维普资讯 http://www.cqvip.com

① 93,18(2) 97-101

生物体液中美多洛尔和α-羟基美多洛尔反相离子对HPLC测定*

药理学教研室 涂植光 全钰珠

R446.1

提 要 建立了同时测定人血浆、唾液和尿液中美多洛尔及其代谢物α-羟基美多洛尔的反相离子对高效液相色谱-紫外检测法。本法回收率≥92%，色谱分离效果好，而层析时间<10min，并有较高的特异性、重复性及精密度，日间及日内测定的变异系数≤6.3%。美多洛尔和α-羟基美多洛尔在上述体液中的最低检测限，除血浆中α-羟基美多洛尔为50ng/ml外，余均为10ng/ml。无论用外标法还是以普萘洛尔为内标物的内标法定量，在0.1-10μg/ml范围内，美多洛尔和α-羟基美多洛尔均有良好的线性关系

关键词 美多洛尔；α-羟基美多洛尔；高效液相色谱法 血浆，尿
中图分类号 R446.1

美多洛尔(美多心安，metoprolol,M)是目前最广泛应用的选择性β1受体阻断剂。其在人体内生成α-羟基美多洛尔(α-hydroxymetoprolol,α-OHM)的代谢反应表现出遗传多态性(genetic polymorphism)，并与异喹胍4-羟化反应多态性受同一基因控制[1,2]。测定人体液中M及α-OHM量，可用于研究这类遗传多态性及M的血药浓度监测。现有测定方法多为高效液相色谱(HPLC)-荧光检测法[3,4]。本文报告以普萘洛尔(propranolol，P)为内标物，用反相离子对HPLC-紫外检测法同时测定人血浆、唾液及尿中M和α-OHM的方法。

材料和方法

1. 药品和试剂

M酒石酸盐标准品(瑞典Astra药厂生产，批号90291.)由华瑞制药有限公司赠送；α-OHM苯甲酸盐标准品由瑞典Astra药厂赠送。盐酸普萘洛尔，庚烷磺酸钠购自Sigma公司，其它试剂均为国产AR级产品。

称取M酒石酸盐、α-OHM苯甲酸盐及盐酸普萘洛尔标准品，分别用甲醇溶解配成100μg/ml上述药品基质的贮备液，密闭置于-30℃冰箱中，每次临用前再用蒸馏水稀释成所需浓度内标液及系列M和α-OHM标准溶液。

2. 样品处理

尿液经3000r/min离心10min，吸取上清尿1ml于具塞试管内，加入1μg内标物P，0.25ml1mol/L Na_2CO_3水溶液，漩涡混匀，再加入5ml二氯甲烷，漩涡混匀提取30s，3000r/min离心10min，弃去上层水相，将有机相转入另一具塞试管内，30℃水浴中氮气流吹干，密闭置于冰箱中冷藏。色谱分析时用1ml移动相液漩涡混溶残留物，3000r/min离心15min，吸取20μl进样分析。

血浆和唾液测定时，分别吸取1ml样品，加入0.5μg内标物P及0.2ml30%三氯乙酸，混匀后3000r/min，离心15min，吸取0.8ml上清液于具塞试管内，加入0.2ml 1.5mol/L NaOH混匀，再加入5ml二氯甲烷，余操作同上。

回收率及标准曲线测定时，在空白样品中分别加入内标物及不同浓度M，α-OHM标准品，混匀后再按前述步骤操作提取。

3. 仪器

HPLC系统由Shimadzu公司LC-6A泵，SPD-

* 本课题由国家教委青年教师基金资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

6AV紫外可见光检测器，Rheodyne 7125 进样器，SCL-6A系统控制器，C-R3A数据处理机及Waters公司 Novapak Phenyl 3.9×150mm 色谱柱组成。紫外光谱扫描用Shimadzu UV-265 紫外分光光度计完成。

结　果

1. 检测波长

将M、α-OHM及P标准品分别溶于移动相液中，行紫外光谱扫描，结果表明，3种化合物均在225nm处有一吸收峰，故将色谱分析检测波长定为225nm。

2. 色谱分析条件

我们曾按通常的反相HPLC法，试用了不同的固定相，改变移动相组成和pH，均不能得到满意之色谱分离。但采用反相离子对色谱法，将分离条件定为以苯基柱为固定相，柱温恒定30℃，移动相由90% 甲醇，10% 2.5mmol/L 庚烷磺酸钠水溶液，0.05% 冰乙酸组成，流速1.2ml/min，可使检测物得到波形对称、尖锐，并达到基线分离之色谱（图1）。α-OHM，M和P的保留时间（R_t）约为5.2min，7.0min 和8.6min。用上述移动相采用C18，C8 柱，除 R_t 不同外，亦可得满意分离效果。

3. 特异性

如图1所示，空白血浆、尿及唾液色谱图中，在检测物出峰处均未见干扰峰。我们还观察到，受试者同时或近期（一周内）使用青霉素、大环内酯类抗生素、SMZ、TMP、氟哌酸、甲硝唑、乙酰水杨酸、醋氨酚、咖啡因、扑尔敏等药，对本测定方法无干扰，提示本法有较好的特异性。

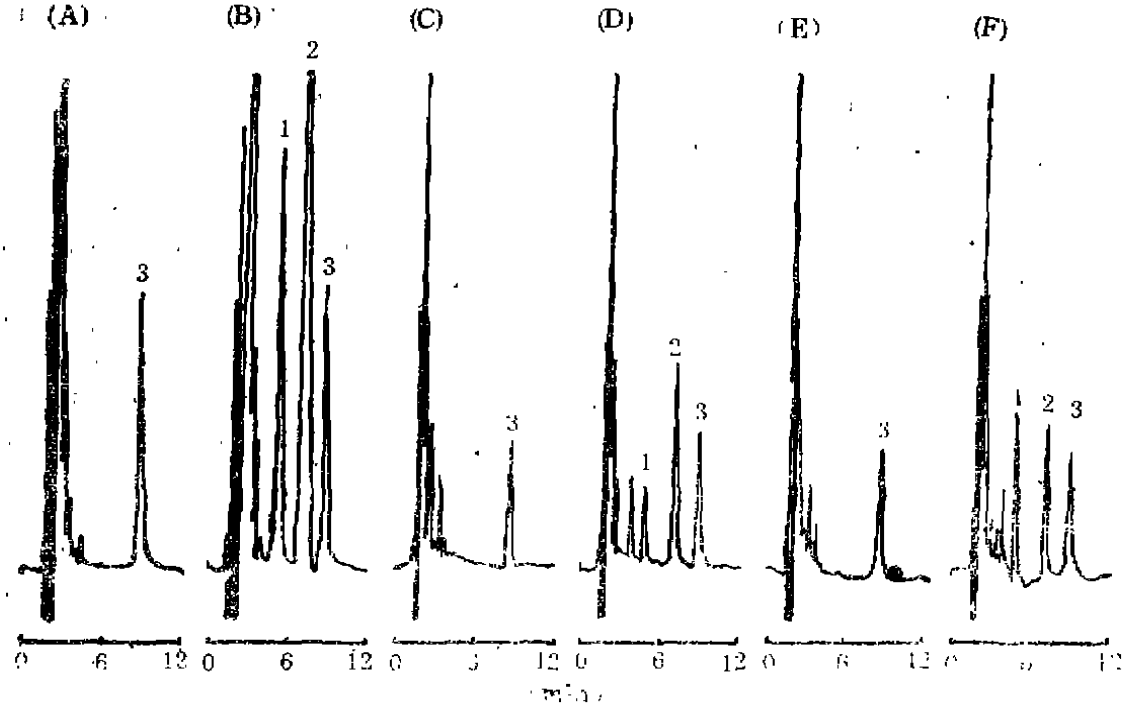


Fig 1. chromatograms of α-hydroxymetoprolol(1), metoprolol(2) and the internal standard propranolol(3)in human urine, saliva and plasma. (A) pre-dose urine of a subject;(B)0-8 h urine collected from the same subject who had taken 100 mg metoprolol tartrate; (C) pre-dose saliva, (D) 2h saliva after the subject had taken 100 mg metoprolol tartrate;(E)blank plasma; (F) plasma containing 0.5 μg of α-hydroxymetoprolol and metoprolol base respectively.

维普资讯 http://www.cqvip.com

4. 回收率及检测限

本方法的回收率见表1。回收率均≥92%，变异系数（*CV*）均<5%。在不同体液中M和α-OHM的最低检测限多为10ng/ml，仅α-OHM在血浆中为50ng/ml。与文献报告的液-液提取，HPLC-荧光检测法相近[5]，但优于尿液直接进样HPLC-荧光检测法[4]。

表1. Extraction efficiency of metoprolol(M) and α-hydroxymetoprolol(α-OHM)

Compound	Extraction efficiency(%)*				
	0.1μg	0.5μg	2.5μg	5μg	10μg
M	95.1±4.2	93.2±4.4	92.0±3.6	95.7±4.6	93.1±2.7
	(4.4%)	(4.7%)	(3.9%)	(4.8%)	(2.9%)
α-OHM	96.0±3.6	97.4±4.4	96.3±1.8	94.3±2.5	94.8±3.9
	(3.8%)	(4.5%)	(1.9%)	(2.7%)	(4.1%)

* $\bar{x}\pm SD$, $n=6$. The values in parentheses represent the coefficient of variation

5. 精密度，重复性及稳定性

按前述方法在同一天，对含不同浓度之M和α-OHM的6批尿样重复测定，以及含不同浓度的M和α-OHM的尿样分别在5d测定（表2），结果表明本法有较高之精密度及重复性。此外，将一批样品提取、吹干、用移动相重溶解后，密闭置于-30℃冰箱中，分别在当日及第3，6，9，12，15d测定，发现在15d内，M和α-OHM量无明显变化（CV均在5%以内）。提示在上述条件下，M和α-OHM至少在15d内是稳定的。

表2. Intra-day and inter-day variation in the determination of metoprolol and α-hydroxymetoprolol in urine ($\bar{x}\pm SD$)

Concentration	Metoprolol		α-hydroxymetoprolol	
(μg/ml)	Area ratio	CV	Area ratio	CV
Intra-day($n=6$)				
0.5	0.192±0.012	6.3%	0.177±0.008	4.5%
1.5	0.595±0.028	4.7%	0.563±0.019	3.3%
2.5	1.012±0.029	2.9%	0.995±0.046	4.6%
5	1.915±0.095	5.0%	1.857±0.088	4.6%
10	3.984±0.211	5.3%	4.031±0.113	2.8%
Inter-day($n=5$)				
0.5	0.190±0.007	3.7%	0.188±0.008	4.8%
1.5	0.586±0.021	3.6%	0.556±0.011	2.0%
2.5	1.080±0.042	3.9%	0.992±0.054	5.5%
5	1.966±0.057	2.9%	1.908±0.042	2.2%
10	3.856±0.170	4.4%	3.936±0.181	4.6%

6. 定量方法

用P作为内标物，从色谱学行为看，是较理想的。在0.1-10μg/ml的范围内，用内标法定量，M和α-OHM均存在良好的线性关系（图2）。但为避免近期曾或同时使用P对本方法的干扰，我们比较了在尿中加入系列浓度的M和α-OHM，分别用内标法或外

维普资讯 http://www.cqvip.com

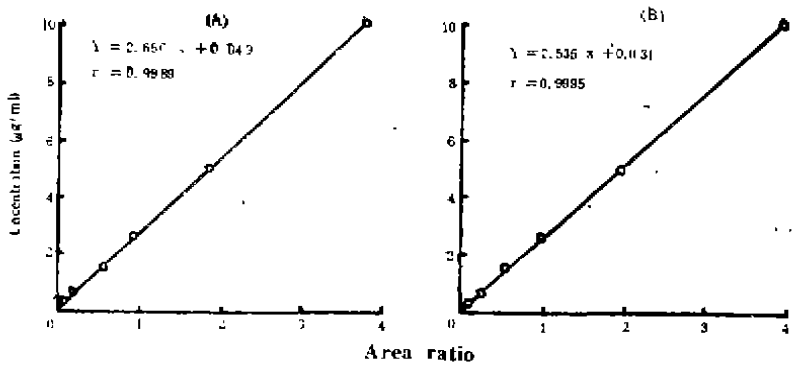


Fig 2. The caliberation curves of α-hydroxymetoprolol(A) and metoprolol(B).

标法得到的直线方程。发现无论用内标法(5次测定)还是外标法(4次测定)，在测定的0.5-10μg基质ml/浓度范围内，用峰高(比)或面积(比)定量，M和α-OHM均有良好的线性关系(r均>0.99)。对上述两种方法的标准曲线方程分别进行多直线回归方程比较[5]，P均>0.05。因此，内标法或外标法定量均有良好的线性关系及重复性。

讨　论

M，α-OHM和P均系弱碱性化合物，和其它具较强极性的化合物一样，用常规反相色谱分离，难以获得满意效果，并易受干扰[6]。此外，对上述物质的HPLC测定，文献报告的方法，均用荧光检测[3,4]。我们建立的人体液中上述物质的反相离子对HPLC-紫外检测法，分离效果好，层析时间较短，有较高的特异性和重复性，在0.1-10μg/ml的范围内，无论用内标法或外标法定量，M和α-OHM均有良好线性关系，本法的灵敏度与文献报告的HPLC-荧光检测法相近，可满足科研及临床要求。而本方法采用HPLC最常配备的紫外检测器，便有利于国内推广。但为避免临床检测中可能遇到的近期或同时使用P对M和α-OHM内标法定量的干扰，除可用外标法定量外，今后还应进一步筛选合适的内标物，改进完善本方法。

参 考 文 献

[1] Lennard MS, et al New Engl J Med 1982; 307:1558
[2] McGourty JG, et al. Br J Clin Pharmacol 1985; 20:555
[3] Lennard MS, et al. J Chromatogr(Biomedical Application)1985; 342:199
[4] Balmer R, et al. Ibid 1987; 417:357
[5] 杨树勤，主编。医学统计学，上海科学技术出版社 1985; 150
[6] 张仁斌，等。高效液相色谱在医药研究中的应用 上海科学技术出版社 1983; 29

(收稿日期 1992-10-06)

DETERMINATION OF METOPROLOL AND α-HYDROXYMETOPROLOL IN HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS BY ION-PAIR RPHPLC

Tu Zhiguang, et al

Dept. of Pharmacology

An ion-pair reverse phase high performance liquid chromatograph method was

维普资讯 http://www.cqvip.com

②
101—105
R587.102

PCR技术在糖尿病研究中的应用

生物化学教研室 刘先俊 吕懿娟 杜建国* 冯佑民*

提 要 本文应用PCR技术从人基因组DNA中扩增出胰岛素基因片段(1128bp)，将扩增产物直接克隆到M_{13}载体中去，用双脱氧链终止法作DNA序列分析。是鉴定胰岛素基因中前肽、A链、B链和C肽编码区域有无碱基突变的一种简便、有效的方法

关键词 PCR；DNA序列分析；人胰岛素基因；非胰岛素依赖型糖尿病
中图分类号 R587.1；Q78

非胰岛素依赖型糖尿病的病因甚为复杂。早期研究表明[1]，胰岛素基因的碱基突变为非胰岛素依赖型糖尿病的病因之一。到目前为止，国外已报道了10个家族存在着胰岛素基因的碱基突变[2]。研究胰岛素的结构变异，不仅可对糖尿病患者作出病因诊断，为以后可能开展的基因治疗提供理论依据；而且可进一步研究胰岛素的结构与功能的关系，对阐明非胰岛素依赖型糖尿病的病因及发病机制无疑具有重要意义。

要从基因水平确定结构变异胰岛素的存在，需从外周血中分离到人基因组DNA (Genomic DNA)。采用鸟枪克隆(Shotgun cloning)，筛选和核苷酸序列分析以确定胰岛素基因的结构变异部位[1]。不仅所需样品量大而且操作复杂费时。

PCR(Polymerase Chain Reaction)是近年来发展起来的用于体外扩增DNA片段的方法[3,4]。这种体外扩增过程基于下列三个步骤的重复循环：模板DNA变性；寡核苷酸引物退火到模板单链DNA的相应互补序列上；用DNA聚合酶介导的引物延伸。短时间内导致特异片段呈指数级扩增。1988年，Miyano等人[5]应用PCR技术扩增出胰岛素基因的部分片段(165bp和40bp)结合寡核苷酸杂交技术来确定胰岛素基因的结构变异，但该法仅用于检测有无特定位点的突变。我们应用PCR方法从人

* 中国科学院上海生化所

developed for simultaneously estimating metoprolol and its metabolite α-hydroxymetoprolol in human plasma, saliva and urine. The extraction efficiency was above 90% in urine for both compounds. This assay procedure was reproducible and precise for metoprolol and α-hydroxymetoprolol, as judged by the coefficient of variation<6.4% on inter-day and intra-day determinatios at all concontrarions examined. The minimum detection limit of metoprolol was 10 ng/ml in plasma, saliva and urine; and that of α-hydroxymetoprolol was 50 ng/ml in plasma and 10 ng/ml in saliva and urine. The calibration curves over the range of 0.1-10 μg/ml for both compounds had high linear relationship and reproducibility, either by external standard method or internal standard method using propranolol as the internal standard

KEY WORDS HPLC; metoprolol; α-hydroxymetoprolol