

# 高效液相色谱法测定6例慢性阻塞性肺病患者血中尼可刹米浓度

陈秋潮、周闻天、李华德 (上海医科大学附属中山医院, 上海 200032)

**提要** 本文报道人体尼可刹米血浓度测定的高效液相色谱法及色谱条件、血浆中样品的提取与分离、回收率和药物干扰性试验等。本法简便、快速、专一性强, 为尼可刹米血浓度测定及其体内动力学研究提供了可靠的分析手段, 定量探讨了6例呼吸衰竭患者血药浓度与药物作用强度及不良反应间的关系。

**关键词** 尼可刹米; 高压液相色谱法; 阻塞性肺疾病

尼可刹米(nikethamide, Nik)是治疗慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)呼吸衰竭的常用药物之一。但长期来在剂量和给药方案及对其评价<sup>(1-3)</sup>不尽一致, 这与缺乏客观血浓度与药理效应对照资料有关。Lewis等曾用气相色谱法测定Nik及其代谢产物在犬血和尿中浓度, 提出在犬中平均致惊厥剂量(50 mg/kg)的半衰期为1.5 h<sup>(4)</sup>, 然而有关Nik在人体中的血药浓度及与药效学

相关性等未见有文献报道。本文介绍高效液相色谱法(HPLC)测定Nik血浆浓度方法, 为进一步研究药物动力学和药效学提供分析手段。并在6例COPD呼吸衰竭患者中定量探讨了血药浓度与药物作用强度及不良反应间的关系, 供临床用药参考。

## 材 料

Nik标准品由上海第十制药厂提供。内标物氨苯砒(dapsonum)由上海第二制药厂提供。其他试剂均系AR。YSB-2型平流泵高效液相色谱仪系中国科学院上海分院科学仪器厂产品, 选用紫外检测器, 波长254 nm。层析柱150×5 mm, 预柱50×5 mm, 固定相YWG C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>(10 μm)由天津市化剂二厂生产。色谱数据处理机CDMC-1, 上海计算技术研究所生产。753 W型可见-紫外分光光度计, 上海光学仪器厂制造。

## 方法与结果

**紫外吸收图谱** 配制 Nik 水溶液 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，用手动扫描法测定 200–300 nm 的紫外吸收值(图 1)，Nik 另一吸收峰( $\lambda_{\text{max}}$ )为 260 nm，可选用 254 nm 为本法检测波长。

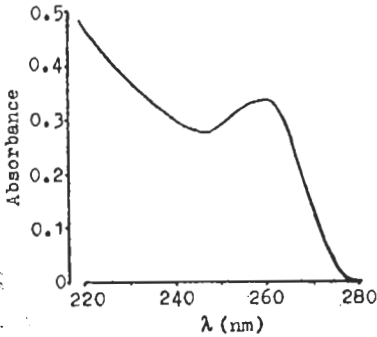


Fig 1. Absorption spectra of nikethamide

### 血药浓度测定

1. 标准液及内标液的配制 精密称取 Nik 和氨苯砞各 10 mg，分别加重蒸馏水与乙醇溶解后配制成 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  标准溶液，4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

2. 醋酸钠-醋酸缓冲液配制 称取醋酸钠 4.10 g，吸取冰醋酸 5 ml，加重蒸馏水至 1000 ml，混匀，配成 0.05 mol/L 的 pH 4.5 缓冲液，室温保存。

3. 流动相配制 流动相为：甲醇：醋酸钠-醋酸缓冲液 (vol : vol) = 42 : 58。

4. 色谱条件 流速 = 1 ml/min，泵压 70–80 kg/cm<sup>2</sup>，灵敏度 0.02 OD，纸速 24 cm/h，Nik 与内标的保留时间分别为 8.75 和 6.00 min，最小检测限为 10 ng。

5. 血浆样品的提取与分离 取肝素抗凝血浆 1 ml，加入 Nik 和内标各 100  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 后，加 5 mol/L 的三氯醋酸溶液 50  $\mu\text{l}$ ，在漩涡混合器上振荡 20 s，离心 3500  $\times g$  10 min，取上清液 5  $\mu\text{l}$  进样。

6. 血浆 Nik 标准曲线谱 取 10 ml 具塞试管 6 支，分别加入 Nik 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  标准溶液 10, 50, 100, 200, 300, 400  $\mu\text{l}$  与内标溶液

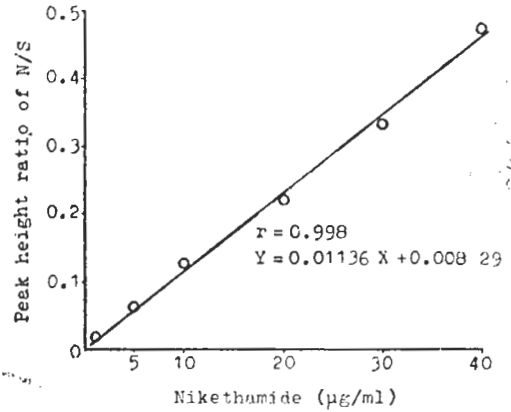


Fig 2. Correlation between Nik (N) plasma concentration and peak height ratio of Nik/internal standard S (dapsonum)

(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 200  $\mu\text{l}$ ，水浴下氮气吹干后，各加正常人血浆 1 ml，5 mol/L 的三氯醋酸 50  $\mu\text{l}$  振荡，离心后取上清液 5  $\mu\text{l}$  进样，将标准样品与内标物峰高之比值，色谱数据处理机处置，与血浓度绘制标准曲线图谱， $r = 0.998$ ， $Y = 0.011 36 X + 0.008 29$  (图 3 A)

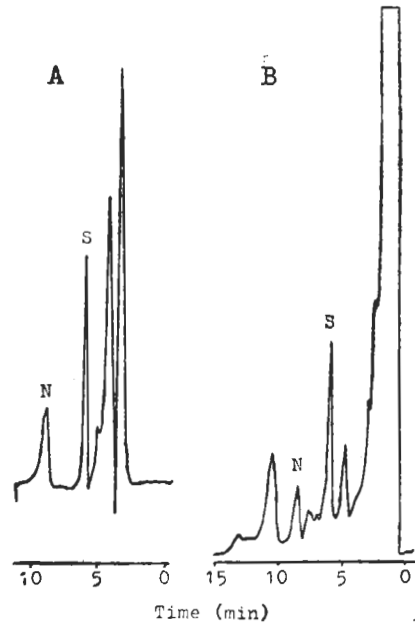


Fig 3. (A) Representative chromatogram of a plasma sample containing internal standard (S) and Nik (N) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . (B) Liquid chromatogram of the plasma extracted from a patient having received Nik for 3 d. The metabolite of Nik did not affect the peak of unchanged Nik.

7. 回收率 1天内回收率,取1ml血浆5份,各加Nik 100  $\mu$ l(100  $\mu$ g/ml)和内标200  $\mu$ l(100  $\mu$ g/ml),按上法提取分离后进HPLC分析,将标准品峰高值与内标峰高值之比代入上述标准曲线的直线方程中,计算得平均回收率为 $98.5 \pm 2.5\%$ , $CV\% = 2.5$ 。4d间回收率,另按相同剂量与方法,每天提取、测定1次,连续4d,平均天间回收率 $96 \pm 3\%$ , $CV\% = 3.7$ 。

8. 药物干扰性试验 考虑到和Nik可能同时伍用的药物有盐酸多巴胺,重酒石酸间羟胺,盐酸去氧肾上腺素,重酒石酸去甲肾上腺素,潘生丁,硫酸阿托品,山梗菜碱,氨茶碱,在相同色谱条件下均不干扰Nik的出峰。

取接受Nik治疗后的病人血浆1ml,提取分离后进样,所得色谱峰清晰,不受血浆峰或其它代谢产物峰的干扰(图3B)

**临床观察** 我们在6例Nik治疗COPD并发失代偿呼吸衰竭患者中进行血浓度测定,观察血浓度与通气量,副作用的关系,6人均男性,年龄56-74( $62 \pm 7$ )岁,体重50-72.5( $59 \pm 10$ )kg。用药方法:Nik置于500ml葡萄糖液中,以2ml/min速度连续静脉滴注4h,平均剂量 $18.60 \pm 0.08$  mg/(kg·h),分别于用后2和4h自股动脉取血2ml,立即离心,3500  $\times$  g,10 min,吸出血浆置低温冰箱保存,待分析。同时测定每分通气量,并与治疗前对照水平比较,其差值作为药物作用强度的标志。测定结果,2h和4h平均血浓度为 $62 \pm 17$ (42-90)和 $119 \pm 42$ (90-203  $\mu$ g/ml)每分通气量增加值分别为 $33 \pm 19\%$ 和 $42 \pm 19\%$ 。在静脉滴注2h中未出现不良反应,而到了4h左右,病人均表现出皮肤搔痒,出汗等不良反应。

## 讨 论

本文采用HPLC测定Nik的血浓度,具有

快速、精密、专一等优点。血浆经三氯醋酸沉淀蛋白质后可直接进样分析,比用有机溶剂提取法更简便,省时。血浆中最低检测浓度为2  $\mu$ g/ml,而用HPLC测定Nik血浓度国内外文献未见报道。因此本法为临床血液监测及药物动力学研究提供了准确、可靠的分析手段。

本文从6例临床COPD病人的观察结果表明,Nik iv gtt期间血浆药物浓度有累积现象,4h与2h相差约1倍。各例所用剂量基本相同,但个体间血浓度差异范围可达100%。提示病人之间药物体内代谢存在差异,可部分解释临床上常用剂量及疗效存在个体差异的原因。本组资料显示Nik有效浓度为40-90  $\mu$ g/ml,此范围内可见通气量明显增加而无不良反应出现。超过90  $\mu$ g/ml血浓水平,即可发生皮肤搔痒,出汗等不良反应。可见Nik治疗安全范围比较狭窄,临床用药须在密切观察下调节给药速率和剂量,以取得最佳疗效避免副作用。Nik血浆浓度与疗效,毒性之间有一定相关性,故如有条件作血液浓度监测,当可指导临床安全有效地用药。

## 参 考 文 献

- 1 Woolf CR. The use of respiratory stimulant drugs. *Chest* 1970; 58 : 49
- 2 Muiasan G, Sorbini CA, Grassi V, et al. A controlled study of three respiratory stimulants in chronic respiratory failure. *Dis Chest* 1969; 55 : 18
- 3 Muiasan G, Sorbini CA, Grassi V, Solinas E, Motolese M. Statistical evaluation of the action of three different respiratory analgesics on pulmonary ventilation. *Ibid* 1967; 52 : 141
- 4 Lewis JH. Determination of nikethamide and N-ethylnicotinamide in the blood and urine of greyhounds. *J Chromatogr* 1979; 172 : 295

## HPLC determination of nikethamide concentration in plasma of 6 patients with chronic obstructive pulmonary disease

CHEN Qiu-Chao, ZHOU Wen-Tian, LI Hua-De

(Zhongshan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

**ABSTRACT** A rapid and quantitative analytical method for determination of nikethamide in human plasma was reported. High performance liquid chromatograph model KYS (Shanghai) fitted with a reversed-phase YWC C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> (10 μg) column and equipped with a 254 nm uv detector was used. The mobile phase consisted of 42% methanol, 58% 0.05 mol/L sodium acetate-acetic acid buffer (pH 4.5). Dapsonum was used as an internal standard. The retention time for nikethamide and internal standard were 8.75 and 6.00 min, respectively. The sensitivity was 10 ng or 2 μg/ml nikethamide in plasma. The within-day recovery rates and CV were 98.5±2.5 and 2.5%; and those

of between-days were 96±4 and 3.7%, respectively.

Nikethamide was given by iv dipping at the rate of 18.4-18.8 mg/(kg·h) to 6 patients with COPD (chronic obstructive pulmonary disease). At the end of 2 and 4 h, the concentration of nikethamide were 62 ±17 and 119±42 μg/ml, respectively. The increase of the minute ventilation was 33±19 and 42±19%, respectively. Mild side-effects were seen when the nikethamide plasma concentration reached 90 μg/ml.

**KEY WORDS** high pressure liquid chromatography; nikethamide; obstructive lung diseases