

# HPLC 法测定人血浆中盐酸特拉唑嗪的浓度

翔宇, 蒋 晔<sup>#</sup>, 安普丽, 郝 福, 李艳荣(河北医科大学药学院, 石家庄市 050017)

中图分类号 R969.1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2007)14-1076-03

**摘要** 目的: 建立以反相高效液相色谱法测定人血浆中盐酸特拉唑嗪浓度的方法。方法: 血样采用二氯甲烷-乙醚(2:3)提取后测定, 其中色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>, 流动相为 0.05mol·L<sup>-1</sup>(pH 4.8) 磷酸二氢钾缓冲液-甲醇-乙腈(61:25:14), 流速为 1.0mL·min<sup>-1</sup>, 荧光检测器激发波长为 334nm, 发射波长为 385nm。结果: 盐酸特拉唑嗪检测浓度在 0.25~64ng·mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好( $r = 0.9995$ ), 最低检测限为 0.1ng·mL<sup>-1</sup>; 平均提取回收率为 84.0%, 平均方法回收率为 100.8%; 日内 RSD ≤ 3.4, 日间 RSD ≤ 3.0。结论: 本方法简便、准确、灵敏, 可用于人血浆中盐酸特拉唑嗪的临床药动学研究和血药浓度检测。  
**关键词** 高效液相色谱法; 盐酸特拉唑嗪; 血药浓度; 荧光检测器

## Determination of Terazosin Hydrochloride in Human Plasma by HPLC

DING Xiangyu, JIANG Ye, AN Puli, HAO Fu, LI Yanrong(Institute of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a RP-HPLC method for the determination of terazosin hydrochloride in human plasma. METHODS: Terazosin hydrochloride and internal standard (parazosin hydrochloride) were extracted from plasma with dichloromethane-diethyl ether (2:3) for determination. The separation was carried on a Diamonsil C<sub>18</sub> column with the mobile phase consisted of 0.05mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate buffer solution (pH 4.8) - methanol-acetonitrile (61:25:14). The flow rate of the mobile phase was 1.0mL·min<sup>-1</sup>, and the excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were set at 334 and 385 nm, respectively. RESULTS: The linear range of terazosin hydrochloride was 0.25~64ng·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9995$ ), with the lowest detectable limit at 0.1ng·mL<sup>-1</sup>. The average extraction recovery was 84.0% and the average methodological recovery was 100.8%. The intra-day RSD and inter-day RSD were no more than 3.4% and 3.0%, respectively. CONCLUSION: This method is rapid, simple, accurate and sensitive, and suitable for the pharmacokinetic study and assaying of terazosin hydrochloride.

**KEY WORDS** RP-HPLC; Terazosin hydrochloride; Blood concentration of drug; Fluorescence detector

盐酸特拉唑嗪(Terazosin hydrochloride)是临床上常用的治疗轻、中度高血压和良性前列腺增生的药物<sup>[1]</sup>。其血药浓度测定方法已有报道,但使用的提取溶剂不理想,操作烦琐<sup>[2,3]</sup>。此外,该药有较强的吸附性,常给试验结果带来较大误差<sup>[3,4]</sup>。鉴于此,笔者建立了更为灵敏、准确、操作简便的高效液相色谱法,以用于盐酸特拉唑嗪的临床药动学研究和血药浓度监测。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

SP8810 高效液相色谱仪(美国光谱物理公司); 474 荧光检测器(美国 Waters 公司); CT22 色谱信号采集器(南京千谱软件公司); LS50B 荧光分光光度计(美国 PE 公司)。

#### 1.2 试剂

盐酸特拉唑嗪对照品(中国药品生物制品检定所,批号:

100375-200401); 内标: 盐酸哌唑嗪对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 100164-200402); 受试制剂: 盐酸特拉唑嗪片(石家庄科迪药业有限公司,规格: 2mg·片<sup>-1</sup>,批号: 060101); 参比制剂: 盐酸特拉唑嗪片(商品名: 高特灵; 英国雅培制药有限公司,规格: 2mg·片<sup>-1</sup>,批号: 24618VA); 乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸二氢钾、乙醚、二氯甲烷均为分析纯。

### 2 方法

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub>(150mm×4.6mm, 5μm); 流动相: 0.05mol·L<sup>-1</sup>(pH 4.8) 磷酸二氢钾缓冲液-甲醇-乙腈(61:25:14); 荧光检测器激发波长: 334nm; 荧光检测器发射波长: 385nm; 流速 1.0mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 30℃。

#### 2.2 标准溶液的配制

netic study[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(20): 2911.

[4] Gilead Science Inc. *HepseraTM (adefovir dipivoxil)*

硕士研究生。研究方向: 药物分析。电话: 0311-86266069。E-mail: dingxiangyu520@163.com

<sup>#</sup> 通讯作者: 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 药物分析。电话: 0311-86265623。E-mail: jiangye@hebm. edu. cn

*Full prescribing Information*[EB/OL]. <http://www.gilead.com>, 2002, 9, 2.

[5] Schiff ER, Lai CL, Hadziyannis S, et al. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients[J]. *Hepatology*, 2003, 38(6): 1419.

(收稿日期: 2007-03-12 修回日期: 2007-04-10)

准确称取盐酸特拉唑嗪对照品适量,用  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 6.5) 磷酸二氢钾缓冲液配制成  $1.28\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  盐酸特拉唑嗪贮备液。取贮备液依次对倍稀释得浓度分别为 640、320、160、80、40、20、10、5、2.5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液。

### 2.3 内标溶液的配制

准确称取盐酸哌唑嗪对照品适量,用  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 6.5) 磷酸二氢钾缓冲液配制成  $206\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的盐酸哌唑嗪内标溶液。

### 2.4 血样处理

取血样 0.2mL, 加入内标溶液 20 $\mu\text{L}$ , 再加入  $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液 50 $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀后, 加入二氯甲烷-乙醚混合有机溶剂 (2:3) 2.5mL, 涡旋 5min, 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15min, 倾出有机层至聚丙烯离心管中, 在 50 $^{\circ}\text{C}$  条件下缓氮气吹干, 加  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 6.5) 的磷酸二氢钾缓冲液 100 $\mu\text{L}$  溶解, 取 20 $\mu\text{L}$  进样。

## 3 结果

### 3.1 盐酸特拉唑嗪的激发光谱与发射光谱

称取盐酸特拉唑嗪对照品适量, 用流动相配制成浓度为  $0.2\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的盐酸特拉唑嗪溶液, 用 LS 50B 荧光分光光度计进行扫描, 其光谱特征详见图 1。

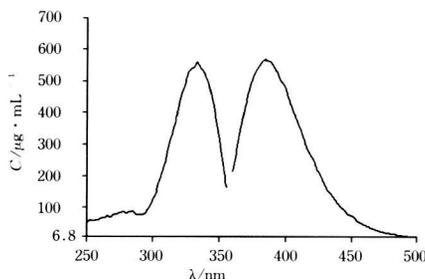


图 1 盐酸特拉唑嗪激发光谱与发射光谱特征

Fig 1 Excitation and emission spectra of terazosin hydrochloride

由图 1 可知, 盐酸特拉唑嗪的最大激发波长为 334nm, 发射波长为 385nm。

### 3.2 色谱行为

在“2.1”项色谱条件下, 盐酸特拉唑嗪与内标的色谱行为详见图 2。

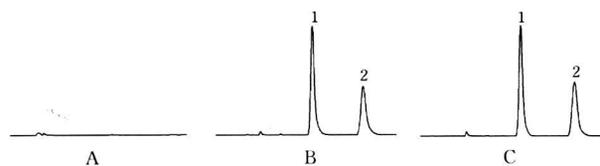


图 2 高效液相色谱

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 盐酸特拉唑嗪对照品 + 内标; C. 血浆样品; 1. 盐酸特拉唑嗪; 2. 盐酸哌唑嗪

Fig 2 HPLC

A. blank plasma; B. blank plasma + terazosin hydrochloride control substance + internal standard; C. plasma sample; 1. terazosin hydrochloride; 2. parazosin hydrochloride

由图 2 可知, 盐酸特拉唑嗪与内标完全分离, 且色谱峰不受代谢产物和内源性杂质的干扰。

### 3.3 标准曲线的绘制

取空白血浆 9 份, 各 0.2mL, 分别加入不同浓度的盐酸特拉唑嗪工作液 20 $\mu\text{L}$ , 使血药浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、

0.5、0.25  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 按照“2.4”项下方法操作, 进样 20 $\mu\text{L}$ , 记录盐酸特拉唑嗪与内标的色谱峰面积, 以两峰面积之比 (Y) 对盐酸特拉唑嗪浓度 (X) 进行加权回归, 绘制标准曲线。得标准曲线方程为  $Y = 4.21 \times 10^{-2}X + 2.30 \times 10^{-3}$  ( $r = 0.9995$ )。结果表明, 血浆中的盐酸特拉唑嗪检测浓度在 0.25~64  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

### 3.4 最低定量限与检测限

取空白血浆 0.2mL, 加入  $2.5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  盐酸特拉唑嗪对照液 20 $\mu\text{L}$ , 按“2.4”项下方法操作, 取 20 $\mu\text{L}$  进样, 记录特拉唑嗪与内标的色谱峰面积, 用标准曲线法计算含量, 测定最低定量限为  $0.25\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 准确度为  $(110.0 \pm 4.5)\%$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ ), RSD = 2.7%。另取最低浓度的盐酸特拉唑嗪工作液对倍稀释后, 按“2.4”项下方法操作, 取 20 $\mu\text{L}$  进样, 按  $S/N > 3$  计, 确定最低检测限为  $0.1\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3.5 盐酸特拉唑嗪提取回收率试验

取空白血浆 0.2mL, 分别加入 64、16、0.5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的盐酸特拉唑嗪标准溶液 20 $\mu\text{L}$ , 制成高、中、低 3 种浓度的样品溶液, 按“2.4”项下方法操作, 进样 20 $\mu\text{L}$ , 记录色谱峰面积。取相应浓度的盐酸特拉唑嗪标准溶液 20 $\mu\text{L}$ , 同法操作作为对照, 计算盐酸特拉唑嗪的提取回收率。结果, 低、中、高 3 种浓度提取回收率分别为  $(87.4 \pm 3.9)\%$ 、 $(82.3 \pm 4.5)\%$ 、 $(81.6 \pm 2.7)\%$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ ), 平均回收率为 84.0%。

### 3.6 方法回收率试验

取空白血浆 0.2mL, 分别加入 64、16、0.5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的盐酸特拉唑嗪标准溶液 20 $\mu\text{L}$ , 配制成高、中、低 3 种浓度的血浆样品, 按照“2.4”项下方法操作, 测得回收率, 结果详见表 1。

表 1 盐酸特拉唑嗪方法回收率试验结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Tab 1 Results of methodological recovery test of terazosin hydrochloride ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

加入浓度 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得浓度 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	方法回收率 /%	$\bar{x}$ /%	RSD /%
0.5	0.49	98.3 ± 5.4	100.8 ± 4.37	1.8
16	16.12	100.8 ± 4.5		1.5
64	66.07	103.2 ± 3.2		0.9

### 3.7 精密度试验

取空白血浆 0.2mL, 分别加入 64、16、0.5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的盐酸特拉唑嗪标准溶液 20 $\mu\text{L}$ , 制备成高、中、低 3 种浓度的血浆样品, 按照“2.4”项下方法操作, 测得日内、日间精密度, 结果详见表 2。

表 2 精密度试验结果

Tab 2 Results of precision test of terazosin hydrochloride

浓度 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内精密度 ( $n = 5$ )		日间精密度 ( $n = 15$ )	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
0.5	0.50 ± 0.1	3.4	0.51 ± 0.1	3.0
16	16.08 ± 3.2	2.6	16.12 ± 3.5	2.8
64	64.23 ± 2.3	1.5	64.45 ± 2.9	2.2

### 3.8 稳定性试验

取空白血浆 0.2mL, 分别于 0、2、4、6、8、12h 时制备高、低浓度的血浆样品, 按照“2.4”项下方法操作, 记录色谱峰面积, 用标准曲线法计算含量。结果表明, 含药血浆在室温条件下 12h 内稳定, RSD 分别为 2.4% 和 0.7%。

### 3.9 吸附性试验

3.9.1 不同时间复溶: 将血浆样品吹干后, 盐酸特拉唑嗪吸附在瓶壁上, 因此笔者考查了样品吹干后放置时间对吸附性的

影响,结果详见表3。

表3 不同时间复溶的吸附性

Tab 3 Adsorbability of sample with redissolution at different time

时间/h	盐酸特拉唑嗪峰面积	盐酸哌唑嗪峰面积	比值	测定浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	实际浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	准确度
0	106 180	158 013	0.672	16.10	16.00	100.6
1	103 640	150 640	0.688	16.03	16.00	100.2
2	78 987	110 413	0.715	17.01	16.00	106.3
4	72 509	88 465	0.820	19.66	16.00	122.9
6	59 810	65 871	0.908	21.78	16.00	136.1

由表3可知,血浆样品吹干后长期放置,盐酸特拉唑嗪与内标盐酸哌唑嗪均有不同程度的吸附,试验结果有较大的偏差。而在1h内溶样,能够保证试验的准确度。

3.9.2 复溶后不同时间进样:将样品吹干,使用磷酸盐缓冲液溶解,仍然会有部分特拉唑嗪吸附在管壁上,因此笔者考查了复溶后放置时间对吸附性的影响,结果详见表4。

表4 复溶后不同时间进样的吸附性

Tab 4 Adsorbability of sample injected at different time after redissolution

时间/h	盐酸特拉唑嗪峰面积	盐酸哌唑嗪峰面积	比值	测定浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	实际浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	准确度
0	106 180	158 013	0.672	16.10	16.00	100.6
2	103 911	155 053	0.670	16.06	16.00	100.4
4	100 703	145 125	0.694	16.17	16.00	101.1
6	73 596	99 324	0.741	17.76	16.00	111.1
8	67 721	78 901	0.858	20.59	16.00	128.7

由表4可知,血样吹干后立即复溶后,长期放置仍然有部分特拉唑嗪吸附在管壁上,但是测定结果在4h内无差异。

### 3.10 血样测定

采用本法测定了20名男性健康受试者交叉服用2mg受试制剂和参比制剂后的血浆样品,以当日的标准曲线计算各时间点样本中的盐酸特拉唑嗪浓度,同时测定质量控制样本以保证结果的可靠性。20名受试者口服盐酸特拉唑嗪片受试制剂和参比制剂后的平均药-时曲线见图3。

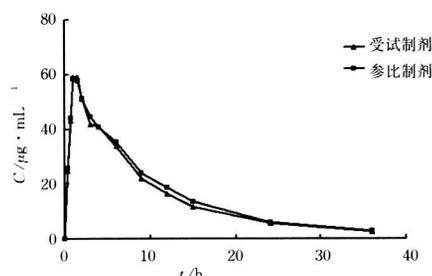


图3 20名受试者口服2mg盐酸特拉唑嗪受试制剂和参比制剂后的平均药-时曲线

Fig 3 Mean concentration-time curves of terazosin hydrochloride

## 4 讨论

文献<sup>[2,5,6]</sup>报道的盐酸特拉唑嗪的最大激发与发射波长分别为250nm和370nm,但在该条件下,检测灵敏度较低。特拉唑嗪为碱性化合物,不同的溶剂及不同的pH值均影响该药的

荧光强度。为此,笔者测定了在该流动相条件下盐酸特拉唑嗪的最大激发波长为334nm,发射波长为385nm,在该测定条件下,检测灵敏度为文献方法的5倍,更适用于血药中痕量盐酸特拉唑嗪的测定。

文献<sup>[2,4]</sup>多使用二氯甲烷提取血浆中的盐酸特拉唑嗪,但二氯甲烷位于血浆下层,因此不易收集;另有文献<sup>[3]</sup>使用了密度较小的乙酸乙酯,虽然能使有机相位于血浆上层,但是需要提取2次,操作烦琐;文献<sup>[5,6]</sup>使用苯的混合溶剂,但是苯对人体的造血系统有较大的毒性。鉴于此,本文采用二氯甲烷-乙醚作为提取溶剂,并对两者的比例进行考查,试验结果表明,当二氯甲烷与乙醚的体积比为2:3时,不仅可以使有机溶剂位于血浆上层,方便了血浆的处理,而且1次提取便可以使回收率达到80%以上。因此,本文采用体积比2:3的二氯甲烷-乙醚为提取溶剂提取血浆中的盐酸特拉唑嗪。

文献<sup>[3,4]</sup>报道,盐酸特拉唑嗪有较强的吸附性,用聚丙烯离心管代替玻璃试管能改善其吸附性。但笔者在试验过程中发现,仅使用聚丙烯离心管并不能有效改善这一现象,因此本文又从以下方面减小特拉唑嗪的吸附性。首先,由于盐酸特拉唑嗪在水中多以离子形式存在,较易吸附在容器壁上,因此使用蒸馏水制备标准溶液时,绘制的标准曲线向上弯曲( $r = 0.9942$ )。而采用磷酸盐缓冲液制备标准溶液时,线性关系良好( $r = 0.9995$ ),这可能是由于缓冲液中离子间的静电作用而抑制盐酸特拉唑嗪吸附到容器上。另由于在较高的pH值环境下,盐酸特拉唑嗪多以分子形式存在,但pH值过高则会降低色谱柱的寿命,因此笔者使用 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 6.5)的磷酸二氢钾缓冲液配制标准溶液,能有效地减少盐酸特拉唑嗪药物的吸附。

“3.9”项下的吸附性试验结果表明:处理血浆样品过程中,使用聚丙烯离心管代替玻璃试管,提取溶剂临进样前吹干,立即使用磷酸盐缓冲液溶解,并于4h内进样,也能有效地减小盐酸特拉唑嗪的吸附。

## 参考文献

- [1] 郝志刚,刘力,尹立新. 特拉唑嗪药理学综述[J]. 山东医药工业, 2000, 19(4): 31.
- [2] 胡玉钦,冯超英,刘会臣. 高效液相色谱法测定人血清中盐酸特拉唑嗪[J]. 北京军区医药, 2000, 12(1): 56.
- [3] 陈钧,陆伟,高科攀,等. 两种盐酸特拉唑嗪片剂人体生物等效性评价[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(6): 446.
- [4] Sekhar EC, Rao TR, Sekhar KR, et al. Determination of terazosin in human plasma, using high-performance liquid chromatographic analysis of terazosin in human plasma[J]. *Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 745(2): 439.
- [5] 李莉,吴琼珠. 特拉唑嗪胶囊的药物动力学及相对生物利用度研究[J]. 江苏药学与临床研究, 2002, 10(3): 1.
- [6] 周永刚,朱秀平,卓海通,等. 盐酸特拉唑嗪胶囊人体生物利用度及药物动力学研究[J]. 中国医院药学杂志, 1998, 18(12): 531.

(收稿日期:2006-07-17 修回日期:2006-08-18)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅