

# UPLC-MS/MS法同时测定患儿血浆中乙胺丁醇及异烟肼的浓度<sup>Δ</sup>

安 静<sup>1\*</sup>,董占军<sup>1#</sup>,张笑丹<sup>2</sup>,刘洪涛<sup>1</sup>(1.河北省人民医院药学部,石家庄 050051;2.河北省胸科医院药学部,石家庄 050041)

中图分类号 R978.3;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)20-2768-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.20.10

**摘要** 目的:建立同时测定患儿血浆中乙胺丁醇(EMB)及异烟肼(INH)浓度的方法。方法:血浆样品经乙腈沉淀蛋白后,采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定。以拉米夫定为内标,色谱柱为Waters ACQUITY® UPLC HSS T<sub>3</sub>,流动相为乙腈-水(含0.05%甲酸及15 mmol/L 甲酸铵),梯度洗脱,流速为0.2 ml/min。采用电喷雾离子源,多反应监测方式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为 $m/z$  205.2→116.0(EMB)、 $m/z$  138.1→121.1(INH)、 $m/z$  230.2→111.9(内标)。结果:EMB、INH血药浓度分别在10~5 000、50~5 000 ng/ml范围内线性关系良好,定量下限分别为10、50 ng/ml;日内、日间RSD<15%,相对回收率为98.7%~105.5%。临床检测4例肺结核患儿体内EMB、INH的血药浓度为94.5~99.7、55.1~80.9 ng/ml。结论:该方法分析快速、灵敏度高,适用于患儿EMB、INH血药浓度的监测及药动力学研究。

**关键词** 乙胺丁醇;异烟肼;超高效液相色谱-串联质谱法;血药浓度;肺结核;患儿

## Simultaneous Determination of Ethambutol and Isoniazid in Children's Plasma by UPLC-MS/MS

AN Jing<sup>1</sup>, DONG Zhanjun<sup>1</sup>, ZHANG Xiaodan<sup>2</sup>, LIU Hongtao<sup>1</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2.Dept. of Pharmacy, Hebei Chest Hospital, Shijiazhuang 050041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of ethambutol (EMB) and isoniazid (INH) in children's plasma. METHODS: After precipitated with acetonitrile, plasma samples were determined by UPLC-MS/MS method. Using lamivudine as internal standard, Waters ACQUITY® UPLC HSS T<sub>3</sub> column was adopted with mobile phase consisted of acetonitrile-water (containing 0.05% formic acid and 15 mmol/L ammonium formate) in gradient mode at the flow rate of 0.2 ml/min. By ESI, positive ion detection was conducted in MRM mode. The monitoring transition ion-pair was  $m/z$  205.2→116.0 for EMB,  $m/z$  138.1→121.1 for INH and  $m/z$  230.2→111.9 for internal standard. RESULTS: The linear range of EMB and INH was 10-5 000 ng/ml and 50-5 000 ng/ml, respectively; the limits of quantitation were 10 and 50 ng/ml; RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 15% and relative recoveries were 98.7%-105.5%. Plasma concentrations of EMB and INH in 4 children with tuberculosis were 94.5-99.7 and 55.1-80.9 ng/ml. CONCLUSIONS: The method is rapid and sensitive, which suitable for children's plasma concentration monitoring of EMB and INH and pharmacokinetic study.

**KEYWORDS** Ethambutol; Isoniazid; UPLC-MS/MS; Plasma concentration; Pulmonary tuberculosis; Children

环境污染、雾霾天气给人们的健康带来各种不利的影响,其中呼吸道传染病肺结核的发病人数逐年增多,尤其是儿童患者增长迅速。抗结核药需长期服用,主要的药品不良反应为药物性肝损伤,且敏感菌株极易对其产生耐药性,这使得临床很难掌握其合理的使用剂量。儿童属于特殊用药人群,但目前国内对肺结核患儿合理用药的关注较少,临床多靠经验用药。用药剂量不足,不仅会诱导耐药菌株的出现,还可能导致治疗的失败;用药剂量过大,则会导致肝损伤等不良反应的发生。因此,临床应对接受抗结核药治疗的患者(或患儿)进行血药浓度监测,根据血药浓度调整用药剂量,以减少不良反应的发生、提高治疗的效果<sup>[1]</sup>。本试验建立了同时检测人血浆中乙胺丁醇(EMB)及异烟肼(INH)浓度的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法,并将其应用于肺结核患儿血药浓度的监测,为临床合理使用抗结核药提供参考。

<sup>Δ</sup> 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(No. ZD20140492)

\* 药师,硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:0311-85988998。E-mail:anjingyaofen@163.com

# 通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:医院药学。电话:0311-85988604。E-mail:13313213656@126.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

Shimadzu LC-30AD 型超高效液相色谱系统(日本岛津公司); AB Sciex Triple Quad 5500 型三重四级杆串联质谱仪(美国 AB 公司); Hettich Zentrifuge 1602 型高速低温离心机(德国 Hettich 公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AB204-S 型标准型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

### 1.2 药品与试剂

盐酸乙胺丁醇对照品(批号:100165-201104,纯度:100.0%)、INH对照品(批号:100578-200401,供含量测定用)、拉米夫定对照品(内标,批号:101007-200701,纯度:99.7%)均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇、甲酸、甲酸铵为色谱纯,水为纯净水。空白血浆来源于河北省人民医院体检中心。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱与质谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY® UPLC HSS T<sub>3</sub> (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B, 含 0.05% 甲酸及 15

mmol/L 甲酸铵), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 0.2 ml/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 µl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 The gradient elution procedure

t, min	A, %	B, %
1.50	2	98
5.00	90	10
7.00	90	10
7.01	2	98
10.00	Stop	Stop

采用电喷雾离子源(ESI), 以多反应监测(MRM)模式扫描, 正离子方式检测; 气帘气压力: 30 kPa; 碰撞气压力: 8 kPa; 电喷雾电压: 5 500 V; 去溶剂温度: 600 °C; 雾化气压力: 60 kPa; 辅助气压力: 60 kPa; 入口电压: 10 V; 碰撞室出口电压: 14 V。其余质谱参数见表2。

表2 质谱参数

Tab 2 Parameters of MS

待测物	母离子, m/z	子离子, m/z	驻留时间, ms	去簇电压, eV	碰撞能量, eV
EMB	205.2	116.0	100	60	15
INH	138.1	121.1	100	80	21
内标	230.2	111.9	100	95	20

## 2.2 溶液的制备

精密称取各对照品适量, 置于10 ml量瓶中, 加水溶解后, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成EMB、INH质量浓度分别为1.01、1.02 mg/ml的对照品贮备液, 置于4 °C冰箱中保存。精密吸取上述对照品贮备液各0.5 ml, 置于10 ml量瓶中, 用50%甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 得EMB、INH质量浓度均为50 µg/ml的混合对照品溶液。取该混合对照品溶液适量, 用50%甲醇水溶液逐级稀释, 分别配制成EMB、INH质量浓度为50、40、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.1 µg/ml的系列标准工作液, 备用。

精密称取内标对照品10 mg, 置于10 ml量瓶中, 加甲醇溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为1 mg/ml的内标贮备液, 置于4 °C冰箱中保存。临用前用水将其稀释成质量浓度为1 µg/ml的内标溶液, 备用。

## 2.3 血浆样品的处理

精密吸取血浆100 µl, 置于1.5 ml离心管中, 加入内标溶液(质量浓度为1 µg/ml)10 µl, 涡旋混匀5 s, 加入乙腈200 µl沉淀蛋白, 涡旋混匀30 s, 16 090×g离心10 min, 精密吸取上清液20 µl, 加入水(含0.05%甲酸及15 mmol/L甲酸铵)180 µl稀释, 涡旋混匀后, 置于进样瓶中, 备测。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取10份不同来源的空白血浆, 含有EMB、INH的血浆样品, 肺结核患儿服药后的血浆样品各适量, 分别按“2.3”项下方法处理后, 进样分析, 记录色谱图。结果表明, 在“2.1”项条件下, EMB、INH及内标的保留时间分别为1.73、1.74、4.68 min, 各色谱峰峰形良好, 血浆中的内源性物质不干扰检测。其典型色谱图见图1。

2.4.2 标准曲线的绘制及定量下限(LLOQ)的考察 取空白血浆90 µl, 加入相应质量浓度的标准工作液各10 µl, 分别配制成EMB质量浓度为10、20、50、100、200、500、1 000、2 000、4 000、5 000 ng/ml, INH质量浓度为50、100、200、500、1 000、2 000、4 000、5 000 ng/ml的系列标准血浆样品。按“2.3”项下方法处理后, 进样分析, 记录色谱图。以待测物质量浓度(x)为横坐标, 待测物峰面积与内标峰面积的比值(y)为纵坐标, 进行线性

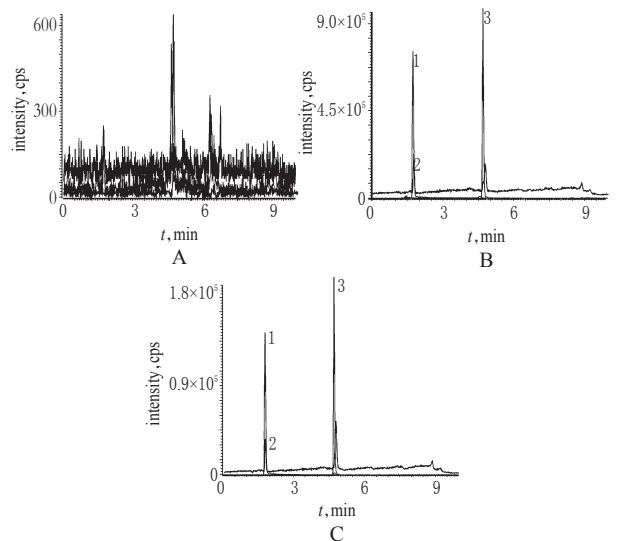


图1 典型色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+EMB(100 ng/ml)+INH(100 ng/ml)+内标; C. 肺结核患儿服药后的血浆样品+内标; 1. EMB; 2. INH; 3. 内标

Fig 1 Representative MRM chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+EMB (100 ng/ml)+INH (100 ng/ml)+internal standard; C. the children's plasma sample collected after oral administration of drugs+internal standard; 1. EMB; 2. INH; 3. internal standard

回归(权重因子为1/x), 得回归方程分别为:  $y_{EMB} = 0.002 07x_{EMB} + 0.042 3$  ( $r = 0.998 6, n = 3$ ),  $y_{INH} = 8.54 \times 10^{-5}x_{INH} + 0.005 75$  ( $r = 0.998 9, n = 3$ )。结果表明, EMB、INH血药浓度分别在10~5 000、50~5 000 ng/ml范围内线性关系良好。

以信噪比(S/N) ≥ 10, 同时满足准确度和精密度要求(即同一样品重复进样5次, 其实测质量浓度的RSD应 ≤ 20%, 误差在 ± 20%以内)的血浆样品的最低质量浓度、标准曲线线性范围的最低点, 即为LLOQ。结果显示, EMB的LLOQ为10 ng/ml, 其RSD为5.0% (n=5), 回收率为80.0%; INH的LLOQ为50 ng/ml, 其RSD为2.5% (n=5), 回收率为92.0%。

2.4.3 精密度与准确度试验 分别配制EMB低、中、高质量浓度(20、200、4 000 ng/ml)和INH低、中、高质量浓度(100、200、4 000 ng/ml)的血浆样品, 按“2.3”项下方法处理, 每质量浓度取5样本分析, 连续测定3 d, 据当日标准曲线计算各样品的实测质量浓度, 考察日内、日间精密度; 将实测质量浓度与理论质量浓度比较, 计算相对回收率, 考察方法的准确度。结果显示, EMB及INH的日间、日内RSD均 < 15%, 相对回收率为98.7%~105.5%。精密度与准确度试验结果见表3。

表3 精密度与准确度试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 3 Results of precision and accuracy tests( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

待测物	理论质量浓度, ng/ml	日内精密度		日间精密度		准确度	
		实测质量浓度, ng/ml	RSD, %	实测质量浓度, ng/ml	RSD, %	相对回收率, %	RSD, %
EMB	20	20.27 ± 0.81	4.0	20.90 ± 1.32	6.3	103.5	10.0
	200	213.67 ± 5.04	2.4	196.40 ± 8.52	4.4	105.5	9.5
	4 000	4 186.67 ± 61.10	1.5	4 220.00 ± 65.84	2.6	104.2	3.4
INH	100	94.51 ± 1.09	10.4	91.43 ± 1.42	13.9	98.7	10.7
	200	203.67 ± 18.50	8.9	215.75 ± 28.5	13.3	101.9	13.6
	4 000	4 113.34 ± 150.12	3.9	4 086.67 ± 102.5	2.6	103.9	7.3

2.4.4 提取回收率和基质效应考察 分别配制EMB低、中、高质量浓度(20、200、4 000 ng/ml)和INH低、中、高质量浓度

(100、200、4 000 ng/ml)的血浆样品,按“2.3”项下方法处理,每质量浓度取5样本分析,得相应峰面积C。取空白血浆适量,按“2.3”项下方法处理后,加入相应质量浓度的标准工作液及内标溶液各适量,配制成EMB低、中、高质量浓度(20、200、4 000 ng/ml)和INH低、中、高质量浓度(100、200、4 000 ng/ml)的血浆样品,每质量浓度取5样本分析,得相应峰面积B。取相应质量浓度的标准工作液,不经提取直接进样分析,得相应峰面积A。基质效应 $=B/A \times 100\%$ ;提取回收率 $(\%) = C/B \times 100\%$ 。结果显示,EMB、INH及内标的基质效应为85.0%~104.7%,提取回收率为94.6%~107.5%,表明基质效应不影响待测物血药浓度的测定。基质效应和提取回收率试验结果见表4。

表4 基质效应和提取回收率试验结果( $n=5$ )

Tab 4 Results of matrix effect and extraction recovery test ( $n=5$ )

待测物	理论质量浓度,ng/ml	基质效应,%	提取回收率,%
EMB	20	85.0	99.3
	200	91.8	101.9
	4 000	104.7	97.9
INH	100	91.4	107.5
	200	89.1	97.8
	4 000	99.4	95.4
内标	100	88.5	94.6

2.4.5 稳定性考察 分别配制EMB低、高质量浓度(20、4 000 ng/ml)和INH低、高质量浓度(100、4 000 ng/ml)的血浆样品,考察其在室温下保存24 h,经历3次冷冻-解冻循环(-20 ℃~20 ℃)等条件下的稳定性。结果显示,各样品在上述稳定性考察条件下,EMB和INH的实测质量浓度与理论质量浓度的相对标准偏差均 $<15\%$  ( $n=5$ ),表明样品在上述条件下稳定性良好。

## 2.5 临床应用

采用本方法测定4例肺结核患儿体内EMB及INH的血药浓度。本研究方案经我院医学伦理委员会审核通过。4例肺结核患儿在服药1个月后,于晨起静脉采血3 ml,采用肝素抗凝后,按“2.3”项下方法处理,进样分析,测得各患儿EMB的血药浓度为94.5、95.2、99.0、99.7 ng/ml,INH的血药浓度为55.1、58.4、76.3、80.9 ng/ml。

## 3 讨论

EMB和INH是肺结核患者初始治疗的一线用药。目前已有文献报道,采用高效液相色谱(HPLC)法测定人血浆中INH的浓度,其LLOQ为0.2  $\mu\text{g/ml}$ ,尚不能满足患儿体内INH血药浓度监测的需要<sup>[2-5]</sup>。由于EMB无紫外吸收,常规的紫外检测器难以检测,有文献报道采用蒸发光散射检测器测定了烟肼丁醇片中的EMB,但蒸发光散射检测灵敏度低,LLOQ为100  $\mu\text{g/ml}$ <sup>[6]</sup>;薛士荣<sup>[7]</sup>采用离子对色谱法测定了盐酸乙胺丁醇片中EMB的含量,其LLOQ约为50  $\mu\text{g/ml}$ ,但上述方法仅对制剂中EMB的含量进行了检测,尚无法应用于临床EMB血药浓度的监测。朱慧等<sup>[8]</sup>采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法同时测定了人血浆中EMB、INH的含量,LLOQ均为100 ng/ml,但由于采用等度洗脱,EMB及INH的保留时间约为1 min,与其他杂质保留时间接近,故受基质的影响较大。本试验在此基础上,建立并验证了同时检测人血浆中EMB及INH浓度的UPLC-MS/MS法,该法具有操作简便、灵敏度高、分析时间短等特点,可用于肺结核患儿体内EMB、INH血药浓度

的监测。

EMB没有紫外吸收,若采用紫外法检测,则不能实现同时测定EMB与其他抗结核药物的血药浓度,所以在实际工作中,对EMB血药浓度检测的研究相对较少。但由于其不良反应会累及泌尿、肝胆、皮肤及其附件等多个系统/器官<sup>[9]</sup>,故对其血药浓度的监测也是很有必要的。本试验建立的UPLC-MS/MS法,实现了对EMB及INH血药浓度的同时测定,且大大提高了灵敏度,LLOQ分别为10、50 ng/ml。

EMB极性较强,传统的液-液萃取几乎不能将其完全提取出来,固相萃取柱也无法较好地将其与基质分离,故本试验最终选择了乙腈沉淀法。但该方法存在较强的基质效应,为了减小基质的干扰,笔者将待测血浆样品进行了稀释处理,并考察稀释3、5、10倍时对基质效应及提取回收率的影响。结果显示,当稀释倍数为5倍时,INH低、中、高质量浓度(50、200、2 000 ng/ml)和EMB低、中、高质量浓度(20、200、2 000 ng/ml)血浆样品的基质效应分别86.8%、75.5%、94.3%、70.1%、76.0%、115.1%,虽较稀释3倍时的基质效应有所降低,但不稳定;当稀释倍数为10倍时,上述样品的基质效应分别为91.0%、89.3%、99.2%、85.0%、92.7%、105.3%,基质效应相对最小,且较为稳定。故本试验最终选择稀释10倍进行分析。稀释行为虽降低了方法的灵敏度,但本检测方法与文献报道的方法<sup>[6-9]</sup>相比,仍具有较高的灵敏度和较广的线性范围,可满足临床血药浓度检测的需求。

本试验所建立的UPLC-MS/MS法在临床应用中只检测了4名肺结核患儿体内EMB及INH的血药浓度,要分析两者在患儿体内的药动学特征,有待进行更大临床样本量的分析与研究。

## 参考文献

- [1] 田洪英,王洪星,姚明.抗结核药物血药浓度监测及临床疗效与安全性分析[J].中国药房,2012,23(26):2 485.
- [2] 钱智磊,张亮,周秋云,等.HPLC法测定结核病患者血浆中异烟肼、吡嗪酰胺、利福平和左氧氟沙星的质量浓度[J].西北药学杂志,2014,29(6):578.
- [3] 张亮,钱智磊,陆磊,等.高效液相色谱法同时测定人血浆中异烟肼、乙酰异烟肼和吡嗪酰胺的浓度[J].药学与临床研究,2014,22(2):112.
- [4] 陆磊,王洁,丁红梓,等.HPLC法测定人血浆中异烟肼、吡嗪酰胺浓度[J].实用药物与临床,2014,17(12):1 589.
- [5] 刘西银,刘榕,何学仙,等.测定异烟肼血药浓度RP-HPLC的建立及其应用[J].宁夏医学杂志,2014,36(5):390.
- [6] 吴春生.高效液相色谱-蒸发光散射检测器法同时测定烟肼丁醇片中盐酸乙胺丁醇和异烟肼含量[J].中国药业,2013,22(19):38.
- [7] 薛士荣.反相离子对高效液相色谱法测定盐酸乙胺丁醇片中盐酸乙胺丁醇含量[J].天津药学,2011,23(4):11.
- [8] 朱慧,李梵,陆宇.LC-MS/MS法同时检测人血浆中异烟肼、乙胺丁醇和吡嗪酰胺的浓度[J].药物分析杂志,2012,32(6):945.
- [9] 龙明立,刘芳群,曾建国,等.90例抗结核药物不良反应调查[J].药物流行病学杂志,2014,2(4):231.

(收稿日期:2015-07-15 修回日期:2016-02-05)

(编辑:张元媛)