

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01525

## LC-MS/MS 测定人血浆中替米沙坦的浓度

### LC-MS/MS in determination of telmisartan concentration in human plasma

金晓玲,高守红,邬蓉,李静娴,陶霞\*

第二军医大学长征医院药学部,上海 200003

**[摘要]** 目的:建立测定人血浆中替米沙坦浓度的 LC-MS/MS 方法,并用该法研究替米沙坦片在健康人体内的药代动力学。

**方法:**采用 LC-MS/MS 测定人血浆中不同时间点替米沙坦的浓度,以地西泮为内标,血浆样品用乙腈沉淀蛋白,色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,3.5 μm),流动相为乙腈-0.3%甲酸水溶液(55:45),流速 0.3 ml/min,柱温 30℃。**结果:**替米沙坦的线性范围为 2.5~500 ng/ml ( $r=0.9957$ ),最低定量限为 2.5 ng/ml( $S/N>10$ ),日内和日间 RSD<8%。**结论:**本法操作简单,选择性好,灵敏度高,适用于替米沙坦的人体药代动力学研究。

**[关键词]** 替米沙坦;LC-MS/MS;药代动力学

**[中图分类号]** R 972.4 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1525-03

替米沙坦(telmisartan),4-{[2-正丙基-4-甲基-6-(1-甲基苯并咪唑-2-基)苯并咪唑-1-基]甲基}联苯基-2-羧酸,是一种新型的口服非肽类血管紧张素 II 受体拮抗剂,可以选择性地、难以逆转地阻滞 AT<sub>1</sub>受体,而对其他受体尤其是心血管系统的受体无影响,是一种长效、高效、低毒的新型降压药。临床研究<sup>[1-4]</sup>表明,替米沙坦每日口服 1 次可产生 24 h 持续降压效果,是市场上一种具有实际意义的“1 d 服 1 次”的长效降压药物。考虑到临床生物样本量大、稳定性差、浓度低、专属性要求高等特点,本研究建立了快速测定血浆中替米沙坦的 LC-MS/MS 方法,一个样品的测定时间仅需 2.5 min,1 d 内能测定 500 多个样品,能快速而简便地分析大量的血浆样品,为临床试验提供参考依据。

#### 1 材料和方法

**1.1 仪器和药品** Agilent 1200 液相色谱-Agilent 6410 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司);Agilent 6410 B.01.00 定量处理软件;飞鸽牌 TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);旋涡振荡混合器 WL-901 Vortex(海口市其林贝尔仪器制造有限公司)。替米沙坦对照品(含量 99.3%,上海医药工业研究所)。替米沙坦片(上海现代浦东药厂有限公司,规格 40 mg,批号 070320);地西泮(内标,中国药品生物制品检定所);甲醇、乙腈和甲酸为色谱纯试剂(德国 Merck 公司);水为纯净水。

**1.2 色谱分离条件** 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm,3.5 μm),流动相为乙腈-0.3%甲酸水溶液(55:45),流速为 0.3 ml/min,柱温为 30℃。

**1.3 质谱分离条件** 采用 ESI 离子源,正离子检测,选择 MRM 工作方式进行一/二级质谱分析。用于定量分析的检

测离子为:替米沙坦  $[M+H]^+$   $m/z$  515→ $m/z$  497,内标地西泮  $[M+H]^+$   $m/z$  285→ $m/z$  193(图 1),干燥气流速为 10 L/min,干燥气温度为 350℃,雾化气压力为 275.792 kPa,毛细管电压为 4 000 V。

**1.4 受试者与试验设计** 本临床试验方案经长征医院伦理委员会审核批准,在试验过程中受伦理委员会指导。10 名男性健康志愿者,年龄(21.8±1.22)岁,体质量(66.8±3.9)kg,肝肾功能及心电图正常,试验前 1 周及试验期间禁用其他药物,试验期间禁烟、酒、茶并签署知情同意书。在禁食 12h 后,于次日晨空腹口服替米沙坦片 40 mg,于给药前及给药后 0.25,0.5,0.75,1.0,1.5,2.0,4.0,8.0,12.0,24.0,36.0,48.0 和 60.0 h 于静脉取血 3 ml,1 700×g 离心 10 min,分离血浆后置-20℃冰箱保存。

**1.5 血浆样品预处理** 取血浆 200 μl 置于 1.5 ml 塑料离心管中,加入 400 μl 乙腈(含内标地西泮 100 ng/ml),涡旋振荡 1 min,于 8 000×g 高速离心 10 min,取上清液 200 μl,加入 200 μl 0.3%甲酸溶液,涡旋混匀后取 10 μl 进样,峰面积内标法定量分析。

**1.6 含量测定的方法学考察** 用健康空白血浆精密配制成 2.5、5.0、25.0、50.0、100.0、250.0 和 500.0 ng/ml 浓度的替米沙坦标准血浆样品,按 1.5 项下方法操作,制备血浆标准曲线。配制 5.0、50.0 和 500.0 ng/ml 3 种不同浓度的替米沙坦血浆质控样品,按 1.5 项下方法操作,进行回收率及日内、日间精密度考察。还考察了替米沙坦血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环的稳定性以及血浆样品经样品处理后室温放置 24 h 的稳定性。

**1.7 药代动力学参数计算** 采用统计矩法计算药代动力学参数, $c_{max}$ 、 $t_{max}$  采用实测值,AUC 采用梯形面积法计算, $\lambda_z$  为

**[收稿日期]** 2008-07-17 **[接受日期]** 2008-08-23

**[作者简介]** 金晓玲,药师。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-63610109-73712,E-mail:taoxia2003@126.com

末端相消除速率常数,用末端相浓度对数与时间回归直线求得: $t_{1/2} = 0.693/\lambda_z$ 。

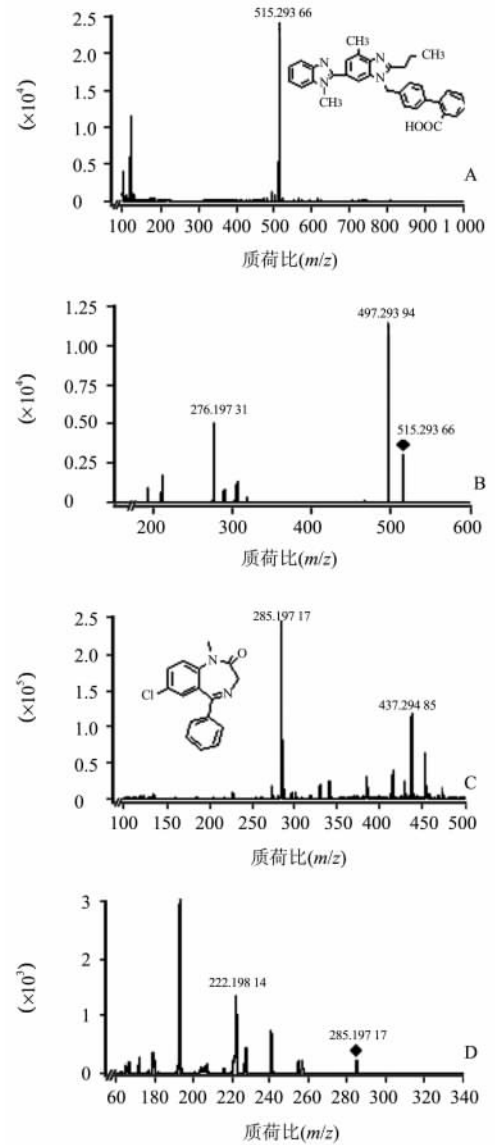


图 1 替米沙坦和内标的 ESI-MS 质谱图

A: 全扫描质谱图; B: 产物离子质谱图; C: 内标全扫描质谱图; D: 内标产物离子质谱图

## 2 结果

2.1 方法专属性 在上述色谱条件下,替米沙坦和地西洋峰形良好,替米沙坦和地西洋的保留时间分别为 1.05 min 和 2.18 min(图 2)。血浆中内源性杂质均不干扰药物的测定。

2.2 方法学考察 结果表明替米沙坦在 2.5~500.0 ng/ml 浓度范围内线性关系良好,回归方程为  $A = 0.0143C + 0.0022$  ( $r = 0.9957$ )。替米沙坦在血浆中最低定量检测限为 2.5 ng/ml, RSD 为 18.09%。低、中、高 3 种浓度的日内及日间精密度分别 <4% 和 <8%, 回收率 96.48%~100.34%。

结果显示替米沙坦血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环后稳定, RSD 为 8.76%; 血浆样品经样品处理后室温放置 24 h 稳定, RSD 为 8.11%。

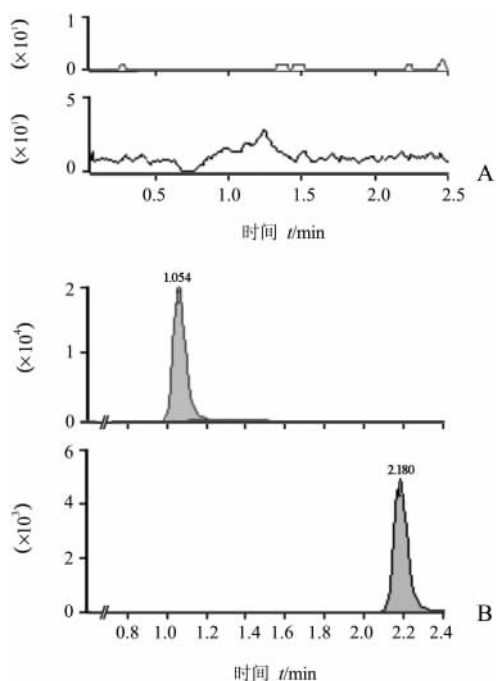


图 2 替米沙坦血浆样品 MRM 色谱图

A: 空白人血浆样品; B: 实测血浆样品

2.3 药代动力学结果 得到的主要药动学参数为:  $t_{1/2}$  ( $19.54 \pm 3.02$ ) h,  $c_{\max}$  ( $176.39 \pm 30.62$ ) ng/ml,  $t_{\max}$  ( $1.2 \pm 0.4$ ) h,  $AUC_{0-60}$  ( $1634.12 \pm 198.25$ ) ng · h · ml<sup>-1</sup>,  $AUC_{0-\infty}$  ( $1682.09 \pm 205.34$ ) ng · h · ml<sup>-1</sup>, 平均血药浓度-时间曲线见图 3。

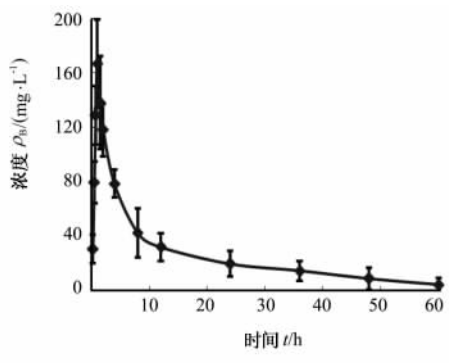


图 3 健康志愿者口服 40 mg 替米沙坦片后的平均血药浓度-时间曲线  
 $n=10, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

本研究采用 ESI 正离子模式, 对所测定的替米沙坦及其内标地西洋的电离条件进行优化,  $[M+H]^+$  峰容易生成有规律的碎片, 便于 MS/MS 测定, 经过优化电离和裂解条件并提高高能打拿极电压, 最终可以满足替米沙坦及其内标地

西洋血药浓度的测定。但提高高能打拿极电压会缩短高能打拿极寿命, 故进样后直接将流动相接入废液瓶, 此时高能打拿极电压为 0, 0.6 min 时切换到质谱仪进行测定, 流动相接入质谱时将高能打拿极电压调为 600 V。不将 0.6 min 前的流动相接入质谱仪不仅可以降低血浆样品中杂质进入质谱的量, 还可以降低离子源的污染。

由于替米沙坦分子结构中含有羧基和碱性氮原子, 所以流动相的 pH 值对其保留时间有一定影响。用乙腈-0.3% 甲酸水溶液 (55:45) 作为流动相时分离效果最好。在研究初期, 曾探讨使用甲醇、乙腈等蛋白沉淀剂处理生物样品, 结果使用乙腈提取回收率高一些, 但若用上清液直接进液质, 峰形不对称且响应较低, 将上清液用水、流动相、0.1% 甲酸、0.3% 甲酸、0.5% 甲酸分别按 1:1 和 1:2 稀释, 结果发现用 0.3% 甲酸 1:1 稀释提取回收率最高, 达 85% 左右。张鹏等<sup>[5]</sup>用 LC-MS/MS 测定血浆中替米沙坦, 但样品前处理需经液液萃取氮气吹干和流动相复溶等复杂过程。本实验建立的方法所需血浆样品量少, 前处理采用蛋白沉淀, 操作简便, 分析测定时间短, 在处理大批量血浆样品时可节省时间。

替米沙坦在人体血浆中的浓度较低, 采用 HPLC-UV 法测定时, 有时可观察到少量杂质干扰低浓度样品的测定。为保证临床大量且复杂生物样本分析的专属性和准确性, 本研究建立了替米沙坦人血浆样本 LC-MS/MS 分析方法, 可以选择性地检测选定的离子以及该离子所产生的子离子, 因而选择性很高, 而对 LC 的分离要求不高, 甚至可以不用 LC 分离而直接将混合样品进入 MS 进行测定, 故可以实现快速分离; 空白血浆无杂质干扰, 最低定量检测浓度可以达到 2.5 ng/ml, 完全满足临床血药浓度监测的要求。

### [参考文献]

- [1] 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]. 中国药科大学学报, 2004, 35: 545-548.
- [2] 樊志君. HPLC-MS 测定人血浆中替米沙坦[J]. 中医药导报, 2007, 13: 108-110.
- [3] Stangier J, Su C A, Hendriks M G, van Lier J J, Sollie F A, Oosterhuis B, et al. The effect of telmisartan on the steady-state pharmacokinetics of digoxin in healthy male volunteers [J]. J Clin Pharmacol, 2000, 40(12 Pt 1): 1373-1379.
- [4] Stangier J, Su C A, Schöndorfer G, Roth W. 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.
- [5] 张鹏, 张逸凡, 陈笑艳, 钟大放. 三种替米沙坦制剂在中国健康人体的药理学及生物等效性 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15: 1491-1495.

[本文编辑] 尹茶