

UPLC-MS/MS 同时测定结核患者体内异烟肼、利福平的浓度

张瑞雨¹, 师真¹, 李文廷¹, 农蕊瑜¹, 李明武^{2*} (1. 昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228; 2. 昆明市第三人民医院, 昆明 650041)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测结核患者体内异烟肼、利福平的浓度。**方法** 血液经过蛋白沉淀,以对乙酰氨基酚为内标采用 Thermo Synchronis C₁₈ 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱分离,以甲醇和醋酸水溶液(0.1%)梯度洗脱进行 UPLC-MS/MS 检测。**结果** 异烟肼在 0.05 ~ 5 μg · mL⁻¹ 内,利福平在 0.01 ~ 10 μg · mL⁻¹ 内响应值与质量浓度呈良好线性关系,相关系数均大于 0.999 0,加标回收率分别为 100.5% ~ 102.5% 和 92.0% ~ 96.4%,检出限分别为 0.05 和 0.01 μg · mL⁻¹,相对标准偏差(RSD)分别为 0.5% ~ 4.3% 和 1.1% ~ 3.9%。**结论** 采用内标法建立了可同时定量检测 INH 和 RFP 的检测方法,该方法特异性好、灵敏度高、重现性和准确度可靠,可用于检测结核患者血液中 INH 和 RFP 的浓度。

关键词: 异烟肼; 利福平; 结核患者; 超高效液相色谱-串联质谱法

doi:10.11669/cpj.2019.05.009 中图分类号:R969 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)05-0407-04

Simultaneous Determination of Isoniazid and Rifampin in Tuberculosis Patients by UPLC-MS/MS

ZHANG Rui-yu¹, SHI Zhen¹, LI Wen-ting¹, NONG Rui-yu¹, LI Ming-wu^{2*} (1. *Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China*; 2. *Third People's Hospital of Kunming, Kunming 650041, China*)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish an UPLC-MS/MS method for the determination of isoniazid and rifampin in tuberculosis patients. **METHODS** The blood protein was precipitated by methanol after adding acetaminophen as internal standard, chromatography separation was performed on Thermo Synchronis C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), gradient elution was conducted using methanol and acetic acid aqueous solution(0.1%) as mobile phase, and MS/MS was used for detection. **RESULTS** The correlation coefficients were greater than 0.999 0 for isoniazid in the range of 0.05 - 5 μg · mL⁻¹ and rifampin in the range of 0.01 - 10 μg · mL⁻¹, the recoveries were 100.5% - 102.5% and 92.0% - 96.4%, the limits of detection were 0.05 and 0.01 μg · mL⁻¹, and the relative standard deviations (RSDs) were 0.5% - 4.3% and 1.1% - 3.9%, respectively. **CONCLUSION** The established internal standard method can simultaneously detect rifampin and isoniazid with good specificity, high sensitivity, reproducibility and accuracy, which can be used to determine the blood concentrations of rifampin and isoniazid in tuberculosis patients.

KEY WORDS: isoniazid; rifampin; tuberculosis patient; UPLC/MS/MS

在 2016 年发病的 1 040 万结核病患者中,有 56% 来自中国等 5 个国家,有 60 万是对利福平有耐药的患者,其中 49 万是耐多药性结核病^[1]。治疗结核病需要长期联合用药,新型抗结核药物的研制近年来并没有明显进展,一线抗结核药物至今仍发挥巨大作用,最常见的一线抗结核药有异烟肼(isoniazid,INH)和利福平(rifampicin,RFP)的联合用药,监测患者服药后的血药浓度是否达到最低抑菌浓度、或浓度过高损害肝脏及产生耐药性,具有重要意义。

有文献[2-3]报道的柱前衍生法、反相 HPLC^[4]及常见的 HPLC-ELSD^[5],UPLC-MS/MS 全国仅有少量文献[6-8]报道,本实验建立的 UPLC-MS/MS 一次抽血同时检测患者体内的 INH 和 RFP 浓度,对结

核病患者在治疗过程中临床选择维持、加大或减少用药剂量提供了科学数据。

1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,1290)、质谱分析仪(美国 AB 公司,SCIEX 4500QTRAP)、高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司,3H16121)、电子天平(Sartorius 公司,BS223S)。

异烟肼(INH 100578-201502,99.8%),利福平(RFP 130496-201403,98.8%)购自中国食品药品检定研究所。内标物对乙酰氨基酚(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,C15846000,色谱纯),甲醇、甲酸为色谱纯,一级纯水由终端机(Sartorius

基金项目: 昆明市科技计划重点项目“异烟肼、利福平不同剂型在肺结核治疗中的差异性研究资助(2015-2-S-01429)”

作者简介: 张瑞雨,男,中级理化检验技师 研究方向:理化检验 * 通讯作者:李明武,男,主任医师 研究方向:疑难结核病 Tel:13888428068 E-mail:ynkmlmw@sina.com

arium opro DI,电阻率 18.2 MΩ · cm) 制得。

2 试验方法

2.1 溶液配制

精密称取各个对照品适量,加体积分数 50% 甲醇溶解,定量配制成质量浓度分别为 INH 10.00 μg · mL⁻¹、REP 30.00 μg · mL⁻¹ 的标准储备液。精密称取内标 IS 适量,加甲醇溶解,定量配制成质量浓度为 20 μg · mL⁻¹ 的内标储备液,储备液置于 -20 °C 保存。临用前用体积分数 50% 甲醇稀释至所需浓度。

2.2 血样处理

涡旋混匀血样,取 200 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入 200 μL 内标,加入 780 μL 甲醇,涡旋 1 min,离心 10 min (12 000 r · min⁻¹, 4 °C),取上清液 400 μL,加一级纯水 800 μL,涡旋 1 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤,进样 5 μL。以上操作除质谱分析外均在生物安全二级实验室生物安全柜内操作。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Thermo Synchronis C₁₈ 柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温为 35 °C,流动相 A 为甲醇溶液,B 为乙酸水溶液 (0.1%),采用梯度洗脱:0 ~ 2.5 min,95% B;2.5 ~ 5.0 min,83% B;5.0 ~ 6.0 min,65% B;6.0 ~ 8.0 min,30% B;8.0 ~ 9.0 min,10% B;9.0 ~ 10.0 min,95% B。流速为 0.40 mL · min⁻¹,进

样体积 5 μL。

2.4 质谱条件

离子源:电喷雾离子源 (ESI);电喷雾电压 (IS):5 500 V;去溶剂温度 (TEM):550 °C;雾化器压力 (GS1):55 kPa;辅助气压力 (GS2):55 kPa;入口电压 (EP):10 V;碰撞室出口电压 (CXP):14 V;扫描方式:INH、REP、IS 均为正离子 MRM 扫描监测;雾化气,气帘气,碰撞气由氮气发生器产生;定性离子对,定量离子对,去簇电压及碰撞能量见表 1。

3 试验结果

3.1 特异性

空白血液、空白血液加入 INH 和 RFP、患者服药血液,分别按“2.2”项下方法处理、分析,色谱图见图 1,异烟肼、内标物、利福平的保留时间分别为 1.39、3.57 和 7.54 min,峰形良好,血液中的内源性物质不干扰检测。

表 1 异烟肼、利福平、乙酰氨基酚质谱参数

Tab. 1 Mass spectrum parameters of isoniazid, rifampicin, acetaminophen

Compound	Q1 (m/z)	Q3 (m/z) ¹⁾ /Q3 (m/z)	DP/eV	CE/eV
Isoniazid	138.1	121.1 ¹⁾ /93.1	40	28
Rifampicin	823.4	791.4 ¹⁾ /399.0	127	23
Acetaminophen	152.1	110.0 ¹⁾ /93.0	64	21

注:¹⁾定量离子

Note:¹⁾quantitative ion

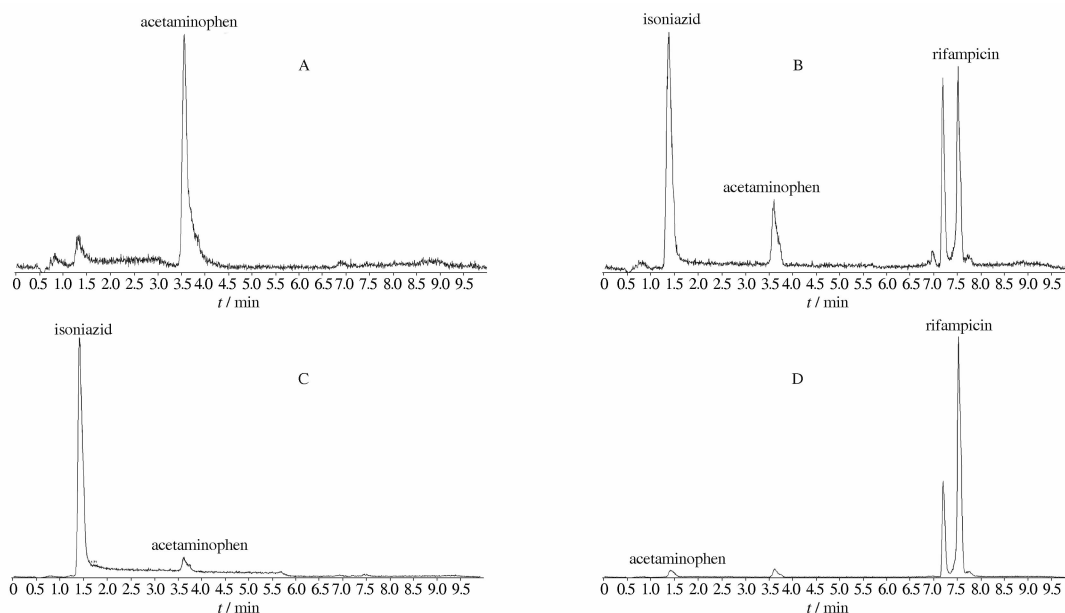


图 1 空白血液 (A), 空白血液加入 INH 和 RFP (B)、患者服异烟肼血液 (C) 和患者服利福平血液 (D) 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank blood (A), blank blood spiked with INH and RFP (B), blood after patient taking INH (C) and RFP (D)

3.2 标准曲线与检出限

配制质量浓度为 0.05 ~ 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列的 INH, 0.01 ~ 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列的 RFP 按“2.2”项下方法处理分析, 以血液中目标物的质量浓度(ρ)为横坐标, 目标物与内标峰面积之比(Y)为纵坐标进行加权回归, 曲线呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.999。以 $S/N \geq 3$ 计, INH 和 RFP 取样量为 200 μL 时检出限分别为 0.05 和 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 见表 2。

3.3 精密度与准确度

用空白血液分 3 组每组 6 份加入高、中、低浓度的标准溶液, 连测 3 d, 分别考察日内和日间精密度与准确度。结果见表 3。

3.4 稳定性考察

分别考察质控血样在室温下放置 24 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻后 20 $^{\circ}\text{C}$ 解冻 24 h、7、14、28 d, 得到 5 组结果见表 4。在以上各储存条件下测定值与理论值之间的

偏差均符合要求, 血样在上述条件下的稳定性良好。

4 讨论

4.1 样品处理

在血样沉淀蛋白方面, 比较过甲醇和乙腈, 2 种试剂净化效果相近, 考虑到检测人员的健康问题, 最后选择甲醇。加入内标后 UPLC-MS/MS 定量比直接外标法定量更加准确。前处理过 0.22 μm 滤头不影响后续检测但能保护检测仪器和柱子不易堵塞, 流动相加入适量醋酸溶液能明显改善峰形。

4.2 实验结果应用

本方法检出限 INH 为 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、REP 为 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与已有报道文献相比均优于 INH 0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、REP 0.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [7] 和 INH 0.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、REP 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [8]。选取 50 例我市传染病医院服用 2 种抗结核药的患者血液,

表 2 2 种抗结核药的线性方程和检出限

Tab. 2 Linear equations and detection limits of the two antituberculosis drugs

Compound	Linear equation	ρ Linear range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	r	ρ Detection limit/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Isoniazid	$y = 2.2519 \times 10^7 \rho + 1002$	0.05 - 5	0.9995	0.05
Rifampicin	$y = 6.2462 \times 10^4 \rho - 96$	0.01 - 10	0.9991	0.01

表 3 异烟肼、利福平测定的精密度和准确度

Tab. 3 Precision and accuracy of isoniazid and rifampicin

Compound	ρ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%		Accuracy /%
		Intra-day ($n = 6$)	Inter-day ($n = 18$)	
Isoniazid	0.10	4.3	8.2	102.5
	1.00	2.2	4.0	101.6
	5.00	0.5	3.5	100.5
Rifampicin	0.05	3.9	6.9	92.3
	0.10	1.3	4.6	92.0
	10.00	1.1	4.8	96.4

表 4 异烟肼、利福平的稳定性考察

Tab. 4 Stability of isoniazid and rifampicin

Condition		INH		RFP	
		1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
24 h at room temperature	RSD/%	4.0		3.2	
	Accuracy/%	102.6		93.6	
Thawing after 24 h	RSD/%	6.5		2.1	
	Accuracy/%	110.2		95.2	
Thawing after 7 d	RSD/%	5.5		5.8	
	Accuracy/%	108.2		92.1	
Thawing after 14 d	RSD/%	8.9		9.6	
	Accuracy/%	96.2		89.2	
Thawing after 28 d	RSD/%	12.6		10.1	
	Accuracy/%	90.1		90.3	

按本方法测定,INH 质量浓度 $0.2 \sim 4.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、REP 质量浓度 $0.4 \sim 9.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 均在标准曲线范围内。本实验建立的取少量血样可同时检测 2 种常见抗结核药物的方法,检测前处理简单,分析周期短,样品储存稳定性好,适合大批量检测血样,检出限和检测范围均符合临床检测需要。

5 结论

本实验利用 UPLC-MS/MS,采用内标法定量建立了可同时检测 INH 和 RFP 的检测方法,该方法特异性好、灵敏度高、重现性和准确度可靠,可用于检测结核患者血液中 INH 和 RFP 的浓度。

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017[EB/OL]. WHO, 2017, [2017-10-10]. https://www.who.int/tb/publications/global_report/zh/
- [2] CHENEVIER P, MASSIAS L, GUEYLARD D, *et al.* Determination of ethambutol in plasma by high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization[J]. *J Chromatogr B*, 1998, 708: Doi. 10. 1016/s0378-4347 (97) 00641-5.
- [3] GUO T, YAN M, SONG H T, *et al.* HPLC Determination of active components in Yi'an Biqin Lifu Yiyao tablets[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(4):528-531.
- [4] QI Y, YANG Q Y, WU S. Ion pair RP-HPLC Determination of ethambutol hydrochloride in the combined preparation of antituberculous[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(4):645-647.
- [5] LIU X Q, WU S P, LI X, *et al.* HPLC-ELSD Determination of content and dissolution of ethambutolhydrochloride tablets [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(5):804-806.
- [6] WU L, SU M X, DI B, *et al.* Concentration determination of ethambutol in human plasma by LC-MS/MS [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志), 2009, 28(11):852-855.
- [7] ZHAO G R, PENG M L, SHEN J, *et al.* Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide and levofloxacin in human plasma by HPLC-MS/MS [J]. *Chin J Drug Appl Monitor*(中国药物应用与监测), 2015, 12(1): 16-19.
- [8] AN J, DONG Z J, ZHANG X D, *et al.* Simultaneous determination of six antituberculosis drugs in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2016, 36(2): 208-216.

(收稿日期:2018-05-22)