

高效液相色谱法测定米非司酮血药浓度的改进

简 洁 熊凤英(柳州 545005 广西医科大学第四附院)

摘要 目的:建立简便、有效的血浆样品提取方法,用于米非司酮(RU₄₈₆)血药浓度的高效液相色谱(HPLC)法测定。方法:以无水乙醇沉淀血浆蛋白,过滤,滤液挥至无乙醇味,碱化后以氯仿为提取液,甲醇为溶媒,在波长302nm处以反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定。结果:米非司酮在0.082 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~5.248 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,内有良好的线性关系,平均回收率为(100.1 \pm 5.93%),RSD日内2.21%,RSD日间3.34%,30例孕妇口服RU₄₈₆后平均血药浓度为:0.520 \pm 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论:本方法提取简便、灵敏度高、专属性强、重现性好,适用于临床血药浓度测定及药动力学研究。

关键词 米非司酮;高效液相色谱法;血药浓度

Determination of Mifepristone in human serum by HPLC

Jian Jie Xiong Fengying (The Pharmacy Department of the 4th Affiliated Hospital of Guangxi Medical College, Liuzhou, 545005)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** A simple, effective extracted method for the determination of mifepristone in human serum was established. **METHOD:** Anhydrous alcohol was used as precipitating agent, trichloromethane as extraction solvent, methyl alcohol as solvent, the detector wave length was 302nm and the mifepristone in serum was extracted with chloroform. **RESULTS:** The linear range was from 0.082 to 5.248 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9996$), and the detection limit was 0.041 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The average recovery in serum was (100.1 \pm 5.93%), The RSD of within day was 2.21%, and that of between-day was 3.34%. **CONCLUSION:** This method was simple and feasible for the determination of mifepristone in human serum.

KEY WORDS mifepristone, blood concentration, HPLC

抗早孕药米非司酮属计划生育用药,它应用广,对疗效和安全性要求高。因此,对其进行血药浓度测定,以保证人工流产的临床效果,意义重大。目前,国内外对其测定主要为HPLC法^[1,2],且多采用干冰丙酮浴冷冻后,以乙醚提取。但此法操作复杂,某些试剂难寻,且有一定的危险性。作者以无水乙醇沉淀血浆蛋白,以氯仿为提取液,甲醇为溶媒,建立了RP-HPLC法用于测定药物流产孕妇血浆中米非司酮浓度,具有操作简单、灵敏度高、重现性好、适应性强等特点,现报道如下:

1 仪器、试剂、与试药

1.1 仪器和色谱条件 LC-10AVP HPLC仪(日本岛津),SPDUV-VIS检测器;色谱柱:(250mm \times 4.6mm,5 μm);流动相:甲醇-乙醇-0.01 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠(42:28:30, V/V/V),pH4.74内含1%三乙胺;流速:1.0 ml $\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长:302nm;进样量:20 μl ,在此色谱条件下,米非司酮保留时间 $t_R=5.84\text{min}$,见图1。

1.2 试剂和试药 甲醇、乙腈(均为色谱纯);三氯甲烷、氢氧化钠、磷酸二氢钾、三乙胺、无水乙醇(均为分析纯);米非司酮对照品(北京第三制药厂,含量99.7%,批号980504);米非司酮片(北京第三制药厂,25mg/片,批号010305)

2 方法与结果

2.1 标准曲线制作:精密称定干燥至恒重的米非司酮对照品适量,以甲醇溶解并稀释为41 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。精密

吸取标准溶液适量加入0.5 ml血浆中,配成0.082,0.164,0.328,0.656,1.312,5.248 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度。均以5 ml无水乙醇沉淀血浆蛋白,振荡2 min,离心20 min(3500pr/min),取出,将上清液倾倒入另一离心管中,于80-90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸至无乙醇味(约余0.1 ml),取出,放冷,加0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠0.2 ml,氯仿5 ml,振荡1 min,离心10 min(3500pr/min),取出,于-4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻20 min后吸取氯仿层,上层残渣用氯仿重复提取一次,将两次吸取的氯仿液合并于离心管中,于70-80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干。残渣以100 μl 甲醇溶解后,取上清液进样20 μl ,以外标法测定,同时做空白对照。以米非司酮峰高(H)对浓度(C)作直线回归,得线性方程: $C=0.07823+1.119\times 10^{-4}H$ ($r=0.9996$),本法测定的最低检测限为0.041 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

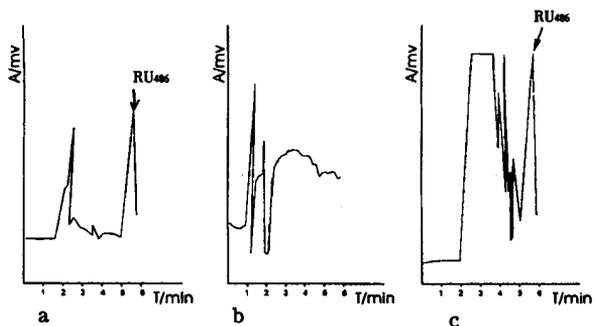


图 1

a:米非司酮标准液色谱图。

b:空白血浆色谱图。

c:口服 RU₄₈₆后人血浆 RU₄₈₆色谱图。

2.2 回收率及精密度实验 取高、中、低三个浓度的标准液,按 2.1 法操作,结果见表 1。

表 1 回收率和精密度试验结果($n=5$)

浓度($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	回收率(%)	RSD 日内(%)	RSD 日间(%)
0.164	99.09 ± 3.78	2.19	3.81
1.654	94.78 ± 2.62	3.42	2.76
6.616	106.5 ± 3.67	1.01	3.44
$\bar{x} \pm s$	100.1 ± 5.93	2.21 ± 1.21	3.34 ± 0.53

3 孕妇米非司酮血药浓度测定

3.1 受试者及给药方法 30 例正常宫内妊娠孕妇,其年龄、体重、孕次、孕期经统计学比较无显著性差异($P > 0.05$),均口服 RU₄₈₆ 25 mg, bid, 连服 3 天,于初次服药后 73 - 74 h 取静脉血 3 ml,抗凝,离心,取血浆待测。

3.2 血药浓度测定 取 0.5 ml 血浆样品,按 2.1 项下操作,30 例孕妇口服 RU₄₈₆ 后平均血药浓度为: $0.520 \pm 0.05 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

4 讨论

4.1 米非司酮回归方程显示:药物浓度与峰高在 0.082 - 5.248 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 有良好的线形关系($r = 0.9996$),平均回收率为(100.1 ± 5.93%),RSD 日内(2.21 ± 1.21)%,RSD 日间(3.34 ± 0.53)%,重现性好,说明本法简便可行。

4.2 本实验的关键之一是无水乙醇滤液的蒸发要控制准

确。残留液太多,不易提取完全,残留液太少易形成粉末层,干扰下一步的提取。经多次实验得出以挥至无乙醇味,残留液约为 0.1 ml 较好。

4.3 氯仿液的回提也是关键。我们采取碱化后以氯仿提取,并将混合液置于 - 4 °C 冰箱冷冻 20 min,使水相冻结,便于下层氯仿液的提取。经过两次操作,血浆中米非司酮提取更完全,分离效果满意。

4.4 RU₄₈₆ 在体内主要有三种代谢物:RU₄₂₆₃₃,RU₄₂₈₄₈,RU₄₂₆₉₈^[3],因缺乏对照品,在所述色谱条件下,本研究只对 RU₄₈₆ 进行了分离测定,30 例孕妇服药前后以 HPLC 法测得的血药浓度为 $0.520 \pm 0.05 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,与文献报道^[4]相似。

参考文献

- 1 罗劲松.晚期妊娠引产产妇产浆中的米非司酮浓度测定.中国医院药学杂志,1999,18(1):9.
- 2 熊凤英,简洁,周淑群等.紫外光光度法测定米非司酮血药浓度.中国医院药学杂志,1998,18(6):262.
- 3 吴尚纯,高纪.抗孕激素 RU₄₈₆ 抗早孕.实用妇产科杂志,1990,6(6):283.
- 4 高晨.晚期妊娠引产产妇产浆中的米非司酮浓度测定.药物分析杂志,2000,20(2):119.

收稿日期:2001-07-17