

HPLC法快速测定人血浆中酒石酸美托洛尔的浓度

张志豪*, 孙萍萍(中山大学附属第一医院, 广州 510080)

中图分类号 R969.1;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)05-0611-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.05.12

摘要 目的:建立快速测定人血浆中酒石酸美托洛尔浓度的方法。方法:血浆样品以3-叔丁基甲醚处理后,采用高效液相色谱法进样测定,色谱柱为Kromasil LC-18DB,流动相为乙腈-10 mmol/L 辛酸磺酸钠溶液(pH=2.0)(30:70),柱温为25℃,流速为1.3 ml/min,荧光检测波长为267 nm(激发波长)、290 nm(发射波长),内标为吲哚洛尔。结果:酒石酸美托洛尔血药浓度在2~300 ng/ml范围内线性关系良好($r=0.999\ 9$),最低检测浓度为1 ng/ml。平均方法回收率为(101.13±4.0)%,日内RSD≤2.47%,日间RSD≤4.51%。结论:该方法简便、快速、灵敏、重现性好,适用于酒石酸美托洛尔临床血药浓度监测及人体药动学研究。

关键词 美托洛尔;血药浓度;高效液相色谱法;药动学

Rapid Determination of Metoprolol Tartrate Concentration in Human Plasma by HPLC

ZHANG Zhi-hao, SUN Ping-ping(The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for rapid determination of metoprolol tartrate (MLT) concentration in human plasma. METHODS: Plasma sample was tested by HPLC after 3-tert-butyl methyl ether treatment. It was performed on a Kromasil LC-18DB column with the mobile phase consisted of acetonitrile -10 mmol/L octane sulfonate solution (pH=2.0) (30:70) at the flow rate of 1.3 ml/min with column temperature of 25℃; and the fluorescence detection wavelength was 267 nm (excitation wavelength), 290 nm (emission wavelength). RESULTS: The plasma concentration of MLT showed a good linear relationship in the range of 2-300 ng/mL ($r=0.999\ 9$), and the minimum detectable concentration was 1 ng/ml. The mean recovery rate was (101.13±4.0)%, and RSDs of intra-day and inter-day were less than 2.47% and 4.51%, respectively. CONCLUSIONS: This method is found to be simple, rapid, sensitive, reproducible and applicable to the clinical plasma concentration monitoring of MLT and human pharmacokinetics study.

KEY WORDS Metoprolol; Plasma concentration; HPLC; Pharmacokinetics

使用量相关,相关性有统计学意义,这与国内外有关研究结果一致^[3-4]。

近年来,铜绿假单胞菌对多种抗菌药物快速产生耐药性已是不争的事实。铜绿假单胞菌耐药率不断增加,已经出现对第三代头孢菌素和亚胺培南耐受的铜绿假单胞菌。第三代头孢菌素中的头孢他啶是经典的抗铜绿假单胞菌药,但近年来耐药菌株在迅速增加。碳青霉烯类的经典代表亚胺培南广泛用于临床,成为抗铜绿假单胞菌的重要药物之一,但近年来由于使用此药所产生的耐药菌株不断涌现,且数量大增,这就使得临床的抗感染治疗显得越来越困难。铜绿假单胞菌耐药的产生主要是由于随着广谱β-内酰胺类抗生素的广泛使用,铜绿假单胞菌产生了多种β-内酰胺酶,孔蛋白通道变化导致外膜通透性降低,生物被膜形成及主动泵出机制,导致多重耐药^[5-6]。针对日益严重的细菌耐药问题,目前国内外的研究认为,不断增长的细菌耐药与抗菌药物的广泛应用所造成的选择性压力密切相关,抗菌药物轮换使用可引起区域性耐药菌的流行病学变化,从而减少耐药菌的产生^[1-7]。因此,及时了解细菌的耐药性变化及与抗菌药物使用量的关系,有规律地轮替使用抗菌药物,有助于改善医院内微生物的生态平衡^[8-9]。

本文仅初步提示了铜绿假单胞菌耐药水平与不同抗菌药物使用量间存在相关性,至于它们之间的确切关系,有待于今后通过更多的多因素分析及临床前瞻性研究进行深入探讨。

参考文献

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:020-87334586

- [1] Karlowsky JA, Jones ME, Thornsberry C, et al. Stable antimicrobial susceptibility rates for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the 2001-2003 tracking resistance in the United States today surveillance studies[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(Suppl 2): 89.
- [2] 陈丽娟, 林静. 我院抗菌药物应用及细菌耐药性分析[J]. *中国药房*, 2007, 18(14): 1 603.
- [3] 马晓鹏, 陈广斌, 蔡伟明. 我院2005—2007年抗菌药物使用量与铜绿假单胞菌耐药的相关性分析[J]. *中国药房*, 2008, 19(26): 2 026.
- [4] Cizman M, Srovin T, Pokorn M, et al. Analysis of the causes and consequences of decreased antibiotic consumption over the last 5 years in Slovenia [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 55(5): 758.
- [5] 张险峰, 张晟, 杨仁洪, 等. 应用哌拉西林/他唑巴坦控制产ESBL菌株增殖[J]. *江苏医药*, 2007, 33(5): 514.
- [6] 汪复. 应加强细菌耐药性和耐药菌感染的研究力度[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(9): 579.
- [7] 杨莉, 倪语星. 抗菌药物交替使用方案对细菌耐药性的影响[J]. *国外医学微生物学分册*, 2004, 27(3): 37.
- [8] 孟甄, 金建玲, 刘玉庆, 等. 细菌耐药性的诱导与消除[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(9): 1 047.
- [9] 何礼贤. 控制和避免细菌耐药: 抗菌药物临床应用策略的研究与实践[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(1): 2.

(收稿日期:2013-11-21 修回日期:2014-03-18)

(编辑:余庆华)

酒石酸美托洛尔(MTL)是一种临床上常用的 β_1 受体阻滞药,近年来用于治疗慢性心力衰竭等疾病,取得了较好的疗效;并有大量临床研究证实, β 受体阻滞药可减少高危患者或心血管手术患者心血管并发症的发生率,是一种安全有效的预防措施^[1]。MTL血药浓度测定国内外已有报道,有些方法采用液-液萃取法^[2-3]、固相萃取法^[4-5]、梯度洗脱法^[6]等,操作烦琐、耗时,有些方法采用乙腈直接沉淀蛋白进样^[6-7],样品处理简便,但方法灵敏度较低。笔者建立了一种简便、快速、灵敏、重现性好的高效液相色谱法,用于临床上围术期应用MTL预防心血管事件发生的患者血浆中的浓度监测及人体药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪,包括600型低压梯度泵、717型自动进样器、474型荧光检测器、Millennium³²色谱工作站(美国Waters公司);XW-80A涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);3K18高速冷冻离心机(德国Sigma公司,本试验离心半径:8 cm)。

1.2 药品与试剂

MTL对照品(美国Sigma公司,纯度:98.0%,批号:016K1155);内标:吲哚洛尔对照品(PDL,美国Sigma公司,纯度:98.0%,批号:068H1314);辛烷磺酸钠(国药集团试剂有限公司,纯度:98%,批号:20121028);乙腈为色谱纯,3-叔丁基甲醚均为分析纯。

2 方法^[8-12]与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil LC-18DB(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-10 mmol/L 辛烷磺酸钠(pH=2.0)(30:70);柱温:25 $^{\circ}$ C;流速:1.3 ml/min;荧光检测波长:267 nm(激发波长,Ex)、290 nm(发射波长,Em)。在该色谱条件下,血浆中内源性杂质均不影响MTL和内标的分离测定,MTL与内标PDL保留时间分别为12、8.2 min。空白血浆、空白血浆+MTL对照品+内标及血浆样品色谱图见图1。

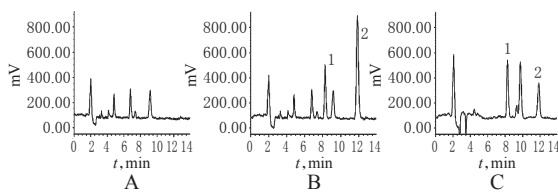


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+MTL对照品+内标;C.血浆样品;1. PDL;2. MTL

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + MTL control + internal + standard; C. plasma sample; 1. PDL; 2. MTL

2.2 血药浓度测定

2.2.1 MTL标准溶液的制备 准确称取MTL对照品10 mg,置于100 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为100 μ g/ml的MTL标准贮备液。将MTL标准贮备液以甲醇稀释,配制成质量浓度分别为0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15 μ g/ml的MTL标准溶液。

2.2.2 内标溶液的制备 准确称取吲哚洛尔对照品适量,置于100 ml量瓶中,以甲醇溶解并定容,得质量浓度为10 μ g/ml的内标溶液。

2.3 血浆样品处理与测定

精密吸取血浆样品1.0 ml,置于10 ml具塞离心管中,加入内标溶液20 μ l,涡旋混合30 s,加入3-叔丁基甲醚2 ml,振摇30 min,4 500 r/min离心10 min。分离有机层,置于1.5 ml离心管中,30 $^{\circ}$ C下以 N_2 流吹干,残渣加入60%甲醇100 μ l涡旋混合30 s使其溶解后,10 000 r/min离心5 min。取上清液20 μ l进样测定,记录色谱图,以MTL峰面积(A_1)与内标峰面积(A_2)之比(y)代入标准曲线计算MTL血药浓度。

2.4 标准曲线的制备

精密吸取空白血浆1.0 ml,置于10 ml具塞离心管中,分别加入不同质量浓度的MTL标准溶液20 μ l,混匀,使其质量浓度分别为2、5、10、20、50、100、150、200、300 ng/ml。按“2.3”项方法操作,以不同质量浓度MTL系列溶液的 A_1 和 A_2 来计算 y 。以 y 值为纵坐标,MTL浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程: $y=0.0253x-0.0084$ ($r=0.9999$)。结果表明,MTL血药浓度在2~300 ng/ml范围内线性关系良好,MTL的最低检测浓度为1 ng/ml。

2.5 回收率及精密度试验

分别于空白血浆1.0 ml中加入低、中、高质量浓度的MTL标准溶液20 μ l,混匀,使其质量浓度分别为7.5、75、300 ng/ml,按“2.3”项方法操作,将MTL峰面积(A_1)与内标峰面积(A_2)之比(y)代入标准曲线计算MTL血药浓度,以测得值与加入值之比计算方法回收率。结果,平均方法回收率为(101.13 \pm 4.0)%($n=15$)。另以甲醇配制相应系列质量浓度的MTL溶液,不经提取直接测定,以此为标准,将两组峰面积相比,计算MTL提取回收率。以同日内测得的MTL浓度计算日内精密度,以1周内5次测得的MTL浓度计算日间精密度。结果,高、中、低质量浓度的提取回收率分别为(89.19 \pm 1.60)%、(88.52 \pm 1.05)%、(87.09 \pm 1.60)%,日内RSD \leq 2.47%,日间RSD \leq 4.51%。回收率及精密度试验结果见表1。

表1 回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of recovery and precision test($\bar{x} \pm s$)

加入量, ng/ml	日内精密度		日间精密度		方法 回收率,%	提取 回收率,%
	测得量, μ g/ml	日内RSD,/%	测得量, μ g/ml	日间RSD,/%		
7.5	7.78 \pm 0.17	2.23	7.81 \pm 0.35	4.51	103.68	87.09 \pm 1.60
75	77.41 \pm 1.91	2.47	77.22 \pm 2.5	3.24	103.21	88.52 \pm 1.05
300	289.46 \pm 3.05	1.06	289.23 \pm 7.31	2.53	96.49	89.19 \pm 1.60

3 讨论

笔者采用振摇提取法测定MTL的血药浓度,具有样品处理简便、提取率稳定、灵敏度高、重现性好的特点。有文献报道用涡旋器涡旋提取药物^[13-16],此方法虽然操作较省时,但会经常出现严重乳化,影响药物回收率,导致每次测定的结果不一致甚至使试验失败:徐维平等^[12]用沉淀法处理样品,则存在杂质干扰多和线性范围窄的缺点。

正己烷、环己烷、乙酸乙酯、1-氯正丁烷都可以作提取溶剂,从综合性能考虑,3-叔丁基甲醚作提取剂,杂质峰相对最

少,提取率较高,而且只需要碱化后一次性提取,比起文献反复提取^[13-15]和多次提取^[16]操作更方便。

笔者发现,采用60%甲醇溶解吹干的残渣得到的提取率最高且杂质干扰最少,如果用较高浓度的甲醇水溶液溶解,得到的色谱图杂质较多;如果用低于60%甲醇水溶液溶解残渣,离心后分离效果不好,提取率明显下降,而且还会缩短色谱柱的寿命。

在查阅文献[12-15]时,发现基本上都未能解决MTL峰形对称性的问题。MTL含氮基团较多,在C₁₈柱上保留较强,会出现拖尾、峰宽的现象。试验中发现,在pH值为2.0和一定量离子对试剂存在时,能解决MTL峰形对称性的问题,大大提高灵敏度。本方法下最低定量浓度为2 ng/ml,低于文献所报道的最低线性定量浓度5 ng/ml^[11-16]。

参考文献

[1] Rtlledge DR, Garrick C. Determination of metoprolol and its a-Hydroxide metabolite in serum by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr Sci*, 1989, 27(9): 561.

[2] 杜少芬,李喜荣,李义贤.美托洛尔治疗围手术期心动过速[J]. *河南医药信息*, 2001, 9(10): 6.

[3] Howell SJ, Sear YM, Yeates D, et al. Risk factors for cardiovascular death after elective surgery under general anaesthesia[J]. *Br J Anaesth*, 1998, 80(1): 14.

[4] Allman KG, muir AD, HWell SJ, et al, resistant hypertension and preoperative silent myocardial ischemia in surgical patients[J]. *Br J Anaesth*, 1998, 80(1): 14.

[5] Stuhmeier KD, Maizer B, Cierpka J, et al. small oral dose of clonidine reduce the incidence of intraoperative myocardial ischemia in surgical patients having vascular surgery[J]. *Anesthesiology*, 1996, 85(4): 706.

[6] Poldermans D, Boersma E, Bax JJ, et al. The effect of bisoprolol on perioperative mortality and myocardial infarction in high - risk patients undergoing vascular surgery. [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(24): 1 789.

[7] Mangano DT, Layug EL, Wallace A, et al. Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after non-cardiac surgery[J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(23): 1 713.

[8] 尹光芬,汤珺,朱东方,等.颈丛麻醉中心动过速用美托洛尔的效果分析[J]. *局部解剖学杂志*, 2001, 10(1): 33.

[9] 谭晓玲,滕晓彬,王忠,等.美托洛尔对冠心病高危人群麻醉手术中心血管应激反应的防治作用[J]. *泸州医学院学报*, 2005, 28(5): 442.

[10] 陆萍,范金红.美托洛尔治疗麻醉期间心动过速的临床观察[J]. *河北医药*, 2004, 26(9): 734.

[11] 赖仁纯,许梅曦.美托洛尔对老年食管癌患者围术期心脏功能的保护作用[J]. *癌症*, 2006, 25(5): 609.

[12] 徐维平,胡世莲,姜玲,等.离子对-反相高效液相色谱法测定人血清中美托洛尔的浓度[J]. *中国临床保健杂志*, 2005, 8(3): 193.

[13] 黄蓓琳,吴涓,王洪泉,等.高效液相色谱法测定人血清中酒石酸美托洛尔浓度[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2000, 17(5): 408.

[14] 吕静,李剑芳.高效液相色谱法测定人血浆中美托洛尔浓度[J]. *广东药学*, 2001, 11(4): 40.

[15] 吴友平,罗伟.同一流相分离检测美托洛尔和普罗帕酮的血药浓度[J]. *中国新药杂志*, 2000, 9(2): 99.

[16] 王德凤,黄桂华.高效液相色谱-荧光检测法测定狗血浆中富马酸美托洛尔的浓度[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2005, 43(12): 1 188.

(收稿日期:2014-08-07 修回日期:2014-09-07)

(编辑:李 劲)

2015年全国疾病预防控制工作会议在京召开

本刊讯 2015年1月15日,国家卫生和计划生育委员会在京召开2015年全国疾病预防控制工作会议,全面总结2014年疾控工作,部署2015年重点任务。国家卫生和计划生育委员会主任李斌出席会议并讲话,副主任王国强作工作报告和总结讲话。

李斌指出,党中央、国务院高度重视疾控工作,习近平总书记、李克强总理、刘延东副总理多次作出重要指示批示。党的十八大以来,在国家层面出台了一系列疾控相关法规政策,重大疾病防治策略不断优化,重大和基本公共卫生服务水平显著提升,出色完成救灾防疫和重大活动卫生保障任务,艾滋病、结核病、血吸虫病、乙肝等重大疾病防控和爱国卫生工作取得显著成效。

李斌强调,要从历史经验、国际形势和国内情况三个维度深化对疾控工作重要意义的认识,进一步增强新形势下做好疾控工作的紧迫感、责任感。当前和今后一段时期要抓好几项重点工作:一是要深入持久地开展爱国卫生运动,宣传贯彻好国务院《关于进一步加强新时期爱国卫生工作的意见》,抓好改水改厕、病媒防制、卫生城镇创建、城乡环境卫生整洁行动、健康城市建设等工作,加强对爱国卫生工作的组织领导。

二是要加强重大疾病预防控制,坚持预防为主、因病施策,严控传染病疫情,实施慢性病综合防控,继续完善精神卫生服务体系,进一步完善防治结合工作机制,健全重大疾病防治保障机制。三是要持续提高基本公共卫生服务水平,通过建立项目管理协作机制、完善考核制度、强化疾控机构对基层的指导,提高资金使用效率,真正让群众受益。四是要切实加强疾控机构队伍建设,加快执行《关于疾病预防控制机构编制标准的指导意见》,认真落实国务院常务会议确定的加强传染病防治人员安全防护的政策措施,积极探索建立符合行业特点的公共卫生医师培养制度。

王国强作了题为《凝心聚力、攻坚克难、改革创新、求真务实,努力开创疾病预防控制工作新局面》的工作报告,全面总结了2014年全国疾控工作取得的新进展、新成效、新经验,分析了疾控工作中存在的突出问题,并对2015年重点任务进行了部署。

国家卫生和计划生育委员会相关司局负责同志,各省、自治区、直辖市卫生和计划生育委员会和新疆生产建设兵团卫生局分管负责同志、有关处(室、办)主要负责同志、疾控中心主任以及中国疾控中心相关负责同志参加了本次会议。