

HPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中普萘洛尔的含量及其药动学研究

魏娟¹, 贾琪¹, 姚广哲¹, 欧阳慧子², 常艳旭¹, 何俊^{1*} (1.天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 301617; 2.天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中普萘洛尔的高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)定量分析方法, 考察大鼠口服给药后, 普萘洛尔在其体内的药动学特征。方法 血浆样品用甲醇沉淀蛋白法处理后, 以盐酸美西律为内标, 采用 LC-MS/MS 分析方法, 测定大鼠血浆中普萘洛尔的浓度。色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈(70:30)等度洗脱; 采用 ESI 离子源, 正离子模式, 多反应离子监测(MRM) m/z 260.2→116.2(普萘洛尔)和 m/z 180.2→58.2(内标盐酸美西律)。结果 普萘洛尔在 5~1 000 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好; 日内、日间精密度 RSD 为 0.36%~6.39%, 准确度为 96.19%~113.38%; 提取回收率为 86.82%~96.12%; 基质效应为 100.1%~103.1%。结论 本方法经方法学验证, 可用于大鼠血浆中普萘洛尔的测定及其药动学研究。

关键词: 普萘洛尔; 高效液相色谱-质谱联用; 大鼠; 血浆; 药动学

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)18-2241-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.18.001

引用本文: 魏娟, 贾琪, 姚广哲, 等. HPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中普萘洛尔的含量及其药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(18): 2241-2244.

Determination of Propranolol in Rat Plasma by HPLC-MS/MS and Its Application in Pharmacokinetic Study

WEI Juan¹, JIA Qi¹, YAO Guangzhe¹, OUYANG Huizi², CHANG Yanxu¹, HE Jun^{1*} (1.Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2.First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-MS/MS method to determine the content of propranolol in rat plasma, and to study the pharmacokinetic characteristics of propranolol in rats after oral administration. **METHODS** The plasma samples were treated with methanol precipitation protein method. LC-MS/MS method was developed and validated for the determination of propranolol in rats using mexiletin as the internal standard. ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) was used, the mobile phase consisting of water containing 0.1% formic acid and acetonitrile (70:30). The detection parameters of mass spectrometry were as follows: ESI ionization source, positive polarity. Ions monitored in the multiple reaction monitoring (MRM) mode were m/z 260.2→116.2 for propranolol and m/z 180.2→58.2 for mexiletin (internal standard). **RESULTS** Calibration curves were linear in range of 5~1 000 ng·mL⁻¹ for propranolol. Intra- and inter-day precision and accuracy were 0.36%~6.39% and 96.19%~113.38%, respectively. Extraction recovery ranged 86.82%~96.12%, and the matrix effect of propranolol ranged 100.1%~103.1%. **CONCLUSION** The LC-MS/MS method is accurate and sensitive, and is successfully applied to evaluate the pharmacokinetics of propranolol in rats plasma.

KEYWORDS: propranolol; HPLC-MS/MS; rat; plasma; pharmacokinetics

普萘洛尔是临床常用的非选择性 β 受体阻滞剂, 主要用于治疗各种原因所导致的心律失常, 如窦性及室上性心动过速、心房颤动等^[1], 也可用于治疗高血压、心绞痛、心律不齐、甲状腺机能亢进及婴幼儿血管瘤等疾病^[2]。普萘洛尔有 S 型和 R 型 2 种光学异构体^[3], 临床上使用的是 2 种异构

体等量混合的消旋品。普萘洛尔主要经肝脏代谢^[4], 其首过消除效应明显, 生物利用度较低(约为 30%), 因此, 建立普萘洛尔血药浓度测定方法十分必要。目前用于普萘洛尔的测定方法主要有高效液相色谱法^[5]、紫外分光光度法^[6]以及毛细管电泳法^[7], 但这些方法专属性较差, 灵敏度较低。而

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673824)

作者简介: 魏娟, 女, 硕士生 Tel: 15222797261 E-mail: hejun673@163.com

*通信作者: 何俊, 男, 博士, 副研究员 Tel: (022)59596163

已报道的 HPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中普萘洛尔的方法^[8-9]，其样品处理较为繁琐。因此，本研究在以往研究方法的基础之上进行优化，以建立一种更加灵敏、方便的测定方法，用于盐酸普萘洛尔的药动力学研究，为临床安全、有效用药提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪串联 Agilent 6430 型三重四级杆质谱仪(美国 Agilent); Agilent Mass Hunter 分析软件(美国 Agilent); AX205 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo); Milli-Q 超纯水仪(天津信睿生物科技有限公司); 5424R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf); G3KT18273 型微型旋涡混合仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 试剂

盐酸普萘洛尔对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100783-201202; 纯度: 100.0%); 盐酸美西律对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100218-200702; 纯度: 100.0%); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 购于 Merck 公司; 甲酸(ROE 公司, 色谱纯); 去离子超纯水自制。

1.3 动物

SPF 级健康 SD 大鼠, ♂, 体质量为(250±10)g, 购买于北京华阜康实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2014-0004。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%甲酸水溶液(30:70); 分析时间 4 min; 柱温 30 °C, 流速 0.3 mL·min⁻¹; 进样量 5 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI); 正离子; 多反应离子监测(MRM); 毛细管电压: 4 000 V; Delta EMV(+): 400 V; 气体温度: 300 °C; 气体流速: 10 L·min⁻¹; 雾化气压力: 40 psi; 被测物质和内标的离子对及质谱参数见表 1。

表 1 被测物质及内标质谱参数

Tab. 1 Mass spectra properties of analytes and IS

化合物	Q1	Q3	Frag./V	C.E./V	Ion mode
普萘洛尔	260.2	116.2	110	14	positive
盐酸美西律	180.2	58.2	85	10	positive

2.3 对照品储备液及内标溶液配制

分别称取盐酸普萘洛尔、盐酸美西律对照品约 10 mg, 精密称定(10.03 mg), 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 得一定浓度的原液, 4 °C 冰箱保存待用; 另外量取一定量的美西律原液, 加甲醇稀释成浓度为 1 μg·mL⁻¹ 的内标溶液, 4 °C 冰箱保存待用。

2.4 血浆样品预处理

精密量取体积为 100 μL 的血浆样品, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入内标溶液 20 μL(盐酸美西律, 1 μg·mL⁻¹), 再加入 280 μL 的甲醇, 涡旋振荡 3 min 后, 离心 10 min(转速: 14 000 r·min⁻¹), 取上清溶液, 进样分析。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 精密量取 100 μL 的空白血浆(不加内标), 其他均按照“2.4”项下处理进样分析, 结果见色谱图 1A; 100 μL 空白血浆中加入一定浓度的盐酸普萘洛尔对照品溶液及内标溶液, 按同法处理, 结果见色谱图 1B; 取给药 30 min 后的血浆样品 100 μL, 同法处理, 结果见色谱图 1C。结果显示, 血浆样品中盐酸普萘洛尔和内标盐酸美西律的保留时间均与对照品一致, 且内源性物质不干扰其测定, 峰形良好。

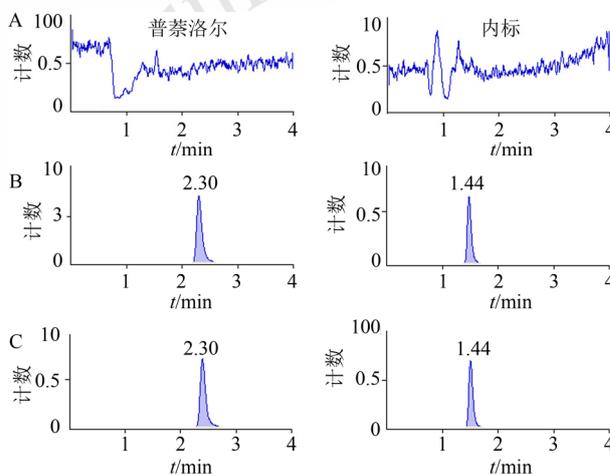


图 1 MRM 图

A-空白血浆; B-空白血浆加入盐酸普萘洛尔对照品; C-给药 30 min 后血浆样品。

Fig. 1 MRM chromatograms

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with propranolol; C-30 min plasma sample after oral administration of propranolol.

2.5.2 标准曲线及定量下限 分别取内标溶液及一系列浓度的盐酸普萘洛尔对照品溶液各 20 μL 于 100 μL 大鼠空白血浆中, 按“2.4”项下的血浆

样品处理方法进行处理,制成相当于含盐酸普萘洛尔浓度分别为5,10,20,50,100,200,500,1 000 ng·mL⁻¹的模拟血浆样品,取上清进样分析,记录色谱图,以血浆中盐酸普萘洛尔的浓度对盐酸普萘洛尔与内标盐酸美西律的峰面积比值作图,绘制标准曲线,用加权(1/X²)最小二乘法进行线性回归运算,结果表明盐酸普萘洛尔在5~1 000 ng·mL⁻¹内线性关系良好,其回归方程为 $Y=0.763\ 073X+0.039\ 192$, $r^2=0.994\ 3$,定量下限为5 ng·mL⁻¹($S/N\geq 10$)。

2.5.3 精密度及准确度 精密量取体积为100 μL的空白血浆,分别加入低、中、高3种浓度的盐酸普萘洛尔对照品溶液,每种浓度的血浆样品各6份,按“2.4”项下血浆样品处理方法进行操作,接连测定3 d,并根据随行标准曲线计算盐酸普萘洛尔在不同质控水平下的浓度,计算日内、日间精密度和准确度,结果表明盐酸普萘洛尔的日内、日间精密度和准确度均<15%,准确度均在96.19%~113.38%内,故均符合生物样品分析要求,准确度及精密度结果见表2。

表2 盐酸普萘洛尔在大鼠血浆中的准确度及精密度结果($n=6$)

Tab. 2 Precision and accuracy of propranolol in rat plasma($n=6$)

化合物	浓度/ng·mL ⁻¹	日内精密度			日间精密度		
		测量值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%	测量值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	准确度/%
盐酸普萘洛尔	10	11.34±0.11	0.96	113.38	11.19±0.09	0.73	111.88
	100	108.32±1.42	1.31	108.32	113.34±7.22	6.39	113.34
	1 000	961.88±3.45	0.36	96.19	1 017.52±49.86	4.9	101.75

表3 盐酸普萘洛尔在大鼠血浆中的基质效应和提取回收率结果($n=6$)

Tab. 3 Extraction recoveries and matrix effects of propranolol in rat plasma($n=6$)

浓度/ng·mL ⁻¹	基质效应/%	RSD/%	提取回收率/%	RSD/%
10	103.1±0.03	2.44	86.82±0.01	1.56
100	100.1±0.08	7.59	95.56±0.08	8.06
1 000	102.8±0.05	4.62	96.12±0.05	5.13

表4 盐酸普萘洛尔在大鼠血浆中的稳定性结果($n=3$)

Tab. 4 Stability of propranolol in rat plasma($n=3$)

浓度/g·mL ⁻¹	室温6 h		自动进样器12 h		反复冻融3次		-80 °C储存14 d	
	测量值/ng·mL ⁻¹	RSD/%						
10	8.56±0.44	5.13	9.46±0.78	8.23	8.26±0.16	1.97	9.37±1.26	13.49
100	99.88±2.04	2.04	109.22±4.18	3.82	103.80±1.11	1.07	96.66±0.41	0.42
1 000	929.95±4.65	0.50	938.96±9.18	0.98	912.28±10.39	1.14	919.58±11.05	1.20

2.5.4 基质效应和提取回收率 精密量取体积为100 μL的空白血浆,按“2.4”项下方法处理,配制低、中、高3种浓度的血浆样品各6份,进样分析,获得相应峰面积为 A_1 ;另取空白血浆100 μL,加入260 μL甲醇,按“2.4”下方法处理后,在上清液中分别加入低、中、高3种浓度的盐酸普萘洛尔对照品溶液20 μL,进样分析,获得相应峰面积为 A_2 ;相同分析条件下测定相应的低、中、高3种浓度对照品溶液各6次,获得相应峰面积为 A_0 ,则提取回收率计算公式为 A_1/A_2 ,基质效应计算公式为 A_2/A_0 。结果表明,3种浓度盐酸普萘洛尔的基质效应和提取回收率RSD均<15%,故均符合生物样品分析要求,结果见表3。

2.5.5 稳定性试验 精密量取体积为100 μL的空白血浆,按照“2.4”项下处理办法,配制低、中、高3种浓度的血浆样品各3份,考察条件分别为室温下放置6 h、反复冻融3次、-80 °C冰箱中冷冻14 d后再处理以及血浆样品处理后自动进样器放置12 h,结果表明各个条件下RSD值均<15%,符合生物样品分析要求,结果见表4。

2.6 药动学研究

健康SD大鼠8只,♂,分别灌胃给药,给药剂量为12.51 mg·kg⁻¹(相当于人临床剂量120 mg·d⁻¹),给药前禁食12 h,可自由饮水,分别于给药后0,0.03,0.08,0.17,0.25,0.5,1,2,4,6,8,10,12,24 h经大鼠眼内眦取血,置于1.5 mL离心管(内含肝素)中,随即离心10 min(转速:7 000 r·min⁻¹),取上清液于1.5 mL离心管中,-80 °C冰箱保存待分析。盐酸普萘洛尔的平均血药浓度-时间曲线见图2。经DAS 1.0软件分析得主要药动学参数,见表5。

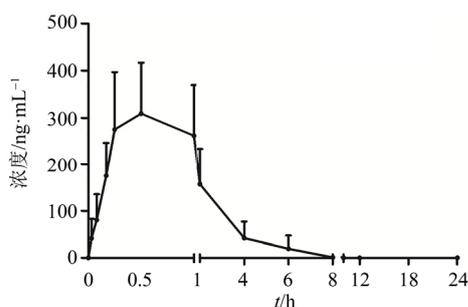


图 2 大鼠灌胃盐酸普萘洛尔后的平均血药浓度-时间曲线($n=8$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves after oral administration of propranolol($n=8$)

表 5 大鼠灌胃给药盐酸普萘洛尔后的主要药动学参数($n=8$)

Tab. 5 Pharmacokinetic parameters of propranolol after oral administration of propranolol($n=8$)

药动学参数	盐酸普萘洛尔
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	328.24±111.79
T_{max}/h	0.42±0.13
$T_{1/2}/h$	0.90±0.20
K_e/h^{-1}	0.81±0.25
$AUC_{(0-4)h}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	724.35±271.37
$AUC_{(0-\infty)h}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	739.64±270.46

3 讨论

实验方法建立过程中, 采用盐酸美西律为内标, 其色谱行为、质谱条件与待测物较接近, 且稳定性好, 信号强; 在对流动相进行考察时, 发现采用乙腈-水进行洗脱时, 待测物和内标物具有更高的响应, 且在水相中加入 0.1%的甲酸可以改善待测物和内标物的峰形, 同时可使基线稳定^[10]; 其次采用等度洗脱法对样品进行分析, 目标峰出现在 1 min 之后, 可以较好避免血浆中内源性物质基质效应的干扰^[11], 同时又能够显著缩短样品的分析周期, 从而加快分析速度; 采用甲醇沉淀蛋白法处理血浆样品, 盐酸普萘洛尔的提取回收率和基质效应均符合生物样品的测定要求。文献已报道的盐酸普萘洛尔血浆样品前处理方法一般为液液萃取法, 萃取法首先碱化血浆样品, 之后用有机溶剂进行萃取, 其操作流程复杂, 且萃取溶剂一般为乙醚、二氯甲烷等毒性试剂, 而甲醇沉淀蛋白法与液液萃取法相比更为方便、安全, 在满足定量要求的同时大大减少了预处理时间, 一定程度可以加快分析速度, 提升效率, 因此本实验方法同样具有实践意义, 值得广泛推广, 此外

该方法还可以应用于其他药动学研究。

实验结果显示, 口服给予盐酸普萘洛尔, 其在大鼠体内的药动学过程属于一室模型, 达峰时间为 30 min 左右, 半衰期大约为 1 h, 表明普萘洛尔在大鼠体内的吸收、消除速度较快。上述结果提示, 盐酸普萘洛尔在大鼠体内吸收、消除较为迅速, 从而对临床用药具有一定的指导作用。

REFERENCES

- [1] BÜHRER C, ERDEVE Ö, BASSLER D, et al. Oral propranolol for prevention of threshold retinopathy of prematurity (ROPROP): protocol of a randomised controlled trial [J]. *BMJ Open*, 2018, 8(7): 1-7.
- [2] 张红岩. 普萘洛尔与美托洛尔的临床应用及药理学研究[J]. *当代医药论丛*, 2018, 16(10): 1-2.
- [3] 张娟红, 徐丽婷, 王荣, 等. 普萘洛尔构象研究与临床应用进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(28): 2680-2683.
- [4] DEL FRARI L, LEAUTE-LABREZE C, GUIBAUD L, et al. Propranolol pharmacokinetics in infants treated for Infantile Hemangiomas requiring systemic therapy: Modeling and dosing regimen recommendations [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2018, 6(3): 1-14.
- [5] WEN S S, WANG J, LI Y X, et al. Determination of microemulsion gel of propranolol in rabbit plasma by solid phase extraction and HPLC with fluorescence detector [J]. *J Log Univ PAPF(Med Sci)(武警后勤学院学报: 医学版)*, 2016, 25(8): 610-613.
- [6] MARTINS S M, ROSA M F D A, SOUZA F, et al. Development and validation of analytical methodology for quantification of propranolol hydrochloride in a multiparticulate biphasic system by UV-vis spectrophotometry [J]. *Acta Scientiarum Technol*, 2018, 40(1): 30754.
- [7] DENG B, YIN H, LIU Y, et al. Pharmacokinetics of propranolol hydrochlorid in human urine by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence [J]. *Anal Sci*, 2011, 27(1): 55-59.
- [8] ZHAO L Z, ZHONG G M, HUANG M. LC/MS/MS Determination of propranolol and its metabolites 4-hydroxypropranolol and *N*-desisopropylpropranolol in rat plasma [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2005, 25(10): 1203-1206.
- [9] PARTANI P, MODHAVE Y, GURULE S, et al. Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(5): 966-976.
- [10] 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(中国现代应用药理学)*, 2018, 35(7): 959-962.
- [11] GONG Y, LI H, LIU W, et al. Determination of moxifloxacin in patients plasma by LC-MS/MS [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2018, 35(6): 797-800.

收稿日期: 2019-01-17

(本文责编: 曹粤锋)