

液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆中二甲双胍和格列吡嗪

赵晓华^{1,2}, 宋波², 钟大放², 张淑秋¹, 陈笑艳^{2*}

(1. 山西医科大学, 山西太原 030001; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 建立了快速、灵敏的液相色谱-串联质谱法测定人血浆中的二甲双胍和格列吡嗪。血浆样品经 0.3% 甲酸-乙腈 (*v/v*) 沉淀蛋白后, 以乙腈-水-甲酸 (70:30:0.3, *v/v/v*) 为流动相, 流速为 0.50 mL·min⁻¹。Zorbax Extend C₁₈ 柱分离, 采用大气压化学电离源; 以选择反应监测 (SRM) 方式进行正离子检测。用于定量分析的离子反应分别为 *m/z* 130 → *m/z* 60 (二甲双胍), *m/z* 446 → *m/z* 321 (格列吡嗪) 和 *m/z* 256 → *m/z* 167 (内标, 苯海拉明)。测定血浆中二甲双胍的线性范围为 2.00 ~ 2 000 ng·mL⁻¹, 定量下限为 2.00 ng·mL⁻¹; 格列吡嗪的线性范围为 1.00 ~ 1 000 ng·mL⁻¹, 定量下限为 1.00 ng·mL⁻¹。该方法专属性好, 灵敏度高, 准确快捷, 适用于二甲双胍和格列吡嗪的临床药代动力学研究。

关键词: 二甲双胍; 格列吡嗪; 液相色谱-串联质谱法; 血浆药物浓度

中图分类号: R917; R969 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)10 - 1087 - 05

Simultaneous determination of metformin and glipizide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAO Xiao-hua^{1,2}, SONG Bo², ZHONG Da-fang², ZHANG Shu-qiu¹, CHEN Xiao-yan^{2*}

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: To develop a sensitive and rapid liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method for simultaneous quantitation of metformin and glipizide in human plasma, metformin, glipizide and internal standard diphenhydramine were separated from plasma by protein precipitation with acetonitrile (containing 0.3% formic acid), then chromatographed by using a Zorbax Extend C₁₈ column. The mobile phase consisted of acetonitrile-water-formic acid (70:30:0.3, *v/v/v*), at a flow rate of 0.50 mL·min⁻¹. A tandem mass spectrometer equipped with atmospheric pressure chemical ionization source was used as detector and operated in the positive ion mode. Selected reaction monitoring (SRM) using the precursor/product combinations of *m/z* 130 → *m/z* 60, *m/z* 446 → *m/z* 321 and *m/z* 256 → *m/z* 167 were used to quantify metformin, glipizide and diphenhydramine, respectively. The linear concentration ranges of the calibration curves for metformin and glipizide were 2.00 - 2 000 ng·mL⁻¹ and 1.00 - 1 000 ng·mL⁻¹, respectively. The lower limits of quantitation of metformin and glipizide were 2.00 ng·mL⁻¹ and 1.00 ng·mL⁻¹, respectively. The method proved to be sensitive, simple and rapid, and suitable for clinical investigation of compound preparation containing metformin and glipizide.

Key words: metformin; glipizide; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; plasma concentration

二甲双胍为双胍类口服降糖药, 可增强外周组

织对葡萄糖的摄取与利用, 促进胰岛素与外周组织胰岛素受体结合而降低胰岛素的抵抗性, 增强其敏感性。格列吡嗪为第二代磺酰脲类口服降糖药, 主要作用机制为直接刺激胰岛素 β 细胞的分泌功能,

收稿日期: 2007-05-17.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 21 - 50800738,

E-mail: xychen@mail.shnc.ac.cn

促进内源性胰岛素的释放增加而降低血糖。临床上可将二者组成复方制剂,既增强内源性胰岛素及胰岛素的活性,亦可减少低血糖反应等不良反应。为了更好地描述复方制剂中二者的药代动力学特征,应对二甲双胍和格列吡嗪的血药浓度进行测定。

二甲双胍极性较大,紫外吸收弱;而格列吡嗪极性较小,紫外吸收好,常规的方法难以实现二者的同时测定。有大量文献报道单独测定人血浆中的二甲双胍^[1-6]或格列吡嗪^[7-10]。最近,有报道分别用 HPLC法^[11]和液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法^[12]同时测定血浆中的二甲双胍和格列吡嗪。前者采用固相萃取法进行血浆样品前处理,血浆用量较大(1 mL),色谱分析时间长达 20 min,且该文只建立了分析方法,而没有实际血浆样品及有关药动力学参数的报道。后者色谱分析时间短,但所选条件下离子抑制作用明显,方法灵敏度较低(二甲双胍定量下限 20 ng·mL⁻¹,格列吡嗪定量下限 4 ng·mL⁻¹)。本文旨在建立灵敏度高,可同时测定人血浆中二甲双胍和格列吡嗪的液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)方法,以用于复方二甲双胍格列吡嗪制剂的药代动力学研究。

材料与方法

仪器 美国 Thermo Finnigan 公司 TSQ Quantum Ultra 型液相色谱-串联质谱联用仪,配有大气压化学电离源(APCI源)以及 Xcalibur 1.4 数据处理系统;美国 Agilent 1100 液相色谱系统(包括 G1311A 型四元输液泵, G1367A 型自动进样器, G1316A 型柱温箱和 G1379A 型脱气机)。

药品与试剂 盐酸二甲双胍、格列吡嗪和内标盐酸苯海拉明对照品均购自中国药品生物制品检定所,纯度分别为 100%, 100% 和 99.7%;二甲双胍格列吡嗪片,迪沙药业集团有限公司(规格为每片含有盐酸二甲双胍 500 mg;格列吡嗪 2.5 mg;批号 060901);甲醇(Sigma 公司,美国)、甲酸(Tedia 公司,美国)和乙腈(Merck 公司,德国)均为色谱纯;水为二次重蒸水;空白血浆由上海中医药大学附属曙光医院临床药理基地提供。

色谱条件 色谱柱为 Zorbax Extend C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm)(美国 Agilent 公司);流动相为乙腈-水-甲酸(70:30:0.3);流速为 0.50 mL·min⁻¹。

质谱条件 离子源为大气压化学电离源(APCI源);正离子方式检测;电晕放电电流为 4.0 μA,加

热毛细管温度为 280 °C;气化室温度为 420 °C;鞘气(N₂)压力为 600 kPa;辅助气(N₂)压力为 135 kPa,吹扫气压力为 35 kPa;碰撞气(Ar)压力为 0.16 Pa。扫描方式为选择反应监测(SRM);碰撞诱导解离(CID)电压分别为 20 eV(二甲双胍)、15 eV(格列吡嗪)和 25 eV(苯海拉明);用于定量分析的离子反应分别为 m/z 130 → m/z 60(二甲双胍)、 m/z 446 → m/z 321(格列吡嗪)和 m/z 256 → m/z 167(苯海拉明)。

血浆样品处理 取血浆 100 μL,依次加入内标溶液(100 ng·mL⁻¹苯海拉明)50 μL, 0.3%甲酸-乙腈溶液 300 μL,混匀,涡旋混合 1 min,静置 5 min,离心 5 min(11 000 r·min⁻¹),分取上清液 200 μL 于另一试管中,40 °C 空气流下吹干,残留物加入流动相 100 μL 溶解,涡旋混合,取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

临床试验方法 临床试验在上海中医药大学附属曙光医院国家药物临床试验机构进行。12 名健康男性受试者经医学伦理委员会批准,签署知情同意书,于试验前一晚 8:00 开始禁食,试验当日晨 7 时在室温条件下空腹或餐后口服受试制剂或参比制剂,用 20%葡萄糖水 250 mL 吞服。服药后至进午餐前每 15 min 补充 25%葡萄糖水 60 mL。服药后 4 和 10 h 进食统一的标准餐,采血期间禁烟酒及咖啡因类饮料,避免剧烈运动。于服药前和服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 和 36 h 静脉采血 4 mL,置肝素化离心试管中,离心(3 500 r·min⁻¹, 10 min),分离血浆,于 -20 °C 冰箱中冷冻待测。

结果

1 质谱分析

二甲双胍、格列吡嗪和内标苯海拉明在 APCI 源电离方式下,主要生成准分子离子峰 $[M+H]^+$, 分别为 m/z 130、 m/z 446 和 m/z 256。选择性对其准分子离子峰进行产物离子全扫描质谱分析(图 1),二甲双胍、格列吡嗪和苯海拉明生成的主要碎片离子分别为 m/z 60、 m/z 321 和 m/z 167,将其作为定量分析时监测的产物离子。

2 方法的专属性

分别取 6 名不同受试者的空白血浆 100 μL,除不加内标溶液外,按“血浆样品处理”项下操作,取 20 μL 进样分析,得色谱图 2A;将一定浓度的对照溶液吹干后加入内标溶液和空白血浆,依同法操作,得色谱图 2B。取受试者口服药物后的血浆样品,依

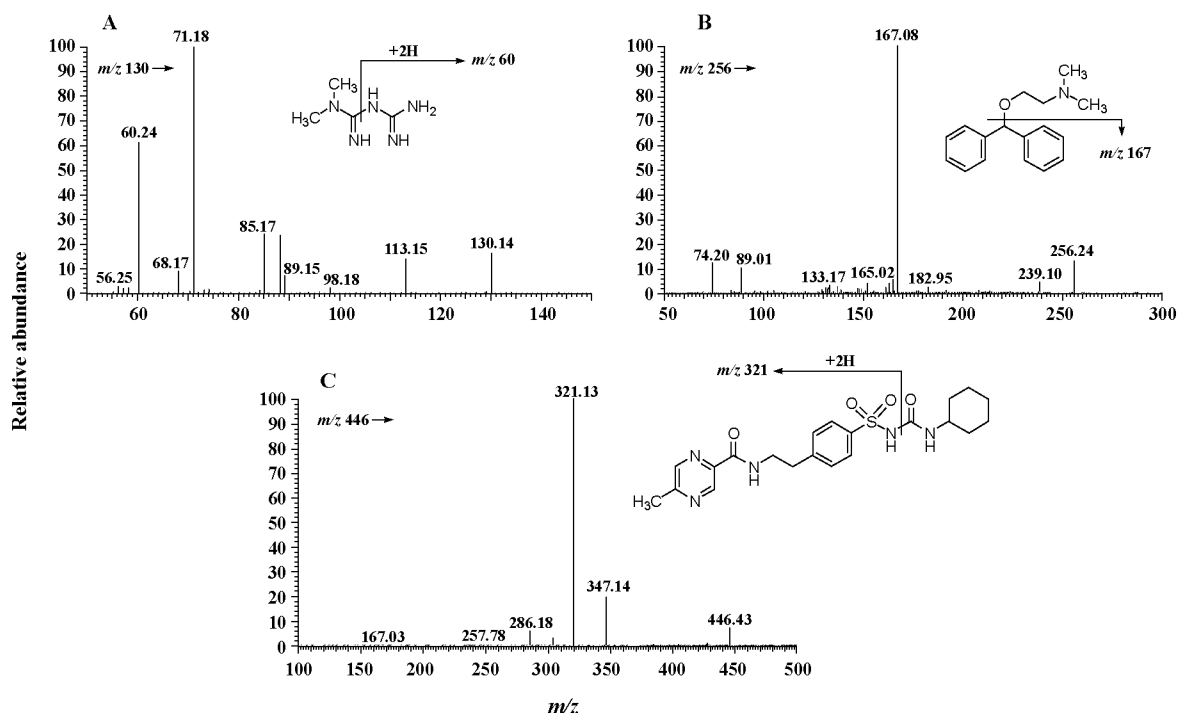


Figure 1 Full scan product ion spectra of $[M + H]^+$ of metformin (A), diphenhydramine (B) and glipizide (C)

同法操作,得色谱图 2C。结果表明,空白血浆中的内源性物质不干扰二甲双胍、格列吡嗪和内标苯海拉明的测定。

3 线性范围和定量下限

系列对照溶液 50 μL 在空气流下吹干后加入空白血浆 100 μL ,配制成相当于二甲双胍、格列吡嗪血浆浓度分别为 2.00/1.00, 4.00/2.00, 12.0/6.00, 40.0/20.0, 160/80.0, 400/200, 1 000/500 和 2 000/1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,按“血浆样品处理”项下操作,分别建立二甲双胍和格列吡嗪的标准曲线。以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权 ($w = 1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程即为标准曲线。二甲双胍的典型回归方程为 $y = 3.544 \times 10^{-3} + 1.628 \times 10^{-3} x$, $r = 0.9953$,格列吡嗪的典型回归方程为 $y = 2.477 \times 10^{-3} + 6.216 \times 10^{-3} x$, $r = 0.9926$ 。

同上法操作,配制二甲双胍、格列吡嗪血浆浓度分别为 2.00/1.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,在方法确证第一天进行 6 样本分析,并根据当日标准曲线求得每一样本测定浓度,求得该浓度下的二甲双胍和格列吡嗪日内精密度的 (RSD) 分别为 6.9% 和 11.8%,准确度 (RE) 分别为 8.2% 和 2.2%,该结果表明此方法下二甲双胍和格列吡嗪的定量下限分别为 2.00 和 1.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4 精密度与准确度

取空白血浆 100 μL ,按“标准曲线和定量下限”项下的方法配制低、中、高 3 个浓度 (二甲双胍、格列吡嗪血浆浓度分别为 4.00/2.00, 160/80.0 和 1 800/900 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品,每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d,根据当日的标准曲线,计算 QC 样品的测得浓度。将 QC 样品的结果进行方差分析,计算本方法的准确度与精密度。由数据可知,在 3 种浓度下,二甲双胍 QC 样品的日内、日间精密度 (RSD) 均小于 14.0%,准确度 (RE) 在 -1.1% ~ 1.3% 之间。格列吡嗪 QC 样品的日内、日间精密度 (RSD) 均小于 11%,准确度 (RE) 在 -2.8% ~ 1.6% 之间。

5 回收率、基质效应和稳定性考察

取 QC 样品,每一浓度进行 6 样本分析。同时另取空白血浆 100 μL ,除不加内标溶液外,按“血浆样品处理”项下操作,用获得的全部上清液溶解相应浓度经吹干处理的对照溶液并加入内标溶液 50 μL ,涡旋混合后,分取上清液 200 μL 于另一试管中,按“血浆样品处理”项下操作,进样分析,得峰面积。以每个浓度两种处理方法的峰面积比值计算回收率。二甲双胍低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 96.8%, 102% 和 93.8%,格列吡嗪的提取回收率分别为 92.8%, 99.3% 和 102%;内标的提

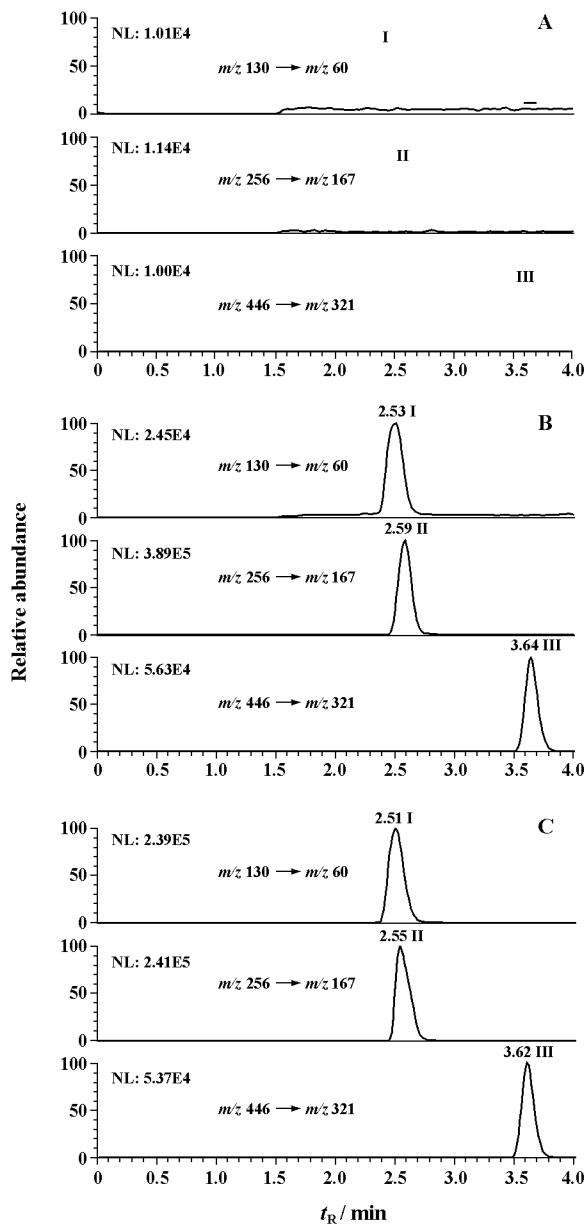


Figure 2 Typical chromatograms of metformin, glipizide and diphenhydramine (IS) in human plasma by selected reaction monitoring (SRM) scan mode. A: Blank plasma sample; B: Blank plasma spiked with metformin in $40.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, glipizide $20.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and diphenhydramine (IS) $50.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; C: A plasma sample 1.5 h after an oral administration of 500 mg metformin and 2.5 mg glipizide to a healthy volunteer. Peaks I, II and III refer to metformin, diphenhydramine and glipizide, respectively

取回收率为 105%。

分别取 6 名受试者空白血浆 $100 \mu\text{L}$, 用 0.3% 甲酸-乙腈溶液 $300 \mu\text{L}$ 沉淀蛋白; 用获得的全部上清液溶解低、高两浓度经吹干处理的对照溶液, 并加

入内标溶液 $50 \mu\text{L}$, 其余按“血浆样品处理”项下操作, 进样分析 (低、高浓度各 6 样本分析); 同时以水代替空白血浆进行相同处理, 获得峰面积。比较两种处理方式下, 二甲双胍、格列吡嗪和内标的峰面积, 比值均在 85% ~ 115% 之间, 表明所采用的条件有效地避免了基质效应。

已有文献报道二甲双胍在经历 4 次冷冻-解冻循环以及冷冻放置 ($-30 \text{ }^\circ\text{C}$) 7 个月稳定^[13], 格列吡嗪血浆样品在经历 3 次冷冻-解冻循环以及冷冻放置 ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) 45 d 稳定^[14]。本实验考察了二甲双胍、格列吡嗪血浆样品在室温放置 2 h 及处理后样品室温放置 24 h 的稳定性。稳定性考察时配制低、高两浓度血浆样品 (二甲双胍、格列吡嗪血浆浓度分别为 $4.00/2.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1800/900 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每个浓度进行 3 样本分析。结果显示, 血浆样品室温放置 2 h 内稳定 (二甲双胍 RE 在 7.2% ~ 12.4% 之间, 格列吡嗪 RE 在 -4.0% ~ -9.2% 之间), 血浆样品经过沉淀蛋白处理后室温放置 24 h 内稳定 (二甲双胍 RE 在 1.4% ~ 6.7% 之间, 格列吡嗪 RE 在 -0.3% ~ -2.4% 之间)。

6 血浆样品测试

未知血浆样品测定按“血浆样品处理”项下操作, 每天建立一条标准曲线, 同时分析低、中、高 (双样本或三样本) 的 QC 样品, 根据当日标准曲线求算未知样品浓度和 QC 样品浓度, 根据 QC 样品测定结果决定当日数据的取舍。

7 分析方法在药代动力学研究中的应用

在临床药代动力学研究中, 12 名男性健康受试者 [年龄 19 ~ 24 岁, 体重 (64 ± 6) kg] 口服二甲双胍、格列吡嗪片 (含盐酸二甲双胍 500 mg; 格列吡嗪 2.5 mg) 1 片后, 于服药前和服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 14, 24 和 36 h 前臂静脉取血 4 mL, 离心 ($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 分离血浆, 冷冻保存直至测定。二甲双胍和格列吡嗪的平均血药浓度-时间曲线见图 3。

讨论

二甲双胍和格列吡嗪化学性质相差较大, 在单独测定的文献报道中, 二甲双胍血浆样品前处理多用沉淀蛋白法^[1-4]。格列吡嗪血浆样品前处理方法有液-液萃取^[8], 沉淀蛋白^[9]和固相萃取法^[10]。为实现二者的同时测定, 本实验采用沉淀蛋白法。

二甲双胍在 ESI (电喷雾电离源) 源下有较好的质谱响应, 但离子抑制作用明显^[12]。作者曾尝试通

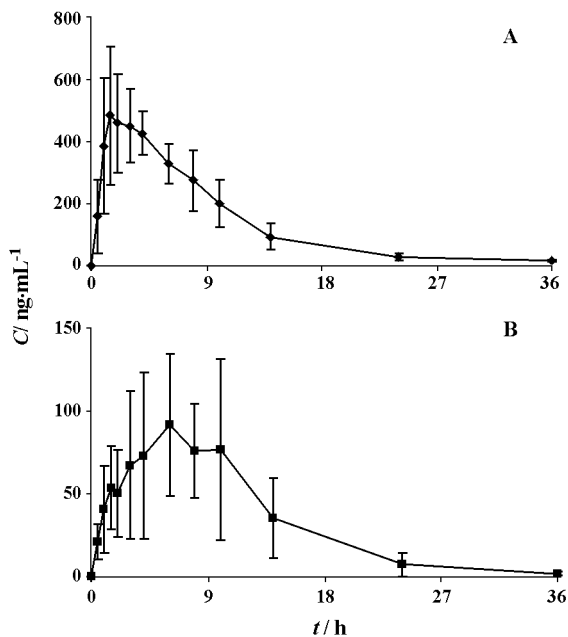


Figure 3 Mean plasma concentration (C)-time (t) curves of metformin (A) and glipizide (B) after oral administration of the compound preparation containing 500 mg metformin and 2.5 mg glipizide to 12 healthy volunteers

过优化色谱条件,延长色谱分析时间,降低离子抑制,但因二甲双胍极性较大,效果不明显。更换APCI源后,虽然二甲双胍质谱响应有所降低,但血浆中内源性物质引起的离子抑制大大降低。与文献^[12]方法相比,本实验所用离子源和色谱条件可以有效降低离子抑制,从而提高灵敏度,将二甲双胍和格列吡嗪的定量下限分别从 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降低到 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,将血药浓度监测时间从服药后 15 h 延长至 36 h。

从二甲双胍的产物离子全扫描质谱图(图 1A)中可以看出,基峰碎片离子为 $m/z 71$,但实验中发现 $m/z 130 \rightarrow m/z 71$ 这一离子对通道中背景噪音较高,因此本实验选用背景噪音较低的 $m/z 130 \rightarrow m/z 60$ 作为二甲双胍定量分析的离子反应,能够达到定量时所要求的灵敏度。

References

- [1] Chen XY, Gu Q, Qiu F, et al. Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 802: 377 - 381.
- [2] Heining K, Bucheli F. Fast liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) determination of metformin in plasma sample [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 34: 1005 - 1011.
- [3] Marques MA, Soares AD, Pinto OW, et al. Simple and rapid method determination for metformin in human plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 308 - 316.
- [4] Zarghi A, Foroutan SM, Shafaati A, et al. Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31: 197 - 200.
- [5] Qu B, Hang TJ, Jiang L. Determination of plasma metformin HCl concentration by ion-pair HPLC and its application to pharmacokinetics [J]. *Chin New Drugs J (中国新药杂志)*, 2004, 13: 637 - 640.
- [6] Huupponen R, Ojala-Karlsson P, Rounu J, et al. Determination of metformin in plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1992, 583: 270 - 273.
- [7] Lin ZJ, Desai-Krieger D, Shun L. Simultaneous determination of glipizide and rosiglitazone unbound drug concentration in plasma by equilibrium dialysis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 801: 265 - 272.
- [8] Liu SK, Pei Q, Yang GP, et al. Determination of glipizide in human plasma by RP-HPLC and its pharmacokinetics in Chinese healthy subjects [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2005, 3: 153 - 155.
- [9] Shen JP, Zhu YQ, Zheng MQ, et al. The relative bioavailability of glipizide tablets in 20 healthy volunteers [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2000, 16: 298 - 300.
- [10] Zhong MK, Liu YB, Shi XJ, et al. Determination of glipizide in plasma by HPLC using solid-phase extraction [J]. *Chin J Clin Pharm (中国临床药理学杂志)*, 2003, 12: 70 - 72.
- [11] AbuRuz S, Killership J, McElroy J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimeperide in plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 817: 277 - 286.
- [12] Ding CG, Zhou Z, Ge QH, et al. Simultaneous determination of metformin and glipizide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21: 132 - 138.
- [13] Zhang M, Moore GA, Lever M, et al. Rapid and simple high-performance liquid chromatographic assay for the determination of metformin in human plasma and breast milk [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 766: 175 - 179.
- [14] Yin R, Chen XH, Bi KS. Study on pharmacokinetics and bioequivalence of glipizide tablets by HPLC-MS in healthy volunteers [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2006, 41: 1405 - 1407.