

## HPLC – ECD 法测定小鼠血浆中异丙肾上腺素浓度

刘亦伟, 王长连, 黄品芳

(福建医科大学附属第一医院, 福州 350005)

**摘要 目的:** 建立高效液相色谱 – 电化学法测定小鼠血浆中异丙肾上腺素浓度, 为研究其小鼠体内药代动力学过程提供检测手段。**方法:** 采用 SymmetryShield C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm 5.0 μm) 流动相为含 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 柠檬酸 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 无水乙酸钠 0.3 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA – Na<sub>2</sub> 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> IPR – B<sub>8</sub> 离子对试剂 0.06 mmol · L<sup>-1</sup> 二正丁胺 1.6% 甲醇水溶液。流速: 0.9 mL · min<sup>-1</sup> 柱温 25 °C。以 3,4 – 二羟基苯胺为内标; 用电化学检测器测定 检测电压: 700 mV。测定小鼠皮下注射异丙肾上腺素(0.75 mg · kg<sup>-1</sup>) 后不同时间的血浆药物浓度, 用 3P97 软件拟合计算相关药动学参数。结果: IP 在浓度范围为 0.5 ~ 294.0 ng · mL<sup>-1</sup> 内 线性关系良好( $r = 0.9998$   $n = 7$ )。平均提取回收率为 85.8%, 平均回收率为 100.9%, 日内及日间 RSD 均小于 3.9% ( $n = 5$ )。最低检测限为 0.08 ng · mL<sup>-1</sup> ( $S/N \geq 3$ )。相关药动学参数为  $AUC_{0-t} = 2424.76 \text{ min} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $V_c = 2774 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $Cl = 0.309 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_a = (0.9817 \pm 0.174) \text{ min}^{-1}$ ,  $Lag \text{ Time} = (0.3076 \pm 0.0375) \text{ min}$ 。结论: 本法准确、快速、稳定、灵敏度高, 可用于生物样品中异丙肾上腺素浓度测定。

**关键词:** 异丙肾上腺素; 高效液相色谱 – 电化学法; 血药浓度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2011)06 – 1098 – 04

## HPLC – ECD determination of isoproterenol concentration in mouse plasma

LIU Yi – wei, WANG Chang – lian, HUANG Pin – fang

(Pharmacy Department of the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

**Abstract Objective:** To develop an HPLC – ECD method for determination of isoproterenol( IP) concentration in plasma. **Methods:** IP can be separated on SymmetryShield C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm 5.0 μm) column, the mobile phase was consisted of 0.05 mol · L<sup>-1</sup> citric acid monohydrate 0.05 mol · L<sup>-1</sup> sodium acetate anhydrous 0.3 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA – Na<sub>2</sub> 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> IPR – B<sub>8</sub> 0.06 mmol · L<sup>-1</sup> dibutylamine and 1.6% Methanol. Flow rate was 0.9 mL · min<sup>-1</sup>, column temperature was 25 °C. The electrochemical detector was set at 700 mV, and dihydroxybenzylamine( DHBA) was used as internal standard. IP concentration in mice plasma were determined after sc. administration(0.75 mg · kg<sup>-1</sup>) the data were processed with 3P97 pharmacokinetic program. **Results:** The isoproterenol was linear over the range 0.5 – 294.0 ng · mL<sup>-1</sup>, the correlation coefficient was 0.9998 ( $n = 7$ ). The average extraction recovery was 85.8%, the average recovery was 100.9%, RSD of intra – day and inter – day were less than 3.9% ( $n = 5$ ). The detection limit was 0.08 ng · mL<sup>-1</sup> ( $S/N \geq 3$ ). The main pharmacokinetic parameters were estimated to be as follows:  $AUC_{0-t} = 2424.76 \text{ min} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $V_c = 2774 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $Cl = 0.309 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_a = (0.9817 \pm 0.174) \text{ min}^{-1}$ ,  $Lag \text{ Time} = (0.3076 \pm 0.0375) \text{ min}$ . **Conclusion:** The method is accurate, rapid and high sensitivity, it was suitable for the determination of isoproterenol in biological sample.

**Key words:** isoproterenol( IP); HPLC; electrochemical detector( ECD); drug concentration in plasma

异丙肾上腺素( isoproterenol, IP) 是临床使用已久的 β 受体激动剂。近年有动物实验表明 IP 可激活肝细胞 β 受体, 使肝脏细胞内合成 cAMP 增多, 从

而间接促进肝间隙联结细胞间通讯( gap junctional intercellular communication, GJIC) 的主要功能蛋白 connexin43 ( Cx43) 组装成有 GJIC 功能的 GJ 构

造<sup>[1]</sup> 从而在肝肿瘤早期通过调节 GJIC 水平,抑制肝肿瘤发生。由于 IP 所致副作用较多,为探索在较低副作用下 IP 发挥调节 GJIC 作用的最佳血药浓度水平,本文在文献[2]的基础上改进,建立高效液相色谱-电化学(HPLC-ECD)法测定小鼠血浆中 IP 浓度,以适用于小鼠体内药动力学研究。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 美国 WATERS 高效液相色谱仪(包括 515 泵,7725i 进样器,2465 电化学检测器,Empower2 数据处理系统);TGL-16G 高速离心机(上海医用分析仪器厂);AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

**1.2 药品与试剂** 盐酸异丙肾上腺素(Sigma 公司,批号:117H0927);DHBA(Sigma 公司,批号:122H3651)。IPR-B<sub>8</sub> 离子对试剂(天津市化学试剂二厂,批号:420292);柠檬酸、EDTA-Na<sub>2</sub>、无水乙酸钠、二正丁胺为分析纯,甲醇为色谱纯,实验用水为三蒸水。

**1.3 实验动物** ICR 小鼠,雌雄各半,体重 25~30 g,许可证:SCXK(沪)2007-0005,中国科学院上海实验动物中心提供。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:Symmetry Shield C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)柱;流动相:含 0.05 mol·L<sup>-1</sup>柠檬酸,0.05 mol·L<sup>-1</sup>无水乙酸钠,0.3 mmol·L<sup>-1</sup>EDTA-Na<sub>2</sub>,1.0 mmol·L<sup>-1</sup>IPR-B<sub>8</sub> 离子对试剂,0.06 mmol·L<sup>-1</sup>二正丁胺,1.6% 甲醇水溶液;流速:0.9 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 25℃;检测电压:700 mV;进样量:20 μL。此色谱条件下样品色谱行为见图 1。

**2.2 对照品储备液的配制** 精密称取盐酸异丙肾上腺素对照品约 1.0 mg,加 0.02 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶解并定容成 10 mL,得异丙肾上腺素储备液(89.5 μg·mL<sup>-1</sup>);精密称取 DHBA 1.61 mg,用 0.02 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶解并定容成 100 mL,精密吸取 600 μL 稀释定容成 25 mL,得到 386.4 ng·mL<sup>-1</sup> DHBA 内标储备液。

**2.3 生物样品处理** 取血浆样品 0.5 mL,加入 Tris-盐酸(pH 8.6)溶液 200 μL,0.05% 偏重亚硫酸钠溶液和内标储备液各 50 μL,用 60 mg 活性氧化铝涡旋振荡提取 6 min,放置沉淀后弃上清液,沉淀分 3 次加入三蒸水 2 mL 洗涤,弃水相,残留物在 4℃ 冰箱中保存 0.5 h,同时用滤纸条吸干残留水分。残

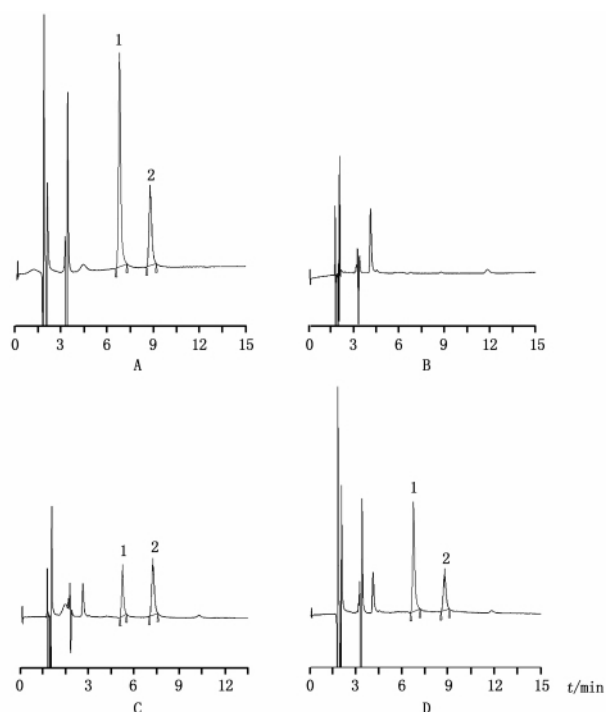


图 1 对照品(A)、空白血浆(B)、对照品血浆(C)及样品血浆(D)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms for reference substance(A), drug-free plasma(B), reference substance plasma(C), sample plasma(D)

1. 内标(internal standard, DHBA) 2. 异丙肾上腺素(isoproterenol, IP)

渣加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup>高氯酸溶液 100 μL,涡旋振荡洗脱 5 min,离心(10000 r·min<sup>-1</sup>) 5 min,取上清液 20 μL 进样分析。

**2.4 线性关系和检测限** 精密吸取适量的 IP 储备液,分别加入空白小鼠血浆,使其浓度为 0.5, 2.1, 10.5, 52.5, 105.0, 210.0, 294.0 ng·mL<sup>-1</sup> 的模拟含药血浆。以“2.3”项下样品处理法处理后,进样分析。以 IP 浓度(*C*, ng·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,IP 与 DHBA 峰面积的比值 *Y* 为纵坐标进行回归分析,IP 在 0.5~294.0 ng·mL<sup>-1</sup> 范围内,线性方程:

$$Y = 0.0199X + 0.0436 \quad r = 0.9998 \quad (n = 7)$$

最低检测浓度为 0.08 ng·mL<sup>-1</sup> (*S/N* ≥ 3)。

**2.5 提取回收率** 取空白小鼠血浆 0.5 mL,同“2.3”项提取后,残渣分别加入 IP 浓度为 1.0, 50.0, 252.0 ng·mL<sup>-1</sup> 的高氯酸溶液,洗脱后进样分析,记录峰面积。同时用空白小鼠血浆精密加入适量 IP 对照品储备液,配制 1.0, 50.0, 252.0 ng·mL<sup>-1</sup> 模拟含药血浆各 5 份,同“2.3”项下方法处理后进样分析,记录峰面积。将提取后样品峰面积与未经提取样品峰面积之比计算提取回收率,结果见表 1。

**2.6 回收率试验** 取空白小鼠血浆精密加入适量

IP 对照品储备液, 配制 1.0, 50.0, 252.0 ng · mL<sup>-1</sup> 模拟含药血浆各 5 份。依照“2.3”项下方法处理后进行样分析, 以“2.4”项下所得曲线计算测定浓度, 同理论浓度的比值计算回收率, 结果见表 1。

**2.7 精密度试验** 同“2.6”项下配制 1.0, 50.0, 252.0 ng · mL<sup>-1</sup> 3 个浓度的模拟血浆样品各 5 份, 1 d 内测定 5 次, 连续 5 d 测定, 考察方法的日内和日间精密度, 结果见表 1。

**表 1 IP 回收率及精密度试验结果(%)**  
**Tab 1 Results of recovery and precision for the determination of IP**

浓度 (concentration) /ng · mL <sup>-1</sup>	提取回收率 (extract recovery) $\bar{x} \pm S$	回收率 (recovery)		日内 (intra - day) RSD	日间 (inter - day) RSD
		$\bar{x}$	RSD		
1.0	84.5 ± 4.6	103.0	3.8	1.7	3.9
50.0	86.9 ± 4.5	99.4	1.7	0.7	1.4
252.0	86.1 ± 3.5	100.3	0.52	0.3	1.2

**2.8 专属性试验** 为了避免由于 IP 导致的小鼠实验过程可能发生的室性心动过速等副作用, 动物实验可能合用地尔硫卓及尼群地平等药物。将地尔硫卓及尼群地平在本文色谱条件下进样分析, 这 2 种物质 15 min 内均无出峰, 不干扰本实验测定。

**2.9 稳定性试验** 同“2.6”项下方法配制 1.0, 50.0, 252.0 ng · mL<sup>-1</sup> 3 个浓度的模拟含药血浆各 2 份, 均分 2 组各含 3 浓度水平 1 份。一组置 -20 °C 冰箱放置冷冻后, 隔日取出, 室温融化, 以“2.3”项下方法操作测定, 重复操作 5 次; 一组在室温条件下放置, 分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 取样同“2.3”项下方法操作测定, 结果见表 2。结果表明血浆样品在室温放置 12 h 或反复冻融 5 次后较稳定。

**表 2 IP 样品稳定性试验结果(n=5)**  
**Tab 2 Results of the stability for IP samples**

浓度 (concentration) /ng · mL <sup>-1</sup>	反复冻融稳定性 RSD	室温稳定性 RSD
	(frozen and melted repeatedly) /%	(room temperature) /%
1.0	5.3	8.2
50.0	5.8	8.4
252.0	6.2	9.4

**2.10 药动学研究中的应用** 120 只 ICR 小鼠, 体重 25 ~ 30 g, 随机平均分成 12 组, 分别皮下注射 IP 0.75 mg · kg<sup>-1</sup>, 于注射后 0.5, 1.0, 2.5, 5, 12.5, 20,

40, 60, 80, 100, 140, 200 min 各取一组行断头取血法取血, 离心取血浆同“2.3”项下方法处理测得 IP 血药浓度。平均药时曲线如图 2。将所测得浓度 - 时间值用 3P97 药动学软件处理, 得主要药动学参数  $AUC_{0-t} = 2424.76 \text{ min} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $V_c = 2774 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $Cl = 0.309 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_a = (0.9817 \pm 0.174) \text{ min}^{-1}$ ,  $Lag \text{ Time} = (0.3076 \pm 0.0375) \text{ min}$ 。

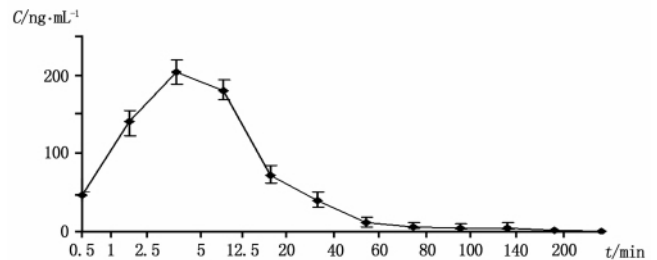


图 2 皮下注射 IP 0.75 mg · kg<sup>-1</sup> 后的平均药 - 时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration - time curves of isoproterenol in mice after sc. with the dose of 0.75 mg · kg<sup>-1</sup>

### 3 讨论

**3.1 测定方法的选择** 药典规定用滴定法或紫外法测定盐酸异丙肾上腺素<sup>[3]</sup> 原料及制剂含量, 但灵敏度难以达到生物样品分析的要求。荧光光度法<sup>[4]</sup>、化学发光法<sup>[5]</sup> 均可用于异丙肾上腺素的测定, 但由于反应体系复杂, 步骤烦琐难以应用于生物样品分析。本文在文献 [2] 基础上加以改进, 采用内标法测定, 减少测定误差, 同时使检测灵敏度提高了 20%, 专属性增加且成本低, 满足试验常规测定需要。

**3.2 样品预处理** 考察了三氯醋酸直接沉淀法, 发现蛋白和其他可溶性杂质影响仍较大, 内标峰易受干扰, 且回收率较低, 因此选用固相吸附法。因 IP 酸性条件下稳定, 故本实验采用经盐酸活化洗涤后的氧化铝作为吸附剂, 比用未经活化的氧化铝提取回收率高约 1.5 倍。且其用 60 mg 时比 50 mg 吸附效果好, 但用量过多则不易洗脱。

**3.3 色谱条件选择** 流动相中甲醇含量对 IP 和 DHBA 色谱行为影响较显著。甲醇含量升高, DHBA 与血中杂质难以较好的分离, 过低则使 IP 保留时间增加, 降低分析效率。在本文流动相中, 1 个检测周期小于 10 min, 分离度亦大于 1.5。比较了在 500, 700, 900 mV 反应电压时, IP 及 DHBA 的出峰情况, 以 700 mV 反应电压下灵敏度及峰形最佳。

#### 4 结论

本法准确、精密、灵敏度高,为研究 IP 在动物体内动力学过程提供了可靠的检测手段。

#### 参考文献

- 1 Saez JC, Bennett MVL, Spray DC. Hepatocyte gap junctions: metabolic regulation and possible role in liver metabolism. In: Hidalgo C, Baccigalupo J, Jamovich E, et al (Ed). Transduction in biological systems. New York: Plenum Corp, 1990. 23
- 2 Lee E, Joseph L, Schmit, et al. Determination of isoproterenol sulfate on surfaces using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A*, 1996, 723: 235
- 3 ChP(中国药典). 2005, Vol II(二部): 509
- 4 QIAO Shan-bao(乔善宝). Direct determination of isoprenaline by fluorescence spectrophotometry(荧光光度法直接测定盐酸异丙肾上腺素的含量). *Chin J Spectros Lab(光谱实验室)* 2005, 22(4): 737
- 5 HE De-yong(何德勇), LÜ Yi(吕弋), HU Yu-fei(胡玉斐), et al. Luminol-potassium ferricyanide chemiluminescence system for the determination of hydrochloride isoprenaline(鲁米诺-铁氰化钾化学发光体系测定盐酸异丙肾上腺素). *Chin J Anal Chem(分析化学)* 2003, 31(10): 1247

(本文于2010年6月21日收到)

## 金少鸿主编随李波副院长赴英国参加“第六届国际打击假药论坛”会议

应“第六届国际打击假药论坛”组委会的邀请,经国家食品药品监督管理局批准,中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)李波副院长率团于2011年5月5日至2011年5月6日赴英国伦敦参加了“第六届国际打击假药论坛”会议(The Sixth Global Forum on Pharmaceutical Anti-Counterfeits)。中检院药品首席检定专家、《药物分析杂志》主编金少鸿研究员作为受邀大会演讲者做了20分钟题为“药品快检车在中国的成功(Mobile Forensic Laboratories - a Chinese Success Story)”的大会报告。现将会议情况介绍如下:

“国际打击假药论坛”由总部位于伦敦的国际著名会议组织和咨询公司 Reconnaissance International 负责举办。大会邀请了来自美国、英国、新加坡、印度、马来西亚、尼日利亚等国药品监管机构、世界银行、国际海关组织、欧洲药品质量和健康管理局等国际组织以及部分大型制药企业共37位代表作了大会发言,全世界来自国家药品监管机构、国际组织、制药企业以及和打击假药相关协会共约180人参加了本次会议。大会期间还举办了相关最新打假技术和产品的展览。本次会议的主题是“全球协作打击假药”,演讲者从监管和技术的角度分别阐述了如何促进打击假药的全球合作。

金少鸿研究员的大会报告首先简要介绍了我国药品移动实验室的研发目的、组成和功能,然后详细介绍了近年来我国药品移动实验室实际应用情况,同时列举了大量生动的实例进行说明,特别是在河南的药品移动实验室在150多天里对1000多批抗艾滋病药物的筛查中没有发现任何伪劣药品、在2008年我国汶川地震中药品移动实验室对国内外捐赠药品的有效监测以及2010年中检院“旗舰车”在保障亚运会用药安全方面都发挥了不可替代的作用,这些实例引起了与会者浓厚的兴趣。会后,尼日利亚药监局参会人员再次找到金少鸿研究员进行讨论并合影留念,表示今后加强联系,寻找学习和合作的机会。

中方代表团通过参加本次会议,体会到我国自主研发的药品移动实验室目前已经在国际上引起了广泛的关注,得到了国际同行的认可。打击假药是全世界重点关注的问题,很多国际组织都专门举办关于打击假药的专题会议(今年计划在北京举行的亚太经合组织生命科学论坛)。我们既要继续保持快检技术的国际领先地位,也要在国际会议上不断介绍、宣传和展示我国药品快检技术的研究和应用成果,加强与国际同行面对面的交流和沟通,了解国际最新动态,为国际药品质量安全做贡献。

详情请浏览: [www.nicbp.org.cn](http://www.nicbp.org.cn)