

HPLC-MS/MS法测定老年糖尿病患者血浆中苯甲酸阿格列汀浓度

张玉倩, 解伟伟, 刘剑, 张志清, 靳怡然* (河北医科大学第二医院药学部, 石家庄 050000)

摘要 目的: 采用HPLC-MS/MS法测定老年糖尿病患者血浆中苯甲酸阿格列汀的浓度。方法: 采用蛋白沉淀的方法处理样品, 色谱柱为Diamonsil C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 使用乙腈-0.1%甲酸溶液作为流动相, 进行梯度洗脱, 流速0.6 mL·min⁻¹, 柱温30 °C, 进样量10 μL。采用电喷雾离子源, 正离子模式对血浆样品中的苯甲酸阿格列汀浓度进行定量检测, 阿格列汀和西格列汀的检测离子对分别为m/z 340.0→116.0和m/z 408.0→235.0。结果: 人血浆中苯甲酸阿格列汀在1~200 ng·mL⁻¹浓度范围线性关系良好, 定量下限为1 ng·mL⁻¹, 批内、批间准确度分别为99.1%~108.5%、102.4%~109.2%, 批内和批间的精密度RSD均<8.9%, 平均提取回收率为86.4%~95.6%, 基质效应为95.1%~106.7%。结论: 本试验建立的方法简单, 灵敏度和准确性高, 适用于苯甲酸阿格列汀在老年糖尿病患者血浆中的含量测定。

关键词: 苯甲酸阿格列汀; 液相色谱串联质谱法; 老年人; 血浆药物浓度; 糖尿病

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)05-0548-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.05.009

Determination of Alogliptin Benzoate Concentration in Plasma of Elderly Diabetic Patients by HPLC-MS/MS

Zhang Yuqian, Xie Weiwei, Liu Jian, Zhang Zhiqing, Jin Yiran* (Department of Pharmacy, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract Objective: To determine the plasma concentration of alogliptin benzoate in elderly patients with diabetes by HPLC-MS/MS. **Methods:** Protein precipitation was used to process the samples. The chromatographic column was a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm), and acetonitrile-0.1% formic acid water was used as the mobile phase. The flow rate was 0.6 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. The concentration of alogliptin benzoate in plasma samples was quantitatively detected by electrospray ion source and positive ion mode. The detection ion pairs of alogliptin and sitagliptin were respectively m/z 340.0→116.0, m/z 408.0→235.0. **Results:** The alogliptin in human plasma had a good linear relationship in the concentration range of 1-200 ng·mL⁻¹. The lower limit of quantification was 1 ng·mL⁻¹. The intra-batch and inter-batch accuracy were respectively 99.1%-108.5% and 102.4%-109.2%, RSD of the intra-batch and inter-assay precision was less than 8.9%, the average extraction recovery was 86.4%-95.6%, and the matrix

基金项目: 河北省中医药管理局课题(编号 2021150)

作者简介: 张玉倩 Tel: 18712918020; E-mail: 380780431@qq.com

通信作者: 靳怡然 Tel: 15803218360; E-mail: jinyiran@sohu.com

effect was in the range of 95.1%-106.7%. **Conclusion:** The method established in this test is simple, sensitive, and highly accurate, and is suitable for the determination of alogliptin benzoate in elderly patients with diabetes plasma.

Keywords: alogliptin benzoate; HPLC-MS/MS; the elderly; plasma concentration; diabetes

苯甲酸阿格列汀 (Alogliptin Benzoate) 是由日本武田 (Takeda) 制药公司开发的二肽基肽酶-4 (Dipeptidyl Peptidase-4, DPP-4) 抑制剂, 该类物质能够抑制肠促胰岛素的灭活, 促进胰岛 β 细胞释放胰岛素, 同时抑制胰岛 α 细胞分泌胰高血糖素, 维持血糖稳定, 且不易诱发低血糖和增加体重^[1-3], 苯甲酸阿格列汀于2014年初正式在我国上市, 国内外重要的糖尿病治疗相关指南均推荐其作为2型糖尿病的一线及全程治疗药物^[4-5]。

目前, 国内外关于阿格列汀的测定方法的报道主要是HPLC法和HPLC-MS/MS法^[6-8], 但其测定的对象主要是健康受试者, 且主要为外国人群, 目前尚未有其在老年糖尿病患者中的应用报道, 因此, 本文建立HPLC-MS/MS法测定苯甲酸阿格列汀在老年糖尿病患者血浆中的药物浓度, 用于阿格列汀在中国糖尿病人群中的药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

三重四级杆质谱联用仪 (API 4000+, 美国AB公司); 液相色谱仪 (Prominence CBM-20A, 日本岛津公司); 低温冰箱 (MDF-U2086S, 日本SANYO); 数控恒温水浴氮吹仪 (KL512J, 北京康林科技有限公司); 涡旋混合器 (XW-80A, 原上海医科大学仪器厂); 电子分析天平 (CPA225D, 德国Sartorius); 高速医用冷冻离心机 (R18, 北京白洋医疗器械)。

1.2 药品与试剂

苯甲酸阿格列汀对照品 (上海士锋生物科技有限公司, 批号19121675, 纯度98.9%); 西格列汀内标 (上海士锋生物科技有限公司, 批号19101241, 纯度98.9%); 甲醇、乙腈 (色谱级) 购于美国Fisher公司; 甲酸 (优级纯, 批号20150515) 购于天津市光复精细化工研究所。

2 方法与结果

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱为Diamonsil C₁₈柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m)。流动相为0.1%甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 10%~55% B; 2~5 min, 55%~70% B; 5~6 min, 70%~90% B; 6~8 min, 90% B。流速: 0.6 mL · min⁻¹, 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 自动进样器温度: 4 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.1.2 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子模式, 多反应监测 (Multiple Response Monitoring, MRM)。正离子模式: 毛细管电压5.5 kV, 源温度550 $^{\circ}$ C; 阿格列汀和西格列汀的检测离子对分别为 m/z 340.0 \rightarrow 116.0, m/z 408.0 \rightarrow 235.0, 去簇电压 (Declustering Potential, DP) 与碰撞电压 (Collision Energy, CE) 分别为86 V、41 eV和30 V、26 eV。

2.2 溶液及样品制备

2.2.1 溶液制备

精密称取苯甲酸阿格列汀对照品约10 mg, 置25 mL的量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 配制成浓度为0.4 mg · mL⁻¹苯甲酸阿格列汀对照品储备液, 置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存。精密称取西格列汀对照品10 mg, 置100 mL的量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 配制成浓度为0.1 mg · mL⁻¹西格列汀对照品储备液; 精密量取适量西格列汀储备液, 用乙腈稀释制得浓度为500 ng · mL⁻¹的内标溶液, 4 $^{\circ}$ C保存待用。

2.2.2 血浆样品及质控样品制备

取0.4 mg · mL⁻¹的苯甲酸阿格列汀对照品储备液1 mL, 置于100 mL的量瓶中, 用乙腈定容摇匀, 制成4 μ g · mL⁻¹的溶液, 再用乙腈逐级稀释, 得到10、50、100、500、1000、1500、2000 ng · mL⁻¹的系列标准溶液。分别取系列标准溶液20 μ L, 40 $^{\circ}$ C水浴N₂吹干后, 加入空白血浆200 μ L, 制得1、5、10、50、100、150、200 ng · mL⁻¹的模拟血浆样品。分别取62.5、1250、3750 μ L的4 μ g · mL⁻¹苯甲酸阿格列汀储备液, 置于10 mL的量瓶中, 乙腈定容, 制得25、500、1500 ng · mL⁻¹的工作液, 分别吸取上述苯甲酸阿格列汀工作液,

40 ℃水浴N₂吹干后,加入空白血浆200 μL,制得2.5、50、150 ng·mL⁻¹的质控样品。

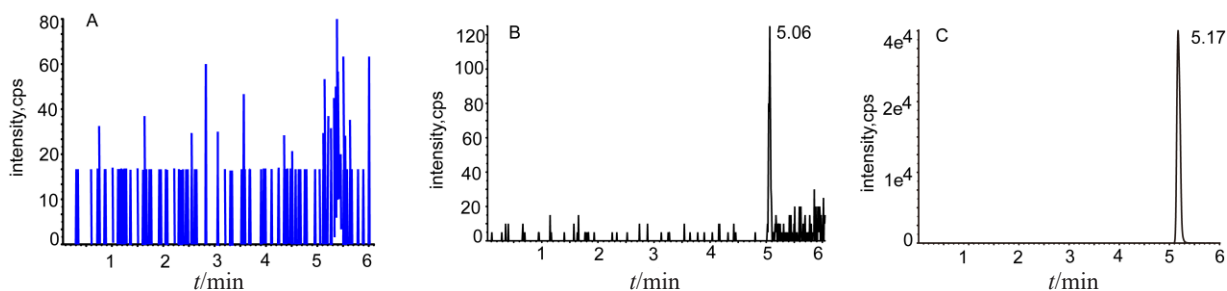
2.3 血浆样品处理

取模拟血浆样品200 μL,置于1.5 mL的离心管中,加入内标溶液(500 ng·mL⁻¹)20 μL,涡旋30 s,加入3倍量的乙腈,涡旋60 s,10000 r·min⁻¹离心5 min,离心后取上清液置于另一洁净的1.5 mL离心管中,40 ℃水浴N₂吹干后,加入初始比例的流动相200 μL复溶,涡旋30 s,进样分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察

测试6个不同来源的空白基质样本(不添加待测物和内标,各1个重复)和1个批次的空白基质(只添加待测物或内标,6个重复),进样10 μL,获得色谱图,见图1。干扰组分的响应应低于待测物定量下限响应的20%,并低于内标响应的5%。



A. 空白血浆; B. 空白血浆中含1 ng·mL⁻¹苯甲酸阿格列汀(定量下限); C. 空白血浆中加入内标(西格列汀)。

图1 苯甲酸阿格列汀与西格列汀的LC-MS/MS色谱图

2.4.2 标准曲线与定量下限

分别取按照“2.2.2”项下方法制备的系列浓度标准血浆样品,按照“2.3”项下方法进行样品处理,并进样分析,记录色谱图。以血浆中苯甲酸阿格列汀的浓度(ng·mL⁻¹)为横坐标,苯甲酸阿格列汀与内标峰面积比值为纵坐标,进行线性回归计算,得标准曲线方程: $Y=0.015X+0.044$ ($r^2=0.996$),血浆中苯甲酸阿格列汀在1~200 ng·mL⁻¹范围内线性关系良好。以信噪比(RSN)为3和10计,血浆中苯甲酸阿格列汀的检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别为0.3 ng·mL⁻¹和1 ng·mL⁻¹。

2.4.3 提取回收率和基质效应

取苯甲酸阿格列汀的低、中、高浓度(2.5、50、150 ng·mL⁻¹)的模拟人血浆样品,按照“2.3”项下方法处理并平行测定5份(A样),与经过样品前处理后的空白样品作为溶剂配制的相同浓度溶液(B样)的测定结果进行比较,计算苯甲酸阿格列汀的平均提取回收率为86.4%~95.6%,B样和相同浓度对照品溶液(C样)的测定结果进行比较,计算苯甲酸阿格列汀的基质效应在95.1%~106.7%范围内。内标的平均回收率为94.2%,结果说明回收率较高,不会对样品的分析产生影响,见表1。

表1 平均提取回收率和基质效应($n=5$)

样品	质控样品浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
阿格列汀	2.5	86.4 ± 6.8	5.21	95.1 ± 1.5	1.59
	50.0	89.7 ± 5.6	4.63	98.4 ± 1.3	1.32
	150.0	95.6 ± 4.3	3.92	106.7 ± 0.9	1.06
西格列汀	500.0	96.4 ± 3.9	3.56	94.2 ± 1.9	1.72

2.4.4 精密度与准确度

从低至高3种不同浓度的质控样品(2.5、50、150 ng·mL⁻¹),按照上述方法处理,每个浓度平行测定5个样品,连续测定3个分析批,计算批内和批间精密度和准确度。批内和批间的精密度RSD

均小于8.9%。准确度用相对误差(Relative Error, RE)表示,批内准确度在99.1%~108.5%之间,批间准确度在102.4%~109.2%之间,结果表明该方法的精密度和准确度良好,见表2。

表2 质控样品在人血浆的批内批间精密度和准确度(n=5)

质控样品浓度 / (ng·mL ⁻¹)	批内			批间		
	实测值 / (ng·mL ⁻¹)	准确度 / %	精密度 / %	实测值 / (ng·mL ⁻¹)	准确度 / %	精密度 / %
2.5	2.50 ± 0.03	105.9	8.9	2.51 ± 0.06	109.2	7.6
50.0	50.14 ± 1.03	99.1	5.2	50.06 ± 1.12	106.9	4.1
150.0	150.20 ± 3.10	108.5	1.8	151.00 ± 2.90	102.4	2.6

2.4.5 稳定性

取空白血浆200 μL,进行低、中、高3个浓度(2.5、50、150 ng·mL⁻¹)的质控样品的制备,每一浓度进行5个样本分析,考察其在如下条件中的稳定性:-40℃低温保存7天、反复冻融3次、处理

后室温放置6 h、自动进样器放置6 h。并考察血浆样品在-40℃低温保存7 d、处理后室温放置6 h、自动进样器放置6 h和反复冻融3次条件下的RSD值,结果均小于5.93%,表明血浆样品在上述条件下稳定性良好,见表3。

表3 质控样品在人血浆中的稳定性(n=5)

储存条件	浓度 / (ng·mL ⁻¹)		精密度 / %	准确度 / %
	标准浓度	实测值		
-40℃低温保存7 d	2.5	2.46 ± 0.07	3.59	102.1
	50.0	51.32 ± 2.56	2.01	108.3
	150.0	152.76 ± 8.92	1.92	110.7
反复冻融3次	2.5	2.52 ± 0.10	5.36	107.6
	50.0	49.10 ± 3.92	3.58	105.2
	150.0	153.14 ± 9.36	2.41	99.1
处理后室温放置6 h	2.5	2.43 ± 0.09	4.58	106.2
	50.0	51.93 ± 2.94	2.25	107.5
	150.0	148.23 ± 7.25	1.23	99.5
自动进样器放置6 h	2.5	2.59 ± 0.13	5.93	99.6
	50.0	48.90 ± 3.26	3.24	100.6
	150.0	153.01 ± 9.26	2.31	105.1

2.5 方法学应用

选取老年2型糖尿病患者7例, 年龄65~85岁, 男女比例适当, 肝肾功能检查合格者入选单次口服25 mg苯甲酸阿格列汀片的药代动力学试验。试验方案经河北医科大学第二医院伦理委员会批准, 受试者签署书面知情同意书。受试者禁食12 h后, 于试验日早晨空腹开始试验。受试者口服苯甲酸阿格列汀片25 mg, 200 mL温水送服。分别于给药前和

给药后1、2、3、4、8、12、24、48和72 h取前臂静脉血4 mL, 放入含有肝素的离心管中, 以3000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, 取上层血浆放入干净的离心管中, 于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏备用, 采用本研究中的方法测定血浆中阿格列汀浓度。

阿格列汀平均药-时曲线见图2。7名受试者阿格列汀血药浓度-时间数据经DAS 3.0拟合, 其主要药动学参数见表4。

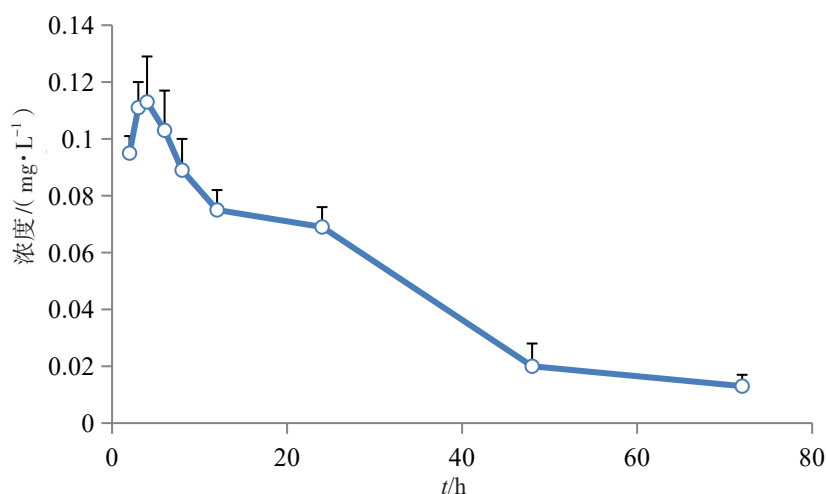


图2 7位受试者服用阿格列汀后血药浓度-时间曲线

表4 7位受试者服用阿格列汀后主要药动学参数

指标	老年糖尿病受试者药动学参数	健康受试者药动学参数
$C_{\max}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$0.121 \pm 0.008^*$	0.110 ± 0.026
T_{\max}/h	3.00 ± 0.57	2.00 ± 0.50
$T_{1/2}/\text{h}$	22.36 ± 2.78	21.40 ± 4.44
$\text{AUC}_{(0-t)}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h})$	1.563 ± 0.467	1.223 ± 0.121
$\text{AUC}_{(0-\infty)}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h})$	1.625 ± 0.637	1.327 ± 0.137

注: * $P < 0.05$ 。

3 讨论

为了建立一种高效灵敏的HPLC-MS/MS方法测定人血浆中苯甲酸阿格列汀的浓度, 本研究对质谱条件、色谱条件及样品前处理进行了优化。在质谱条件优化方面, 通过优化选择了响应高、特异性强的离子对, 并确定了最佳的DP和CE, 采用MRM的模式, 保证测定结果的准确性。在色谱条件方面, 尝试了等度和梯度洗脱, 发现等度洗脱, 虽运行时

间短, 但峰形太宽且拖尾, 因此选择采用梯度洗脱。对于样品的处理, 也尝试了乙酸乙酯萃取、乙醚萃取和乙腈沉淀蛋白的方式, 经比较发现采用液液萃取的方式, 提取效率较差, 方法灵敏度不高, 采用乙腈沉淀蛋白的方式, 样品峰响应较高, 且无内源性物质干扰, 因此最后选择乙腈沉淀蛋白的方式处理样品。

已有学者做过关于苯甲酸阿格列汀或与其他

降糖药物合用在健康受试者体内的药动学^[3, 9-10]。将老年糖尿病患者服药后的药动学参数与文献^[10]进行对比(见表4),采用SPSS 21.0软件对药动学参数进行分析和处理,其中 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 进行完全随机两样本 t 检验比较,而药动学参数(T_{max} 、 $T_{1/2}$)进行两独立样本非参数检验^[11-12],当 $P < 0.05$ 时,认为统计学上有意义。经过比较,两组间的药动学参数(AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 T_{max} 、 $T_{1/2}$)的统计学分析结果为无显著性差异,但两组间 C_{max} 比较 $P < 0.05$,说明差异具有统计学意义。老年糖尿病患者服药后体内 C_{max} 比健康受试者高,这是由于老年人肝细胞减少、肝药酶活性下降,对药物代谢能力下降,且老年人肾功能降低,导致肾脏排泄药物减少^[13-15],尤其阿格列汀主要是经过肾脏代谢,给药剂量的60%~71%以原型通过尿液排泄,导致阿格列汀在老年糖尿病患者体内 C_{max} 偏高。

本研究方法与之前文献^[5-6]相比稳定性好、灵敏度高,且重复性好,本试验提高了检测的灵敏度,建立的最低定量限为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,标准曲线范围为 $1 \sim 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,可以满足实际测样的低浓度的需求,同时又可以保证实施完整人体生物样本浓度的需求,更符合临床应用的标准。本文建立苯甲酸阿格列汀人血浆浓度的HPLC-MS/MS的测定方法,可用于临床老年糖尿病患者苯甲酸阿格列汀的血药浓度监测。

参考文献:

- [1] 时春娟,赵春才,陆超,等. HPLC法测定苯甲酸阿格列汀片的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(37): 71-72.
- [2] 胡晋卿,张明,尚德为,等. LC-MS/MS法测定精神分裂症合并2型糖尿病患者血浆中沙格列汀的浓度[J]. 今日药学, 2014, 24(8): 556-559.
- [3] Abdel-Ghany MF, Abdel-Aziz O, Ayad MF, et al. Enhanced LC-MS/MS Analysis of Alogliptin and Pioglitazone in Human Plasma: Applied to a Pharmacokinetic Study[J]. J Chromatogr B, 2017, 1058(7): 93-101.
- [4] 周洋,石秀锦,彭文星,等. 2014-2018年我国七城市 DPP-4 抑制剂使用现状调查[J]. 中国药物应用与监测, 2019, 16(6): 369-382.
- [5] 黄涛,秦洁. 二肽基肽酶4抑制剂对糖尿病肾病保护作用的研究进展[J]. 中国现代医生, 2016, 54(6): 155-159.
- [6] 孙著叶,乔世琴,罗兆亮. HPLC法检查苯甲酸阿格列汀原料药的有关物质[J]. 中国药房, 2014, 25(33): 3.
- [7] 邵洁,高爽,李雪雪,等. 苯甲酸阿格列汀原料药的有关物质及含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(10): 6.
- [8] 周现滢,荣荣,赵云丽,等. HPLC法测定苯甲酸阿格列汀的有关物质含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(6): 7.
- [9] Mowaka S, Elkady EF, Elmazar MM, et al. Enhanced LC-MS/MS Determination of Alogliptin and Metformin in Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study[J]. Microchem J, 2017, 130(1): 360-365.
- [10] Christopher R, Covington P, Davenport M, et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Tolerability of Single Increasing Doses of the Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Alogliptin in Healthy Male Subjects[J]. Clin Therapeut, 2008, 30(3): 513-527.
- [11] Qian Q, Zhou N, Qi P, et al. A UHPLC-QTOF-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Eight Triterpene Compounds from PoriaCocos (Schw.) Wolf Extract in Rat Plasma: Application to a Comparative Pharmacokinetic Study[J]. J Chromatogr B, 2018, 1102-1103(1): 34-44.
- [12] 张玉倩. 文多灵在大鼠体内外代谢及对细胞色素P450酶活性影响的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- [13] 李盈. 老年人药代动力学特征与合理用药[C]//中国医院协会. 第九届临床药师论坛论文集, 2013: 1-4.
- [14] 宋春艳. 老年人药物不良反应及合理用药干预[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(3): 228-229.
- [15] 朱绍元. 药物代谢动力学角度的老年人临床用药分析[J]. 中国医药指南, 2014, 12(7): 138-139.

(收稿日期 2021年10月21日 编辑 邹宇玲)