

糖尿病患者尿液中常见药物含量的 高效液相色谱法测定

刘洋¹, 黄丽娟¹, 王吉德¹, 春瑞¹, 徐世茹², 孙凤³, 封顺¹

(1. 新疆大学 石油天然气精细化工教育部自治区重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院肾病科, 新疆 乌鲁木齐 830001; 3. 新疆医科大学第六附属医院 内分泌科, 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要: 建立了高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定糖尿病患者尿液中二甲双胍、格列吡嗪和替米沙坦 3 种常用药物含量的方法。室温条件下以 2.5 mmol/L 十二烷基硫酸钠-20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 4.6)-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 实现了 3 种药物的有效分离。采用 3 种不同检测波长, 测得二甲双胍、格列吡嗪和替米沙坦的检出限分别为 13.6 ($\lambda = 232$ nm)、31.5 ($\lambda = 276$ nm)、57.0 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda = 297$ nm), 对应的线性范围分别为 1.0~100.0、1.0~100.0、5.0~250.0 mg/L, 回收率为 82%~113%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.5%~3.1%。利用该法对 9 名糖尿病患者尿样中的 3 种药物残留量进行分析, 结果表明该方法样品处理简便, 色谱分离完全, 结果准确可靠, 为糖尿病患者尿液中的药物代谢组学研究提供了基础。

关键词: 糖尿病; 尿液; 高效液相色谱法; 二甲双胍; 格列吡嗪; 替米沙坦; 同时检测

中图分类号: O657.72 TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)03-0293-05
doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.03.012

Simultaneous Determination of Three Diabetic Drugs in Urine by High Performance Liquid Chromatography

LIU Yang¹, HUANG Lijuan¹, WANG Jide¹, DING Chunru¹, XU Shiru², SUN Feng³, FENG Shun¹

(1. Key Laboratory of Oil & Gas Fine Chemicals Ministry of Education, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

2. Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital Nephrology, Urumqi 830001, China 3. Department of Endocrinology, Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China)

Abstract A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established for the simultaneous determination of 3 drugs for diabetic mellitus (DM), including metformin hydrochloride, glipizide and telmisartan, in urine. The macromolecules in urine samples of DM patients were firstly removed by acetone precipitation method and the supernatants were dried and redissolved in methanol. Then the extracts were analyzed by HPLC coupled with a diode-array detector. The separation of analytes was performed on an Inertsil ODS column by gradient elution using acetonitrile-2.5 mmol/L SDS-20 mmol/L NaH_2PO_4 solution (pH = 4.6) as mobile phase. The recoveries of 3 diabetic mellitus drugs were in the range of 82% - 113% with relative standard deviations of 1.5% - 3.1%. To obtain highest sensitivity, different wavelengths were chose for different drugs. The detection limits were 13.6 $\mu\text{g/L}$ for metformin hydrochloride at 232 nm, 31.5 $\mu\text{g/L}$ for glipizide at 276 nm and 57.0 $\mu\text{g/L}$ for telmisartan at 297 nm, respectively. The linear ranges of metformin hydrochloride, glipizide and telmisartan were in the range of 1.0-100.0, 1.0-100.0, 5.0-250.0 mg/L, respectively. The method was used to detect the contents of 3 drugs in real urine samples of DM patients. The result showed the method was applicable for the study of DM pharmacometabolomics.

Key words diabetes mellitus; urine; high performance liquid chromatography; metformin hydrochloride; glipizide; telmisartan; simultaneous determination

糖尿病 (Diabetes mellitus, DM) 是世界范围内的一种代谢性疾病^[1]。近年来随着我国人均寿命的延长, 糖尿病患者的数量不断上升^[2]。治疗糖尿病常用的西药主要有盐酸二甲双胍 (Metformin hydrochloride)

收稿日期: 2010-10-15 修回日期: 2010-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21075105); 自治区高校科研计划资助项目 (XJEDU20101003)

通讯作者: 封顺, Tel: 0991-8582087, E-mail: fengshun@xju.edu.cn

ride)、格列吡嗪 (G lipizide)、替米沙坦 (Telmisartan) 等。其中盐酸二甲双胍是目前最常用的双胍类口服降血糖药, 主要作用于胰岛外组织, 抑制肠吸收葡萄糖, 增加外周组织对葡萄糖的利用, 减少肝糖原异生, 从而达到降低血糖的目的^[3], 在临床得到广泛应用^[4]。格列吡嗪是第二代磺酰脲类降血糖药, 通过直接刺激胰岛 β 细胞, 促进内源性胰岛素分泌^[5-6]。临床上, 盐酸二甲双胍和格列吡嗪常共同使用治疗 2 型糖尿病。糖尿病常伴有高血压症, 替米沙坦作为一种非肽类血管紧张素 II 受体拮抗剂, 可选择性地、不可逆转地阻滞 AT1 受体, 是一种长效、低毒的新型降压药^[7]。因此临床上应用于伴高血压的非胰岛素依赖性糖尿病患者。

目前这 3 种药物的分离分析方法主要有紫外分光光度法、毛细管电泳高频电导检测法、HPLC、GC-MS 和 HPLC-MS 法等^[8-13], 但现有报道均仅针对其中的 1 种或 2 种药物进行定量定性分析。由于这 3 种药物的物理、化学性质存在很大差异, 采用上述方法无法同时对其分析。而尿液作为唯一能够在无创条件下大量获得的体液^[4], 建立一种对尿液中这 3 种药物同时分析的方法有着非常重要的意义。本文通过监测尿液中这 3 种药物的含量, 为研究药物在体内的分布、排泄及药物代谢动力学提供了研究基础^[15-17]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

梅特勒-托利多 MP230 pH Meter, 高速冷冻离心机 (Coulter Avanti J25, 美国 Beckman 公司); C_{18} SPE 柱 (3 mL/500 mg 美国 Agilent 公司); 高纯水系统 (韩国 Classic UF)。日本岛津高效液相色谱系统, 包括 LC-10A_{vp} 液相色谱仪, SIL-10AD 自动进样器, SPD-M10A_{vp} 二极管阵列检测器和 LC Solution 工作站。

甲醇、乙腈 (色谱纯, Sigma 公司); 盐酸二甲双胍 (中美上海施贵宝制药有限公司)、格列吡嗪片 (海南赞邦制药有限公司)、替米沙坦片 (北京京丰制药有限公司) 及其他试剂均为分析纯; 实验用水为 MilliQ 超纯水。

1.2 液相色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-3.5 μ m (150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m); 流动相: A 相为 pH 4.6 的十二烷基硫酸钠 (SDS 2.5 mmol/L) - 磷酸二氢钠 (20 mmol/L) 溶液, B 相为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~2 min, 5% B; 2~12 min, 5%~60% B; 12~17 min, 60% B; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μ L; 用二极管阵列检测器在 200~400 nm 波长范围内对待测组分进行光谱扫描, 选择保存波长 190~400 nm 的紫外光谱图。

1.3 标准溶液的配制

用 C_{18} 固相萃取柱对市售盐酸二甲双胍、格列吡嗪、替米沙坦进行提纯, 并准确配成 1 g/L 的标准储备液, 于冰箱冷藏保存。

1.4 样品处理

1.4.1 生物样品采集 9 份 2 型糖尿病患者晨尿 (新疆维吾尔自治区人民医院、新疆医科大学第六附属医院提供), 包括 6 男 3 女, 年龄 (60 \pm 12) 岁, 体重 (71 \pm 15) kg。其中服用二甲双胍患者尿样 6 份 (编号为 M1~M6), 服用格列吡嗪和二甲双胍患者尿样 1 份 (编号 G1), 服用替米沙坦和二甲双胍患者尿样 2 份 (编号 T1~T2)。

1.4.2 样品预处理 量取 20 mL 尿样于 100 mL 离心管中, 冰浴, 加冷丙酮 80 mL, 4 $^{\circ}$ C 静置 5 h, 以保证尿液中的蛋白质大分子充分沉淀; 8 000 g 离心 15 min 除去蛋白质; 将上清液真空干燥, 并用 4 mL 甲醇复溶作为样品原液。取样品原液 50 μ L 稀释至 1 mL, 过 0.45 μ m 膜, 备用。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

盐酸二甲双胍极性较强, 使用水-乙腈体系时, 在反相柱上无保留。为改善其在 C_{18} 柱上的保留行为, 加入 SDS 作为离子对试剂, 可明显增加盐酸二甲双胍的保留值。在此基础上分别考察了 3 种药物

在不同浓度磷酸二氢钠及 SDS 溶液、不同 pH 值以及不同有机相 (甲醇、乙腈) 比例下的色谱行为, 最终确定以 2.5 mmol/L SDS-20 mmol/L 磷酸二氢钠 (pH 4.6) - 乙腈为流动相。在此色谱条件下, 3 种常见 DM 药物的 HPLC 色谱图见图 1。由图可见, 二甲双胍、格列吡嗪和替米沙坦的保留时间分别 14.52、13.50、10.89 min。

2.2 方法的线性范围及检出限

精密量取 1 g/L 的二甲双胍和格列吡嗪标准储备溶液各 100 μL, 分别用甲醇定容至 1 mL, 得到 100 mg/L 的药物储备液。用甲醇依次将二甲双胍和格列吡嗪稀释配成质量浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 mg/L 的系列标准溶液; 将 1 g/L 替米沙坦标准储备溶液配成质量浓度分别为 5.0、10.0、25.0、50.0、250.0 mg/L

的系列标准溶液, 按“1.2”方法进行处理和分析。以峰面积 y 和质量浓度 ρ (mg/L) 做标准曲线, 以 3 倍信噪比 ($S/N = 3$) 确定检出限。3 种药物的线性方程、相关系数、线性范围及检出限见表 1。由表 1 可以看出, 本方法具有良好的线性关系, 相关系数均大于 0.999。

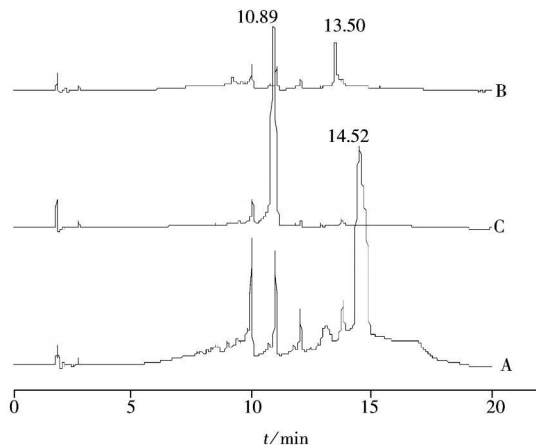


图 1 3 种 DM 药物的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 3 DM drugs standards
A. metformin hydrochloride (100 mg/L), B. glipizide (100 mg/L),
C. telmisartan (250 mg/L); injected volume 20 μL; detection wavelength: A. 232 nm, B. 276 nm, C. 297 nm

表 1 3 种 DM 药物的线性方程与线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of 3 DM drugs

Drug	Regression equation	r	Linear range $\rho / (mg \cdot L^{-1})$	Detection limit $\rho / (\mu g \cdot L^{-1})$
Metformin hydrochloride	$y = 58.78\rho + 0.7436$	0.9998	1.0~100.0	13.6
Glipizide	$y = 10.80\rho + 0.0222$	0.9992	1.0~100.0	31.5
Telmisartan	$y = 12.41\rho - 0.0092$	0.9992	5.0~250.0	57.0

2.3 实际样品的测定

2.3.1 实际尿样中药物回收率与精密度实验 人的尿液成份复杂, 经丙酮沉淀法处理后, 上清液中仍有大量的小分子化合物, 可能对待测组分有较严重的干扰。为验证方法的可行性, 将 3 种药物分别加入已去除蛋白质等高分子的尿液中, 测定 3 种药物的回收率和精密度。由于人个体之间及同一个体不同时间点, 因生理因素及摄入水量的不同, 晨尿总量存在着较大的差异, 导致尿液中内源性代谢物的浓度会随之发生改变。为减小这些因素对最终实验结果的影响, 提高药代组学研究的准确性、代表性, 用尿液体积作为归一化方法。取 DM 患者尿样 20 mL 经“1.4.2”处理后, 先用 HPLC 进行分析, 分别测定二甲双胍、格列吡嗪和替米沙坦的含量, 然后采用标准加入法对二甲双胍、格列吡嗪和替米沙坦进行定量分析, 测定尿样中药物的含量, 计算平均回收率, 并测定峰面积的相对标准偏差, 实验结果见表 2。结果表明 3 种常见糖尿病药物的平均回收率为 82%~113%, 峰面积的 RSD 均不大于 3.1%, 表明方法的重复性良好, 所建立的方法可用于实际样品中 3 种糖尿病常用药物的分离分析。

表 2 3 种 DM 常见药物的回收率和相对标准偏差 ($n = 3$)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations of 3 DM drugs ($n = 3$)

Drug	Sample	Content $m / \mu g$	Added $m / \mu g$	Found $m / \mu g$	Average recovery $\bar{R} / \%$	RSD $s_r / \%$
Metformin hydrochloride	M1	12.39	10.00	22.57	104	2.2
	M2	7.31	10.00	16.97	92	1.7
	M3	9.19	10.00	21.77	113	2.7
	M4	6.82	10.00	15.91	95	2.8
	M5	11.61	10.00	19.56	91	2.4
	M6	3.92	10.00	12.69	87	1.5
Glipizide	G1	1.06	10.00	11.82	106	1.8
Telmisartan	T1	7.15	10.00	15.26	88	3.1
	T2	11.62	10.00	17.79	82	1.9

2.3.2 患者尿样测定 将服用二甲双胍、格列吡嗪和替米沙坦的糖尿病患者尿样经“1.4.2”方法处理后,按“1.2”条件进行测定,DM 患者信息及测定结果见表 3。患者尿样的 HPLC 色谱图见图 2。依据图 1 中 3 种药物的保留时间定性,图 2 中色谱峰 a、b、c 分别为二甲双胍、格列吡嗪、替米沙坦。3 种药物的色谱图分别在各自的最大吸收波长下检测得到。

由表 3 数据可知,随着糖尿病患者的年龄、体重以及患病时间的变化,尿液中的药物残留量存在较大的个体差异。以二甲双胍为例,摄入量均为 500.0 mg/12 h,晨尿中二甲双胍含量的变化范围为 1.91~8.98 mg/20 mL,最高值和最低值相差近 5 倍,而尿液中替米沙坦的含量差异约 17 倍,这种现象不能仅用排尿总量解释,应与患者的实际病情有关。

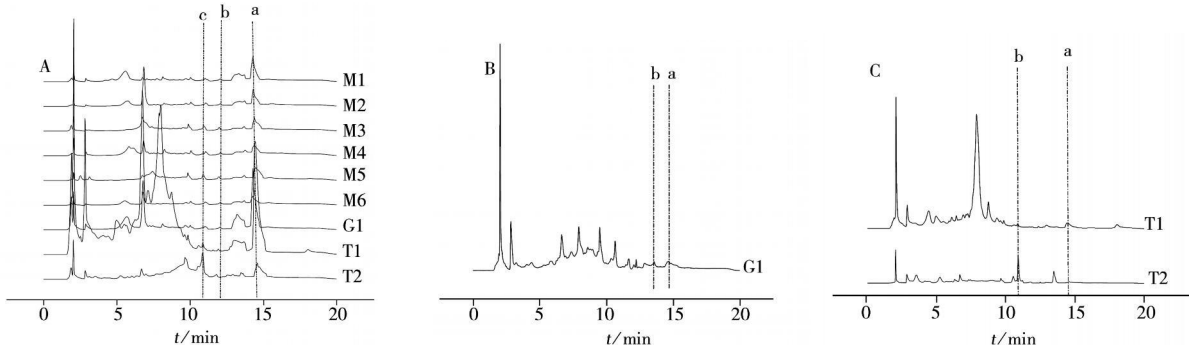


图 2 9 名 DM 患者尿样的 HPLC 色谱图

Fig 2 Chromatograms of different urine samples of 9 DM patients
M1-M6: treated with metformin hydrochloride G1: treated with glipizide and metformin hydrochloride T1-T2: treated with telmisartan and metformin hydrochloride
detection wavelength A: 232 nm, B: 276 nm, C: 297 nm

表 3 实际尿样检测结果 (n=3)

Table 3 Analytical results of 3 DM drugs in urine samples of DM patients (n=3)

Drug	Sample	Gender	Age(y)	Weight(kg)	DM (y)	Dose of drug (mg/12 h)	Content in urine (mg/20 mL)
Metformin hydrochloride	M1	Male	60	69	10	500.0	4.76
	M2	Female	60	56	3	500.0	3.51
	M3	Male	72	77	3	500.0	3.77
	M4	Female	57	61	16	500.0	2.78
	M5	Male	52	73	3	500.0	4.76
	M6	Male	71	80	14	500.0	1.91
	G1	Female	63	65	10	500.0	8.98
	T1	Male	48	78	7	500.0	1.68
	T2	Male	62	86	9	500.0	1.95
Glipizide	G1	Female	63	65	10	5.0	0.42
Telmisartan	T1	Male	48	78	7	80.0	0.15
	T2	Male	62	86	9	80.0	2.45

3 结论

本文采用反相高效液相色谱法,针对不同目标药物在不同特定波长下有最大吸收波长,利用二极管阵列检测器全波段扫描的优点,分别在 232、276、297 nm 处对 3 种 DM 常见药物进行定性分析,以降低杂质干扰,提高方法的灵敏度。同时测定了 3 种药物在糖尿病患者尿液中的残留量,实验结果准确可靠;为生物样品中 DM 药物的检测提供了一种快捷、有效的分析方法。方法可用于 DM 患者尿液及其它体液样品的应急检测,并为 DM 患者尿液中药物代谢组学的研究提供了方法学依据。

参考文献:

[1] LI X, XU Z L, LU X, YANG X H, YIN P Y, KONG H W, YU Y, XU G W. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/tandem of flight mass spectrometry for metabolomics Biomarker discovery for diabetes mellitus[J]. Anal Chim Acta 2009, 633(2): 257-262

[2] 印晓星, 张银娣. 糖尿病肾病的发病机理及其药物治疗[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(5): 541-544

- [3] JONES K L, ARSLAN IAN S, PETEROKOVA V A, PARK J S, TOMLINSON M J. Effect of metformin in pediatric patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial [J]. *Diabetes Care*, 2002, 25(1): 89- 94.
- [4] 何江. 高效液相色谱法测定盐酸二甲双胍血药浓度 [J]. *中国医药指南*, 2008, 6(10): 19- 20.
- [5] 毛金银, 丁黎, 张银娣. HPLC-MS 测定人血浆中格列吡嗪及其药动学研究 [J]. *中国药师*, 2009, 12(12): 1707- 1709.
- [6] ABURUZ S, MILLERSHIP J, MCELNAY J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glibenclamide in plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 817(2): 277- 286.
- [7] 武洁, 冯芳, 蒋娟娟, 田勇. HPLC-MS 法测定人血浆中替米沙坦及药代动力学研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2004, 35(6): 545- 548.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 2 部. 北京: 化学工业出版社, 2000: 539.
- [9] 翟海云, 吴燕红, 黄宝美, 黄庆华, 杨冰仪, 陈缙光. 盐酸二甲双胍的毛细管电泳法快速测定 [J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(7): 923- 926.
- [10] BAO Y Q, ZHAO T, WANG X Y, QIU Y P, SU M M, JIA W P, JIA W. Metabonomic variations in the drug-treated type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(4): 1623- 1630.
- [11] 朱炳辉, 龙朝阳, 吴西梅, 杨杏芬. 固相萃取 / 高效液相色谱法对中成药和保健品中 7 种降糖化学药物的测定 [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(5): 534- 537.
- [12] 梁峰, 王颖, 李平. Agilent 快速高分离液相色谱 (RRLC) / 6410 串联四极质谱测定二甲双胍的血药浓度 [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(8): 96- 97.
- [13] 郭继芬, 陈笑艳, 钟大放. 6 种口服降糖药的液相色谱-质谱分析 [J]. *分析测试学报*, 2000, 19(6): 5- 8.
- [14] AHMED F. Sample preparation and fractionation for proteome analysis and cancer biomarker discovery by mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(5/6): 771- 798.
- [15] CAUBET C, LACROIX C, DECRAMER S, DRUBE J, EHRICH J H H, MISCHAK H, BASCANDS J L, SCHANSPRA J P. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease [J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(1): 27- 35.
- [16] SUN J C, SCHNACKENBERG L K, HOLLAND R D, SCHMITT T C, CANTOR G H, DRAGAN Y P, BEGER R D. Metabonomics evaluation of urine from rats given acute and chronic doses of acetaminophen using NMR and UPLC-MS [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871(2): 328- 340.
- [17] THONGBOONKERD V. Biomarker discovery in glomerular diseases using urinary proteomics [J]. *Proteom Clin Appl*, 2008, 2(10/11): 1413- 1421.