

UPLC法同时测定人血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平的浓度

朱翔*, 王俊龙, 杜庭彦, 马国伟, 陈洁#

昆明市第三人民医院药学部, 云南 昆明

收稿日期: 2022年8月10日; 录用日期: 2022年9月7日; 发布日期: 2022年9月15日

摘要

目的: 建立同时测定人血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平浓度的方法。方法: 色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.7 μm), 柱温: 40℃, 流动相分别为乙腈及磷酸二氢钾溶液(0.025 mol·L⁻¹), 血浆采用蛋白沉淀法前处理, 流速0.3 ml/min, 进样量1 μL。进样含有异烟肼、吡嗪酰胺、利福平对照品的血浆, 检测方法的专属性、线性关系、回收率、精密度及稳定性, 并通过该方法测定联用异烟肼、吡嗪酰胺、利福平后的结核患者血浆中的药物浓度。结果: 血浆样本中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平均独立出峰, 互不干扰; 线性关系良好(均 $r^2 > 0.999$); 回收率均在80%~100%; 精密度RSD值均<10%; 稳定性RSD值均<11%。17例肺结核患者中除异烟肼有1例低于线性范围, 吡嗪酰胺有1例高于线性范围外, 其余均在检测范围内。结论: 本法方便快捷, 准确稳定, 可用于临床结核患者血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平浓度的测定。

关键词

结核, 超高效液相色谱, 异烟肼, 吡嗪酰胺, 利福平, 血药浓度

Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide and Rifampicin in Human Plasma by UPLC

Xiang Zhu*, Junlong Wang, Tingyan Du, Guowei Ma, Jie Chen#

Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Kunming, Kunming Yunnan

Received: Aug. 10th, 2022; accepted: Sep. 7th, 2022; published: Sep. 15th, 2022

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 朱翔, 王俊龙, 杜庭彦, 马国伟, 陈洁. UPLC法同时测定人血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平的浓度[J]. 药物资讯, 2022, 11(5): 402-408. DOI: 10.12677/pi.2022.115052

Abstract

Objective: To establish the method in order to simultaneous determine concentration of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in human plasma. **Methods:** The chromatographic column was ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.7 μm), the column temperature was 40°C, the mobile phase was acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate solution (0.025 mol·L⁻¹), the plasma was pretreated by protein precipitation method, the flow rate was 0.3 mL/min, and the inject volume was 1 μL. The plasma containing isoniazid, pyrazinamide and rifampicin was injected. Then we tested the specificity, linear relationship, recovery, precision and stability. The drug concentration in the plasma of tuberculosis patients who took isoniazid, pyrazinamide and rifampicin was determined by UPLC-UV method. **Results:** The peaks of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin were independent and did not interference of each other, and the linear relationship was good ($r^2 > 0.999$). The recoveries was between 80%~100%, the intra- and inter-day precision was less than 10%, and the stability was less than 11%. Among the 17 patients with pulmonary tuberculosis, except 1 case of isoniazid below the linear range and 1 case of pyrazinamide was higher than the linear range, the rest were in the detection range. **Conclusion:** This method is convenient, rapid, accurate and stable, and can be used for the determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in plasma of patients with clinical tuberculosis.

Keywords

Tuberculosis, Ultra High Performance Liquid Chromatography, Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin, Blood Concentration

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

全球传染性疾病中,结核病(tuberculosis, TB)成为第二大致死原因。据世界卫生组织(WHO)最新统计,全世界每年新增结核患者 800~1000 万,死亡 130 万,其中我国新增结核患者约为 150 万,死亡 13 万[1]。结核病已成为重大的公共卫生问题,严重威胁着人类生命健康安全。异烟肼、吡嗪酰胺、利福平作为一线抗结核药,联合使用构成治疗方案的核心,但体内药物浓度过低会导致耐药的发生,浓度过高则会产生毒副作用,严重影响治疗效果。适当的药物选择和精确的给药剂量是保证患者疗效、减少耐药风险和预防不良反应的最佳策略,也是血药浓度监测(therapeutic drug monitoring, TDM)的最终目标[2]。通过监测体内药物浓度,可调整给药剂量,进而提高药物疗效。本研究通过超高效液相色谱-紫外(UPLC-UV)系统建立同时测定人血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平浓度的方法并进行验证,从而为临床评价药物疗效或制定个体化给药方案提供数据支持。

2. 材料

2.1. 仪器

ACQUITY UPLC 系统(H-Class Bio, 美国 Waters 公司); GENIUS 5K-C 型低速离心机(中国长沙鑫奥仪器仪表有限公司); TGL-16R/18R 型高速冷冻离心机(中国珠海黑马医学仪器有限公司); MX-S 型旋涡

混合仪(美国 Scilogex 公司); AR2140 型电子分析天平(美国 Ohaus 公司)。

2.2. 药品试剂

异烟肼对照品(批号: 100578-201903, 纯度: 99.9%, 中国食品药品检定研究院); 吡嗪酰胺对照品(批号: 100178-201104, 纯度: 99.9%, 中国食品药品检定研究院); 利福平对照品(批号: 130496-201403, 纯度: 98.8%, 中国食品药品检定研究院)。甲醇(色谱纯, 批号: 10953707820, 德国 Merck 公司); 乙腈(色谱纯, 批号: JB098030, 德国 Merck 公司); 磷酸二氢钾(分析纯, 批号: 20160523, 中国国药集团化学试剂有限公司); 试验用水为娃哈哈纯净水; 空白血浆由昆明市第三人民医院提供。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 × 50 mm, 1.7 μm), 柱温: 40℃。流动相 A 为乙腈, B 为 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液; 梯度洗脱程序: 0~0.4 min, A:B = 4:96; 0.4~0.6 min, A:B = 8:92; 0.6~1.5 min, A:B = 65:35; 2.5~3.8 min, A:B = 80:20; 3.8~6 min, A:B = 4:96, 流速: 0.3 mL·min⁻¹。进样体积: 1 μL。检测波长: 异烟肼(261 nm)、吡嗪酰胺(268 nm)、利福平(340 nm), 梯度程序: 0~1.3 min: 268 nm; 1.3~6 min: 340 nm。

3.2. 标准品的配制

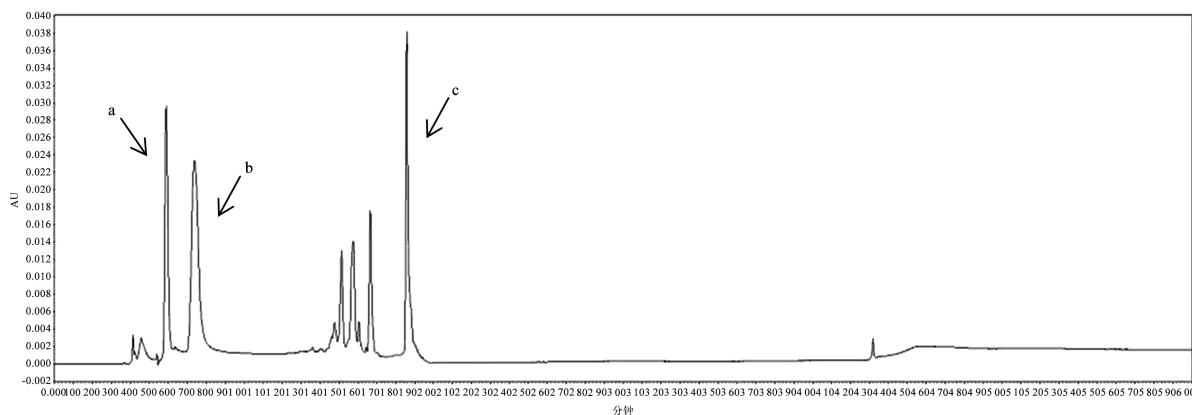
精密称量异烟肼、吡嗪酰胺、利福平对照品 50 mg, 加入 50 mL 纯净水溶解, 配制浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液, 避光放置 4℃ 备用。

3.3. 血样前处理

将血样进行离心, 离心速度为 3000 r·min⁻¹, 离心 5 min。取上清血浆 300 μL 加 700 μL 甲醇, 涡旋器混匀 1 min, 12,000 r·min⁻¹, 4℃, 离心 15 min, 离心后取上清, 用 0.22 μm 滤头过滤至进样瓶中进行分析。

3.4. 方法学考察

专属性考察: 将空白血浆, 标准品溶液及加入标准品溶液的血浆参照方法 2.3 处理, 按方法 2.1 色谱条件进样测定, 结果见图 1, 异烟肼(图 1a)保留时间为 0.53 min, 吡嗪酰胺(图 1b)保留时间为 0.71 min, 利福平(图 1c)保留时间为 1.83 min, 有较好的分离, 互不干扰, 提示该方法专属性较好。



(A)

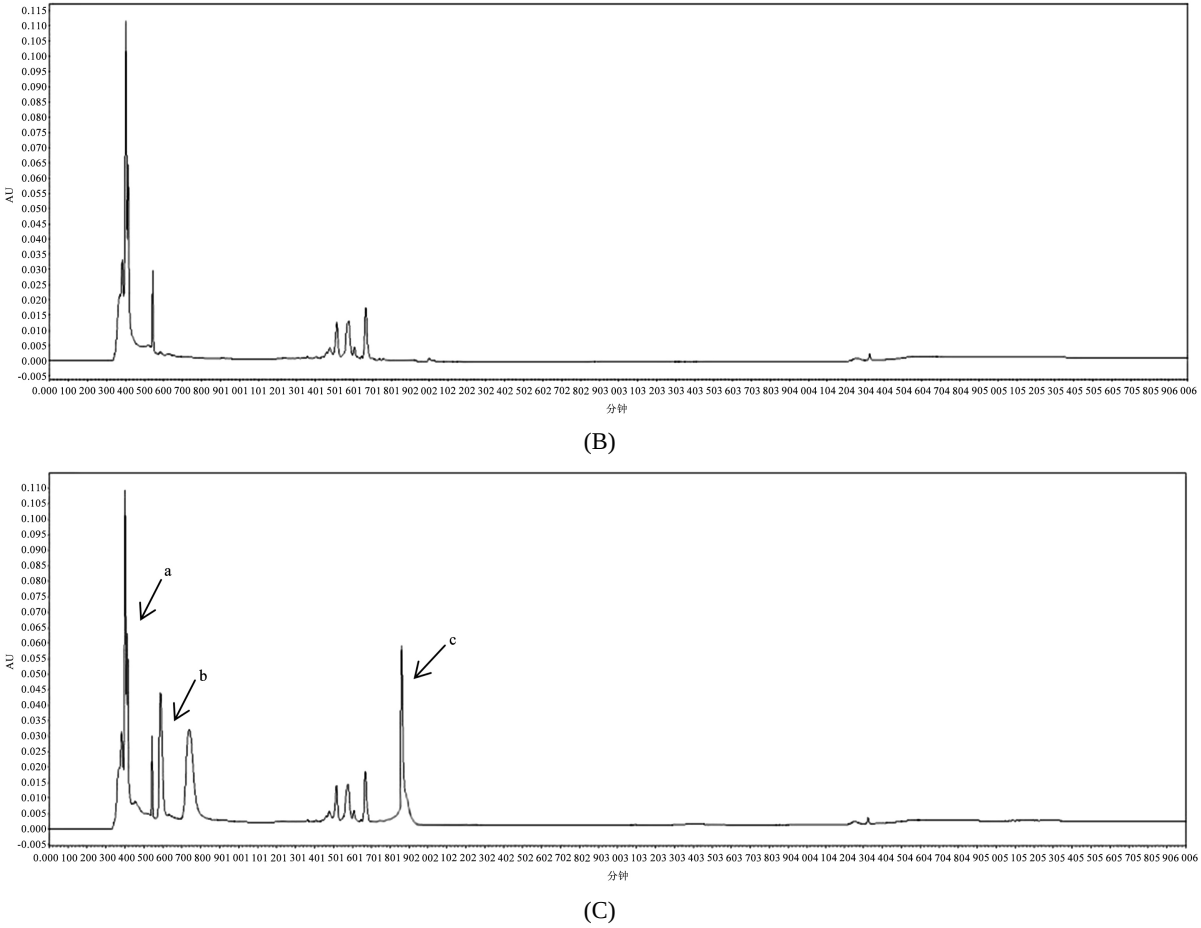


Figure 1. Chromatograms of isoniazid (a), pyrazinamide (b), and rifampicin (c). (A) Standard solution; (B) Blank plasma; (C) Blank plasma + standard solution

图 1. 异烟肼 (a)、吡嗪酰胺 (b)、利福平 (c) 色谱图。(A) 标准品溶液；(B) 空白血浆；(C) 空白血浆 + 标准品溶液

线性关系考察：取浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液，用空白血浆梯度稀释，使 3 种药物终浓度为 0.25、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，每个浓度 3 份，参照方法 3.3 处理，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，并计算回归方程， r^2 ，结果见表 1，异烟肼、吡嗪酰胺、利福平在 0.25~32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

Table 1. Result of the linear relationship of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin

表 1. 异烟肼、吡嗪酰胺、利福平线性关系考察

组分	回归方程	线性范围($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r^2
异烟肼	$Y = 1268.3X - 224.9$	0.25~32	0.9992
吡嗪酰胺	$Y = 3085.8X - 88.373$	0.25~32	0.9997
利福平	$Y = 677.21X - 136.86$	0.25~32	0.9993

回收率实验：取空白血浆将浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液梯度稀释为低、中、高浓度(0.25、2.5、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，每个浓度 6 份，参照方法 2.3 处理，计算日内(连测 6 次)及日间(连测 6 天)精密度及回收率(回

收率 = $A_{\text{血浆稀释的药物}} / A_{\text{纯净水稀释的药物}}$ 。精密度实验：结果见表 2，显示 RSD 值均小于 10%。回收率结果见表 3，不同浓度的异烟肼、吡嗪酰胺、利福平回收率均大于 80%，RSD 值均小于 10%。

Table 2. Result of precision of isoniazid, pyrazinamide, and rifampicin (n = 6)
表 2. 异烟肼、吡嗪酰胺、利福平精密度结果(n = 6)

组分	浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度 RSD(%)	
		日内	日间
异烟肼	0.25	3.9	6.2
	2.5	1.3	8.8
	25	2.7	4.9
吡嗪酰胺	0.25	6.9	9.2
	2.5	6.0	4.7
	25	4.9	5.3
利福平	0.25	8.6	10.0
	2.5	8.1	8.1
	25	8.3	4.8

Table 3. Result of recovery of isoniazid, pyrazinamide, and rifampicin (n = 6)
表 3. 异烟肼、吡嗪酰胺、利福平回收率结果(n = 6)

组分	浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率(%)	RSD(%)
异烟肼	0.25	83.7	9.8
	2.5	89.4	1.5
	25	88.3	2.4
吡嗪酰胺	0.25	80.6	4.5
	2.5	87.4	2.6
	25	91.6	1.2
利福平	0.25	88.2	8.7
	2.5	85.5	6.0
	25	93.8	6.4

稳定性考察：取空白血浆将浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液梯度稀释为低、中、高浓度(0.25、2.5、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，分别于以下条件测定，1) 25℃条件下放置，于第 0，2，4，8，12，24 h 测定；2) 4℃条件下放置，于第 0 天，1 天，3 天，5 天测定；3) -20℃条件下放置，于第 0 天，1 天，3 天，5 天测定，测定前从冰箱拿出常温下解冻。结果见表 4，异烟肼、吡嗪酰胺、利福平在不同时间及不同温度下保存后测定基本保持稳定。

Table 4. Results of stability of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin
表 4. 异烟肼、吡嗪酰胺、利福平稳定性结果

组分	浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD(%)		
		25℃	4℃	-20℃
异烟肼	0.25	10.6	5.2	8.3
	2.5	9.8	8.4	5.5
	25	9.4	3.3	6.4
吡嗪酰胺	0.25	9.7	9.1	8.8
	2.5	8.1	1.6	7.3
	25	5.1	3.3	3.9
利福平	0.25	10.7	8.3	10.8
	2.5	10.8	6.3	6.1
	25	9.1	3.8	5.5

3.5. 方法学的验证

研究对象：选取昆明市第三人民医院 2021 年 11 月 01 日至 2021 年 11 月 30 日期间结核科门诊及住院确诊患者 17 例，其中男 10 例、女 7 例，年龄 16~55 岁，平均年龄(35.94 ± 11.24)岁。纳入标准：所有患者均签署知情同意书，本研究经医院伦理委员会批准。排除标准：患有肺炎、肺气肿、肺癌等其它肺部疾病；严重的心、肝、肾等脏器疾病者；严重精神障碍者。

患者在下一次用药前 2 h 采集血液，通过本研究建立的方法测定患者体内药物浓度。结果显示，异烟肼血药浓度为 $0.18\sim 39.04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，吡嗪酰胺血药浓度为 $0.82\sim 50.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，利福平血药浓度为 $0.36\sim 11.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，异烟肼有 1 例低于线性范围，吡嗪酰胺有 1 例高于线性范围，除此之外，其余各项数据均在线性范围内。

4. 讨论

结核患者治疗过程中，为了提高治愈率、降低毒性、防止耐药产生，通常采用多种一线抗结核药物联合长期使用，但由于药物之间存在相互作用使其在体内的吸收或代谢发生改变，而且长期用药会导致体内药物蓄积产生毒性反应。TDM 的开展可优化给药方案和药物剂量，提高药物疗效，降低毒副作用。

对于 TDM 的研究，HPLC 和 GC 是首选[3]。目前，同时测定血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平浓度的方法主要是通过普通高效液相色谱系统建立[3] [4]，但存在耗时长，敏感性低的问题，而张瑞雨等[5]虽通过 UPLC-MS/MS 技术建立同时测定异烟肼、利福平浓度的方法，但该法仅能同时对其中两种药物进行分析，尚无 UPLC-UV 同时测定人血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平浓度的方法报道。本研究在同一处理条件下可同时测定异烟肼、吡嗪酰胺、利福平浓度，时间缩短至 6 min，且结果准确稳定，对于大量样本检测具有较高的临床应用价值。本实验在血浆前处理的方法选择上，由于固相萃取[6] [7]及液-液萃取[8] [9]存在成本较高，重现性低，操作复杂的问题，本研究选择了简便快捷的蛋白沉淀法。对于蛋白沉淀剂，比较了甲醇和乙腈，甲醇由于样品提取回收率较高，并且毒性较低，最终选择甲醇。利福平常温下不稳定[10]，整个处理过程应尽可能快速，并在 4℃ 离心，经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后上机检测，可防止仪

器和柱子堵塞。检测操作上的误差,所服用药物之间的相互作用,生理或病理原因导致代谢功能的改变等可能导致血药浓度的变化。17例肺结核患者中,异烟肼的药物浓度低于线性范围可能与药物间相互作用有关,利福平为肝药酶诱导剂,通过提高细胞色素 P450 的代谢活性,促使其本身或其他药物代谢加快,导致浓度降低[11]。吡嗪酰胺血药浓度高于线性范围可能与给药剂量相关,因此需要加强药物浓度监测,适当调整给药剂量,从而提高药物疗效并降低不良反应的发生。

综上所述,本研究通过 UPLC-UV 系统建立同时检测人血浆中的异烟肼、吡嗪酰胺、利福平浓度的方法,结果准确稳定,成本低廉,可用于临床结核患者血浆中药物浓度测定。

基金项目

云南省科技厅地方高校联合专项——面上项目(2018010070280)。

参考文献

- [1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2018) Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 354 Diseases and Injuries for 195 Countries and Territories, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, **392**, 1789-1858.
- [2] 王乐乐, 杨松, 唐神结. 治疗性药物监测在结核病治疗中的应用进展[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(3): 285-290.
- [3] Bozorg, B.D., Goodarzi, A., Fahimi, F., et al. (2019) Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide and Rifampin in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography and UV Detection. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **18**, 1735-1741.
- [4] 张亮, 钱智磊, 陆磊, 等. 同时测定血浆 INH、AcINH、RFP 和 PZA 的高效液相色谱法建立及其在肺结核患者中的应用[J]. 山东医药, 2015, 55(48): 23-26.
- [5] 张瑞雨, 师真, 李文廷, 等. UPLC-MS/MS 同时测定结核患者体内异烟肼、利福平的浓度[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(5): 407-410.
- [6] Saras-Nacenta, M., López-Púa, Y., López-Cortés, L.F., et al. (2001) Determination of Efavirenz in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **763**, 53-59. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00357-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00357-7)
- [7] Fox, D., O'Connor, R., Mallon, P., et al. (2011) Simultaneous Determination of Efavirenz, Rifampicin and Its Metabolite Desacetyl Rifampicin Levels in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **56**, 785-791. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.07.041>
- [8] Sailaja, A.L., Kumar, K.K., Kumar, D.V.R.R., et al. (2007) Development and Validation of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Efavirenz in Human Plasma. *Chromatographia*, **65**, 359-361. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0170-x>
- [9] Ramachandran, G., Kumar, A.K.H., Swaminathan, S., et al. (2009) Simple and Rapid Liquid Chromatography Method for Determination of Efavirenz in Plasma. *Journal of Chromatography B*, **879**, 3663-3667. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.047>
- [10] Le Guellec, C., Gaudet, M.L., Lamanetre, S., et al. (1997) Stability of Rifampin in Plasma: Consequences for Therapeutic Monitoring and Pharmacokinetic Studies. *Therapeutic Drug Monitoring*, **19**, 669-674. <https://doi.org/10.1097/00007691-199712000-00011>
- [11] 荆颖, 黄淑萍, 王倩, 张洁. 利福平药动学影响因素的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(12): 1726-1728.