文章编号:1000-5404(2005)08-0731-03

论著

LC-MS 和 HPLC 法测定人血浆中格列本脲和二甲双胍方法的建立

石 英,刘松青,代 青 (第三军医大学西南医院药学部,重庆 400038)

提 要:目的 建立人血浆中盐酸二甲双胍的高效液相色谱和格列本脲的液相色谱-质谱测定方法。**方法** 二甲双胍血浆样品经乙腈直接沉淀蛋白进样。分析柱:EC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 (4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:0.03 mol/L $(NH_4)H_2PO_4$:乙腈(75:25,pH 7.0),流速 1.0 ml/min;检测波长 240 nm。格列本脲血浆中加入格列吡嗪为内标,经乙酸乙酯提取,进行 LC-MS 测定。色谱柱为 ORBAX SB300C_{18}柱(2.1 mm × 150 mm,5 μm),流动相为乙腈:0.1% 乙酸铵(55:45),流速为 0.2 ml/min;ESI 选择性正离子检测。**结果** 格列本脲浓度为 2 ~ 200 ng/ml 线性关系良好($r = 0.999\ 8$),盐酸二甲双胍浓度为 6.25 ~ 4 000 ng/ml 线性关系良好($r = 0.999\ 9$)。二甲双胍和格列本脲方法的日内和日间 RSD < 5%。**结论** 所建立的人血浆中格列本脲的 HPLC-MS 测定方法和二甲双胍的 HPLC 测定方法灵敏、准确、简便,可用于格列本脲、二甲双胍的人体药代动力学研究。

关键词:HPLC;LC-MS;二甲双胍;格列本脲;血药浓度
中图法分类号:R965.2; R969.1; R977.15 **文献标识码**:A

Determination of metformin hydrochloride and glibenclamide using HPLC and LC-MS

SHI Ying, LIU Song-qing, DAI qing (Department of Pharmacology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of plasma metformin hydrochloride and an HPLC/ESI-MS method for the determination of plasma glibenclamide in human. **Methods** The metformin plasma samples were added with acetonitrile to denature proteins and the supernatant was injected into the system directly by using EC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of 0.03 mol/L $(NH_4)H_2PO_4$:acetonitrile (75:25, pH 7.0) at the flow rate of 1.0 ml/min and the detection wavelength of 240 nm. Using glipizide as a internal standard, the glibenclamide plasma samples were extracted with ethyl acetate and determined by LC-MS using a chromatographic column ORBAX SB300C_{18} (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.1% ammonium acetate (55:45, V/V) at the flow of 0.2 ml/min. **Results** The glibenclamide concentration had a good linear correlation in the range of 2 – 200 ng/ml ($r = 0.999\ 8$) while the metformin concentration in the range of 6.25 – 4 000 ng/ml ($r = 0.999\ 9$). Both the inter-day and intra-day RSD of metformin and glibenclamide were lower than 5%. **Conclusion** The assays have been proved to be sensitive, accurate and convenient and can be used in the study of human pharmacokinetics of glibenclamide and metformin hydrochloride.

Key words: HPLC; LC-MS; metformin; glibenclamide; plasma concentration

格列本脲属于第 2 代磺酰脲类口服降糖药,主要通过刺激胰岛功能细胞的胰岛素释放而发挥急性降糖作用;二甲双胍可降低肝糖元的异生,促进组织摄取葡萄糖[1,2]。临床上将这两种作用机制互补的降糖药组成复方制剂,以改善Ⅱ型糖尿病患者的血糖控制,但时有血糖过低的情况,故需准确测定血药浓度。由于格列本脲口服剂量小,血药浓度低,血浆干扰较大,用 HPLC 法难以定量,故本研究建立了 LC-ESI-MS 法测定格列本脲和 HPLC 法测定二甲双胍,为格列本脲/二甲双胍复方制剂在人体中的安全使用提供有效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Waters 2690 Alliance 液相色谱仪,包括 Waters 2487 双波长检测器,Millennium32 数据采集处理系统;高速离心机(美国 Abbott 公司);超纯水器(Milli-Q plus, USA, Millipore 公

作者简介:石 英(1976 –),女,四川省蓬安县人,药剂师,主要从事临床药理方面的研究。电话:(023)68765495

收稿日期:2005-01-05;修回日期:2005-03-23

司);微孔滤膜及过滤装置(Millipore USA);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Agilent1100 型液相色谱仪,包括在线脱气仪,四元梯度泵,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器;MS:1946B 型,四极杆分离器,电子倍子增检测器;Agilent Chemstation A.08.01。

1.1.2 试剂 格列本脲、二甲双胍、格列吡嗪标品购于中国药品生物制品检定所,甲醇、三氟乙酸、乙酸乙酯均为色谱纯,磷酸二氢铵、乙酸铵、磷酸为分析纯,水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

1.2.1.1 血浆中二甲双胍测定的色谱条件 色谱柱:EC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:0.03 mol/L(NH_4)H_2PO_4:乙腈(75:25, V/V);流动相中水相 pH 7.0;流速 1.0 ml/min;检测波长 240 nm;柱温 30 ℃;灵敏度 0.02 AUFS;进样量 20 μl。

1.2.1.2 血浆中格列本脲测定的色谱和质谱条件 色谱柱:ORBAX SB300C_{18}柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:乙腈:0.1%乙酸铵(55:45, V/V),按流动相体积的 0.1% 加入三氟乙酸,柱温 40 ℃;流速 0.2 ml/min;进样量 20 μl。格列本脲定量分析用正离子选择离子方式模式(M/Z:446,494);干燥气流速:5 L/min;碎裂电压:100 V;干燥气温度 350 ℃;毛细管电压:3 000 V;雾化室压力:30 PSIG。

1.2.2 血浆样品处理

1.2.2.1 二甲双胍血浆样品的处理 取待测血浆 0.4 ml,加入乙腈 0.8 ml,漩涡振荡 30 s 沉淀蛋白,高速离心(13 000 r/min)5 min,取上清液 20 μl 进样测定。

1.2.2.2 格列本脲血浆样品的处理 取待测血浆 1.0 ml,置 10 ml 具塞离心管中,精密加入格列吡嗪内标液 20 μl (4 μg/ml),加乙酸乙酯 3.0 ml,漩涡振荡 3 min,4 000 r/min离心 10 min,转移上清液至另一离心管中,于 45 ℃水浴中氮气吹干。残留物以 100 μl 流动相旋涡溶解,13 000 r/min离心 5 min,取上清液 20 μl 供 LC-MS 分析。

1.2.3 标准曲线的制备

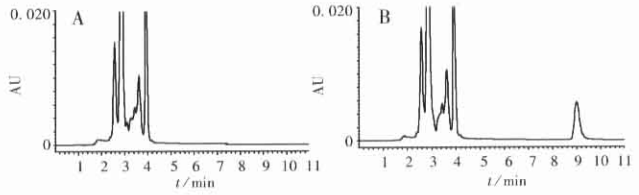
1.2.3.1 二甲双胍标准曲线的制备 取空白血浆加入二甲双胍标准液(1 000 μg/ml)适量,使成为 4 000 ng/ml,再依次用空白血浆稀释成2 000、1 000、500、250、100、50、25、12.5、6.25 ng/ml 系列的浓度,按 1.2.2.1 方法处理后进样测定。

1.2.3.2 格列本脲标准曲线的制备 取空白血浆加入格列本脲标准甲醇液(100 μg/ml)适量,使成为 400 ng/ml,再依次用空白血浆稀释成 200、100、40、20、10、5、2 ng/ml 系列的浓度,按 1.2.2.2 方法处理后进样测定。

2 结果

2.1 色谱行为

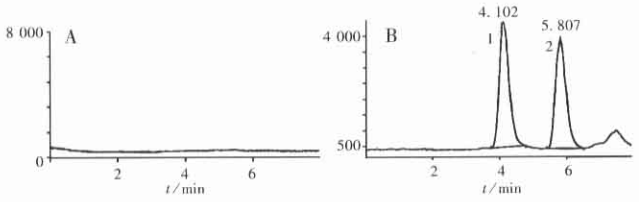
在 1.2.1.1 色谱条件,二甲双胍分离良好,保留时间 9.158 min,血浆中内源性物质不干扰样品测定,在 1.2.1.2 LC-MS 条件下,格列本脲与内标分离良好,内标与格列本脲保留时间分别为 4.102、5.807 min,血浆中内源性物质不干扰样品测定,见图 1、2。



A: Blank plasma; B: Plasma spiked with Metformin

图 1 二甲双胍色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of metformin



A: Blank plasma; B: Plasma spiked with internal standard and glibenclamide (1: Internal standard; 2: Glibenclamide)

图 2 格列本脲色谱图

Fig 2 Chromatograms of glibenclamide

2.2 标准曲线与线性范围

2.2.1 二甲双胍标准曲线与线性范围 将二甲双胍峰面积(A)对浓度(C)进行回归,得回归方程:$A = 3.69 \times 10^1\ C + 1.89 \times 10^1$, $r = 0.999\ 9$, $n = 9$。二甲双胍为 6.25 ~ 2 000 ng/ml 线性关系良好,最低检测浓度为 6.25 ng/ml (以 S/N≥3 计)。

2.2.2 格列本脲标准曲线与线性范围 将格列本脲峰面积(As)与内标格列吡嗪峰面积(Ar)比 R(R = As/Ar)对浓度(C)进行回归,得回归方程:$R = 1.924\ 62C + 1.181\ 25 \times 10^{-2}$, $r = 0.999\ 8$, $n = 7$。格列本脲为 2 ~ 200 ng/ml 线性关系良好,最低检测浓度为 1 ng/ml(以 S/N≥3 计)

2.3 回收率与精密度试验

取空白血浆,分别配成含格列本脲 2、40、200 ng/ml 的标准液与含二甲双胍 25、250、2 000 ng/ml 的标准液各 5 份照"2.2"方法操作,计算日内、日间变异系数与回收率,结果见表 1。

表 1 二甲双胍和格列本脲回收率与精密度试验结果($n = 5$)

Tab 1 Results of recovery and precision test for metformin and glibenclamide ($n = 5$)

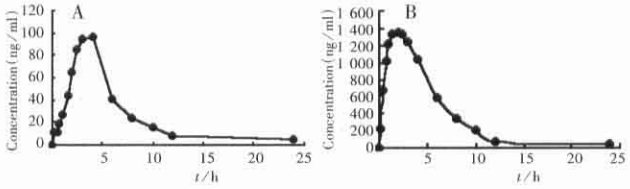
Concentration		Recovery($\bar{x} \pm s$, %)		Inter-day RSD(%)		Intra-day RSD(%)	
Metformin (ng/ml)	Glibenclamide (ng/ml)	Metformin	Glibenclamide	Metformin	Glibenclamide	Metformin	Glibenclamide
25	2.0	101.13 ± 1.95	102.77 ± 4.54	0.5	1.31	4.5	3.6
250	40	101.57 ± 1.27	105.00 ± 4.56	0.6	1.85	1.6	2.35
2000	200	103.99 ± 3.05	98.87 ± 3.78	0.1	2.20	2.3	2.43

2.4 稳定性试验

将含格列本脲、二甲双胍不同浓度的血浆样品置 -60 ℃低温冰箱冷冻保存,30 d 后测定含量,样品含量下降变化均在 4% 以内(96.27%、99.41%),说明格列本脲、二甲双胍血浆样品在 -60 ℃低温保存条件下可稳定至少 30 d。

2.5　方法应用

18 名健康男性自愿者，年龄 18～23 岁，体质量(61.3 ± 3.2) kg，身高(170.9 ± 3.7)cm，体格检查显示血压、心率、心电图、呼吸状况、肝、肾功能和血象无异常；试验前 4 周未用过任何药物；经医院伦理委员会批准并经自愿者自愿签署知情同意书。受试者早晨空腹温水 200 ml 送服格列本脲片 2.5 mg 和二甲双胍片 500 mg，于服药前与服药后 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0 h 分别取静脉血 4.0 ml，肝素抗凝，分离血浆，－60 ℃冷冻保存。18 名健康受试者的药时曲线见图 3。



A：Glibenclamide；B：Metformin

图 3　18 名健康受试者口服格列本脲片和二甲双胍片血药浓度-时间曲线

Fig 3　Mean plasma concentration-time curve of glibenclamide and metformin of 18 volunteers after oral administration

3　讨论

在格列本脲的血药浓度检测条件选择时，曾采用乙醚、苯、等有机溶剂提取血浆，用 HPLC[3,4] 法检测，结果显示血浆中杂质很多，药物峰与杂质峰重叠分离不开，故重新建立了 LC-ESI -MS 的定量分析法，从而很好的解决了这一问题。由于格列本脲具有酸性和碱性基团，正负离子均可检测到，但以正离子方式检测时响应较强，所以本研究采用正离子方式进行检测。采用乙酸乙酯提取，对样品和内标的提取率高，且易挥干，杂质干扰很少。而乙腈直接沉淀蛋白方法则大大简化了二甲双胍样品处理过程，具有快速、简便、灵敏、经济的特点，便于实际应用。

参考文献：

[1] 简太海，李丽敏，丁　黎，等. 盐酸二甲双胍/格列本脲复方片剂在人体的药代动力学[J]. 中国药理学报，2004，20(3)：334－337.

[2] 杜小莉，张翠莲. 降血糖新药-格列本脲和盐酸二甲双胍复合片[J]. 中国药学杂志，2002，37(11)：869－871.

[3] Niopas I，Daftsios A C. A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies[J]. Pharm Biomed Anal，2002，28(3-4)：653－657.

[4] Valdes Santurio J R，Gonzalez Porto E. Determination of glibenclamide in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography[J]. Chromatogr B Biomed Appl，1996，682(2)：364－370.

（编辑　龙　亮）

（上接 730 页）

并取子宫内膜活检，如有可疑病变或术前有不规则阴道流血者，则做诊刮送病理检查，本组共送病理检查 9 例，未发现子宫内膜癌病例。

3　讨论

3.1　宫腔镜下取环的安全性与有效性

子宫是一个半关闭的空腔脏器，宫腔内手术不能直视，只能凭借术者的经验与手感，因此手术具有盲目性。对于绝经妇女，绝经后 1～2 年取环适宜，因绝经期妇女雌激素水平较低，生殖器官萎缩，子宫变小、金属环为圆形，有弹性，由于环的刺激，可引起子宫肌的生理性收缩，容易使金属环变形、移位，甚至嵌顿，用环钩取环时易引起环断裂、残留，最终取环失败，增加了损伤与感染的危险性。断裂、嵌顿、残留节育器的取出是计划生育及妇产科工作者比较棘手的问题，取环失败给患者带来巨大的心理及生理伤害。宫腔镜通过光源照亮放大视野，使宫腔盲区清晰可见，特别是断裂、残留、短小的或微小的金属节育器，通过宫腔微型取环钳，都能准确无误地取出，避免了盲目性操作产生的子宫内膜损伤以及子宫穿孔、肠穿孔、出血及感染等[1]。应用宫腔镜下取环术不仅能准确对节育器定形、定位，还可以顺利取出节育器，明显提高了手术的准确性与安全性[2]，减轻患者痛苦，减少不必要的费用。

3.2　米索前列醇在绝经期妇女宫腔镜下取环术中的运用

米索前列醇为 PGE1 前生物，对子宫肌有兴奋作用，并能软化宫颈及扩张宫颈内口[3]。因此，米索前列醇阴道上药用于绝经后妇女取环术前准备是一安全有效的方法，对于降低取环并发症具有积极意义。

3.3　腹腔镜联合宫腔镜处理宫腔镜下取环失败

宫腔镜检查虽可发现宫腔内异物，但不能发现移位于盆腔的节育器。本组中有 1 例患者在宫腔镜下未见节育器，行腹部摄片提示盆腔中节育器存留，后经腹腔镜手术在盆腔中取出。腹腔镜在盆腔操作，但不能引导宫腔内操作。如两者联合使用，则移位于腹腔中的节育器将不难取出，且取环过程中可监视有无子宫穿孔[4]。

关键词：绝经期；宫内节育器；宫腔镜

中图法分类号：R713　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 乐　杰 主编. 妇产科学[M]. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，2004. 387－389.

[2] Mauldin W P，Segal S J. IUD use throughout the world "past，present and future"[J]. Contraception，1992，45(3)：278－280.

[3] 葛春晓，汤晓秋. 宫腔镜腹腔镜在宫内节育器并发症中的应用[J]. 中国微创外科杂志，2002，2(增刊)：66－68.

[4] Trivedi S S，Goel M，Jain S. Hysteroscopic management of intrauterine devices with lost strings[J]. Br J Fam Plann，2000，26(4)：229－230.

[5] More B. Misoprostol：an old drug，new indications[J]. J Postgrad Med，2002，48(4)：336－339.

[6] 艾恩飞，段　华，黄晓武，等. 宫腔镜宫内异物取出术及其监护方法的探讨[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2002，18(11)：673－674.

（编辑　陈聪连）