

## 高效液相色谱法测定非离子造影剂欧乃帕克

朱秋毓, 顾勇, 丁峰, 林善锁

(复旦大学附属华山医院肾病科, 上海 200040)

**摘要** :建立了一种快速、灵敏的细径柱高效液相色谱测定非离子造影剂欧乃帕克的方法。用高氯酸去除血浆蛋白, 流动相采用简单的 7% (体积分数) 甲醇水溶液体系。方法的线性范围为 0.5 ~ 500 mg/L, 相关系数大于 0.999 8。欧乃帕克的最低检测量为 154 pg, 保留时间为( 3.46 ± 0.02 ) min, 总分析时间少于 5 min。日内、日间相对标准偏差( RSD )分别小于 4.3% 和 11.4%。方法的平均回收率大于 91.51%。

**关键词** :高效液相色谱法; 细径柱; 非离子造影剂; 欧乃帕克

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713( 2004 )01-0036-02

## Determination of Iohexol by High Performance Liquid Chromatography

ZHU Qiuyu, GU Yong, DING Feng, LIN Shantan

( Department of Nephrology, Affiliated Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China )

**Abstract** : A fast, sensitive and reproducible method for the determination of iohexol by high performance liquid chromatography with narrow-bore column was developed. The method involved one step deproteinization of plasma by perchloric acid and a simple, isocratic elution system of 7% ( v/v ) methanol solution. The linearity of the method ranged from 0.5 to 500 mg/L of iohexol with a correlation coefficient of more than 0.999 8. Minimum detection limit was 154 pg of the agent in plasma. Retention time for the contrast medium in the elution system was ( 3.46 ± 0.02 ) min and a single run was less than 5 min. The relative standard deviation of iohexol in peak area was less than 4.3% for run to run within a day and 11.4% for day to day operations. The recoveries of iohexol in plasma were over 91.51% at low, middle and high concentrations.

**Key words** : high performance liquid chromatography; narrow-bore column; non-ionic contrast medium; iohexol

欧乃帕克是一种非离子造影剂。大量的临床实践表明该药物在反映残余肾功能方面同其他经典的同位素造影剂如<sup>51</sup>Cr-乙二胺四乙酸( EDTA )、<sup>125</sup>I-Iothalamate 等可靠性相同<sup>[1-3]</sup>。由于欧乃帕克独有的低肾毒性、非放射性、低过敏性等特点, 近来已逐步成为测定肾小球滤过率( GFR )的首选药物。

文献报道测定欧乃帕克的方法主要包括高效液相色谱法( HPLC )<sup>[4-6]</sup>、毛细管电泳法( CE )<sup>[7,8]</sup>、X-射线荧光法<sup>[9]</sup>及早期的化学方法<sup>[10]</sup>。后两种方法由于分析灵敏度低, 目前已较少应用。CE 虽然灵敏度高, 但重复性较差, 加之普及率不高, 使其应用受到一定限制。相比而言, HPLC 法由于灵敏度及重复性等均能满足分析要求, 因而更易为临床所接受。但文献报道的方法多采用标准口径的色谱柱, 试剂消耗量大、分析成本高, 所用流动相多为含盐缓冲液, 对仪器有损害。我们改用细径柱进行分析, 并

采用简单的甲醇-水流动相, 获得了理想的结果。

### 1 实验

#### 1.1 试剂

高氯酸( PCA, 分析纯)、甲醇( HPLC 纯) 购自上海化学试剂公司。欧乃帕克标准品购自 Nycomed 公司。三重蒸馏水用于配制所有溶液。

#### 1.2 欧乃帕克标准液与样品制备

欧乃帕克标准溶液: 取适量欧乃帕克标准品( 747 g/L ), 用水稀释至 10 g/L 作为储备液, -4 °C 保存。用水将储备液依次稀释至 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 250 和 500 mg/L 作为工作液, -4 °C 冷藏。

血浆样品: 吸取 100 μL 肝素化血浆置于 Eppendorf 管内, 加入 300 μL 8% ( 体积分数 ) PCA。将其于漩涡混合器上剧烈震荡 1 min 后, 以 7 500 r/min 离心 5 min。取上清液直接作 HPLC 分析。

### 1.3 仪器与色谱条件

Agilent 1100 型 HPLC 仪, 配备有 G1311A 型四元泵、G1322A 型脱气机、G1313A 型自动进样器及 G1314A 型可变波长紫外检测器(池体积为 14  $\mu\text{L}$ )。检测波长设定在 254 nm。色谱柱为 Hypersil C18 100 mm  $\times$  2.0 mm i. d. 3  $\mu\text{m}$ (大连依利特公司)。流动相为 7%(体积分数)的甲醇水溶液, 用前经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜(Millipore, USA)过滤; 流速 0.25 mL/min。进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。柱温为 35  $^{\circ}\text{C}$ 。

所有色谱数据均由 Agilent 化学工作站(Version A. 09.01)按峰高进行定量计算, 其结果表示为均值  $\pm$  标准差(SD)。统计分析用配对学生  $t$  检

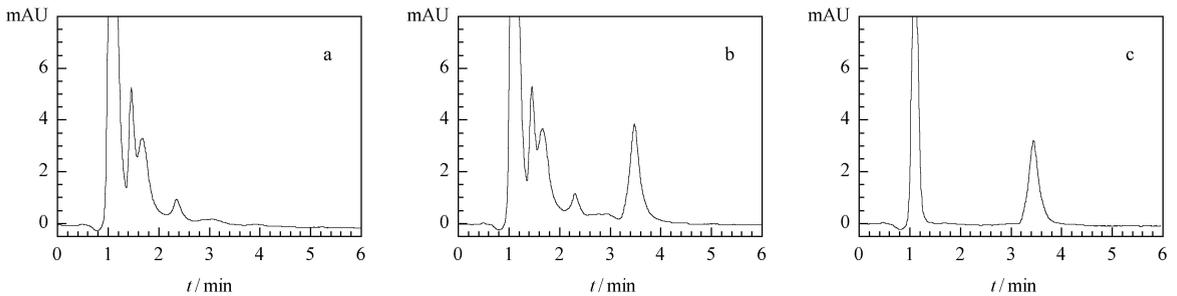


图 1 血浆空白(a)、欧乃帕克血浆样品(b)和欧乃帕克标准溶液(c)的色谱分离图

Fig. 1 Chromatograms of plasma blank (a), iohexol standard in plasma (8.8 mg/L) (b) and iohexol standard in water (8.8 mg/L) (c)

### 2.2 回收率与精密度

取 100  $\mu\text{L}$  混合血浆, 分别添加欧乃帕克标准液, 使其质量浓度达到 1, 50, 200 mg/L(最终浓度)。同上用 PCA 去蛋白操作等进行回收率测试, 结果表明平均回收率大于 91.51%(表 1)。日内和日间的精密度测定结果分别小于 4.3% 和 11.4%。

表 1 血浆中欧乃帕克的回收率及测定精密度  
Table 1 The recovery of iohexol in plasma and methodological precision

Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/%	
			run to run (n = 6)	day to day (n = 4)
0	0	-	-	-
1	0.915 1	91.51	4.26	11.4
50	50.66	101.3	1.76	3.66
200	205.6	102.8	1.66	5.17

### 2.3 样品稳定性和色谱柱寿命

对欧乃帕克样品(1 mg/L)每隔 6 h 测定 3 次, 连续测定 24 h 以观察其稳定性。结果表明该药物非常稳定, 即便置于室温也无任何降解变化(按峰高均值进行比较, 第 0 h 与第 24 h 的峰高均值为 0.345 与 0.358( $P > 0.05$ ))。

用理论塔板数( $N$ )来衡量色谱柱寿命。首次与经 600 次进样后的  $N$  值分别为 2 641/m 与 2 438/m ( $P > 0.05$ )。经 900 次进样后  $N$  值下降至 2 300/m。

验  $P < 0.05$  表明有统计差异。

## 2 结果

### 2.1 色谱图、线性方程及检测限

色谱分离图见图 1。欧乃帕克的保留时间为 (3.46  $\pm$  0.05) min, 总分析时间为 4.8 min。以峰高  $y$  对欧乃帕克质量浓度  $x$  进行线性回归, 在 0.5 ~ 500 mg/L 线性关系良好, 其回归方程为:  $y = -0.6002 + 0.2897x$ , 相关系数大于 0.9998 ( $n = 4$ ); 在血浆中的最低检测量为 154  $\mu\text{g}$ (信噪比  $S/N \geq 3$ ), 比文献 [6] 的灵敏度(最低检测量 7.5 ng)提高了近 50 倍。

## 3 讨论

用 PCA 一步沉淀蛋白质, 较之乙腈的去蛋白作用更为彻底, 简单的流动相组成、低流速及 1  $\mu\text{L}$  的进样量减少了样品或流动相中杂质对色谱柱的污染, 延长了柱的使用寿命。该法快速、简便和灵敏, 可应用于临床检测 GFR、药代动力学研究等工作。

### 参考文献:

- [1] Johnsson E, Attman P O, Samuelsson O, Haraldsson B. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14(10): 2407
- [2] Shi Hao, Chen Nan, Chen Xiaonong, et al. Vth Congress of Chin Soc Nephrol Abs(史浩, 陈楠, 陈晓农, 等. 第 6 届中国肾脏病学会会议论文汇编), A001. 2002
- [3] Swan S K, Halstenson C E, Kasiske B L, Collins A J. Kidney Int, 1996, 49(1): 232
- [4] Agasoster T, Biomed B. J Chromatogr B, 1998, 716: 293
- [5] Bourrinet P, Feldman H, Dencausse A, Chambon C, Bonnemain B. J Chromatogr B, 1995, 670(2): 369
- [6] Harapanhalli R S, Yaghmai V, Patel Y D, Baker S R, Rao D V. Anal Chem, 1993, 65: 606
- [7] Rocco M V, Buckalew V M Jr, Moore L C, Shihabi Z K. Am J Kidney Dis, 1996, 28(2): 173
- [8] Shihabi Z K, Constantinescu M S. Clin Chem, 1992, 38(10): 2117
- [9] Brown S C W, O'leily P H. J Urol, 1991, 146(3): 675
- [10] Back S E, Masson P, Nilsson-Ehle P. Scand J Clin Lab Invest, 1988, 48(8): 825