treat the plasma samples. **Result:** The linear range of pyrazinamide was 1.645-105.28 μg·ml⁻¹($r=0.9995$), the average relative recovery of low, middle and high concentration was (85.70±0.75)%, (99.53±2.82)% and (98.93±0.62)%, respectively, and the RSDs were less than 10%. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate and sensitive for the plasma concentration monitoring and clinical pharmacokinetic studies of pyrazinamide.

KEY WORDS Pyrazinamide; HPLC; Plasma concentration

吡嗪酰胺(pyrazinamide)为抗结核药,对人型结核杆菌有较好的抗菌作用,而对其他非结核分枝杆菌不敏感,因此,常与其他抗结核药(如链霉素、异烟肼、利福平及乙胺丁醇)

联合用于治疗结核病,也可用于结核性脑膜炎^[1]。本品在体内抑菌浓度为 12.5 μg·ml⁻¹,达 50 μg·ml⁻¹可杀灭结核杆菌^[2]。吡嗪酰胺的不良反应较大,易引起高尿酸血症和肝脏

通讯作者:刘芳群 Tel:13908494455 E-mail:csszyyyjk@163.com

损害,长期大剂量使用可发生中毒性肝炎等^[1],但其血药浓度不稳定,难以确定是否达到有效的治疗窗。目前为止,国内外关于血浆中吡嗪酰胺浓度测定方法的报道有液相色谱法(LC)^[3-6]和液质联用法(HPLC-MS)^[7]。为有效地对吡嗪酰胺进行血药浓度监测(TDM),本实验建立了外标法测定人血浆中吡嗪酰胺浓度的方法,简便、快速、准确、灵敏度高,可用于吡嗪酰胺人体血药浓度测定及药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(LC-20AT 泵,SPD-M20A 紫外检测器);Shimadzu LCSolution 色谱工作站。CPA225D 电子分析天平(Sartorius 公司);TG16G 型台式高速离心机(Aida 公司);WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);艾科浦超纯水系统(Aquapro 公司);-70℃超低温保存箱(Haier 公司)。

1.2 试剂

吡嗪酰胺化学对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100178-200403,含量>98.0%);水为超纯水;乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);乙酸铵(分析纯,北京化工厂);空白血浆(长沙市中心医院血库提供)。

2 方法与结果

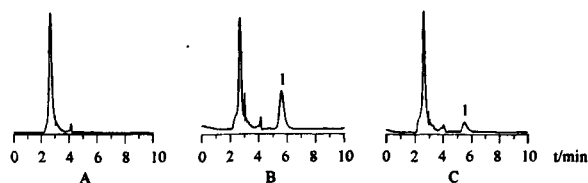
2.1 溶液的制备

2.1.1 吡嗪酰胺标准贮备液 精密称取吡嗪酰胺对照品 26.32 mg,置 25 ml 棕色量瓶中,甲醇溶解后并定容至刻度,配得 1.052 8 mg·ml⁻¹标准贮备液,密封置于 4℃冰箱保存。

2.1.2 吡嗪酰胺系列标准溶液 分别精密吸取吡嗪酰胺标准贮备液一定量于 5 ml 量瓶中,用甲醇依次稀释配得浓度为 16.45,32.90,65.80,131.6,263.2,526.4,1 052.8 μg·ml⁻¹的标准溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱 Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm;Dikma 公司);流动相:0.05 mol·L⁻¹乙酸铵-乙腈(91:9);流速:1.0 ml·min⁻¹;紫外检测波长:268 nm;柱温:25℃;进样体积:20 μl;吡嗪酰胺的保留时间约为 5.6 min,色谱图见图 1。



A. 空白血浆 B. 空白血浆+吡嗪酰胺对照品
(13.16 μg·ml⁻¹) C. 患者用药后血浆样品 1. 吡嗪酰胺

图1 吡嗪酰胺的 HPLC 色谱图

2.3 血浆样品处理

取血浆 100 μl 于具塞离心管中,加入甲醇 300 μl,涡旋振荡 2 min,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液即得。

2.4 标准曲线制备

取空白血浆 90 μl,加吡嗪酰胺标准系列溶液 10 μl,配制成 1.645,3.29,6.58,13.16,26.32,52.64,105.28 μg·ml⁻¹的血浆样本,按“2.3”项下操作,并进行色谱分析;以血浆标准溶液浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归,得标准曲线为:Y=14 067.51X+11 356.35(r=0.999 5,n=

7)。结果表明吡嗪酰胺血浆浓度在 1.645~105.28 μg·ml⁻¹与峰面积有良好线性关系。血浆中吡嗪酰胺最低定量浓度为 1.645 μg·ml⁻¹(S/N=3)。

2.5 相对回收率试验

配制低、中、高 3 个浓度(2.34,23.34,94.75 μg·ml⁻¹)的标准血浆各 5 份,按“2.3”项下操作,进样 20 μl,记录峰面积,计算 3 个浓度的回收率。结果见表 1。

表1 回收率试验(n=5)

浓度(μg·ml ⁻¹)	平均回收率(%)	RSD(%)
2.34	85.70	7.53
23.34	99.53	2.82
94.75	98.93	0.62

2.6 绝对回收率试验

配制低、中、高 3 个浓度(2.34,23.34,94.75 μg·ml⁻¹)的标准血浆各 5 份,按“2.3”项下操作,进样 20 μl,记录峰面积,与流动相配制的相同浓度对照品溶液所测峰面积相比较,计算 3 个浓度的绝对回收率。结果见表 2。

表2 绝对回收率试验(n=5)

浓度(μg·ml ⁻¹)	平均绝对回收率(%)	RSD(%)
2.34	78.76	8.18
23.34	87.96	5.10
94.75	87.41	1.01

2.7 精密度试验

配制低、中、高 3 个浓度(2.34,23.34,94.75 μg·ml⁻¹)的标准血浆各 5 份,按“2.3”项下操作,在 1 d 内重复测定 5 次和连续 3 d 测定其浓度,计算日内和日间变异,结果见表 3。

表3 精密度试验(n=5)

浓度(μg·ml ⁻¹)	日内 RSD(%)	日间 RSD(%)
2.34	9.43	8.31
23.34	4.88	4.81
94.75	1.24	1.29

2.8 稳定性考察

配制低、中、高 3 个浓度(2.34,23.34,94.75 μg·ml⁻¹)的标准血浆样品,每一种稳定性考察时,每一浓度进行 5 个样本分析。血浆样品于室温下放置 0、2、4、24 h,按“2.3”项下操作,考察未处理血浆样品的室温稳定性;血浆样品按“2.3”项下操作后,分别于 0、2、4 h 进样测定,考察处理后血浆样品的室温稳定性;血浆样品在 -20℃冷冻-解冻 2 次和 -70℃冻存 14 d 后,按“2.3”项下操作,进行色谱测定,考察血浆样品 2 次冷冻-解冻稳定性和在 -70℃冻存放置 14 d 的稳定性。发现未处理的吡嗪酰胺血浆样品室温放置 24 h 稳定,RSD 均小于 15%;处理后的吡嗪酰胺血浆样品室温放置 4 h 稳定,RSD 均小于 10%;吡嗪酰胺血浆样品 2 次冷冻-解冻、在 -70℃冻存放置 14 d 均稳定,RSD 均小于 10%。

2.9 临床应用

经 37 名患者知情同意,于服用吡嗪酰胺一段时间后抽血监测血药浓度,37 名患者年龄 17~89 岁,男性 27 名,女性 10 名。均为每天 2 次服用吡嗪酰胺片,其中 27 名患者的剂

量是每次0.5 g,另10名患者则是每次0.25 g。在服药4~5 d达到稳态血药浓度后,在次日服药前采血约3 ml于肝素化试管中,分离出血浆,按“2.3”项下操作,测定吡嗪酰胺血药浓度。结果:37名患者的平均血药浓度为 $(11.08 \pm 4.25) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,其中27名每次服用0.5 g的患者的平均血药浓度为 $(12.68 \pm 3.73) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,10名每次服用0.25 g的患者的平均血药浓度为 $(7.14 \pm 2.98) \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

3 讨论

吡嗪酰胺的血药浓度测定方法已有文献报道,有的文献^[3-7]采用离子对色谱法和液质连用技术进行吡嗪酰胺血药浓度的检测,实验成本较高,仪器普及率较低,难以在临床上推广。文献^[5]采用 KH_2PO_4 缓冲液($\text{pH}=2.5$)为流动相, pH 偏低,会严重影响色谱柱的柱效和降低其使用寿命;文献^[6]采用 KH_2PO_4 缓冲液梯度洗脱,洗脱程序较复杂,且时间长。本法采用乙腈-0.05 mol·L⁻¹乙酸铵溶液(9:91)为流动相,吡嗪酰胺的保留时间合适,峰形较好,且不受血浆中内源性杂质的干扰。在样品处理过程中,采用蛋白沉淀法操作简便快速,重复性好,通过比较采用甲醇、乙腈、三氯醋酸^[5]、高氯酸^[6]作蛋白沉淀剂,其中采用甲醇沉淀蛋白,提取回收率较高,且内源性杂质少,故选择甲醇为蛋白沉淀剂。

实验采用外标法测定人血浆中吡嗪酰胺的浓度,不受其他物质的干扰,且在1.645~105.28 g·ml⁻¹范围内线性关系好,准确,能满足临床血药浓度监测要求。

参考文献

- 1 四川美康医药软件研究开发有限公司. 药物临床信息参考[M]. 成都:四川科学技术出版社,2005.308
- 2 师海波,王克林. 最新临床药物手册[M]. 北京:军事医学科学出版社,2009.130
- 3 Kraemer HJ, Feltkamp U, Breithaupt H. Quantification of Pyrazinamide and its metabolites in plasma by ionic-pair high-performance liquid chromatography. Implications for the separation mechanism [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 706(2):319-328
- 4 Khuhawar MY, Rind FM. Liquid chromatography determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 766(2):357-363
- 5 杨正管,王庆彪,刘莹. 高效液相色谱法测定人血浆中异烟肼和吡嗪酰胺的含量[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(2):105-107
- 6 胡咏梅,徐新华,许建明. HPLC法测定血清中异烟肼、吡嗪酰胺及利福平浓度[J]. 安徽医科大学学报, 2002, 37(5):372-374
- 7 Wu JW, Shih HH, Wang SC, et al. Determination and pharmacokinetic profile of pyrazinamide in rat blood, brain and bile using microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography and verified by tandem mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 552(2):231-239

(2011-04-15 收稿 2011-06-10 修回)

HPLC 测定跌打止痛贴膏中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 含量

朱莹 (沈阳市食品药品检验所 沈阳 110023) 魏清榕 (鞍山市食品药品检验所) 胡东梅 (锦州市中心医院)
史曼秋 (辽宁省医药实业有限公司)

摘要 目的:建立 HPLC 法同时测定跌打止痛贴膏中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 含量的方法。方法:色谱柱为 Shim-pack CLC-ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液,梯度洗脱;检测波长 203 nm,柱温 35℃,流速 1.0 ml·min⁻¹。结果:三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 线性范围分别为 0.035 8~0.178 8 mg·ml⁻¹ ($r=0.9997$), 0.225 5~1.128 0 mg·ml⁻¹ ($r=0.9996$);平均回收率分别为 96.8% ($RSD=2.1\%$) 和 97.3% ($RSD=2.2\%$)。结论:本方法简便可靠,重复性好,可用于测定跌打止痛贴膏中三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的含量。

关键词 跌打止痛贴膏; 高效液相色谱法; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2011)09-1297-03

Determination of Notoginsenoside R₁ and Ginsenoside Rg₁ in Dieda Zhitong Plasters by HPLC

Zhu Ying¹, Wei Qingrong², Hu Dongmei³, Shi Manqiu⁴ (1. Shenyang Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China; 2. Anshan Institute for Drug and Food Control; 3. Jinzhou Central Hospital; 4. Liaoning Medicine Industrial Co. Ltd.)

ABSTRACT Objective: To develop an HPLC method for the determination of notoginsenoside R₁ and ginsenoside Rg₁ in Dieda Zhitong plasters. **Method:** The chromatographic separation was performed on a Shim-pack CLC-ODS C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a linear gradient elution of acetonitrile-0.05% phosphoric acid. UV detection wavelength was set at 203 nm, the flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and column temperature was set at 35℃. **Result:** Notoginsenoside R₁ and ginsenoside Rg₁ had a good linearity within the range of 0.035 8-0.178 8 mg·ml⁻¹ ($r=0.9997$) and 0.225 5-1.128 0 mg·ml⁻¹ ($r=0.9996$) with the average recovery of 96.8% ($RSD=2.1\%$) and 97.3% ($RSD=2.2\%$), respectively. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate, rapid and suitable for the quality control of Dieda Zhitong plasters.

KEY WORDS Dieda Zhitong plasters; HPLC; Notoginsenoside R₁; Ginsenoside Rg₁

跌打止痛贴膏是由三七、白芍、延胡索、乳香、没药、土鳖虫等按一定比例配比,加入基质制备而成的贴剂。具有活血

通讯作者:朱莹 Tel:13019316669 E-mail:zhaoni216@sina.com

Rp-HPLC法测定人血浆中吡嗪酰胺的浓度

作者：

鲁虹, 陈豪, 毛艳梅, 曾建国, 刘芳群, Lu Hong, Chen Hao, Mao Yanmei, Zeng Jianguo, Liu Fangqun

作者单位：

鲁虹, 毛艳梅, 曾建国, 刘芳群, Lu Hong, Mao Yanmei, Zeng Jianguo, Liu Fangqun(长沙市中心医院药剂科临床药理学室 长沙410004), 陈豪, Chen Hao(沃特世科技上海)有限公司

刊名：

中国药师 

英文刊名：

China Pharmacist

年, 卷(期)：

2011, 14(9)

参考文献(7条)

1. Wu JW;Shih HH;Wang SC Determination and pharmacokinetic profile of pyrazinamide in rat blood,brain and bile using microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography and verified by tandem mass spectrometry 2004(02)

2. 胡咏梅;徐新华;许建明 HPLC法测定血清中异烟肼、吡嗪酰胺及利福平浓度 2002(05)

3. 杨正管;王庆彪;刘莹 高效液相色谱法测定人血浆中异烟肼和吡嗪酰胺的含量 2000(02)

4. Khuhawar MY;Rind FM Liquid chromatography determination of isoniazid,pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood 2002(02)

5. Kraemer Hi;Feltkamp U;Breithaupt H Quantification of Pyrazinamideand it s metabolites in plasma by ionic-pair high-performance liquid chromatography.Implications for the separation mechanism[外文期刊] 1998(02)

6. 师海波;王克林 最新临床药物手册 2009

7. 四川美康医药软件研究开发有限公司 药物临床信息参考 2005

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgys201109021.aspx