

· 临床检验研究论著 ·

测定人尿液中替米沙坦的 LC-MS/MS 方法及其应用*

王晓琳, 张丹, 刘曼, 刘会臣[△]

(航天中心医院临床药理室, 北京 100049)

摘要:目的 建立测定人尿液中替米沙坦的 LC-MS/MS 方法(液相色谱-串联质谱法), 并应用于中国健康受试者口服替米沙坦后的尿液样本分析, 以探究中国人群中替米沙坦的尿液排泄情况。**方法** 尿液样本分别未经酶解及酶解处理后, 采用液液萃取法提取后进样测定, 未经酶解处理所得为尿液中替米沙坦原形, 经酶解处理所得为尿液中替米沙坦总量, 而两者之差即为以葡萄糖醛酸结合物形式存在的替米沙坦。**结果** 替米沙坦尿药浓度在 1.00~500.00 ng/mL 范围内线性关系良好, 定量下限为 1.00 ng/mL; 相对误差(RE)在±15%以内, 批内相对标准偏差(RSD)、批间 RSD 均小于 15%。中国健康受试者尿液中以替米沙坦葡萄糖醛酸结合物形式存在的替米沙坦占尿液总排泄量的 98%左右, 替米沙坦经由尿液排泄的数量不到给药剂量的 1%。**结论** 实验建立的 LC-MS/MS 方法专属准确、简单灵敏、分析速度快, 可满足尿液未经酶解及酶解后替米沙坦测定的要求。中国人群的替米沙坦尿液排泄情况与西方人群并无差异。

关键词: 替米沙坦; 葡萄糖醛酸结合物; 尿液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)08-0950-03

Determination of telmisartan in human urine by LC-MS/MS and its application*

Wang Xiaolin, Zhang Dan, Liu Man, Liu Huichen[△]

(Department of Clinical Pharmacology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China)

Abstract: **Objective** To establish LC-MS/MS method for the determination of telmisartan in human urine, analyze urine samples collected from healthy Chinese volunteers, and study the urinary excretion of telmisartan in Chinese. **Methods** Urine samples were analyzed following incubation with glucuronidase or not, and then treated with a liquid-liquid extraction method, so the difference of amount of telmisartan obtained by these two processing methods just was the amount of telmisartan which was present as telmisartan glucuronide. **Results** The calibration curve was linear over the concentration range of 1.00–500 ng/mL with the lowest detection limit of 1.00 ng/mL. Intra-batch and inter-batch RSD were both less than 15%, and the RE were within ±15%. In Chinese healthy volunteers, about 98% of telmisartan in urine was present as telmisartan glucuronide, and urinary excretion accounted for <1% of the dose. **Conclusion** The method is specific, sensitive and effective, and satisfy the determination of telmisartan in urine following incubation with glucuronidase or not. The urinary excretion of telmisartan in Chinese was similar to westerners.

Key words: telmisartan; telmisartan glucuronide; urine

替米沙坦是非肽类血管紧张素 II 受体 AT1 拮抗剂类抗高血压药物, 可迅速、持久地降低血压, 是治疗轻中度原发性高血压的一线药物之一^[1-3]。替米沙坦体内代谢过程与细胞色素 P450 酶无关, 在体内仅生成一种代谢物即葡萄糖醛酸结合物。国外文献报道, 替米沙坦主要通过粪便排泄, 尿液排泄量不到 1%, 且主要为葡萄糖醛酸结合物^[4-7]。替米沙坦在中国人体内的药代动力学过程呈现非线性特征, 并具有显著的个体间差异^[8-10]。本文建立测定人尿液中替米沙坦的 LC-MS/MS 方法, 以探究中国人群的尿液排泄情况。由于替米沙坦葡萄糖醛酸结合物对照品不易得, 故本实验采用间接法测定该化合物的排泄量: 尿液样本经葡萄糖醛酸酶水解后的替米沙坦总量与尿液中替米沙坦原形之差即为以葡萄糖醛酸结合物形式存在的替米沙坦。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 API3200 型三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子化源以及 Analyst 1.4.2 数据处理软件(美国 Applied Biosystem Inc.); Prominence LC-20A 超快速高效液相色谱系统, 配有 LC-20AD 溶剂输送泵、SIL-20AHT 自动进样器、

CTO-20A 柱温箱、CBM-20A 系统控制器、DGU-20A3 在线脱气机(日本 Shimadzu Technologies Inc.)。其他仪器包括 GL-88B 旋涡混合器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司)、QB-600 型高速振荡混合器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司)、SC-3616 台式低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)、MTN-2800D 氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。替米沙坦片(商品名:美卡素, 上海勃林格殷格翰药业有限公司生产, 规格:80 毫克/片, 批号:810868); 替米沙坦对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度为 99.3%, 批号:100629-200401); 地西洋对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度 99.9%, 批号:171225-200903); β-葡萄糖醛酸酶(美国 Sigma, 冻干粉, 货号 G7396-25KU, 临用时每 1 mg 以 pH6.8 磷酸盐缓冲液 1 mL 溶解, 配制成约为 740 U/mL 的酶溶液)。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。空白人尿液来自健康志愿者。

1.2 方法

1.2.1 色谱及质谱条件 色谱柱: Zorbax SB-C18 柱(美国 Agilent, 150 mm×2.1 mm I. D., 5 μm 粒径); 流动相: 甲醇-10 mmol/L 乙酸铵(含 0.5% 甲酸)(70:30); 流速: 0.4 mL/min;

柱温:40 ℃;进样量:5 μL。离子源:电喷雾离子化源;正离子方式检测;离子喷射电压:2 500 V;温度:450 ℃;源内气体 1(GS1,N2)压力:276 kPa;气体 2(GS2,N2)压力:413 kPa;气帘气体(N2)压力:138 kPa;扫描方式为多重反应监测(MRM);用于定量分析的离子反应分别为 m/z 515.2 m/z 276.3(替米沙坦)和 m/z 285.2 m/z 193.2(地西洋),解簇电压(DP)分别为 78 V 和 57 V,碰撞能量(CE)分别为 56 eV 和 38 eV;碰撞气(CAD,N2)压力 21 kPa;Q1 和 Q3 分辨率均为 UNIT。

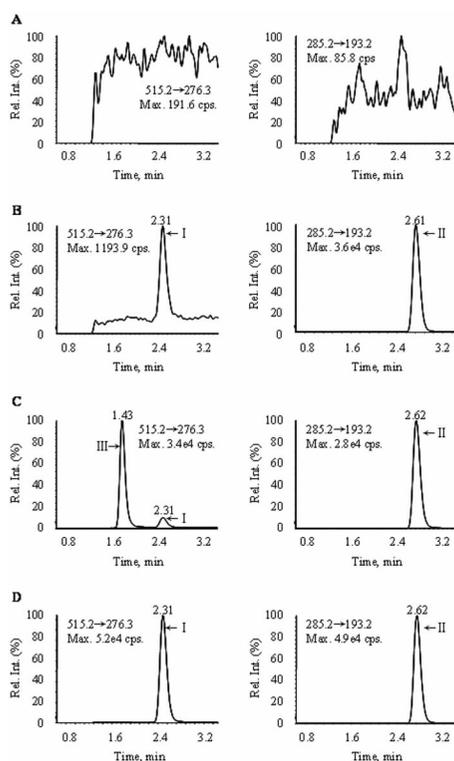
1.2.2 对照品溶液及标准尿液样本的配制 精密称取替米沙坦对照品适量,置 10 mL 容量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 1.00 mg/mL 的替米沙坦储备液,精密取该储备液适量,用甲醇-水(7:3)稀释成各浓度的替米沙坦对照品溶液,再分别以空白尿液稀释得到标准曲线样本(替米沙坦浓度分别为 1.00、2.00、10.00、50.00、100.00、500.00 ng/mL)。另精密称取替米沙坦对照品适量,同法配制成定量下限(LLOQ)、质控(QC)样本(替米沙坦浓度分别为 1.00、2.00、50.00、400.00 ng/mL)。精确称取地西洋对照品适量,置 5 mL 容量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 1.00 mg/mL 的地西洋溶液,再以甲醇-水(7:3)稀释成地西洋浓度为 100 ng/mL 的内标溶液。

1.2.3 尿液样本处理 未经酶解测定:取尿液 50 μL,依次加入 pH6.8 的磷酸盐缓冲液 50 μL、内标溶液 50 μL、乙醚-二氯甲烷(3:2)3 mL,涡流 30 s,振荡 10 min,3 500 r/min 离心 5 min,转移上清液于另一玻璃试管,40 ℃ 恒温浴下氮气吹干,残渣用甲醇-水(7:3)200 μL 复溶,涡流 30 s,复溶后的溶液全部转移至进样瓶中进行 LC-MS/MS 分析。酶解后测定:取尿液 50 μL,加入葡萄糖醛酸酶溶液 50 μL,37 ℃ 孵育 15 h,再加入内标溶液 50 μL,其余处理同上。

1.2.4 方法学验证

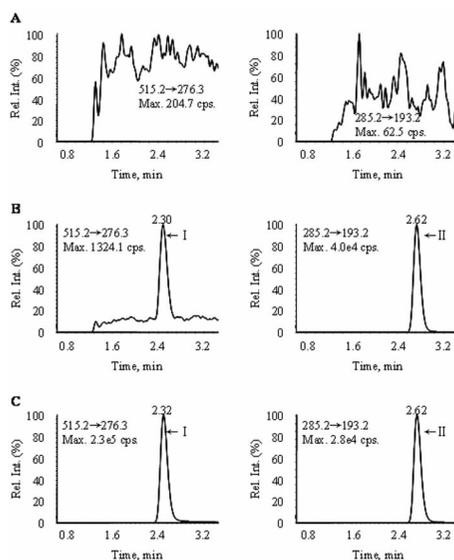
1.2.4.1 选择性 分别取 6 个不同来源的空白尿液,以等体积的甲醇-水(7:3)代替内标溶液,按“尿液样本处理”项操作,得色谱图,其中 1 个空白尿液样本未经酶解和经酶解处理后的色谱图见图 1A 和图 2A;取替米沙坦的 LLOQ 样本,按“尿液样本处理”项操作,未经酶解和经酶解处理后得到的色谱图分别见图 1B 和图 2B;取 1 名受试者用药后收集的尿液样本,按“尿液样本处理”项操作,未经酶解和经酶解处理后得到的色谱图分别见图 1C 和图 2C;替米沙坦和内标对照品溶液的色谱图见图 1D;图 1C 中出现未知色谱峰 III(保留时间为 1.43 min),且该峰在酶解处理后消失(图 2C),推测为替米沙坦葡萄糖醛酸结合物在离子源内裂解产生替米沙坦所形成的色谱峰。结果表明,替米沙坦和内标地西洋的保留时间分别约为 2.31 min 和 2.62 min,空白尿液经两种处理后内源性物质均不干扰替米沙坦和内标地西洋的测定。

1.2.4.2 基质效应 按“尿液样本处理”项下操作,处理 6 个不同来源空白尿液,得到空白尿液基质后,再加入低、中、高 3 个浓度的替米沙坦溶液及内标溶液,以其进样得到的峰面积除以相应浓度的替米沙坦溶液及内标溶液直接进样得到的峰面积,计算尿液中内源性物质对替米沙坦和内标地西洋的基质效应因子。尿液未非酶解和酶解处理后内源性物质对低、中、高 3 个浓度尿液样本中替米沙坦的基质效应因子分别为(95.6±2.8)%、(94.8±1.4)%、(96.7±1.1)%和(106.8±1.4)%、(103.5±2.3)%、(99.3±0.4)%、平均基质效应因子分别为(95.7±2.0)%和(103.2±3.5)%、对内标地西洋的基质效应因子分别为(94.1±1.2)%和(91.1±1.2)%。



A:空白尿液;B:替米沙坦 LLOQ 样本(浓度为 1.00 ng/mL)加入内标溶液;C:受试者口服替米沙坦(80 mg)后尿液样本加入内标溶液。I:替米沙坦;II:地西洋。

图 1 未经酶解处理的尿液中替米沙坦和内标地西洋的典型 MRM 色谱图



A:空白尿液;B:替米沙坦 LLOQ 样本(浓度为 1.00 ng/mL)加入内标溶液;C:受试者口服替米沙坦(80 mg)后尿液样本加入内标溶液。I:替米沙坦;II:地西洋。

图 2 经酶解的尿液中替米沙坦和内标地西洋的典型 MRM 色谱图

1.2.4.3 线性范围与 LLOQ 取标准曲线样本,按“尿液样本处理”项下操作,以尿液中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($W=1/\chi^2$)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。每个分析批建立一条标准曲线,每浓度 2 个样本,连续测定 3 个分析批。两种处理方法测定尿液中替米沙坦的线性范围均为

1.00 ng/mL~500 ng/mL。按“尿液样本处理”项操作,处理 LLOQ 样本,每个分析批 6 样本,连续测定 3 个分析批,以同一分析批的标准曲线计算 LLOQ 样本的浓度,根据测定结果计算其相对误差(RE)、批内相对标准偏差(RSD)、批间 RSD,RE 在±15%以内,批内 RSD 与批间 RSD 均小于 15%,因此定量下限为 1.00 ng/mL。

1.2.4.4 精密度与准确度 按“尿液样本处理”项操作,处理替米沙坦低、中、高 3 个浓度的 QC 样本,每浓度 6 样本,连续测定 3 个分析批,以同一分析批的标准曲线计算 QC 样本的浓度,根据 QC 样本的测定结果计算方法的准确度与精密度,非酶解和酶解处理的相对误差均在±15%以内,批内、批间相对标准偏差均小于 15%。

1.2.4.5 提取回收率 按“尿液样本处理”项操作,处理替米沙坦低、中、高 3 个浓度的 QC 样本,每浓度 6 样本,以其进样得到的峰面积除以空白尿液经处理后再加入低、中、高 3 个相应浓度的替米沙坦溶液及内标溶液后进样得到的峰面积,计算尿液中替米沙坦和地西泮的提取回收率。尿液未经酶解和酶解处理后低、中、高 3 个浓度尿液样本中替米沙坦的提取回收率分别为(93.4±4.3)%、(92.8±1.4)%、(92.9±1.3)%和(97.1±6.6)%、(94.6±1.7)%、(97.5±1.6)%、平均提取回收率分别为(93.0±2.6)%和(96.4±4.0)%、尿液样本中内标地西泮的提取回收率分别为(93.2±2.8)%和(94.0±2.1)%。

1.2.4.6 稳定性 取低、中、高 3 个浓度的 QC 样本,每浓度 3 样本测定,结果表明尿液样本室温下放置 6 h、反复 3 次冻融以及尿液样本未经酶解和酶解处理后的样液放置 6 h 稳定。

1.3 方法应用 尿液采集:8 名健康男性受试者于试验前一天吃清淡晚餐后禁食,试验当日早晨空腹口服替米沙坦(80 mg),于用药前 8 h 内、用药后 0~2 h、2~4 h、4~8 h、8~12 h、12~24 h 收取尿液,测量体积后取 10 mL 置-80℃冰箱中保存,测定未经酶解及酶解尿液中的替米沙坦的浓度,并计算替米沙坦及替米沙坦葡萄糖醛酸结合物的尿液排泄量。

2 结 果

8 名受试者替米沙坦及替米沙坦葡萄糖醛酸结合物(以替米沙坦计)尿液排泄量见表 1。

表 1 尿液排泄量结果

受试者 编号	替米沙坦 原形排泄量 (μg)	替米沙坦葡萄糖 醛酸结合物 排泄量* (μg)	尿液排泄中 代谢物所 占比例* (%)	尿液排泄 量/给药 剂量(%)
01	1.1	204.0	99.5	0.3
02	2.1	147.5	98.6	0.2
03	2.5	186.5	98.7	0.2
04	2.7	231.8	98.8	0.3
05	3.2	244.6	98.7	0.3
06	10.2	585.7	98.3	0.7
07	24.2	582.7	96.0	0.8
08	10.9	585.4	98.2	0.7

*:以替米沙坦计。

3 讨 论

尿液中替米沙坦的测定方法仅有少量国外文献报道^[7,11-12],且多采用荧光法检测,分析时间较长,易产生非特异性干扰,而本实验建立的 LC-MS/MS 方法专属准确、简单灵敏、分析速度快,可满足尿液未经酶解及酶解后替米沙坦测定

的要求,并成功应用于替米沙坦尿液排泄量的研究。本实验结果表明中国健康受试者尿液中以替米沙坦葡萄糖醛酸结合物形式存在的替米沙坦占尿液总排泄量的 98%左右,替米沙坦经由尿液排泄的数量不到给药剂量的 1%,与国外文献^[4]报道一致,因此中国人群的替米沙坦尿液排泄情况与西方人群并无差异,尿排泄差异不是导致替米沙坦在中国人体内药代动力学个体差异大的原因。

参考文献

- [1] Rosario BH, Hendra TJ. Telmisartan in the treatment of hypertension[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008, 4(4): 485-492.
- [2] Stangier J, Su CA, Roth W. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients[J]. J Int Med Res, 2000, 28(4): 149-167.
- [3] Tatami S, Sarashina A, Yamamura N, et al. Population pharmacokinetics of an angiotensin II receptor antagonist, telmisartan, in healthy volunteers and hypertensive patients [J]. Drug Metab Pharmacokin, 2003, 18(3): 203-211.
- [4] Stangier J, Schmid J, Türk D, et al. Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [¹⁴C]telmisartan in healthy volunteers[J]. J Clin Pharmacol, 2000, 40(12 Pt 1): 1312-1322.
- [5] Ebner T, Heinzel G, Prox A, et al. Disposition and chemical stability of telmisartan 1-O-acylglucuronide[J]. Drug Metab Dispos, 1999, 27(10): 1143-1149.
- [6] Stangier J, Su CA, Schöndorfer G, et al. Pharmacokinetics and safety of intravenous and oral telmisartan 20 mg and 120 mg in subjects with hepatic impairment compared with healthy volunteers[J]. J Clin Pharmacol, 2000, 40(12 Pt 1): 1355-1364.
- [7] Torrealday N, González L, Alonso RM, et al. Experimental design approach for the optimisation of a HPLC-fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan in urine[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 32(4/5): 847-857.
- [8] Zhang P, Zhang Y, Chen X, et al. Pharmacokinetics of telmisartan in healthy Chinese subjects after oral administration of two dosage levels[J]. Arzneimittelforschung, 2006, 56(8): 569-573.
- [9] 熊玉卿, 李新华, 黄鹏, 等. 替米沙坦在中国健康志愿者体内的药代动力学特征[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(9): 1038-1041.
- [10] Guo X, Chen XP, Cheng ZN, et al. No effect of MDR1 C3435T polymorphism on oral pharmacokinetics of telmisartan in 19 healthy Chinese male subjects[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(1): 38-43.
- [11] del Rosario Brunetto M, Contreras Y, Clavijo S, et al. Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50(2): 194-199.
- [12] Nie J, Zhang M, Fan Y, et al. Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 828(1/2): 62-69.