

UPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 的含量及药动学研究

李剑波, 谢明华(浙江大学医学院附属第二医院余杭分院, 杭州 311000)

摘要: 目的 建立 UPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4, 并对柴胡皂苷 B2、B4 静脉给药后的药动学进行研究。方法 以柴胡皂苷 F 为内标, 采用 UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)柱, 柱温为 40 ℃。流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 洗脱时间为 4 min, 使用氮气作为去溶剂化气体(800 L·h⁻¹)和锥形气体(50 L·h⁻¹)。MRM 模式对柴胡皂苷 B2 *m/z* 825.4→617.5、柴胡皂苷 B4 *m/z* 957.6→649.6 和柴胡皂苷 F(内标)*m/z* 973.7→119.0 进行定量分析。大鼠血浆用乙腈沉淀法去除蛋白。结果 在 5~5 000 ng·mL⁻¹ 内, 大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 线性良好(*r*>0.995), 定量下限为 5 ng·mL⁻¹。柴胡皂苷 B2 日内精密度 RSD<12%, 日间精密度 RSD<15%。柴胡皂苷 B4 日内精密度 RSD<14%, 日间精密度 RSD<15%。柴胡皂苷 B2、B4 的准确度范围为 89.3%~110.2%。结论 该分析方法灵敏、快速、选择性良好, 并成功应用于柴胡皂苷 B2、B4 静脉给药后的大鼠药动学研究。

关键词: 柴胡皂苷 B2; 柴胡皂苷 B4; 药动学; UPLC-MS/MS

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)03-0317-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.012

引用本文: 李剑波, 谢明华. UPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 的含量及药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 317-321.

Development of UPLC-MS/MS Method for Determination of Saikosaponin B2 and B4 in Rat Plasma and Application in Pharmacokinetics Study

LI Jianbo, XIE Minghua(Yuhang Branch, Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 311000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UPLC-MS/MS method for the determination of saikosaponin B2 and B4 in rat plasma. The pharmacokinetics of saikosaponin B2 and B4 after intravenous administration in rats were studied. **METHODS** Saikosaponin F was used as internal standard, UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) column was used and the column temperature was set at 40 ℃. The mobile phase was consisted of acetonitrile and water (containing 0.1% formic acid), gradient elution with the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹ for 4 min. Nitrogen was used as desolvation gas (800 L·h⁻¹) and cone gas (50 L·h⁻¹). MRM was used to quantitatively analyze saikosaponin B2 *m/z* 825.4→617.5, saikosaponin B4 *m/z* 957.6→649.6 and saikosaponin F (internal standard) *m/z* 973.7→119.0. Rat plasma samples were treated by acetonitrile precipitation to remove protein. **RESULTS** In the range of 5~5 000 ng·mL⁻¹, the concentrations of saikosaponin B2 and B4 in rat plasma showed good linear relation ship(*r*>0.995), with the lower limit of quantification of 5 ng mL⁻¹. Saikosaponin B2 had an intra-day RSD<12% and inter-day RSD<15%. Saikosaponin B4 had an intra-day RSD<14%, inter-day RSD<15%. The accuracy of saikosaponin B2 and B4 ranged from 89.3% to 110.2%. **CONCLUSION** The method is sensitive, rapid and selective, and successfully applied to the pharmacokinetics study of saikosaponin B2 and B4 after intravenous administration.

KEYWORDS: saikosaponin B2; saikosaponin B4; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS

柴胡为伞形科植物柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)或狭叶柴胡(*Bupleurum scorzonnerifolium* Willd.)的干燥根^[1-2], 性微寒, 味辛、苦, 归肝、胆、肺经, 具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功能, 用于感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛等症。柴胡根中主要成分为柴胡皂苷, 研究发现柴胡皂苷具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、调节内分泌及免疫系统等作用^[3]。

柴胡皂苷 B2 和柴胡皂苷 B4 是柴胡主要药效成分之一, 药效成分在体内的变化和分布特征与其药理效应密切相关, 结构式见图 1。为了进一步了解柴胡皂苷 B2 和柴胡皂苷 B4 在体内的吸收和分布规律, 有必要进行药动学研究, 为药物研发提供理论依据。

目前, 已有较多文献对大鼠体内柴胡皂苷 A、D 进行报道^[4-10]。而对柴胡皂苷 B2、B4 的药动学

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2016ZA170); 杭州市卫生科技计划项目(2016B36); 北京医卫健康公益基金会项目(YWJKJJHKYJJ-B17160)

作者简介: 李剑波, 男, 硕士, 主管药师

Tel: (0571)89360936

E-mail: 15356189099@163.com

研究相对较少^[11], 国内还未见文献报道。UPLC-MS/MS 与 LC-MS/MS 相比, 分析方法更加灵敏, 在药动学的研究中优势明显^[12-13], 同时, 其强大的分离分析能力更适用于成分复杂的中药和化合物体系的体内代谢研究。本研究建立了 UPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 的方法, 并对柴胡皂苷 B2、B4 静脉给药后的药动学进行研究。

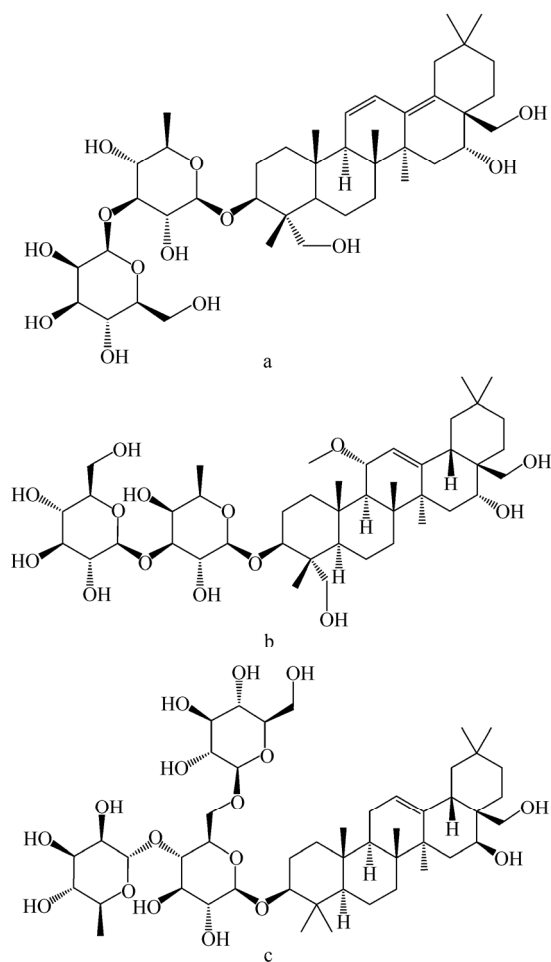


图1 化学结构式

a-柴胡皂苷 B2; b-柴胡皂苷 B4; c-柴胡皂苷 F(内标)。

Fig. 1 Chemical structures

a-saikosaponin B2; b-saikosaponin B4; c-saikosaponin F(IS).

1 材料与方法

1.1 材料

柴胡皂苷 B2(批号: MUST-16113002; 纯度>98%)、柴胡皂苷 B4(批号: MUST-16060108; 纯度>98%)和柴胡皂苷 F(内标, 批号: MUST-16070805; 纯度>98%)均购自成都曼斯特制药有限公司。乙腈(色谱纯, 批号: 10884030717)和甲醇(色谱纯, 批号: 1716507345)购自 Merck 公司。超纯水由 Milli-Q 纯化系统制备。

SD 大鼠, ♂, 体质量 200~220 g, 购自温州医科大学动物实验中心, 实验动物使用许可证号: SYXK(浙)2015-0009。

1.2 仪器

ACQUITY I-Class UPLC、XEVO TQS-micro 三重四极杆质谱仪、Masslynx 4.1 软件(美国 Waters 公司); Milli-Q 纯化系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 柱温设为 40 °C。流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱(0~0.2 min, 10%A; 0.2~1.5 min, 10%→80%A; 1.5~2.0 min, 80%A; 2.0~2.5 min, 80%→10%A; 2.5~4.0 min, 10%A)。流速为 0.4 mL·min⁻¹, 洗脱时间为 4 min。

氮气作为去溶剂化气体(800 L·h⁻¹)和锥形气体(50 L·h⁻¹)。毛细管电压设为 1.5 kV, 离子源温度为 150 °C, 去溶剂化温度为 400 °C。MRM 模式对柴胡皂苷 B2 *m/z* 825.4→617.5、柴胡皂苷 B4 *m/z* 957.6→649.6 和柴胡皂苷 F(内标)*m/z* 973.7→119.0 进行定量分析。

2.2 对照品溶液的制备

用甲醇-水(50:50)配制柴胡皂苷 B2(1.0 mg·mL⁻¹)、柴胡皂苷 B4(1.0 mg·mL⁻¹)和柴胡皂苷 F(1.0 mg·mL⁻¹)储备溶液。储备液用甲醇稀释制备一系列浓度标准品工作液。所有溶液在 4 °C 下储存。

2.3 标准曲线的制备

空白大鼠血浆添加适量的标准品工作溶液制备柴胡皂苷 B2 和柴胡皂苷 B4 血浆标准曲线, 使大鼠血浆中的柴胡皂苷 B2 或柴胡皂苷 B4 浓度为 5, 20, 50, 200, 500, 1 000, 2 500, 5 000 ng·mL⁻¹, 标准曲线的范围为 5~5 000 ng·mL⁻¹。以与标准曲线相同的方式, 制备质量控制(QC)样品, 3 个血浆浓度为 8, 400, 4 000 ng·mL⁻¹。

2.4 样品处理

在 1.5 mL EP 管中加入 100 μL 血浆样品, 加乙腈 200 μL(含内标柴胡皂苷 F 100 ng·mL⁻¹), 涡旋混合 1.0 min, 离心分离(13 000 r·min⁻¹, 4 °C, 10 min)。取上清液 100 μL 于进样瓶的内衬管中, 取 2 μL 进样分析。

2.5 方法验证

验证方法按照 FDA 生物分析方法验证指南进行^[14]。验证项目包括选择性、基质效应、线性、

精密度、准确度、回收率和稳定性。

2.5.1 选择性 通过分析大鼠空白血浆, 空白血浆添加柴胡皂苷 B2、B4 和内标物柴胡皂苷 F, 及静脉给药后的大鼠血浆样品来评价方法的选择性。

2.5.2 线性关系考察 在与待测血浆样品相同的条件下, 等体积进样, 测量各峰的峰面积, 用峰面积对样品浓度绘制标准曲线, 通过标准曲线来评估线性关系。

2.5.3 精密度和准确度试验 通过 6 次重复测量 3 个 QC 水平的血浆样品评价精密度和准确度。精密度用 RSD 表达, 通过连续 3 d 测量 QC 样品来确定日内和日间精密度。通过分析连续 3 d 测量 QC 样品的平均值与真值相符合程度, 确定日内和日间准确度。

2.5.4 回收率和基质效应 通过 QC 样品测量的峰面积与相对应标准峰面积进行比较来计算回收率。通过对空白血浆经样品处理后加入 3 个 QC 浓度的标准溶液所得峰面积与对应浓度的标准溶液所得峰面积进行比较, 评价基质效应。

2.5.5 样品残留考察 重复 3 次定量上限(ULOQ)后进样空白血浆样品, 评价样品残留。

2.5.6 稳定性试验 考察柴胡皂苷 B2、B4 和柴胡皂苷 F(内标)的储备液、工作溶液和血浆 QC 样品在不同储存条件下的稳定性。包括短期稳定性(室温下 2 h), 自动进样器 12 h, 长期稳定性(-20°C , 30 d), 冻融稳定性(连续 3 d 3 次冻融, -20°C 至室温)。

2.6 药动学研究

取 12 只 SD 大鼠(体质量 200~220 g), 6 只大鼠以 $1.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 舌下静脉给予柴胡皂苷 B2; 另外 6 只大鼠以 $1.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 舌下静脉给予柴胡皂苷 B4。大鼠分别在给药后的 5 min, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 h 尾静脉取血 0.3 mL 于 1.5 mL 的 EP 管中。血液静置 2 h 后, 离心分离($13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C , 10 min), 取 100 μL 血浆于 1.5 mL 的 EP 管中, 于 -20°C 冷冻保存。

药动学参数: 血浆浓度-时间曲线下面积(AUC), 平均停留时间(MRT), 血浆清除率(CL), 表观分布体积(V), 最大血浆浓度(C_{max})和半衰期($t_{1/2}$), 由 DAS 2.0 软件(中国药科大学)使用非房室模式拟合。

3 结果

3.1 选择性

柴胡皂苷 B2、B4 和内标的保留时间分别为 2.06, 1.95, 1.88 min。未发现明显杂质和内源性

物质对检测有干扰, 说明该方法选择性好。结果见图 2。

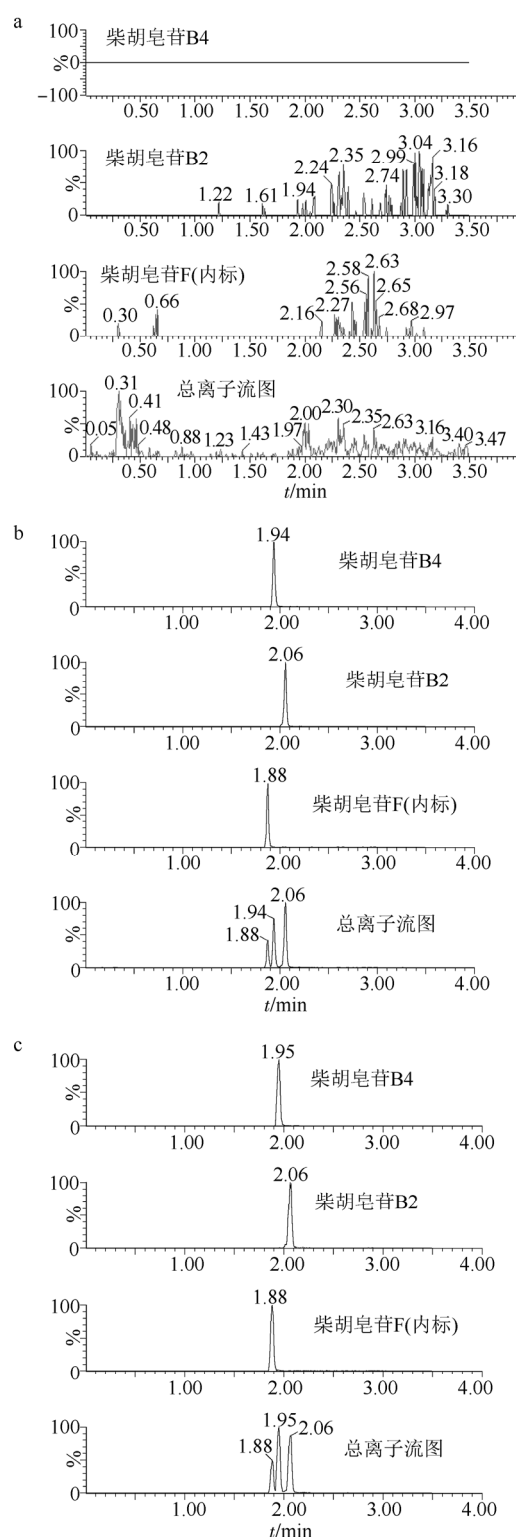


图 2 UPLC-MS/MS 谱图

a-空白血浆样品; b-空白血浆添加柴胡皂苷 B2、B4 和柴胡皂苷 F; c-大鼠血浆样品。

Fig. 2 UPLC-MS/MS spectra chromatogram

a-blank plasma; b-blank plasma spiked with saikosaponin B2, B4 and saikosaponin F(IS); c-rat plasma sample.

3.2 标准曲线

大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 标准曲线浓度范围为 5~5 000 ng·mL⁻¹。标准曲线方程式： $Y_1=0.008\ 82X_1+0.009\ 93$, $r=0.999\ 1$, $Y_2=0.008\ 27X_2-0.001\ 91$, $r=0.999\ 4$ 。其中 Y_1 代表柴胡皂苷 B2 与内标物的峰面积比值, X_1 代表血浆中柴胡皂苷 B2 浓度; Y_2 代表柴胡皂苷 B4 与内标物的峰面积比值, X_2 代表血浆中柴胡皂苷 B4 浓度。大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 的定量下限(LLOQ)为 5 ng·mL⁻¹, 信噪比为 10。大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 的检出限为 2 ng·mL⁻¹, 信噪比为 3。

3.3 精密度、准确度、回收率和基质效应

柴胡皂苷 B2 日内精密度 RSD<12%, 日间精密度 RSD<15%, 准确度范围为 88.7%~113.7%, 平均回收率≥84.7%, 基质效应为 95.4%~101.2%, 结果见表 1。

柴胡皂苷 B4 日内精密度 RSD<14%, 日间精密度 RSD<15%, 准确度范围为 89.3%~112.8%, 平均回收率≥83.8%, 基质效应为 92.7%~108.7%。柴胡皂苷 F(内标)的回收率为 85.8%, 基质效应为 97.5%。结果见表 2。

表 1 大鼠血浆中柴胡皂苷 B2 的精密度、准确度、回收率和基质效应($n=6$)

Tab. 1 Precision, accuracy, recovery and matrix effect of saikosaponin B2 in rat plasma($n=6$)

浓度/ ng·mL ⁻¹	精密度/%		准确度/%		回收率/ %	基质效应/ %
	日内	日间	日内	日间		
5	11.5	14.1	88.7	113.7	87.4	98.6
8	10.0	12.9	108.4	110.2	95.5	95.4
400	9.8	5.3	96.6	94.1	93.2	101.2
4 000	7.6	6.7	103.9	92.6	84.7	96.8

表 2 大鼠血浆中柴胡皂苷 B4 的精密度、准确度、回收率和基质效应($n=6$)

Tab. 2 Precision, accuracy, recovery and matrix effect of saikosaponin B4 in rat plasma($n=6$)

浓度/ ng·mL ⁻¹	精密度/%		准确的/%		回收率/ %	基质效应/ %
	日内	日间	日内	日间		
5	13.6	14.7	109.3	112.8	88.2	105.8
8	9.0	11.9	89.3	102.9	90.1	103.2
400	12.5	10.2	103.8	97.0	86.4	108.7
4 000	8.6	3.3	106.9	101.1	83.8	92.7

结果表明, 建立的 UPLC-MS/MS 精密度、准确度、回收率和基质效应符合柴胡皂苷 B2、B4 的药动学研究要求。

3.4 残留的考察

在 ULOQ 样品后进样的空白样品中未显示出任何显著的峰(≥20%的 LLOQ 和 5%的内标)。本研究采用的梯度洗脱结束时增加 1.5 min 平衡, 加上仪器的洗针系统, 有效地清理了样品的残留。

3.5 稳定性试验

柴胡皂苷 B2、B4 和柴胡皂苷 F(内标)的储备液、工作溶液和血浆样品在室温 2 h, 自动进样器 12 h, -20 °C 30 d 以及 3 次冻融, 变异在±15%之内, RSD<15%, 说明柴胡皂苷 B2、B4 和内标稳定性良好。

3.6 药动学研究

静脉给予柴胡皂苷 B2、B4 后所得药物浓度-时间曲线见图 3。非房室模型拟合主要药动学参数见表 3。

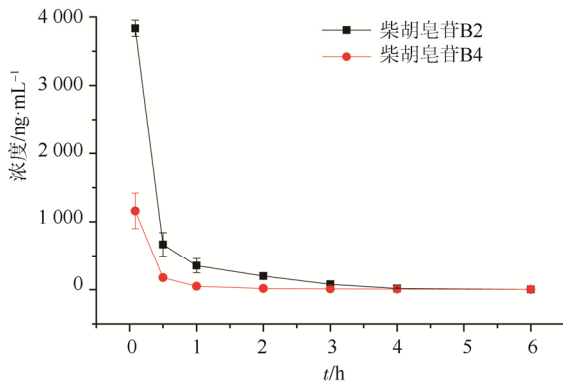


图 3 柴胡皂苷 B2(1.5 mg·kg⁻¹)、柴胡皂苷 B4(1.5 mg·kg⁻¹) 静脉给药后的血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Plasma concentration-time curve of saikosaponin B2 (1.5 mg·kg⁻¹), saikosaponin B4 (1.5 mg·kg⁻¹) after intravenous administration

表 3 大鼠静脉给予柴胡皂苷 B2、B4 后的药动学参数

Tab. 3 Main pharmacokinetic parameters of saikosaponin B2, B4 in rats after intravenous

参数	柴胡皂苷 B2 (1.5 mg·kg ⁻¹)	柴胡皂苷 B4 (1.5 mg·kg ⁻¹)
AUC _(0-t) /h·ng·mL ⁻¹	1 993.2±189.7	503.4±69.1
AUC _(0-∞) /h·ng·mL ⁻¹	1 995.9±189.3	505.4±69.2
MRT _(0-t) /h	0.63±0.05	0.46±0.08
MRT _(0-∞) /h	0.64±0.04	0.48±0.08
t _{1/2} /h	0.6±0.1	1.0±0.1
CL/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.8±0.1	3.0±0.5
V/L·kg ⁻¹	0.7±0.1	4.2±0.7
C _{max} /ng·mL ⁻¹	3 833.8±117.7	1 159.7±259.6

4 讨论

UPLC-MS/MS 应用于血浆中柴胡皂苷 B2、B4 定量检测, 比传统 HPLC 分析时间快, 灵敏度高。只需 4 min 即可完成对血浆样品的分析, 可以节省

很多时间与溶剂^[15-16], 比 Guan 等^[11]报道的运行时间 15 min 更快。电喷雾 ESI 正负极选择在方法学研究中常被评价^[17], 试验发现 ESI 负离子模式比正离子模式灵敏度更高。流动相乙腈-0.1%甲酸, 使用梯度洗脱, 可以得到满意的色谱峰与保留时间。方法建立过程选择内标也是一个重要任务, 选柴胡皂苷 F 为内标是因为它与柴胡皂苷 B2、B4 有相似的保留时间和电离方式。

在 UPLC-MS/MS 分析之前, 除去蛋白质和潜在干扰是方法建立的 1 个关键点^[18-21]。本研究使用的蛋白质沉淀方法简单有效, 乙腈作为蛋白质沉淀溶剂可以给出良好提取效率和可接受的基质效应。虽然乙腈蛋白沉淀法稀释了血浆浓度, 但本研究的定量下限为 5 ng·mL⁻¹, 可以满足此次药动学研究的要求。

本研究建立了灵敏、快速、选择性良好的 UPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中柴胡皂苷 B2、B4 方法, 线性范围为 5~5 000 ng·mL⁻¹, 检出限为 2 ng·mL⁻¹, 运行时间为 4 min, 成功应用于柴胡皂苷 B2、B4 大鼠舌下静脉给药后的药动学研究。

REFERENCES

- XIE D H, CAI B C, AN Y Q, et al. Advancement in research of chemical components and pharmacological effect of saikosaponin [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2007, 23(1): 63-65.
- ZHANG S H, LIU C L, WANG Y F, et al. Determination of 17 elements in the radix bupleuri by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry [J]. Chin J Health Lab Tec(中国卫生检验杂志), 2017, 27(16): 2308-2310.
- QIAO Y R, ZHANG F, FANG Y, et al. LC-MS analysis of saikosaponins in rat lung tissues after oral administration of bupleurum saikosaponin extract [J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报), 2016, 47(3): 264-269.
- LI C, XUE H G, FENG L J, et al. The effect of saikosaponin D on doxorubicin pharmacokinetics and its MDR reversal in MCF-7/adr cell xenografts [J]. Eur Rev Med Pharm Sci, 2017, 21(19): 4437-4445.
- KWON M H, JEONG J S, RYU J, et al. Simultaneous determination of saikosaponin a, paeonol, and imperatorin, components of DA-9805, in rat plasma by LC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2017(1068): 289-296.
- HE M, CHEN W W, WANG M M, et al. Simultaneous determination of multiple bioactive components of Bu-zhong-yi-qi-tang in rat tissues by LC-MS/MS: Application to a tissue distribution study [J]. J Chromatogr B, 2017(1044): 177-184.
- ZHANG G S, HU P Y, LI D X, et al. Formulations, hemolytic and pharmacokinetic studies on saikosaponin a and saikosaponin d compound liposomes [J]. Molecules(Basel, Switzerland), 2015, 20(4): 5889-5907.
- XU L, SONG R, TIAN J X, et al. Analysis of saikosaponins in rat plasma by anionic adducts-based liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. Biomed Chromatogr, 2012, 26(7): 808-815.
- TANG Y H, ZHANG Y Y, ZHU H Y, et al. A high-performance liquid chromatographic method for saikosaponin a quantification in rat plasma [J]. Biomed Chromatogr, 2007, 21(5): 458-462.
- WANG S C, ZHAO H P, HUANGFU M J. Pharmacokinetic of saikosaponin D in Wuling capsules in mouse [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2005, 27(7): 809-811.
- GUAN X F, WANG X Y, YAN K J, et al. UPLC-MS/MS determination and pharmacokinetic studies of six Saikosaponins in rat plasma after oral administration of Bupleurum Dropping Pills [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016(124): 288-293.
- LIU M, SU X, LI G, et al. Validated UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin, simvastatin hydroxy acid and berberine in rat plasma: Application to the drug-drug pharmacokinetic interaction study of simvastatin combined with berberine after oral administration in rats [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015(1006): 8-15.
- AI Y, WU Y, WANG F, et al. A UPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of three monoterpene glycosides and four alkaloids in rat plasma: application to a comparative pharmacokinetic study of Huo Luo Xiao Ling Dan and single herb extract [J]. J Mass Spectrom, 2015, 50(3): 567-577.
- FDA. US department of health and human services guidance for industry: Bioanalytical Method Validation [S]. 2013.
- FANG B, BAO S, WANG S, et al. Pharmacokinetic study of ardisiacrispin A in rat plasma after intravenous administration by UPLC-MS/MS [J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(3): e3826.
- WANG J, ZHAO T, KONG J, et al. Determination of vitacoxib, a novel COX-2 inhibitor, in equine plasma using UPLC-MS/MS detection: Development and validation of new methodology [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017(1061/1062): 270-274.
- ZHANG Q, WEN C, XIANG Z, et al. Determination of CUDC-101 in rat plasma by liquid chromatography mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014(90): 134-138.
- WANG S H, WU H Y, HUANG X L, et al. Determination of N-methylcystisine in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015(990): 118-124.
- MA J S, WANG S H, HUANG X L, et al. Validated UPLC-MS/MS method for determination of hordenine in rat plasma and its application to pharmacokinetic study [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015(111): 131-137.
- XIANG Y C, LI H, HUANG Y, et al. Determination of linezolid in critically ill patients plasma by LC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(7): 959-962.
- ZHAO B Y, YANG C, YUAN Y, et al. Determination of metoprolol in human plasma using UHPLC coupled to mass spectrometry [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 840-844.

收稿日期: 2018-04-04
(本文责编: 李艳芳)