

## 高效液相色谱法同时测定人血清中 普罗帕酮及其活性代谢物的浓度

张菀陵 唐跃年

(上海第二医科大学附属新华医院, 上海 200092)

普罗帕酮(propafenone, PPF)是一个高效低毒的新型抗心律失常药物<sup>(1)</sup>(结构式见图1)。临床常用于防治室性或室上性快速型心律失常;起效迅速,疗效确切,深受临床的欢迎。由于 PPF 半衰期波动大,病人血药浓度差异很大;进一步研究发现 PPF 的主要活性代谢产物 5-羟基普罗帕酮(5-hydroxypropafenone, 5-OHP)及 *N*-去丙基普罗帕酮(*N*-depropylpropafenone, NDP)(结构式见图1)在人体内均有较强的抗心律失常活性。为了进一步研究 PPF 的药代动力学、药效学和研究人体肝脏 P-450 酶对 PPF 的代谢方式提供理论依据,有必要建立一个灵敏度高、专一性好、能同时测定血清中 PPF 及其活性代谢物浓度的方法。

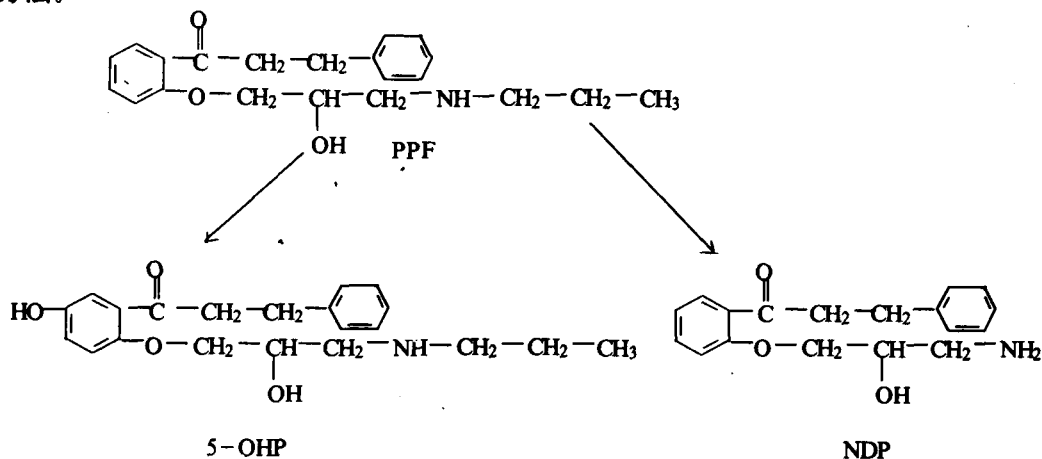


Fig 1 Structures of propafenone and its two major metabolites in man.

PPF 的血浓度测定大多采用 HPLC 法, Keller 等<sup>(2)</sup>首先报道了 HPLC 测定 PPF 的方法,但血浆用量大,灵敏度低。Brode 等<sup>(3,4)</sup>改进了方法的灵敏度。近年来, Kroemer 等<sup>(5,6)</sup>报道了 PPF 及其活性代谢物用 HPLC 测定的方法。国内目前仅见 HPLC 测定 PPF 的血浓度报道<sup>(9)</sup>。本文报道用 HPLC 法同时测定 PPF 及其活性代谢物的浓度。

### 实验部分

**仪器** 高效液相色谱仪系统(美国 Beckman 公司 338 型,带 406 控制器、166 紫外检测仪、110B 双泵、427 积分仪), XW-80 型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), 80-1 型离心沉淀机(上海手术器械厂)。

**试药** PPF (上海信谊制药厂), 5-OHP 及 NDP(德国 Dr. Margarete Fischer-Bosch 研究所提供), 安定(diazepam, IS; 上海黄河制药厂)。以上对照品均用甲醇配制成 1 mg/ml 的溶液, -20℃ 贮存。甲醇(HPLC 淋洗剂), 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸、乙醚均为分析纯试剂。

**色谱条件**

不锈钢色谱柱 4.6 mm × 250 mm. 柱填料为 Ultrasphere-ODS, 5 μm. 检测波长 254 nm, 灵敏度 0.01 AUFS. 泵压 2000 psi, 纸速 0.25 cm/min, 流动相为 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH) 2.7—甲醇 (43:57)。流速 1.0 ml/min, 室温。色谱图见图 2。

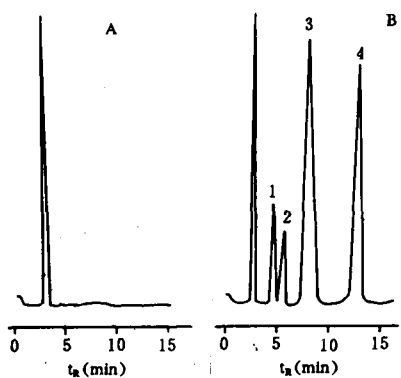


Fig 2 HPLC chromatograms. A. Blank serum;

B. Extracted serum spiked with 5-OHP (1),

NDP(2), PPF (3) and IS (4).

**样品预处理**

精密吸取患者血清 0.5 ml 于 10 ml 刻度试管中, 加入内标物安定(0.5 mg/ml) 1 μl, 再加乙醚 10 ml, 分三次提取, 旋转振荡 3 min, 离心 (4000 r/min) 5 min 后吸取乙醚层, 合并三次提取液置尖底试管中, 50℃ 水浴加热, 氮流下吹去乙醚, 残渣加 0.1 ml 甲醇溶解, 混匀, 取 20 μl 进行 HPLC 测定。

**线性关系**

取 0.5 ml 空白血清分别精密加入不同量的 PPF, 5-OHP 和 NDP, 经样品预处理及 HPLC 分离后, 分别对药物浓度与内标峰高比(Hs/Hi)进行线性回归。其线性范围及回归方程分别为 250 ~ 5000 ng/ml,  $Y = 0.4520X + 0.003029$ ; 100 ~ 2000 ng/ml,  $Y = 0.7494X - 0.02046$ ; 40 ~ 750 ng/ml,  $Y = 1.1373X + 0.012740$ 。

**回收率与精密度**

取 0.5 ml 空白血清, 分别加入不同量的 PPF, 5-OHP 和 NDP, 按样品预处理项下操作, HPLC 测定, 计算回收率, 批内样本 5 份, 批间样本 5 份, 批间样本在二周内提取测定; 各药物的回收率及精密度见表 1

Tab 1 Recovery and precision of the method

| Drug  | Within day    |               |              |          |         | Day-to-day    |               |              |          |         |
|-------|---------------|---------------|--------------|----------|---------|---------------|---------------|--------------|----------|---------|
|       | Added (ng/ml) | Found (ng/ml) | Recovery (%) | Mean (%) | RSD (%) | Added (ng/ml) | Found (ng/ml) | Recovery (%) | Mean (%) | RSD (%) |
| PPF   | 249           | 256           | 102.81       |          |         | 249           | 252           | 101.20       |          |         |
|       | 498           | 490           | 98.39        |          |         | 498           | 511           | 98.59        |          |         |
|       | 996           | 1002          | 100.60       | 99.54    | 2.13    | 996           | 1032          | 103.61       | 99.35    | 3.00    |
|       | 1992          | 1981          | 99.45        |          |         | 1992          | 1967          | 98.74        |          |         |
|       | 4980          | 4803          | 96.45        |          |         | 4980          | 4711          | 94.60        |          |         |
| 5-OHP | 93            | 99            | 106.45       |          |         | 93            | 101           | 108.60       |          |         |
|       | 185           | 178           | 96.22        |          |         | 185           | 188           | 101.62       |          |         |
|       | 370           | 367           | 99.19        | 100.02   | 3.66    | 370           | 368           | 99.46        | 101.05   | 4.17    |
|       | 740           | 749           | 101.22       |          |         | 740           | 736           | 99.46        |          |         |
|       | 1850          | 1795          | 97.03        |          |         | 1850          | 1778          | 96.11        |          |         |
| NDP   | 38            | 40            | 105.26       |          |         | 38            | 42            | 110.53       |          |         |
|       | 75            | 77            | 102.67       |          |         | 75            | 73            | 97.33        |          |         |
|       | 150           | 149           | 99.33        | 100.48   | 3.13    | 150           | 146           | 97.33        | 101.72   | 4.89    |
|       | 300           | 289           | 96.33        |          |         | 300           | 309           | 103.00       |          |         |
|       | 750           | 741           | 98.80        |          |         | 750           | 753           | 100.40       |          |         |

## 干扰试验及灵敏度

收集临床可能与 PPF 合用的部分药物进行测定, 各药的保留时间表明, 仅苯妥英干扰 PPF 的代谢物测定, 其它药物对测定均无干扰(见表 2)。

Tab 2 Retention time of some compounds

| Compound                | Retention time (min) |
|-------------------------|----------------------|
| Mexiletine              | 3.65                 |
| Lidocaine               | 2.95                 |
| Phenytoin               | 5.32                 |
| Nadolol                 | 2.16                 |
| Monoethylglycylxylidide | 2.15                 |
| Glycylxylidide          | 2.08                 |
| PPF                     | 7.67                 |
| 5-OHP                   | 4.36                 |
| NDP                     | 5.14                 |
| Diazepam(IS)            | 13.69                |

PPF: Propafenone; 5-OHP: 5-Hydroxypropafenone;

NDP: N-Depropylpropafenone.

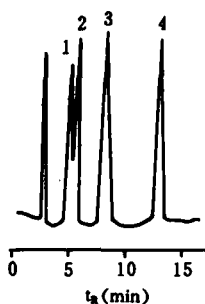
## 讨 论

国外文献色谱条件中试剂均采用价格较高的乙腈, 且预处理手续繁锁。本法采用简易、价廉的检测条件, 较适合国内临床血药浓度检测的开展, 由于国产 HPLC 甲醇纯度不高, 在低波长时仪器基线不易稳定, 虽经提纯仍无改善, 选用 254nm 波长时, 仪器稳定性好, 各化合物的检测限很小, 本法可用于临床药物动力学参数的测定。

流动相的 pH 对 PPF 两代谢物的分离度关系密切, 本实验缓冲液 pH 2.7, 分离度好(见图 2)。如果改变缓冲液 pH 条件, 当缓冲液 pH  $\geq 3$  时 PPF 两代谢物不能分离(见图 3)。

目前已知 PPF 具多种氧化态型代谢, 其 5-OH 氧化为肝 P450 IID6 微粒体酶所催化; 而 N-去丙基代谢可能受 P450 IIIA4 同功酶的催化<sup>(8)</sup>, 因此, 从代谢机制而言, PPF 与利多卡因、环孢霉素、美多心安、奎尼丁等药物具有潜在的相互作用, 本方法的建立也为研究这些药物的相互作用及进一步研究 PPF 的肝酶代谢机制提供了一个手段。

Fig 3 HPLC chromatogram.  
Mobile phase: MeOH - 10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH  $\geq 3$ ) (57:43); Flow rate: 1.0 ml/min. 1 ~ 4. cf Fig 2. cf Fig 2.



致谢 德国 HK Kroemer 博士提供了普罗帕酮两活性代谢物的对照品。上海医科大学王振铨、刘璐老师对本文的工作提供帮助。

关键词 普罗帕酮; 高效液相色谱法

## 参 考 文 献

- 1 Gillis AM and Kates RE. Clinical pharmacokinetics of the newer antiarrhythmic agents. *Clin Pharmacokinet* 1984; 9: 375.
- 2 Keller K. et al. Correlation between serum concentration and pharmacological effect on atrioventricular conduction time

- of the antiarrhythmic drug propafenone. *Eur J Clin Pharmacol* 1978; 13:17.
- 3 Brode E. et al. Untersuchungen zur Analytik von Propafenone Mittels Interner Analogstandardisierung. *Arzneimittelforschung* 1982; 32: 1.
  - 4 Harapat SR and Kates RE. High-performance liquid chromatographic analysis of propafenone in human plasma samples. *J Chromatogr* 1982; 230: 448.
  - 5 Kromatogr HK. et al. Stereoselective disposition and pharmacologic activity of propafenone enantiomers. *Circulation* 1989; 79: 1068.
  - 6 Kwame OA. et al. The relative potency of major metabolites and enantiomers of propafenone in an experimental reperfusion arrhythmia model. *J Cardiol Pharmacol* 1990; 15: 75.
  - 7 陈秋潮, 等. 高效液相法测定心律平血浓度及其药代动力学研究. *中国临床药理学杂志* 1985; 1: 12.
  - 8 Bargetzi MJ. et al. Lidocaine metabolism in human liver microsome by cytochrome P450 IIIA4. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 521.

## SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PROPAFENONE AND ITS ACTIVE METABOLITE IN SERUM BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

WL Zhang and YN Tang

(Department of Pharmacy, Xinhua Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092)

**ABSTRACT** A rapid, sensitive and simple high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of propafenone (PPF) and its metabolites (5-hydroxypropafenone, 5-OHP; N-depropylpropafenone, NDP) in serum has been developed. Separation of PPF, 5-OHP and NDP was achieved by reversed phase chromatography using a mobile phase consisting of 57% methanol and 43% 10 mmol/L potassium dibasic phosphate (pH 2.7) at a flow rate of 1.0 ml/min on a 5  $\mu$ m ODS-C18 column. The eluent was monitored at 254 nm.

The method showed a good linearity. The recoveries of PPF, 5-OHP and NDP were found to be  $99.54 \pm 2.13\%$ ,  $100.02 \pm 3.66\%$  and  $100.48 \pm 3.10\%$ , respectively. Precision studies for both within day and day-to-day at different concentrations provided RSD values of less than 5%. Some commonly used drugs can be determined in the same procedure without interference except phenytoin. This method is well adapted to the therapeutic monitoring of PPF treated patients, as well as for pharmacokinetic studies.

**Key words** Propafenone; HPLC