

文章编号: 1006-2858(2011)12-0995-05

硝苯地平对美托洛尔大鼠体内药动学的影响

刘茜, 褚雨, 赵辉, 邵馨, 张旭, 刘艳芳

(沈阳药科大学 药学院 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立一种 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中美托洛尔的浓度, 研究硝苯地平对美托洛尔在大鼠体内药动学的影响。方法 采用 C_{18} 柱分离, 用普萘洛尔作内标, 流动相: 乙腈-水-甲酸(体积比为 40.0:60.0:0.1), 用乙酸乙酯提取处理, 采用 ESI 源, 正离子方式检测, 扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)。结果 单独给药组与联合给药组主要药动学参数如下: $\rho_{\max}$ 分别为 (502.8 ± 67.0) 和 $(623.8 \pm 137.3) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $t_{\max}$ 分别为 (0.50 ± 0.08) 和 $(0.58 \pm 0.13) \text{h}$, $t_{1/2}$ 分别为 (1.25 ± 0.80) 和 $(1.53 \pm 0.58) \text{h}$, AUC_{0-4} 分别为 (442.8 ± 50.9) 和 $(730.8 \pm 218.2) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, MRT_{0-4} 分别为 (1.24 ± 0.14) 和 $(1.68 \pm 0.41) \text{h}$, Cl/F 分别为 (39.0 ± 3.41) 和 $(25.4 \pm 7.46) \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, AUC_{0-4} 、 MRT_{0-4} 、 Cl/F 具有显著性差异($P < 0.05$), 其他药动学参数无显著性差异($P > 0.05$)。结论 硝苯地平影响美托洛尔在大鼠体内吸收和消除的药动学过程。

关键词: 美托洛尔; 硝苯地平; 高效液相色谱-串联质谱; 药动学

中图分类号: R 917

文献标志码: A

美托洛尔(metoprolol)是一种 β -受体阻滞剂, 对 β_1 -受体有选择性阻断作用, 临床上用于治疗高血压、心绞痛、心肌梗死、心律失常等^[1-3]。硝苯地平(nifedipine)是一种二氢吡啶类钙离子拮抗剂, 临床适用于预防和治疗冠心病心绞痛, 适用于各种类型的高血压^[4]。临床上已有很多两药联用的报道^[5-6], 在治疗高血压方面已得到较好疗效, 而此方面的药动学研究较少, 检测血浆中的美托洛尔多采用高效液相-荧光检测法^[7], 本文作者建立一种简单、灵敏的 LC-MS/MS 法来研究硝苯地平对美托洛尔的药动学影响。

1 仪器与材料

Agilent 1100 液相系统 [美国 Agilent 公司, 配备美国 Applied Biosystems 公司 API 2000 型三重四极杆串联质谱仪, 电喷雾离子源(ESI), Analyst 1.4.1 软件], BS124S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), TGL-46G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂), Vortex-Genie2 漩涡混合器(美国 Spring 仪器有限公司), 恒温水浴锅(北京医疗设备厂)。

酒石酸美托洛尔(天津一方科技有限公司,

含量质量分数为 99.5%), 硝苯地平(中国药品生物制品检定所, 含量质量分数为 99.9%), 盐酸普萘洛尔(内标物, 常州亚邦制药有限公司提供, 含量质量分数为 99.5%), 乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯, 重庆迪马公司), 乙醚、乙酸乙酯(分析纯, 天津康科德科技有限公司)。

雄性 Wistar 大鼠 [沈阳药科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(军)2007-004]。

2 方法

2.1 色谱/质谱条件

色谱柱为 Luna C_{18} (50 mm $\times$ 2.00 mm, 5 μm , 美国 Phenomenex 公司), C_{18} 保护柱(2.1 mm $\times$ 10 mm, 美国 Waters 公司), 流动相为乙腈-水-甲酸(体积比为 40.0:60.0:0.1), 流速为 200 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μL 。

电喷雾离子源(ESI), 离子源喷射电压为 5 500 V, 温度为 380 $^{\circ}\text{C}$, 气帘气体(N_2)压力为 172.38 kPa, 碰撞气体(N_2)压力为 27.58 kPa, 正离子方式检测, 扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 267.6 $\rightarrow$ m/z 133.1 (美托洛尔) 和

收稿日期: 2011-04-20

作者简介: 褚雨(1984-), 女(汉族), 山东枣庄人, 硕士研究生, E-mail: chuyu5566@163.com; 刘茜(1968-), 女(汉族), 辽宁大连人, 副教授, 从事体内药物分析、药物代谢动力学和临床药学研究, Tel. 024-23986298, E-mail: lqzm@yahoo.com.cn。

m/z 259.5 $\rightarrow m/z$ 116.2 (内标, 普萘洛尔)。美托洛尔和普萘洛尔 $[M+H]^+$ 的产物离子全扫描质谱图见图1。

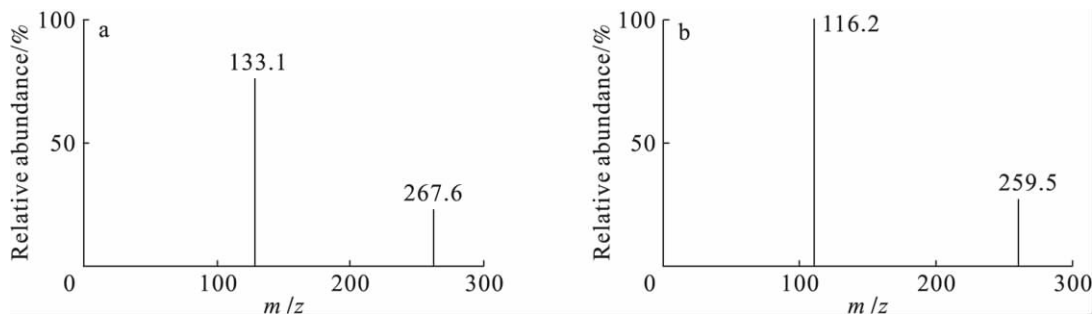


Fig. 1 MS/MS spectra of metoprolol(a) and propranolol(b)

2.2 标准溶液的制备

精密称取酒石酸美托洛尔 12.8 mg (相当于美托洛尔 10.0 mg), 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得到美托洛尔贮备液 (质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。取美托洛尔贮备液适量, 用甲醇稀释至质量浓度为 20、50、100、200、500、1 000、2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列标准溶液。

精密称取 11.4 mg 盐酸普萘洛尔 (相当于普萘洛尔 10.0 mg), 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得到内标贮备液 (普萘洛尔浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。取普萘洛尔贮备液适量, 用甲醇稀释至质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标溶液。

2.3 血浆样品的处理

于 5 mL 具塞离心管中加入大鼠血浆 100 μL , 分别加入内标溶液 (普萘洛尔 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 50 μL 、甲醇 50 μL 和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 50 μL , 涡旋 1 min, 加入乙酸乙酯 2.5 mL, 涡旋 5 min, 离心 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min, 取上层有机相 2.0 mL 于另一离心管中, 40°C 氮气流下吹干, 残留物加入流动相 100 μL 溶解, 取 20 μL 进样分析。

2.4 实验方案

健康雄性 Wistar 大鼠 12 只, 体质量为 180 ~ 220 g, 随机分成 2 组 (分别为单独和联合给药组), 每组各 6 只。给药前禁食 12 h, 自由饮水。单独给药组灌胃给予美托洛尔 ($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。联合给药组灌胃给予美托洛尔 ($18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和硝苯地平 ($9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 分别于给药后 0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、8.00 h 经大鼠眼球后静脉丛取静脉血 0.5 mL, 离心 ($3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min, 取血浆, 于 -20°C 保存待测。

谱图见图1。

2.5 分析方法的验证

2.5.1 方法的专属性

取大鼠空白血浆 100 μL , 除以相应体积甲醇代替内标外, 其他按“2.3”条操作, 进样 20 μL , 得色谱图 2a; 将一定浓度的美托洛尔标准溶液和普萘洛尔内标溶液加入空白血浆中, 按“2.3”条操作, 进样 20 μL , 得色谱图 2b; 取灌胃给药后收集的大鼠血浆样品按“2.3”条操作, 进样 20 μL , 得色谱图 2c。美托洛尔和普萘洛尔的保留时间分别为 1.10 min 和 1.16 min; 结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰美托洛尔和普萘洛尔的测定。

2.5.2 标准曲线

取大鼠空白血浆 100 μL , 加入标准溶液 50 μL , 制成相当于美托洛尔浓度为 10、25、50、100、250、500、1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的模拟大鼠血浆样品, 按“2.3”条的方法操作, 记录色谱图。以待测物质量浓度为横坐标 (ρ), 待测物与内标物峰面积比值为纵坐标 (Y), 用加权 ($W = 1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得直线回归方程为: $Y = 6.77 \times 10^{-3} \rho + 2.46 \times 10^{-2}$, $r = 0.997\,0$ 。根据线性考察结果, 美托洛尔在 $10 \sim 1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。定量下限为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.3 方法回收率与精密度

取大鼠空白血浆 100 μL , 加入相应的标准溶液 50 μL , 制成相当于美托洛尔浓度为 25、100、800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量控制样品, 按“2.3”条的方法操作, 每一质量浓度进行 6 个样本, 连续测定 3 d, 与标准曲线同时进行, 计算质量控制样品测得浓度, 并与配制血浆浓度比较, 求得日内精密度分别为 2.99%、7.57% 和 6.88%, 日间精密度分别为 9.85%、9.26% 和 14.1%, 准确度分别为 104.3%、97.0% 和 100.4%。结果见表 1。

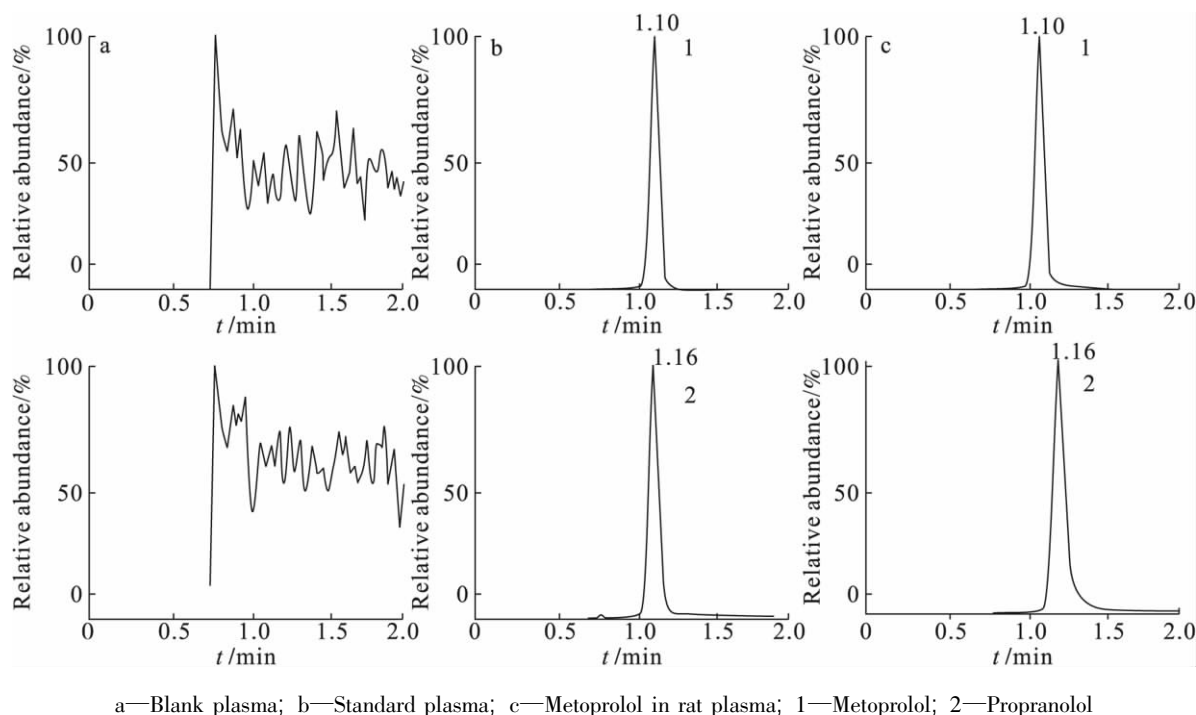


Fig. 2 Chromatograms of metoprolol in rat plasma

Table 1 Method recovery and precision of metoprolol ($n = 18 \bar{x} \pm s$)

$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery / %	Intraday RSD / %	Interday RSD / %
25	104.3 ± 1.15	2.99	9.85
100	97.0 ± 7.55	7.57	9.26
800	100.4 ± 64.8	6.88	14.1

2.5.4 提取回收率考察

取大鼠空白血浆 100 μL , 除不加内标改加相应体积甲醇外, 按“2.3”条配制美托洛尔低、中、高 3 个质量浓度 (25、100、800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 质量控制血浆样品, 每一质量浓度进行 6 样本分析, 获得相应峰面积, 记录为 A1; 另取大鼠血浆 100 μL , 除不加标准溶液和内标溶液外, 按“2.3”条操作, 向获得的上清液中分别加入相应浓度的标准溶液 50 μL , 于氮气流下吹干, 残留物加 100 μL 甲醇溶解, 分别取上清液 20 μL 进样, 获得相应峰面积 (3 次测定的平均值), 记录为 A2。以每一质量浓度 2 种处理方法的峰面积比值 $A1/A2$ 计算血浆样品提取回收率, 结果见表 2。

Table 2 Extraction recovery of metoprolol in rat plasma and in mice tissue

$\rho_{\text{plasma}} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$\bar{x}$	$\text{SD} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD / %
25.0	70.9	8.1	11.4
100.0	71.0	7.8	11.0
800.0	75.1	2.6	3.4
IS(100.0)	75.2	3.8	5.0

2.5.5 基质效应

分别取大鼠空白血浆 100 μL , 除不加内标改加相应体积甲醇外, 按“2.3”条操作, 将美托洛尔储备液加入到取出的上清液里, 使上清液里美托洛尔浓度为 25、100 和 800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 涡旋混合, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干, 残留物加流动相 100 μL 溶解, 取 20 μL 进行分析, 每种质量浓度 3 样本分析, 获得相应峰面积 (3 次测定的平均值), 记录为 A2。同时用 100 μL 水来代替大鼠空白血浆, 同上操作, 取 20 μL 进样分析, 每种浓度 3 样本分析, 获得相应峰面积 (3 次测定的平均值), 记录为 A3。以每一质量浓度 2 种处理方法的峰面积比值 $A2/A3$ 计算基质效应, 美托洛尔 3 种浓度下 2 种处理方法的峰面积比值分别为 90.6%、101.8% 和 100.3%。同法处理, 内标普萘洛尔为 102.4%。结果表明, 大鼠血浆测定方法的基质效应可忽略不计。

2.5.6 稳定性考察

作者考察了美托洛尔血浆样品 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 d 的稳定性, 血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环

的稳定性以及血浆样品经提取处理后室温放置 8 h 的稳定性 结果表明血浆样品在上述条件下稳定 结果见表 3。

Table 3 Stability of metoprolol in rat plasma

Run	$\rho_{\text{added}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{found}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{SD}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{RSD}/\%$	$\text{RE}/\%$
Room temperature for 8 h	25.0	23.8	1.0	4.2	-4.9
	100.0	103.0	2.1	2.0	3.3
	800.0	802.0	102.0	12.7	0.3
Freeze for 15 d	25.0	24.1	0.2	0.8	-3.6
	100.0	101.0	13.7	13.6	0.9
	800.0	772.0	45.0	5.8	-3.5
Freeze-thaw cycle 1	25.0	24.6	2.9	11.6	-1.7
	100.0	91.0	1.2	1.3	-9.0
	800.0	757.0	40.9	5.4	-5.4
Freeze-thaw cycle 2	25.0	26.4	0.4	1.5	5.7
	100.0	102.0	5.2	5.2	1.6
	800.0	806.0	13.0	1.6	0.8
Freeze-thaw cycle 3	25.0	26.4	1.3	5.0	5.6
	100.0	104	5.7	5.4	4.2
	800.0	753.0	28.1	3.7	-5.9

3 结果

单独与联合给药组血药浓度-时间曲线见图 3。

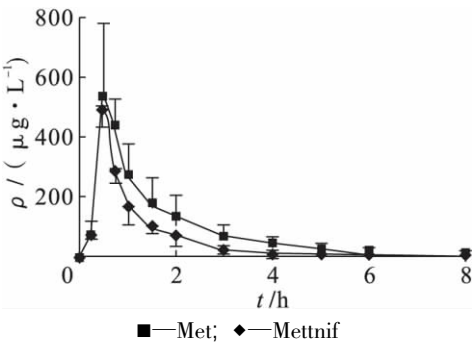


Fig. 3 Mean plasma concentration-time curve of metoprolol after i. g. administration to rats

Table 4 Non-compartmental pharmacokinetic parameters of metoprolol after single and combination administration to rats

Pharmacokinetics parameters	Metoprolol(18 mg·kg ⁻¹)	Metoprolol(18 mg·kg ⁻¹) + Nifedipine(9 mg·kg ⁻¹)	P
$\rho_{\text{max}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	502.8 ± 67.0	623.8 ± 137.3	0.081
t_{max}/h	0.50 ± 0.00	0.58 ± 0.13	0.061
$t_{1/2}/\text{h}$	1.28 ± 0.80	1.53 ± 0.58	0.262
$\text{AUC}_{0-4}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1})$	442.8 ± 50.9	730.8 ± 218.2	0.008 ^a
$\text{MRT}_{0-4}/\text{h}$	1.24 ± 0.14	1.68 ± 0.41	0.055
$\text{Vd}/\text{F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	74.9 ± 54.4	59.5 ± 41.5	0.565
$\text{Cl}/\text{F}/(\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1})$	39.0 ± 3.41	25.4 ± 7.46	0.001 ^a

a— $P < 0.05$

硝苯地平后,大鼠体内药动学数据显示 联合用药后 联合用药组 AUC_{0-4} 、 MRT_{0-4} 明显大于单独给药组 联合用药组 Cl/F 明显小于单独给药组,

美托洛尔结果数据经 DAS2.0 软件处理后得到各主要药动学参数及主要药动学参数的统计分析结果见表 4。

4 讨论

本文作者建立了 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中美托洛尔的浓度,方法具有专属性强,灵敏度高,分析速度快的特点,适于美托洛尔大鼠药动学研究。作者考察了乙腈-水,甲醇-水等不同比例的流动相,最终选择乙腈-水-甲酸(体积比为40.0:60.0:0.1),信号响应较强,得到较好的峰形和保留时间。

大鼠单独灌胃给予美托洛尔以及联合给予

AUC_{0-4} 反应药物吸收的程度,说明联合给药组美托洛尔的吸收程度比单独给药组大, MRT 类似于半衰期的统计据, MRT 代表药物质量浓度消除掉

63.2% 所需的时间,说明联合给药组消除所需要的时间比单独给药组有明显延长,CL 是表征药物消除的重要参数,也说明联合给药组的药物清除时间比单独给药组长,实验结果表明硝苯地平影响美托洛尔在大鼠体内的吸收和消除的药动学过程^[8],建议临床两药联用时,应重视两药间的相互作用,根据具体情况调整剂量,本实验为临床两药联用提供实验依据。

参考文献:

- [1] DONG Shu-ying, TONG Xu-hui, LIU Jian-chun, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of metoprolol sustained release tablets in Chinese healthy volunteers by LC-MS/MS[J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2008, 27(6): 429-433.
- [2] HOCHT P, PEZZO J A, TAIRA C A. Hypothalamic anti-hypertensive effect of metoprolol in chronic aortic coarctated rats [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005, 32(8): 681-686.
- [3] METRA M, TORP-PEDERSEN C, SWEDBERG K, et al. Influence of heart rate, blood pressure, and beta-blocker dose on outcome and the differences in outcome between carvedilol and metoprolol tartrate in patients with chronic heart failure: results from the COMET trial [J]. Eur Heart J, 2005, 26(21): 2259-2268.
- [4] WU Jing, WANG Ben-jie, WEI Chun-min, et al. Pharmacokinetics of nifedipine sustained-release tablets in healthy Chinese volunteers [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2007, 16(16): 192-196.
- [5] 韩若凌, 王彦卿, 史晏海, 等. 硝苯地平缓释片合并小剂量美托洛尔治疗高血压病的疗效 [J]. 河北医科大学学报, 1998, 19(5): 266-269.
- [6] SHOJI T, AKI Y, HORUCHI K, et al. Regional hemodynamic effects of betaxolol, a new selective beta 1-blocker and atenolol in spontaneously hypertensive rats [J]. Jpn J Pharmacol, 1992, 60(3): 253-259.
- [7] 李惠芬, 李光华, 邢淑华. HPLC-荧光检测法测定美托洛尔的血药浓度 [J]. 中国药房, 2008, 19(29): 2272-2273.
- [8] 温彬宇, 王嗣岑. HPLC/MS 考察大鼠和肝微粒体 CYP450 活性及硝苯地平代谢研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(7): 506-509.

Effect of nifedipine on pharmacokinetics of metoprolol in rats

LIU Qian, CHU Yu, ZHAO Hui, SHAO Xin, ZHANG Xu, LIU Yan-fang
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To develop an LC-MS/MS method for the quantification of metoprolol in rat plasma for investigating the interactive effects of nifedipine to metoprolol in rat plasma. **Methods** Mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile-water-formic acid ($V:V:V=40:0:60:0:0.1$) was used for the separation. Internal standard was propranolol, the extraction was performed by ethyl acetate and the samples were analyzed on C_{18} column. The ion source was adopted positive ion and multiple reaction monitoring (MRM). **Results** The pharmacokinetic parameters of metoprolol in rats after the i. g. administration of metoprolol alone and the combination of metoprolol and nifedipine were as follows: $\rho_{\max}$ were (502.8 ± 67.0) and $(623.8 \pm 137.3) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $t_{\max}$ were (0.50 ± 0.08) and $(0.58 \pm 0.13) \text{h}$, $t_{1/2}$ were (1.25 ± 0.80) and $(1.53 \pm 0.58) \text{h}$, AUC_{0-4} were (442.8 ± 50.9) and $(730.8 \pm 218.2) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, MRT_{0-4} were (1.24 ± 0.14) and $(1.68 \pm 0.41) \text{h}$, Cl/F were (39.0 ± 3.41) and $(25.4 \pm 7.46) \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. AUC_{0-4} , MRT_{0-4} , Cl/F showed significant difference with each other ($P < 0.05$), there were no significant differences of the other pharmacokinetic parameters ($P > 0.05$). **Conclusions** This method is sensitive and stable. The absorption and elimination of metoprolol in rats were effected by nifedipine.

Key words: metoprolol; nifedipine; LC-MS/MS; pharmacokinetics