

高效液相色谱法测定人血清中酒石酸美托洛尔浓度

黄蓓琳 吴 涓 王洪泉 蔡玉凤(上海 200065 上海同济医科大学附属甘泉医院)

摘要 目的:建立测定人血清中酒石酸美托洛尔浓度的 HPLC 方法,为临床药理研究提供科学的分析技术。方法:血清样品经萃取纯化后溶于流动相中,进样分析。测定使用 C_{18} 色谱柱,甲醇-水相(50:50,水相中含 0.16% 戊烷磺酸钠和 0.014% 无水乙酸钠)为流动相,以纳多洛尔为内标,用荧光检测 $E_x = 277\text{nm}$, $E_m = 299\text{nm}$ 。结果:本方法线性范围为 10 ~ 300ng/ml,最低检测浓度为 1ng/ml。平均回收率为 $(102.15 \pm 6.76)\%$ 。结论:本方法选择性强,灵敏,重现性好,适用于临床血药浓度检测。

关键词 酒石酸美托洛尔;人血清;高效液相色谱法

Determination of metoprolol in serum by reversed-phase high performance liquid chromatography

Huang Beiling(Huang BL), Wu Juan(Wu J), Wang Hongquan(Wang HQ), et al(Guangquan Hospital of Shanghai Tongji University, Shanghai 200065)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of metoprolol in serum by HPLC and to provide scientific analysis for the studies of the pharmacology of metoprolol in clinic. **METHOD:** The extracts of samples were analyzed on a C_{18} column with methanol-aqueous solution(0.16% sodium 1-pentanesulfonate and 0.014% sodium acetate anhydrous) (50:50). Nadolol was the internal standard. The chromatograph was monitored by fluorescence detection($E_x = 277\text{nm}$, $E_m = 299\text{nm}$). **RESULTS:** The linear range were 10 ~ 300ng/ml. The limit of sensitivity was approximately 1ng/ml. The average recovery was 102.15% with $s = 6.7\%$. **CONCLUSION:** The method was sensitive with good selectivity and reproducibility and can be used to measure metoprolol serum levels in clinic.

KEY WORDS metoprolol, human serum, HPLC, extraction

美托洛尔(Metoprolol)为选择性 β_1 受体阻滞剂,常用于治疗高血压和心绞痛,它的分子量是 267,其酒石酸盐的分子量为 685,美托洛尔是弱碱性物质 $pK_a = 9.7^{[1]}$ 。为测定体内这一碱性药物的血药浓度,本文采用离子对试剂,在分离药物与内源性酸性杂质上有良好的效果。本文所建立的测定方法,也为人体药动学研究提供了科学的分析技术。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪(LC-9A 泵, RF-10AXL 荧光检测器, C-R4A 数据处理器, 日本岛津); TG-16G 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); XW-80A 型漩涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 试药

酒石酸美托洛尔(Assia Chemical Industries Ltd.); 纳多洛尔(由上海医药工业研究院提供); 戊烷磺酸钠

(日本东京化成工业株式会社 Lot FHH01);无水乙酸钠(分析纯,上海试剂四厂 910116);HPLC 甲醇(上海化学试剂研究所 980801);氢氧化钠、正己烷、二氯甲烷均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 标准溶液配制

酒石酸美托洛尔标准溶液:取酒石酸美托洛尔 10.0mg 置于 10ml 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,即为酒石酸美托洛尔标准液(1.00mg/ml)。

内标液:称取纳多洛尔 10.0mg 于 10ml 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,精吸 0.2ml 于 10ml 量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,即为内标液(0.02mg/ml)。

2.2 色谱条件

色谱柱为 C_{18} 柱(Shim-pack CLC-ODS 0.15m $\times$ 6.0 ϕ , 5 μ m 岛津制作所);流动相为甲醇-水相(50:50,水相中含 0.16%戊烷磺酸钠和 0.014%无水醋酸钠)冰醋酸调 pH3.5;流速 1.0ml/min;荧光检测:Ex = 277nm, Em = 299nm;柱温 30 $^{\circ}$ C,注入量 20 μ l。

2.3 血药浓度测定

取血清 1.00ml 于离心管中,准确加入内标液 50 μ l,再加入 4M 氢氧化钠 0.5ml,加入 4ml 正己烷-二氯甲烷(4:1)漩涡混合提取 1min,3500r/min 离心 15min,分离上层有机相,氮气挥干,残渣加流动相 100 μ l,漩涡溶解,12000r/min 离心 5min,取 20 μ l 进样分析。

2.4 血清酒石酸美托洛尔标准曲线的制备

在 10ml 离心管中分别加入 1.0ml 空白血清,再加入酒石酸美托洛尔标准溶液,使血药浓度相当于 10.0, 100.0, 150.0, 200.0, 300.0ng/ml,按“血药浓度测定”项方法,求出酒石酸美托洛尔对内标的峰面积比(X)与酒石酸美托洛尔浓度(Y)的回归方程。结果表明:酒石酸美托洛尔在 10~300ng/ml 浓度范围内线性关系良好, $r=0.9995$,回归方程为 $Y=12.09X-111.50$ 。酒石酸美托洛尔的最低检测浓度为 1ng/ml($S/N=2$)。

2.5 提取回收率

配制含不同浓度的酒石酸美托洛尔标准血样,经萃取后再加入内标,测定其峰高比 R_1 ,同法测定不经萃取的标准酒石酸美托洛尔加内标的峰高比 R_2 ,按 $R_1/R_2 \cdot 100\%$ 计算提取回收率,结果见表 1。

2.6 方法回收率

分别配制浓度为 100, 150, 300ng/ml 的血清样品,按血药浓度测定项方法进行测定,将测定的酒石酸美托洛尔峰高与内标物的峰高比代入标准曲线,求出测定药物浓度,按测定量/添加量 $\cdot 100\%$ 公式计算方法回

表 1 人血清中酒石酸美托洛尔提取回收率/ $\bar{x} \pm s, n=5$

浓度/ng $\cdot$ ml $^{-1}$	提取回收率/%	RSD/%
10	86.23 $\pm$ 4.98	5.78
150	78.88 $\pm$ 3.53	4.47
300	80.65 $\pm$ 1.51	1.88

收率。结果表明:3 种浓度的回收率分别为(109.76 $\pm$ 6.86)%, (96.84 $\pm$ 4.28)%和(99.84 $\pm$ 3.34)%, $n=5$ 。平均回收率为(102.15 $\pm$ 6.76)%。

2.7 精密度

配制含酒石酸美托洛尔浓度为 10, 150, 300ng/ml 的血样,按“血药浓度测定”项方法测定日内、日间的精密度值,结果见表 2。

表 2 人血清中酒石酸美托洛尔精密度/ $\bar{x} \pm s, n=5$

加入量 /ng $\cdot$ ml $^{-1}$	日内/ $n=6$		日间/ $n=18$	
	测定量/ng $\cdot$ ml $^{-1}$	RSD/%	测定量/ng $\cdot$ ml $^{-1}$	RSD/%
10	10.07 $\pm$ 0.63	6.27	9.81 $\pm$ 0.96	9.79
150	148.64 $\pm$ 9.89	6.65	151.61 $\pm$ 11.69	7.71
300	305.42 $\pm$ 15.99	5.24	307.23 $\pm$ 14.98	4.88

3 讨论

3.1 血清样品预处理方法的选择

在预试验中曾分别采用了沉淀法和萃取法提取药物,发现萃取法的提取率明显高于沉淀法,且沉淀法的杂质干扰较多,上机分析时的低 pH 对系统和反相柱填料不利,提取量与药物浓度之间的线性关系不佳,故选定萃取法。采用萃取法的过程中,我们也尝试了多种有机溶,如:乙醚、氯仿、环己烷、正己烷-二氯甲烷(4:1)。其中正己烷-二氯甲烷(4:1)的提取率高,干扰少,峰形好,提取量与药物浓度之间的线性关系较好,故选定正己烷-二氯甲烷(4:1)作为提取溶剂。

3.2 色谱条件的选择

液相法测美托洛尔多采用反相分离柱^[2],根据本实验室条件,选用 Shim-packCLC-ODS 柱进行分离,通过对流动相比比例等选择,我们建立了分离血清中美托洛尔与内标物的最佳分离条件,可将内标物与美托洛尔很好地分离。 t_R 分别为 8.6min 和 5.2min。色谱分离图见图 1。

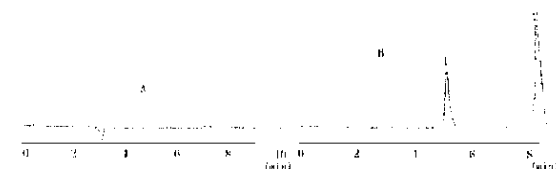


图 1 空白血清(A)与含酒石酸美托洛尔、内标物血清(B)色谱分离图

1 - 内标物;2 - 酒石酸美托洛尔

参考文献

- 1 Rtlodge DR , Garrick C . Determination of metoprolol and its α -Hydroxide metabolite in serum by reversed-phase high performance liquid chromatography . J Chromatogr , Sci , 1989 , 27(9): 561 .
- 2 Beal JL , Tett SE . Determination of pindolol enantiomers in human plasma and urine by simple liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography . J Chromatogr B Biomed Sci Appl , 1998 , 715(2): .409

收稿日期 : 2000 - 06 - 29