

反相高效液相色谱法测定人血中利福平浓度

陈赛贞¹, 袁国平², 胡大平¹, 陈越斌¹ (1. 浙江省台州医院临床药学实验室, 台州 317000; 2. 浙江省台州市药检所, 台州 317000)

摘要 目的: 建立测定人血清中利福平浓度的高效液相色谱法(HPLC)。方法: 血清加 4 倍量的甲醇沉淀后离心, 取上清液用 0.45 μ 微孔滤膜滤过后进样。采用 Nova- Pak C₁₈ 柱, 以甲醇- 醋酸盐缓冲液(62: 40) 为流动相, 氯氮 作为内标, 在 334nm 波长处测定。结果: 利福平的线性范围为 1~25 μ g/ml, 平均回收率为 (100.9 \pm 4.2)% , 日内、日间 RSD 均小于 4%。最低检测限为 0.5 μ g/ml (信噪比 \geq 3)。结论: 本法简便、可靠, 适用于临床监测。

关键词: 利福平; 高效液相色谱法; 血药浓度

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0111(2000) 04- 0225- 03

Determination of rifampicin concentration in human serum by RP- HPLC

CHEN Sai-zhen¹, YUAN Guo-ping², HU Da-ping¹, CHEN Yue-bin (1. Department of Clinical Pharmacy, Taizhou Hospital of China, Taizhou 317000, China; 2. China taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 317000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To determine the concentration of rifampicin in human serum by RP- HPLC. **METHODS:** Serum was precipitated with centrifugation after added 4 times of methanol, and its supernatant clear fluid was injected after filtration with 0.45 μ micro-pore filter membrane. The method used Nova- Pak C₁₈ column as chromatogram column, methanol- acetate buffer solution as flow phase, chlordiazepoxide as internal standard. The detection wavelength was 334nm. **RESULTS:** The linear range of rifampicin was 1~25 μ g/ml. Average recovery was (100.9 \pm 4.2)%. Daily and daytime RSD were less than 4%. The lowest detection limit was 0.5 μ g/ml (the rate of signal and noise was greater than or equal to 3). **CONCLUSION:** This method is simple, reliable and indicated for clinical monitoring.

KEY WORDS: rifampicin; HPLC; blood drug concentration

利福平具有广谱抗菌作用, 对结核杆菌、麻风和革兰阳性球菌特别是耐青霉素的金葡萄菌均有很强的抗菌作用, 近年来临床应用十分广泛。但由于血药浓度受各种因素影响较大, 因此有必要对该药进行临床监测。利福平的血药浓度测定文献有报道用紫外分光光度法测定^[1], 但其灵敏度低, 又因利福平中含有多种具紫外吸收的杂质, 干扰测定, 限制了该方法的使用。根据本实验室的条件, 建立了用直接沉淀法对样品进行前处理, 以氯氮 为内标测定人血清中

利福平浓度的方法。该法较灵敏、经济、快速, 适合临床监测的需要。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪, 包括 510 泵, 486 检测器; Nova- Pak C₁₈ 柱 (150 \times 3.9mm 4 μ); CDMC- B 型色谱数据处理机 (上海计算技术研究所); LM₁₄₋₂₀₄ 型自动平衡记录仪 (上海大华仪表厂) 等。

1.2 试剂

利福平对照品、醌式利福平对照品均来自 MERCK 公司; 利福平原料及胶囊均来自浙江医药股份有限公司新昌制药厂; 氯氮 原料经无水乙醇精制 2 次, 60℃ 以下烘干, 避光保存; 甲醇为色谱纯; 无水乙醇、醋酸钠、醋酸均为分析纯; 正常人混合血清由本院血库提供。

1.3 利福平标准液配制

精密称取利福平 100mg, 加甲醇溶解并定容于 25ml 容量瓶中, 作为贮备液, 于 -20℃ 冰柜贮存, 可用 1wk。精密吸取此贮备液适量, 用水溶解成含利福平 10.0~250μg/ml 的一系列浓度的标准液, 低于室温避免强光照射的条件下 2h 内使用。

1.4 内标溶液的配制

精密称取氯氮 精制品 125mg, 加无水乙醇溶解并定容于 25ml 容量瓶中, 作为贮备液。精密吸取此液 1ml 置于 25ml 容量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 作为内标液使用。此两液置 -20℃ 冰柜中保存, 可使用 6mo, 峰形及含量不变。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

流动相为甲醇-0.025mol/L NaAc(62:40), 用 HAc 调 pH 到 7.0, 检测波长: 334nm, 流速: 1.0ml/min, 灵敏度: 0.02AUFS, 柱温: 室温。氯氮 为内标物, 在此条件下, 氯氮 保留时间为 5.69min, 利福平保留时间为 7.97min, 两峰分离良好。在此波长下, 血清内源物吸收很小, 不干扰测定(见图 1)。

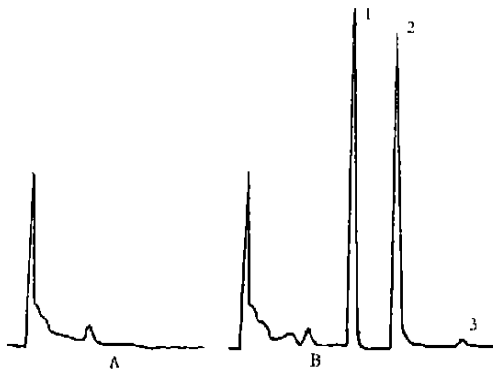


图 1 人血清空白样品(A)和人血清样品(B)色谱图

1. 氯氮 2. 利福平 3. 醌式利福平

2.2 样品的处理

取血清 0.1ml, 加氯氮 内标液(0.2μg/1μl) 10μl, 振摇, 加甲醇 0.4ml, 于旋涡振荡器上振荡 4min, 于 16000r/min 条件下离心 10min, 取上清液用 0.45μ 有机系微孔滤膜在 4000r/min 条件下离心过滤, 取上清液 20μl 进样。

2.3 标准曲线的制备

分别取 10~250μg/ml 系列利福平标准液 0.1ml, 加 0.9ml 正常人混合血清使成含利福平分别为 1.0、5.0、10、15、20、25μg/ml 的标准血清, 同样品处理项下操作, 测定峰面积, 以浓度为 X, 利福平峰面积与内标峰面积之比为 Y 作线性回归, 得回归方程为 $Y = 0.03939 + 0.07700X$, $r = 0.9998$ ($n = 5$)。

2.4 回收率与精密度试验

测定配制的利福平浓度为 7.5、12.5、17.5μg/ml 的标准血样, 测得浓度与实际浓度之比为方法回收率, 结果平均回收率为(100.9±4.2)%。每天测 5 次为日内 RSD, 测定分 5d 进行为日间 RSD, 见表 1。

表 1 利福平回收率与精密度($n = 5$)

实际浓度 (μg/ml)	测得浓度 (μg/ml)	回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
7.50	7.40	98.7	3.6	3.9
12.50	12.74	101.9	1.9	2.1
17.50	17.85	102.0	2.3	3.8

3 讨论

3.1 流动相的选择

本实验曾参考文献^[2], 采用甲醇-水(67:33)为流动相进行测定, 但发现在本实验所使用的色谱柱条件下利福平和醌式利福平不能很好分离。经多次实验, 选用甲醇-0.025mol/L NaAc(62:40)(用 HAc 调 pH 到 7.0)作为流动相能使醌式利福平与利福平较好分离, 两者出峰时间分别为 7.97 和 10.63min, 在 3.43min 处有另一杂质峰, 但因无对照品, 不能确定为何物质。

3.2 内标物的选择

曾选用地西洋、硝西洋, 但地西洋峰与醌式利福平峰太近, 硝西洋峰与利福平的另一不知名杂质峰太近, 均不能很好分离。改进流动相比, 仍未得到较好结果。氯氮 虽然对日光

较敏感^[3],但无水乙醇溶液置-20℃冰柜中,因不见光及低温,放置半年未见其峰形及峰面积发生变化,只要注意贮存条件,作为内标应用还是可行的。

3.3 样品的处理

本实验曾选用乙醚-二氯甲烷、乙酸乙酯等提取,在提取及用氮气流吹干有机溶剂的操作过程中,均可使部分利福平被氧化为醌式利福平。因而选用直接沉淀法测定,虽最低检测限为 0.5 μ g/ml(信噪比 ≥ 3),但作为临床监测还是可以的。为延长色谱柱的使用寿命,采取把加蛋白沉淀剂后的上清液用 0.45 μ 微孔滤膜过滤,在柱前添加保护柱等措施,现色谱柱已使用近 200 个样品,柱效仍良好。利福平遇光易变

质,水溶液易氧化^[4],中性时最稳定。而在碱性条件下利福平很容易被氧化成醌式利福平,较强酸性条件下易被分解成 3-甲酰利福霉素 SV。因此本实验选用 pH7.0 的流动相。整个操作过程均应避免强光照射。

参考文献:

- [1] 倪福英,魏 荣. 紫外分光光度法测定利福平的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志,1996,16(5):223-224.
- [2] 张万国,蒋雪涛,朱才娟. 高效液相色谱法测定兔血浆中利福平浓度及药物动力学研究[J]. 中国抗生素杂志,1996,21(4):273
- [3] 沈克温,王绪明,韩永平. 实用药物分离鉴定手册[M]. 北京:人民军医出版社,1986:329.
- [4] 陈新谦,金有豫. 新编药理学[M]. 第 14 版. 北京:人民卫生出版社,1997:100. 收稿日期:2000-02-20

• 短篇报道 •

我院开展药品不良反应监察工作的一些做法

陆晓和, 马爱华, 陈巧云, 宋小骏, 郑 群(南京总医院药剂科, 南京市 210002)

关键词: 药品不良反应; 监察

中图分类号: R969

文献标识码: C

文章编号: 1006-0111(2000)04-0227-01

我院于 1986 年开展药品不良反应监察工作,至今共收到药品不良反应(ADR)监察报告 300 份,经监测肯定的为 288 份。我们的具体做法是:

1 建立 ADR 监察领导小组

根据国家卫生部 1990 年发出的“关于在医院建立药品不良反应监察报告制度的通知”以及广州军区武汉总医院的工作经验,我院于 1992 年成立了 ADR 监察领导小组,主要由药剂科承担,负责 ADR 监察工作的组织工作。

2 建立报告程序

报告程序为:临床医师或药师填写报告,上交药剂科,立即由药师和医师共同监测其 ADR 性质并确定其治疗方案和治疗结果。而后由 ADR 监察领导小组组长复查,上报军区或全军 ADR 监察中心。

3 ADR 报告范围

一般为上市后药品和列为国家重点监察的药品,监测该药品引起的所有可疑不良反应。最近几年,我们将工作重点放在报告药品引起的严重、罕见或新的不良反应方面,并重点监察新药的 ADR。药师对门诊和住院病人使用新药实行了跟踪监测 ADR,收到了良好的效果。

4 奖励制度

为了加强对 ADR 监察工作的开展,激发医师报告的积极性,减少漏报率,我院对这项工作,利用了经济杠杆作用,对医师填写 ADR 监察报告,按报告份数给予奖励。收到了较明显的效果。

ADR 监察工作对医院药品监督管理、指导临床合理用药是必不可少的。对正确处理好医院的医疗纠纷及医疗诉讼也起到了积极的作用。

收稿日期:2000-06-05