

## 反相高效液相色谱法测定血浆及尿液中的异烟肼

金 鸣<sup>1</sup>, 黄 河<sup>2</sup>, 陈新山<sup>1</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院法医学系, 湖北 武汉 430030;  
2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

**摘要** 建立了血浆及尿液中异烟肼的高效液相色谱快速测定方法, 以满足临床药物分析和法医学鉴定的需要, 提高对血浆及尿液中异烟肼浓度检测的准确性。以香草醛为衍生化试剂, 将异烟肼经柱前衍生为异烟肼-香草醛腙, 直接对处理后样品中的腙进行定性、定量分析。以在空白人体液样本中定量添加标准异烟肼的方法考察了样品的前处理方法、仪器条件、线性范围、精密性、回收率等, 并对健康受试者血液中的异烟肼浓度进行了监测。结果表明, 方法的线性范围为 0.2 mg/L~12.0 mg/L; 检测限为 0.2 mg/L; 日内、日间精度均小于 4.0% ( $n=5$ ); 回收率在 96.3% 以上。该方法快速、准确、实用, 适用于临床药物浓度监测、法医毒物分析和药代动力学等相关研究。

**关键词** 高效液相色谱; 异烟肼; 血浆; 尿液

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2002)05-0442-04

## Determination of Isoniazid in Blood and Urine Samples by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

JIN Ming<sup>1</sup>, HUANG He<sup>2</sup>, CHEN Xin-shan<sup>1</sup>

(1. Faculty of Forensic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China; 2. Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China)

**Abstract**: For the purpose of more accurate and rapid analysis of isoniazid in body fluid samples, a reversed-phase high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed. Vanillin, being as a derivatizing reagent, was added to the plasma and urine samples when they were pretreated. Isoniazid and vanillin reacted to form isonicotinoyl hydrazone which was separated and detected. The pretreatment method of sample, the linear range, the precision, and the recovery of isoniazid were investigated by using human's plasma and urine spiked with standard isoniazid. The linear range was 0.2 mg/L-12.0 mg/L (for plasma,  $r=0.9996$ ; for urine,  $r=0.9994$ ). The detection limit was 0.2 mg/L. The intra-day and inter-day precisions of assay for isoniazid were 2.3% - 2.6% and 3.8% - 4.0% ( $n=5$ ) for plasma, 1.3% - 4.0% and 2.1% - 3.9% ( $n=5$ ) for urine respectively. The average recoveries of isoniazid were from 96.5% to 99.8% in plasma and from 96.3% to 99.4% in urine. The HPLC method has been used to investigate the concentration of isoniazid in the volunteer's plasma. The quantitative analysis of isoniazid in plasma was not interfered by impurities, the metabolites of isoniazid and the derivatizing reagent residue. This analytical method for isoniazid is sensitive, rapid and convenient. It is suitable for the analysis of toxics in forensic samples, the detection of drug concentration in clinical medicines and pharmacokinetic studies.

**Key words**: high performance liquid chromatography; isoniazid; plasma; urine

异烟肼(isoniazid, INH, 又称雷米封)是临床上抗结核病的首选药物之一。INH 毒副作用较大<sup>[1]</sup>, 仅在治疗量范围内使用也容易发生急性或蓄积性中毒。近年来, 我国结核发病率明显上升, 对 INH 等抗结核药物的使用也随之增加, 由此引发的中毒、死

亡及医疗纠纷案件也随之增多。所以 INH 中毒在临床药(毒)物分析中占有较重要的位置。有关 INH 中毒检验与临床药物浓度监测的色谱分析方法较多, 如薄层色谱法<sup>[2]</sup>、气相色谱法<sup>[3, 4]</sup>、液相色谱法<sup>[5-10]</sup>等。但大都面临提取率低、操作繁琐的问

题。其中有些方法只适用于对原药中的 INH 成分进行分析或对致死量血药浓度测定,难以满足治疗量下对血液、尿液中 INH 浓度进行快速检测的要求;有些分析方法还必须使用特殊的仪器或试剂,在一般的药(毒)物分析实验室难以实施。因此,为满足临床血药浓度监测和法医学鉴定中准确、快速、便捷的需要,我们对 INH 体液样品的前处理方法和高效液相色谱(HPLC)检测方法再次进行了研究,建立起一个实用的分析方法,并以所建方法对健康受试者血液中的 INH 浓度进行了 24 h 全程监测及尿液中 INH 的单样品测试,测定结果理想。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-1 型高效液相色谱仪,色谱工作站, TGL-16G 台式高速离心机。

INH 标准品购自公安部第二研究所(纯度为 99.0%)。香草醛、三氯醋酸、三乙胺、高氯酸、甲醇和磷酸二氢钾均为国产分析纯。去离子水经双蒸后使用。衍生化试剂为 16 g/L 香草醛甲醇溶液。

### 1.2 INH 标准溶液的配制

准确称量 INH 标准品 10.0 mg,用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,得到 1.0 g/L INH 的标准储备液。移取标准储备液 5.0 mL 稀释至 10 mL,配制成为 500 mg/L 的 INH 标准溶液备用。

### 1.3 血浆、尿液样品的采集

抽取健康人静脉血,经高速离心(3 000 r/min × 10 min),吸取血浆于 -20 °C 冷冻保存,作为空白血浆样品备用。

健康受试者单剂量口服异烟肼后,在 24 h 内分 12 个时间段分别抽取静脉血 5.0 mL,离心(3 000 r/min × 10 min),取血浆于 -20 °C 冷冻保存,作为 INH 血液浓度代谢样本待测。

取健康人尿液作为空白尿液备用。取健康受试者尿液作为 INH 尿液代谢样本待测。尿液于 -20 °C 冷冻保存。

### 1.4 血浆、尿液样品的前处理

取血浆样本 0.25 mL 置于 1 mL 离心试管中,加入 100 g/L 三氯醋酸 50  $\mu$ L,16 g/L 的香草醛溶液 40  $\mu$ L,然后加甲醇至总体积为 0.5 mL。将上述溶液于 40 °C 水浴反应 20 min,冷却,高速离心(10 000 r/min × 5 min),吸取上清液 20  $\mu$ L 进样,外标法定量。

取尿液样本,使用前离心(5 000 r/min × 10 min),吸取上清液 0.25 mL,其后样品前处理操作同血浆。

## 1.5 色谱条件

色谱分离柱:YWG-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm i.d. × 200 mm)预柱:YWG-C<sub>18</sub>柱(6 mm i.d. × 25 mm)流动相:V(0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>):V(CH<sub>3</sub>OH)=61:39,每 500 mL 流动相加入体积分数为 70% 的 HClO<sub>4</sub> 0.2 mL 及体积分数为 20% 的三乙胺 0.4 mL;检测波长 340 nm;流速:1 mL/min;进样量 20  $\mu$ L。

## 2 结果

### 2.1 标准工作曲线、线性范围和检测限

取空白血浆及空白尿液各 6 份,每份 0.25 mL,分别加入浓度为 500 mg/L 的 INH 标准溶液 0.2  $\mu$ L,0.8  $\mu$ L,2.0  $\mu$ L,4.0  $\mu$ L,8.0  $\mu$ L 和 12.0  $\mu$ L;再分别加入 100 g/L 三氯醋酸 50  $\mu$ L 和 16 g/L 香草醛溶液 40  $\mu$ L,加甲醇至 0.5 mL,配制成为质量浓度分别为 0.2 mg/L,0.8 mg/L,2.0 mg/L,4.0 mg/L,8.0 mg/L 和 12.0 mg/L 的 INH 血浆及尿液样本(平行操作的样本数为 5)。按样品处理方法处理后,在上述色谱条件下,分别进样 20  $\mu$ L,测出其峰面积。将峰面积(Y)对样品的质量浓度(X,mg/L)进行线性回归,结果见表 1。

表 1 血浆、尿液中异烟肼的回归方程、线性范围、相关系数及检测限(n=5)

Table 1 The regression equations, linear ranges, correlation coefficients and the detectable limits of isoniazid in plasma and urine(n=5)

Sample	Linear range (mg/L)	Regression equation *	Correlation coefficient	Detectable limit (mg/L)
Plasma	0.2-12.0	$Y=2.93 \times 10^5 X - 9.30 \times 10^4$	0.999 6	0.2
Urine	0.2-12.0	$Y=3.54 \times 10^5 X - 1.17 \times 10^5$	0.999 4	0.2

\* X is the mass concentration of isoniazid, mg/L; Y is peak area.

### 2.2 精密度试验

取浓度为 0.8 mg/L,4.0 mg/L 或 8.0 mg/L 和 12.0 mg/L 的 3 个标准血浆和尿液样本的提取物,分别于同 1 d 内 5 个不同时间点及不同日内连续测定 5 d,由测得浓度计算标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD),获得日内、日间精密度值,结果见表 2 和表 3。所得 RSD 均在 4.0% 以内,精密度符合要求,测定方法可靠。

表 2 血浆中异烟肼测定的精密度(n=5)

Table 2 The precision of determination of isoniazid in plasma(n=5)

$\rho$ (isoniazid) (mg/L)	Intra-day		Inter-day	
	( $\bar{\rho} \pm SD$ ) (mg/L)	RSD (%)	( $\bar{\rho} \pm SD$ ) (mg/L)	RSD (%)
0.8	0.79 ± 0.02	2.6	0.79 ± 0.03	3.8
4.0	3.85 ± 0.10	2.6	3.89 ± 0.15	3.9
12.0	12.52 ± 0.29	2.3	11.76 ± 0.47	4.0

表 3 尿液中异烟肼测定的精密度( $n=5$ )Table 3 The precision of determination of isoniazid in urine ( $n=5$ )

$\rho$ (isoniazid) (mg/L)	Intra-day		Inter-day	
	( $\bar{\rho} \pm SD$ ) (mg/L)	RSD (%)	( $\bar{\rho} \pm SD$ ) (mg/L)	RSD (%)
0.8	0.80 ± 0.01	1.3	0.77 ± 0.03	3.9
8.0	7.73 ± 0.10	1.3	7.67 ± 0.16	2.1
12.0	12.08 ± 0.48	4.0	11.28 ± 0.44	3.9

## 2.3 回收率的测定

配制 INH 质量浓度分别为 0.8 mg/L, 4.0 mg/L, 8.0 mg/L 和 12.0 mg/L 的血浆及尿液样本, 经样品前处理后在“1.5”节所述色谱条件下进行分析( $n=5$ )。由测得质量浓度计算回收率, 结果见表 4 和表 5。

表 4 血液中异烟肼回收率测定结果( $n=5$ )Table 4 The recovery of isoniazid in plasma ( $n=5$ )

Added (mg/L)	Found (mg/L)	Recovery (%)	RSD (%)
0.8	0.79 ± 0.03	98.8 ± 3.3	3.3
4.0	3.86 ± 0.20	96.5 ± 3.9	4.0
8.0	7.98 ± 0.32	99.8 ± 3.5	3.6
12.0	11.76 ± 0.52	98.0 ± 3.8	3.9

表 5 尿液中异烟肼回收率测定结果( $n=5$ )Table 5 The recovery of isoniazid in urine ( $n=5$ )

Added (mg/L)	Found (mg/L)	Recovery (%)	RSD (%)
0.8	0.78 ± 0.03	97.5 ± 4.0	4.1
4.0	3.89 ± 0.13	97.3 ± 3.2	3.3
8.0	7.70 ± 0.16	96.3 ± 2.0	2.1
12.0	11.93 ± 0.44	99.4 ± 3.9	3.9

血浆及尿液中 INH 的回收率均在 96.3% 以上, 符合定量分析的要求。

## 2.4 INH 的高效液相色谱图

图 1 和图 2 是在“1.5”节所述色谱条件下得到的谱图。

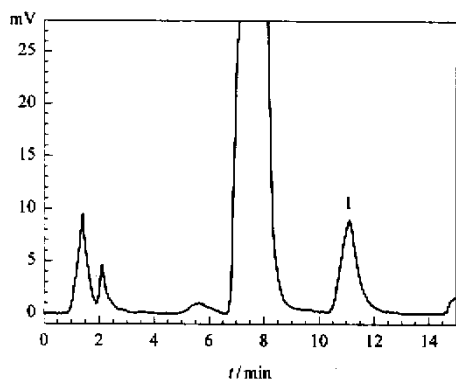


图 1 血浆样本的色谱图

Fig.1 Chromatogram of plasma

1. isoniazid (6.63 mg/L).

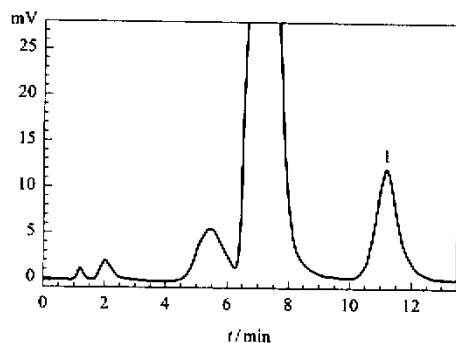


图 2 尿液样本的色谱图

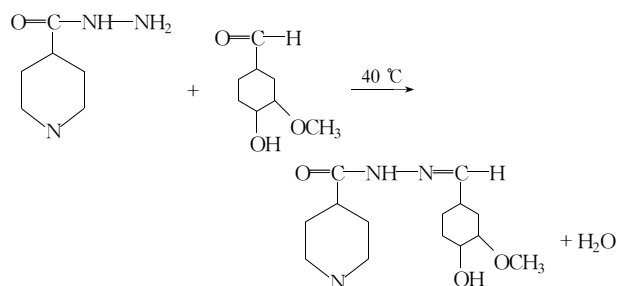
Fig.2 Chromatogram of urine

1. isoniazid (8.74 mg/L).

## 3 讨论

### 3.1 样品的前处理条件选择

INH 与香草醛的柱前衍生化反应为<sup>[9,10]</sup>:



反应于 40 °C 水浴加热 20 min 可 1:1 定量完成, 产物是 INH-香草醛腙。

INH 极性较大, 难溶于有机溶剂, 不能用有机溶剂直接从生物样品中提取出来。腙是一个弱极性化合物, 易溶于有机溶剂, 可用乙酸乙酯、氯仿、氯仿-乙醚等有机溶剂萃取。因此, 衍生物腙可以用适宜的有机溶剂萃取后检测或不经萃取直接吸取上清液对腙进行色谱分析。实验表明, 对于血浆和尿液中的 INH-香草醛腙, 高速离心后直接取上清液进行 HPLC 检测, 其回收率明显高于用有机溶剂对腙萃取后再进行检测的方法。

### 3.2 流动相的选择

实验中分别对以下不同组成的流动相进行了考察: ① V(0.02 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): V( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) = 55:45; ② V(0.02 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): V( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) = 70:30; ③ V(0.02 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): V( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) = 60:40; ④ V(0.02 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): V( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) = 61:39, 每 500 mL 流动相中加入 0.2 mL 70%  $\text{HClO}_4$  和 0.4 mL 20% 三乙胺。

在流动相为①的条件下, 衍生物腙与过量的香草醛都出峰太快, 二者分离不完全, 在流动相为②与③的条件下, 腙先流出色谱柱, 其次是过量的香草

醛,这样不利于操作和观察;在流动相为④的条件下,色谱峰峰形好、分离完全,过量的香草醛与生物胺依次流出色谱柱,保留值分别为香草醛 8.45 min,胺 11.09 min,因此选定流动相④。

### 3.3 实际应用

健康受试者 10 人,男性,25 岁~36 岁,体重 55 kg~67 kg,单剂量口服国产异烟肼片剂 250 mg,于服药后 0 h,0.33 h,0.67 h,1 h,2 h,3 h,4 h,5 h,7 h,9 h,12 h 和 24 h 12 个时间点分别抽取静脉血,测定 24 h 内血液中异烟肼质量浓度的变化。INH 血液浓度随时间的变化曲线见图 3。

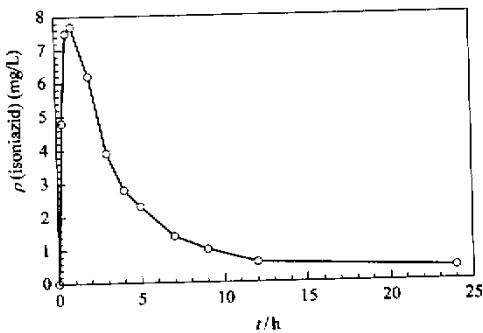


图 3 异烟肼的代谢曲线

Fig.3 The pharmacokinetic curve of isoniazid in blood

测定结果显示:该方法灵敏度高、选择性好,足以满足治疗量范围内的测试要求。在全程监测的时间范围内,测试不受内源性杂质、INH 代谢成分及过量衍生生化试剂的干扰。

我们还对常与之同用的利福平、吡嗪酰胺两药物进行了干扰测试,在“1.5”节所述色谱条件下,无利福平、吡嗪酰胺色谱峰出现。所以该方法可在利福平、吡嗪酰胺同时存在的情况下对血浆、尿液中的 INH 进行定性、定量分析。测试尿液样品时,应视样品中药物含量对尿液适当稀释。

### 参考文献:

- [1] JIAO Xiao-ling, YANG Yu-zhang, WANG Ji-min, WANG Xiao-miao, XIAO Yue-ping, AI Min, REN Li-Ping, MA En-bo, YANG Zhan-bin. Chinese Journal of Pharmacoepidemiology, 1995, 4(2): 77  
焦小玲,杨毓章,王济民,王小森,肖跃平,爱民,任利平,马恩博,杨占斌. 药物流行病学杂志, 1995, 4(2): 77
- [2] WANG Ying-yuan, YUN Ke-ming, LI Gui-ming, WANG Yu-jin, ZHANG Lian-shan, ZHANG Ju-liang. Chinese Journal of Forensic Medicine, 1997, 12(3): 158  
王英元,负克明,李贵明,王玉谨,张连山,张菊亮. 中国法医学杂志, 1997, 12(3): 158
- [3] Karlaganis G, Peretti E, Lauterburg B H. J Chromatogr, 1987, 420: 171
- [4] ZHANG Liang, HANG Tai-jun, BI Bao-ying. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 1999, 16(6): 41  
张亮,杭太俊,毕宝英. 中国现代应用药理学, 1999, 16(6): 41
- [5] Gaitonde C D, Pathak P V. J Chromatogr, 1990, 532: 418
- [6] Walubo A, Chan K, Wong C L. J Chromatogr, 1991, 567: 261
- [7] PANG Qing-yun, LU Yan, YU Li, DAI Hong, TIAN Hong-zhao. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 1998, 18(4): 259  
庞青云,陆岩,余立,代红,田洪昭. 药物分析杂志, 1998, 18(4): 259
- [8] CHENG Hui-yue. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2000, 20(3): 186  
程辉跃. 药物分析杂志, 2000, 20(3): 186
- [9] Gupta R N, Lew M. J Chromatogr, 1988, 425: 441
- [10] Lacroix C, Laine G, Gouille J P, Nouveau J. J Chromatogr, 1984, 307: 137