

HPLC – MS/MS 法测定人血浆中维格列汀浓度及其应用*

王医成^{1,2}, 贺康¹, 彭静波^{1,2}, 饶泰¹, 陈尧^{1,2}, 郭莹^{1,2}, 谭志荣^{1,2**}

(1. 中南大学湘雅医院临床药理研究所, 长沙 410078; 2. 中南大学临床药理研究所, 长沙 410078)

摘要 目的: 建立 HPLC – MS/MS 法测定人 EDTA 抗凝血浆中维格列汀的浓度, 并将其应用于药代动力学研究。方法: 以稳定同位素标记¹³C – ¹⁵N – 维格列汀为内标, 血浆样品用乙腈进行蛋白沉淀处理, 采用 Hypurity C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 – 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 2 μL, 采用电喷雾离子源 (ESI 源), 多反应监测正离子模式进行检测。用于定量分析的维格列汀监测离子对 *m/z* 304.3 → 154.2, 内标监测离子对 *m/z* 310.3 → 160.3。考察其专属性、标准曲线、定量限、精密性、回收率、基质效应、稳定性, 并使用该方法对健康受试者的血浆维格列汀浓度进行测定。结果: 血浆中维格列汀质量浓度在 1.11 ~ 534.0 ng · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。4 个浓度水平的批内、批间精密性 (RSD) 均在 0.9% ~ 8.5%, 准确度在 99.8% ~ 109.3%。低浓度血浆样品室温放置 0.5、1、2 h 的准确度分别为 92.0%、87.6%、71.2%, 冰上放置 0.5、1、2 h 的准确度分别为 102.0%、94.5%、86.6%, 该结果提示维格列汀在血浆中可能存在不稳定现象。提取回收率、基质效应以及其他稳定性结果等均符合生物样品分析的相关要求。8 例健康受试者药代动力学研究结果: *t*_{1/2} 为 (1.49 ± 0.37) h, *t*_{max} 为 (2.06 ± 1.11) h, *C*_{max} 为 (290.94 ± 100.36) ng · mL⁻¹, AUC_{0–24 h} 为 (1 343.46 ± 186.89) ng · h · mL⁻¹, AUC_{0–∞} 为 (1 351.31 ± 188.79) ng · h · mL⁻¹。结论: 该方法操作简便, 特异性好, 灵敏度高, 成功应用于 8 名健康受试者空腹口服给药 50 mg 维格列汀片后的药代动力学研究, 可作为一种可靠的检测方法用于人体药代动力学研究和治疗药物监测。

关键词: 高效液相色谱质谱联用法; 维格列汀; 二肽基肽酶 IV (DDP-4); 稳定性; 药代动力学; 糖尿病; 治疗药物监测 (TDM)

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793 (2024) 01 – 0068 – 08

doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024.01.07

HPLC – MS/MS method for the quantification of vildagliptin in human plasma and its application*

WANG Yi – cheng^{1,2}, HE Kang¹, PENG Jing – bo^{1,2}, RAO Tai¹,
CHEN Yao^{1,2}, GUO Ying^{1,2}, TAN Zhi – rong^{1,2**}

(1. Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China;

2. Institute of Clinical Pharmacology, Hunan Key Laboratory of Pharmacogenetics, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Objective: To develop a high performance liquid chromatography – mass spectrometry (HPLC – MS/MS) method for the determination of vildagliptin in human anticoagulant plasma with ethylenediamine tetra acetic

* 湖南省自然科学基金资助项目 (2020JJ9057, 2022JJ80113, 2022JJ80097)

** 通信作者 Tel: (0731) 84805380; E – mail: tanzr@163.com

第一作者 Tel: (0731) 84805380; E – mail: 41703837@qq.com

acid and apply it to the study of pharmacokinetics. **Methods:** $^{13}\text{C} - ^{15}\text{N}$ - vildagliptin was used as internal standard (IS). After extraction from human plasma by protein precipitation with acetonitrile, all components were separated by a Hypurity C_{18} column (150 mm \times 2.1 mm, 5 μm), using a gradient elution procedure consisting of methanol and 5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ ammonium formate at a flow rate of 0.5 mL $\cdot \text{min}^{-1}$, and the column temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. Injection volume was just 2 μL . Positive electrospray ionization was performed using multiple reaction monitoring (MRM) with transitions of m/z 304.3 \rightarrow 154.2 for vildagliptin and m/z 310.3 \rightarrow 160.3 for internal standard. Specificity, standard curve, lower limit of quantification, precision, recovery, matrix effect and stability were examined. Then this method was used to determine the plasma concentration of veragliptin in healthy subjects. **Results:** The calibration curve of vildagliptin in human plasma was linear over the concentration range of 1.11 to 534.0 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$. The lower limit of quantitation was 1.11 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$. The intra- and inter-day precisions at four quality control levels were within 0.9% - 8.5%, and the accuracy was within 99.8% - 109.3%. The data of short-term stability at room temperature displayed that the accuracy percentage of LQC samples was 92.0% for 0.5 h exposure, 87.6% for 1 h exposure, 71.2% for 2 h exposure. These of LQC samples chilled on ice was 102.0% for 0.5 h exposure, 94.5% for 1 h exposure, 86.6% for 2 h exposure. These results showed a phenomenon that there was a possible degradation of vildagliptin in plasma. The results of extraction recovery and matrix effect and other stability met the requirements of biological sample analysis. The pharmacokinetic study results of 8 healthy subjects showed that $t_{1/2}$ was (1.49 \pm 0.37) h, t_{max} was (2.06 \pm 1.11) h, C_{max} was (290.94 \pm 100.36) ng $\cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ was (1 343.46 \pm 186.89) ng $\cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ was (1 351.31 \pm 188.79) ng $\cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion:** This method is easy to operate, has high specificity, and sensitivity. It has been successfully applied to the pharmacokinetic study of 8 healthy subjects after oral administration of 50 mg vildagliptin tablets on an empty stomach. Therefore, it can be used as a reliable detection method for human pharmacokinetic research and therapeutic drug monitoring.

Keywords: HPLC - MS/MS; vildagliptin; dipeptidyl peptidase - 4 (DPP - 4); stability; pharmacokinetics; diabetes; therapeutic drug monitoring (TDM)

维格列汀 (vildagliptin, 图 1) 是由瑞士诺华制药有限公司研制开发的一种选择性、竞争性、可逆的二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase - 4, DPP - 4) 抑制剂, 通过与 DPP - 4 结合形成复合物而抑制该酶的活性, 在提高胰高血糖素样肽 - 1 (GLP - 1) 浓度, 促使胰岛 B 细胞产生胰岛素的同时, 降低胰高血糖素浓度, 从而降低血糖, 并且对体重无明显影响^[1], 因此, 2007 年获得欧盟委员会批准, 用于治疗 2 型糖尿病, 2011 年被正式批准在中国上市, 目前已在 100 多个国家获得批准使用。

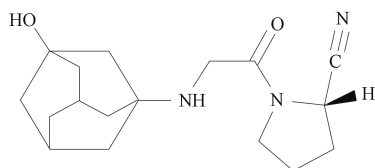


图 1 维格列汀结构式

Fig. 1 Chemical structure of vildagliptin

作为一种广泛应用的抗糖尿病药物, 维格列汀在人体血浆中的定量分析对其药代动力学研究和治疗药物监测具有重要意义。然而, 迄今为止, 与血浆中维格列汀浓度的检测方法相关的文献报道并不多见, 报道的检测方法主要包括 RP - HPLC^[2-3] 和 LC - MS/MS^[4-10]。在这些文献中, 有关方法学验证的报道比较少, 特别是对维格列汀在血浆和全血中的稳定性更是鲜有提及。

本研究采用乙腈沉淀蛋白前处理方法, 使用 HPLC - MS/MS 法测定人血浆中维格列汀的浓度, 实验中着重考察了维格列汀在血浆和全血中的稳定性, 并经过方法学验证后将此方法应用于维格列汀片的中国健康受试者人体药代动力学研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Triple quad 6500 型三重四极杆串联质谱仪 (AB Sciex 公司), 配备电喷雾电离源 (ESI 源); Ana-

lyst1.6.3 定量处理软件(AB Sciex 公司);液相色谱为 Nexera UHPLC/HPLC 系统(岛津公司),包括 LC-30AD 型输液泵、SIL-30AC 型自动进样器、DGU-20A5R 型脱气机和 CTO-20A 型柱温箱。氮气发生器(PerMuta 公司);Millipore 明澈-D24 UV 型超纯水一体化系统(Millipore 公司);AB265-S 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多公司);Microfuge 20R 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司)。

1.2 药品和试剂

维格列汀片(商品名为佳维乐,规格为每片 50 mg),诺华制药有限公司生产。维格列汀对照品(批号 1-MLM-173-1,纯度 97.0%)、同位素内标对照品 $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ -维格列汀(批号 24-GHZ-75-1,纯度 99.2%)均购于 Toronto Research Chemicals 公司。甲醇及乙腈(Merck 公司)、甲酸铵(CNW 公司)均为色谱纯。去离子水由 Millipore 纯水仪制备。人空白血浆、溶血血浆、高脂血浆及空白全血由中南大学湘雅医院提供。

1.3 药动学研究血浆样品

临床试验方案经中南大学临床药理研究所伦理委员会批准。8 名符合入选标准的健康受试者在签署知情同意书后,空腹口服维格列汀片(每片 50 mg) 1 片,于给药前(0 h)和给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、10、12、16、24 h 由肘前静脉采血 4 mL 至 EDTA 抗凝负压管中,0.5 h 内置于低温离心机中离心($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min,分离获得血浆样品,并立即置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Thermo 公司 Hypurity C_{18} ($150\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) 色谱柱,以 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~0.5 min, 70% B; 0.5~2.0 min, 70% B→90% B; 2.0~3.5 min, 90% B; 3.5~4.0 min, 90% B→70% B; 4.0~6.0 min, 70% B),流速 $0.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $2.0\ \mu\text{L}$ 。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾电离源(ESI 源),正离子方式检测;扫描方式为多反应监测(MRM),源喷射电压为 $5\ 500\ \text{V}$;温度为 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$;离子源气体 1(N_2)压力为 $379\ \text{kPa}$;离子源气体 2(N_2)压力为 $379\ \text{kPa}$;气帘气体(N_2)压力为 $241\ \text{kPa}$;碰撞气压力为 $62\ \text{kPa}$;扫描时间为 $100\ \text{ms}$ 。维格列汀监测离子对为 $m/z\ 304.3\rightarrow$

154.2 ,去簇电压(DP)为 $50\ \text{V}$,射入电压(EP)为 $10\ \text{V}$,碰撞能量(CE)为 $23\ \text{eV}$,碰撞室的射出电压(CXP)为 $10\ \text{V}$;内标监测离子对为 $m/z\ 310.3\rightarrow 160.3$,DP 为 $80\ \text{V}$,EP 为 $10\ \text{V}$,CE 为 $24\ \text{eV}$,CXP 为 $10\ \text{V}$ 。

2.3 系列标准血浆样品、质控血浆样品及内标工作溶液的制备

分别精密称取维格列汀对照品适量共 2 份,用甲醇溶解并定容,配制得质量浓度为 1.068 、 $1.070\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维格列汀储备液,分别用于配制系列标准样品和质控样品。用甲醇-水(50:50, v/v)分别稀释储备液,获得质量浓度为 22.25 、 44.50 、 89.00 、 178.00 、 534.00 、 $1\ 186.67$ 、 $3\ 560.00$ 、 $10\ 680.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液和质量浓度为 22.25 、 44.50 、 535.00 、 $8\ 560.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控溶液;取上述系列标准溶液和质控溶液各 $5\ \mu\text{L}$,分别加入人空白血浆 $95\ \mu\text{L}$,涡旋 $30\ \text{s}$,获得质量浓度为 1.11 、 2.23 、 4.45 、 8.90 、 26.70 、 59.33 、 178.00 、 $534.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标准血浆样品和质量浓度分别为 1.11 、 2.23 、 26.75 、 $428.00\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的定量限、低、中、高浓度质控血浆样品。

精密称取内标对照品适量,用甲醇溶解并定容,配制得质量浓度为 $0.315\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标储备液,并用乙腈稀释获得质量浓度为 $3.15\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标工作溶液备用。

2.4 血浆样品预处理

取血浆样品 $100\ \mu\text{L}$ 至 $2\ \text{mL}$ EP 管中,加入内标工作溶液 $1.0\ \text{mL}$,振荡器上涡旋震荡 $5\ \text{min}$,离心($15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) $10\ \text{min}$,吸取上清液 $50\ \mu\text{L}$ 至另一干净 $2\ \text{mL}$ EP 管中,再加入 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液与乙腈混合液(1:1) $300\ \mu\text{L}$,涡旋震荡 $2\ \text{min}$,离心($15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) $5\ \text{min}$,转移上清至进样瓶,进行 LC-MS/MS 分析。

2.5 方法验证

2.5.1 专属性 分别取 6 个不同来源的人空白血浆样品和含内标 $3.15\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品(取内标溶液 $5\ \mu\text{L}$,加入人空白血浆 $95\ \mu\text{L}$,涡旋 $30\ \text{s}$),按“2.4”项下方法处理(不加内标工作液,加入乙腈 $1.0\ \text{mL}$),然后进行 LC-MS/MS 分析测定。另取 6 个不同来源的人空白血浆配制含维格列汀 $1.11\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准血浆样品以及受试者服药 $1\ \text{h}$ 后的血浆样品,按“2.4”项方法处理后进行 LC-MS/MS 分析测定。结果显示,维格列汀和内标的保留时间分别为 2.27 和 $2.28\ \text{min}$ (见图 2),无内源性物质干扰维格列汀和内标的测定。

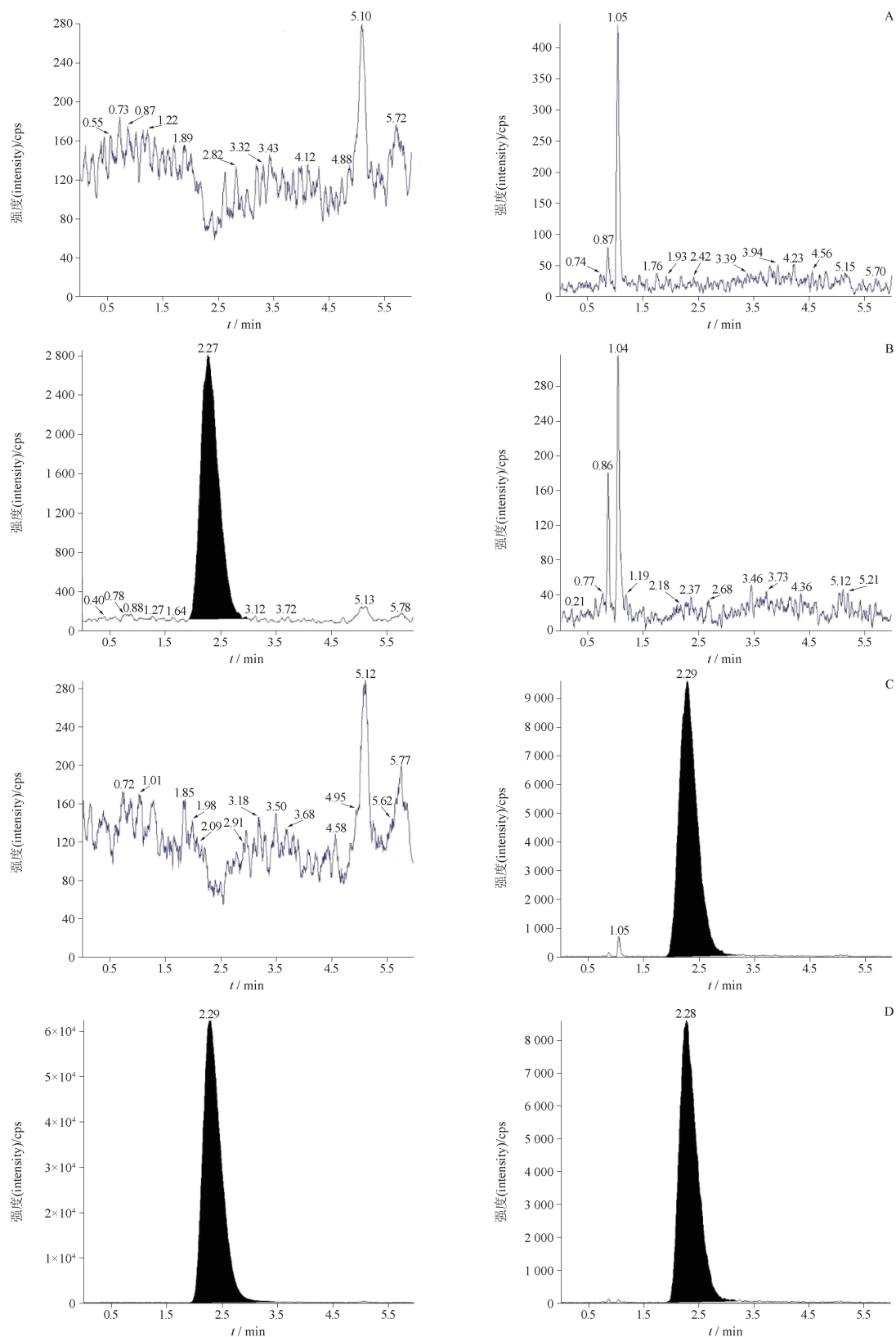


图2 空白血浆样品(A)、含维格列汀 $1.11 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准血浆样品(B)、含内标 $3.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品(C)、受试者服药 1 h 后血浆样品(D)
 Fig. 2 Typical chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with $1.11 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vildagliptin (B), blank plasma spiked with $3.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IS (C), and 1 h plasma sample after administration of vildagliptin tablets and spiked with IS (D)

2.5.2 标准曲线和定量下限 取“2.3”项下制备的系列标准血浆样品,按“2.4”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析测定;以维格列汀浓度(X)为横坐标,维格列汀与内标的峰面积比值(Y)为纵坐标,采取加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行线性回归运算,获得标准曲线。取定量下限质控血浆样品进行 6 样本分析,测定 3 d,根据当日标准曲线计算每一样本测得浓度,求得维格列汀的定量下限。结果显示,血浆维格列汀质量浓度在 $1.11 \sim 534.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,典型标准曲线回归方程为 $Y=0.0383X-0.00771 \quad r=0.9985$

定量限为 $1.11 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5.3 精密度与准确度 取“2.3”项下制备的定量限、低、中、高 4 个浓度的质控血浆样品,分别按“2.4”项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析测定,每一浓度进行 6 样本分析并在 3 d 内测试,根据当日标准曲线计算质控血浆样品的浓度,然后计算批内、批间精密度与准确度,结果见表 1。批内精密度(RSD)在 $0.9\% \sim 5.2\%$,准确度在 $104.6\% \sim 109.3\%$,批间精密度(RSD)在 $1.6\% \sim 8.5\%$,准确度在 $99.8\% \sim 108.2\%$;日内和日间的精密度和准确度均符合生物样品测定相关要求^[11-12]。

表 1 维格列汀质控样品精密度和准确度

Tab. 1 Precision and accuracy of vildagliptin quality control samples

理论浓度 (theoretical concentration)/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	批内(intra-batch)($n=6$)			批间(inter-batch)($n=3$)		
	实测值 (determined) \pm SD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 (accuracy)/ %	精密度 (precision) RSD/%	实测值 (determined) \pm SD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 (accuracy)/ %	精密度 (precision) RSD/%
1.11	1.22 ± 0.06	109.3	5.2	1.11 ± 0.10	99.8	8.5
2.23	2.33 ± 0.10	104.6	4.1	2.32 ± 0.17	104.0	7.5
26.75	28.04 ± 0.25	104.8	0.88	28.53 ± 0.46	106.7	1.6
428.00	462.06 ± 6.32	108.0	1.4	462.99 ± 9.73	108.2	2.1

2.5.4 基质效应 分别取 6 份不同来源的人空白血浆、3 份溶血空白血浆、3 份高脂空白血浆各 $100 \mu\text{L}$,分别加入内标工作溶液 1.0 mL ,涡旋震荡 5 min 后,离心($15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min ,取上清液 $1000 \mu\text{L}$,再分别加入低、中、高质控溶液 $5 \mu\text{L}$ 涡旋混匀后,吸取上清液 $50 \mu\text{L}$ 至另一干净 2 mL EP 管中,再加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液与乙腈混合液(1:1) $300 \mu\text{L}$,涡旋震荡 2 min ,离心($15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min 后进样分析,得到相应峰面积(A);同时另取水 $100 \mu\text{L}$

代替空白血浆,按上述方法处理并进样分析后得到相应峰面积(B)。将同一浓度采用上述 2 种方法处理后得到的峰面积进行比较计算分别获得分析物和内标的基质效应($A/B \times 100\%$),再将分析物和内标的基质效应进行比较计算得到内标归一化的基质效应。结果见表 2,正常血浆、溶血血浆和高脂血浆的内标归一化基质效应 RSD 均在 4.6% 以内。结果表明,维格列汀和内标在本方法的色谱和质谱条件下,可忽略基质效应的影响。

表 2 不同血浆的基质效应

Tab. 2 Matrix effect of vildagliptin in different plasma

理论浓度 (theoretical concentration)/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	正常血浆(normal plasma)		高脂血浆(hyperlipidemia)		溶血血浆(hemolyze)	
	基质效应 (matrix effect)/%	RSD/ %	基质效应 (matrix effect)/%	RSD/ %	基质效应 (matrix effect)/%	RSD/ %
2.23	114.23 ± 4.71	4.1	112.12 ± 5.11	4.6	116.27 ± 5.33	4.5
26.75	110.92 ± 1.76	1.5	110.04 ± 1.32	1.2	111.16 ± 1.97	1.8
428.00	111.78 ± 1.34	1.2	111.13 ± 0.71	0.61	113.64 ± 1.38	1.2

2.5.5 回收率 取低、中、高质控血浆样品,按“2.4”项下方法操作,每一浓度进行6样本分析。同时另取人空白血浆 100 μL ,按“2.5.4”项下方法处理后进样分析。以每一浓度采用2种处理方法后得到的峰面积比值计算处理回收率。结果显示维格列汀在低、中、高浓度的回收率分别为85.0%、89.2%和84.9%。

2.5.6 稳定性 文献报道维格列汀易发生氰化水解而不稳定^[13],因此,在建立检测方法时,全面考察了维格列汀的稳定性,包括质控血浆样品室温放置0.5、1、2 h;冰上(4 $^{\circ}\text{C}$)放置0.5、1、2 h;质控全血样品(取质控溶液5 μL ,加入人空白全血95 μL ,涡旋30 s得到)室温放置0.5、1、2 h;质控血浆样品预处理后在自动进样器放置30 h;质控血浆样品3次冷冻-解冻循环和-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置90 d;以及维格列汀储备液和系列标准溶液室温放置6 h、低温长期放置的

稳定性。考察时,每个方法均考察低、高2个质控浓度水平各6个样品。

验证结果见表3,低浓度质控血浆样品在室温放置0.5、1、2 h的准确度从92.0%降至71.2%,冰上(4 $^{\circ}\text{C}$ 左右)放置0.5、1、2 h,准确度从102.0%降至86.6%;低浓度质控全血样品室温放置0.5、1、2 h,准确度从102.4%降至86.5%;高浓度质控血浆样品和质控全血样品的准确度则无明显降低。质控血浆样品3次冷冻-解冻循环和-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置90 d均稳定;质控血浆样品预处理后自动进样器放置30 h亦稳定。甲醇溶解配制的维格列汀储备液在室温放置6 h和-20 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱放置43 d,甲醇水溶液稀释配制的系列标准溶液在室温放置6 h以及冷藏(2~8 $^{\circ}\text{C}$)15 d之后与新鲜配制的相同浓度溶液进行峰面积比较,偏差分别是1.8%、0.87%、-2.0%和0.59%。

表3 维格列汀在不同条件下的稳定性考察结果($n=6$)

Tab. 3 Stability results of vildagliptin under different conditions

稳定性试验 (stability test item)	2.23 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		428.00 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	实测值 (determined) \pm SD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 (accuracy)/ %	实测值 (determined) \pm SD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 (accuracy)/ %
冻融3次(freeze - thaw three cycles)	2.11 \pm 0.09	94.7	464.73 \pm 3.93	108.6
-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置90 d(storage at -80 $^{\circ}\text{C}$ for 90 d)	2.09 \pm 0.04	93.7	488.91 \pm 4.24	114.2
自动进样器放置30 h(autosampler for 30 h)	2.04 \pm 0.08	91.6	427.79 \pm 11.67	100.0
室温放置0.5 h(room temperature for 0.5 h)	2.05 \pm 0.08	92.0	465.09 \pm 2.34	109.3
室温放置1 h(room temperature for 1 h)	1.94 \pm 0.04	87.6	464.15 \pm 4.66	108.5
室温放置2 h(room temperature for 2 h)	1.59 \pm 0.03	71.2	463.50 \pm 2.14	108.3
冰上放置0.5 h(storage on ice for 0.5 h)	2.27 \pm 0.13	102.0	468.76 \pm 7.05	109.1
冰上放置1 h(storage on ice for 1 h)	2.11 \pm 0.05	94.5	465.08 \pm 2.83	108.7
冰上放置2 h(storage on ice for 2 h)	1.93 \pm 0.10	86.6	464.01 \pm 3.26	108.4
全血室温放置0.5 h(stability in blood at room temperature for 0.5 h)	2.28 \pm 0.11	102.4	440.23 \pm 9.46	102.9
全血室温放置1 h(stability in blood at room temperature for 1 h)	2.19 \pm 0.08	98.2	441.96 \pm 7.17	103.3
全血室温放置2 h(stability in blood at room temperature for 2 h)	1.93 \pm 0.07	86.5	442.47 \pm 5.73	103.4

2.5.7 稀释效应 质控血浆样品用人空白血浆稀释5倍后,测定维格列汀的精密度和准确度分别为0.8%和101.1%;结果表明血浆样品经空白血浆稀释5倍后测定不影响结果的准确性。

2.5.8 药动学研究血浆样品再分析 选取32个达

峰浓度点及消除相末端浓度点附近的血浆样品进行再分析,占研究样品总数的25%。按“2.4”项下方法操作,测定结果显示,32个血浆样品再分析的结果与原始值的差异在-17.24%~10.47%,100%达到了接受标准。

2.6 人体药代动力学研究

将建立并经过验证的方法应用于维格列汀片的人体药代动力学研究,8名受试者空腹口服维格列汀片 50 mg,经检测并统计得到的结果显示:维格列汀 $t_{1/2}$ 为 (1.49 ± 0.37) h, t_{max} 为 (2.06 ± 1.11) h, C_{max} 为 (290.94 ± 100.36) ng · mL⁻¹, 血浆 $AUC_{0-24 h}$ 为 $(1\ 343.46 \pm 186.89)$ ng · h · mL⁻¹, $AUC_{0-\infty}$ 为 $(1\ 351.31 \pm 188.79)$ ng · h · mL⁻¹, 维格列汀的平均药时曲线见图 3。

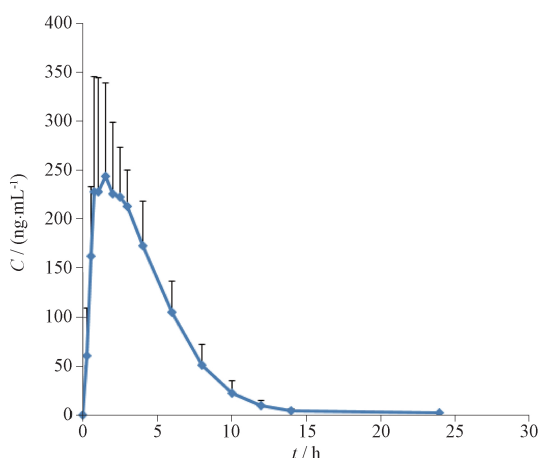


图 3 受试者空腹口服维格列汀片 50 mg 后的药时曲线 ($n=8$)

Fig. 3 Mean plasma concentration - time profiles of vildagliptin in human plasma after administration with 50 mg vildagliptin tablets, each point and bar represents the mean \pm SD

3 讨论

本方法在建立的过程中对色谱条件如色谱柱、流动相组合、流动相比比例、流速等均进行了优化考察。色谱柱考察了 Hypurity C₁₈、Luna C₁₈、ACE Super C₁₈ 柱等不同填料和粒径的色谱柱,流动相试用过甲醇-水、乙腈-水等组合,以及水中加入不同浓度的甲酸铵、甲酸等试剂,流动相比比例则考察了等度和梯度洗脱,测试了 0.3、0.4、0.5 mL · min⁻¹ 等流速,最终选择 Hypurity C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) 色谱柱, 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵水溶液-乙腈组合,梯度洗脱,0.5 mL · min⁻¹ 的流速等色谱条件,可以获得最佳的色谱保留和峰形。在样品处理方面,有的报道采用固相萃取法^[7-10],但这些方法的过程繁杂且成本高;有的报道采用液液萃取法^[4],其过程同样繁杂不易操作。本研究采用蛋白沉淀法,研究过程中尝试过

甲醇、甲醇含甲酸等溶剂进行提取,效果并不理想,最终采用乙腈进行蛋白沉淀,可以获得最佳的提取效率,并将内标直接配制在乙腈中,减少额外加入内标带来的溶剂效应。此外,血浆样品在沉淀蛋白离心后,取上清液用流动相混合液进行稀释,能够获得最佳的峰形。

相较于其他文献^[4-10],本研究进行了相对完整的方法学验证,包括维格列汀在全血中的稳定性、高脂血浆和溶血血浆基质效应。并且在稳定性验证过程中发现维格列汀存在不稳定现象,这在其他文献中没有报道过。不稳定的现象在血浆和全血中均存在,且在低浓度血浆样品中比较明显,而高浓度血浆样品则不明显,低温(4℃左右)情况下,不稳定的现象可以得到延缓。可能的原因是维格列汀的结构中含有氰基,在弱碱性的血浆和全血中发生了氰基水解,但水解的量较少,因此,对低浓度血浆样品影响较明显,但对高浓度血浆样品则无明显影响。本研究的稳定性结果提示,在研究维格列汀人体药动学的临床试验过程中,采血后分离血浆应该在低温(4℃)环境下 1 h 内完成,并应立即转移至超低温(-80℃)条件下保存待测。

本研究定量限为 1.11 ng · mL⁻¹,明显低于其他文献^[4-10]报道。最终,本方法经过验证后成功应用于人体药代动力学研究,8名受试者空腹口服维格列汀片 50 mg 后,经检测和数据统计,血浆中的主要药动学参数 AUC 、 C_{max} 、 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 与文献报道^[7-10,14-15]基本一致。

综上所述,本研究成功建立了一种 HPLC-MS/MS 法测定人 EDTA 抗凝血浆中维格列汀的浓度,本方法具有较高的灵敏度、准确度与精密度,检测线性范围宽,检测时间短,可作为一种可靠的检测方法用于人体药动学研究和治疗浓度监测。

参考文献

- [1] PI-SUNYER F, SCHWEIZER A, MILLS D, *et al.* Efficacy and tolerability of vildagliptin mono therapy in drug-naïve patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007, 76(1): 132
- [2] PHARNE AB, SANTHAKUMARI B, GHEMUD AS, *et al.* Bio-analytical method development and validation of vildagliptin a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor by RP-HPLC method[J]. *Pharm Pharm Sci*, 2012, 4(3): 119
- [3] KASHID AM, GHORPADE DA, TORANMAL PP, *et al.* Development and validation of reversed phase HPLC method for the de-

- termination of vildagliptin using an experimental design [J]. *J Anal Chem*, 2015, 70(4): 510
- [4] HESS C, MUSSHOF F, MADEA B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography – mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(1): 33
- [5] PONTAROLO R, GIMENEZ AC, DE FRANCISCO TM, *et al.* Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by a HILIC – MS/MS method [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 965: 133
- [6] FACHI MM, CERPUEIRA LB, LEONART LP, *et al.* Simultaneous quantification of antidiabetic agents in human plasma by a UPLC – QToF – MS method [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): 1
- [7] 汪云, 吴金伶, 李敬, 等. 维格列汀片在健康受试者中的生物等效性研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(17): 2070
WANG Y, WU JL, LI J, *et al.* Bioequivalence of vildagliptin tablets in healthy volunteers [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38(17): 2070
- [8] SUNKARA G, SABO R, WANG Y, *et al.* Dose proportionality and the effect of food on vildagliptin, a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor, in healthy volunteers [J]. *J Clin Pharmacol*, 2007, 47: 1152
- [9] HU P, YIN Q, DECKERT F, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in healthy Chinese volunteers [J]. *J Clin Pharmacol*, 2009, 49(1): 39
- [10] SACHIKO M, SHRIPAD D, CHITNIS KK, *et al.* Bioequivalence and food effect assessment for vildagliptin/metformin fixed – dose combination tablets relative to free combinations of vildagliptin and metformin in Japanese healthy subjects [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2016, 54(4): 305
- [11] European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation [S/OL]. (2011 – 07 – 21) [2017 – 08 – 14]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
- [12] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 363
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 363
- [13] STEPHANIE A, ELIZABETH M, STEPHEN N, *et al.* Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase – 4 inhibitor, for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014, 10(4): 599
- [14] 江思艳, 童九翠, 胡骅, 等. 维格列汀片空腹人体生物等效性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(7): 803
JIANG SY, TONG JC, HU H, *et al.* Bioequivalence of vildagliptin tablets in healthy volunteers [J]. *Chin J New Drugs*, 2018, 27(7): 803
- [15] HE YL, SABO R, CAMPESTRINI J, *et al.* The effect of age, gender, and body mass index on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in healthy volunteers [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2008, 65(3): 338

(本文于 2023 年 12 月 22 日修改回)