

HPLC-MS/MS 法测定 2 型糖尿病患者血浆中瑞格列奈

梁大虎^{1#}, 何春远^{2#}, 汪旻晖¹, 孙 华¹, 李相鸿¹, 杨 斌¹, 谢海棠^{1*}

1. 安徽省药物临床评价中心, 安徽 芜湖 241000

2. 六安市人民医院, 安徽 六安 237000

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 测定 2 型糖尿病患者血浆中瑞格列奈的浓度。**方法** 采用 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 5 mmol 醋酸铵水溶液 (含 0.1% 甲酸) - 乙腈 (10:90); 柱温: 35 °C; 体积流量: 0.5 mL/min; 进样器温度为常温; 进样体积: 5 μL, 进样时间: 6 min。采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子多反应离子监测 (MRM) 扫描, 瑞格列奈、内标那格列奈的检测离子对分别为: m/z 453.6→230.5、 m/z 318.4→166.3。采集规律服用瑞格列奈片的 2 型糖尿病患者静脉血约 4 mL, 采用 HPLC-MS/MS 法测定患者血药浓度。**结果** 瑞格列奈在 0.1~50 ng/mL 线性关系良好, 定量下限为 0.1 ng/mL。在定量下限 (0.1 ng/mL) 和低、中、高质量浓度下, 准确度为 91.71%~103.67%, 日内、日间精密度的 RSD 均小于 10%。在低、高两种质量浓度下, 瑞格列奈基质效应和提取回收率分别为 96.97%~97.62% 和 81.22%~93.94%, 且稳定性较好。**结论** 本方法简单、经济、快速、灵敏, 可用于 2 型糖尿病患者人体血浆中瑞格列奈的测定。

关键词: 瑞格列奈; HPLC-MS/MS; 2 型糖尿病; 血浆药物浓度

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)04-0960-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.04.016

Determination of repaglinide in plasma of patients with type 2 diabetes mellitus by HPLC-MS/MS

LIANG Da-hu¹, HE Chun-yuan², WANG Min-hui¹, SUN Hua¹, LI Xiang-hong¹, YANG Bin¹, XIE Hai-tang¹

1. Anhui Provincial Center for Drug Clinical Evaluation, Wuhu 241000, China

2. Lu'an People's Hospital, Lu'an 237000, China

Abstract: Objective To establish a method HPLC-MS/MS for the determination of repaglinide in plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. **Methods** The separation was carried out on Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ chromatography column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 5 mmol ammonium acetate aqueous solution (0.1% formic acid) and acetonitrile (10:90). Temperature of column was set at 35 °C, and the flow rate was 0.5 mL/min. Sampler temperature was set at room temperature. The injection volume was 5 μL, and the injection time was 6 min. Electrospray ion source and positive ion multiple reactions monitoring scanning were used. The ion pairs of repaglinide and internal standard nateglinide were m/z 453.6→230.5 and m/z 318.4→166.3, respectively. The venous blood of type 2 diabetes mellitus patients who regularly administered with Repaglinide Tablets was collected for 4 mL. The blood concentration was determined by HPLC-MS/MS. **Results** The linear ranges of repaglinide were 0.1 — 50 ng/mL with the LLOQ of 0.1 ng/mL. At the LLOQ (0.1 ng/mL), and the low, medium and high mass concentrations, the accuracy were 91.71% — 103.67% with RSD of inter-day and intra-day precisions less than 10%. At low and high concentrations, the matrix effect and extraction recovery were 96.97% — 97.62% and 81.22% — 93.94%, respectively, with good stability. **Conclusion** The method is simple, economical, rapid and sensitive, can be used for the determination of repaglinide in human plasma of patients with type 2 diabetes mellitus.

Key words: repaglinide; HPLC-MS/MS; type 2 diabetes mellitus; plasma drug concentration

收稿日期: 2018-12-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173134); 皖南医学院中青年科研基金项目 (WK2016F06)

作者简介: 梁大虎 (1985—), 男, 安徽淮南人, 药师, 硕士研究生, 定量药理研究方向。E-mail: tigerliang1986@126.com

何春远, 硕士研究生, 定量药理方向。E-mail: 1006912735@qq.com

*通信作者 谢海棠, 研究员, 从事定量药理研究。Tel: (0553)5738200 E-mail: xiehaitang@sina.com

#共同第一作者

瑞格列奈为非磺脲类胰岛素促泌剂,主要通过胰岛 β 细胞磺脲类受体上的非磺脲类结合位点结合刺激胰岛素的分泌而降低血糖,可降低0.5%~1.5%的糖化血红蛋白(HbA1c)值,临床主要用于治疗经控制饮食、降低体质量和运动锻炼仍不能有效控制血糖的2型糖尿病患者,在肾功能不全的患者中使用较为安全^[1-2]。瑞格列奈有较大的个体间用药差异性^[3-4]。近年来的关注热点集中在糖尿病病人个体化用药和如何避免疗效不佳或产生严重的低血糖、肝损害等毒副作用^[5]。虽有文献报道瑞格列奈浓度的测定方法如高效液相色谱法^[6-8]、串联质谱法^[9-12],但是上述检测方法存在样品前处理复杂、分析时间较长、灵敏度不能满足要求等不足。本实验建立了更加简单、快速、灵敏的HPLC-MS/MS法测定人血浆中瑞格列奈,旨在为实施精准个体化医疗提供切实可行的定量研究方法,更好地指导临床合理用药。

1 仪器与试剂

1.1 实验仪器

岛津LC-20AD二元泵、SIL-HTc自动进样器、CTO-10ASvp柱温箱、API4000三重四极杆质谱仪、Analyst Software 1.6.2工作站(美国AB SCIEX公司);Mettler Toledo AB135s型电子天平;SANYO深低温冰柜;IKA-Werke Typ VX 2E型摇床;TGL-16G台式离心机。

1.2 试剂

瑞格列奈片(Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG生产,规格0.2 mg/片,批号20170023)。瑞格列奈对照品(Sigma公司,批号018K4701V,质量分数98.0%);内标那格列奈对照品(Sigma公司,批号063M4741V,质量分数98.0%);甲醇(德国默克公司),乙腈(美国ACS公司),甲酸(美国天地公司),以上试剂均为色谱纯;水为Milli-Q去离子水,其余试剂均为分析纯及以上。空白血浆来自于健康志愿者。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:5 mmol 醋酸铵水溶液(含0.1%甲酸)-乙腈(10:90);柱温:35 $^{\circ}$ C;体积流量:0.5 mL/min;进样器温度为常温;进样体积:5 μ L,进样时间:6 min。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子多

反应离子监测(MRM)扫描模式,瑞格列奈、内标那格列奈的检测离子对分别为 m/z 453.6 $\rightarrow$ 230.5、 m/z 318.4 $\rightarrow$ 166.3。质谱参数:碰撞气(CAD)41 kPa,气帘气(CUR)172 kPa,雾化气(Gas1)275.8 kPa,辅助加热气(Gas2)413.7 kPa,喷雾电压(Is)5 500 V,雾化温度(TEM)500 $^{\circ}$ C。瑞格列奈和内标那格列奈的离子去簇电压(DP)、碰撞活化电压(CE)、入口电压(EP)、碰撞室出口电压(CXP)分别为7、104、36、19、10、9、17、14 V。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取9.22 mg瑞格列奈对照品置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并加至刻度,得904 μ g/mL对照品储备液,置于4 $^{\circ}$ C冰箱,临用时采用经过校准的精密移液器稀释成500、250、100、50、25、10、5、2.5、1 ng/mL系列标准工作液和高、中、低(300、30、3 ng/mL)3个浓度的质控(QC)工作液和定量下线(LLOQ)(1 ng/mL)样品。

精密称取内标那格列奈6.91 mg于10 mL量瓶中,加甲醇-水(50:50)溶解并加至刻度,得到677 μ g/mL的内标储备液,用甲醇-水(50:50)溶液稀释得到250 ng/mL的内标工作液。

2.3 血浆样本处理方法

2.3.1 血浆样品的配制和处理 取健康志愿者空白血浆样本200 μ L,置于2 mL具塞离心管中,分别加入不同质量浓度的对照品工作液或质控工作液各20 μ L,涡旋混匀30 s,即得含瑞格列奈质量浓度分别为0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50 ng/mL的标准血浆样品或含瑞格列奈质量浓度分别为0.1、0.3、3、30 ng/mL的LLOQ血浆样品以及低、中、高浓度的质控血浆样品,再依次加入内标工作液20 μ L和乙腈500 μ L,涡旋混匀30 s,12 000 r/min离心5 min,取上清液进样5 μ L分析。

2.3.2 含药血浆样品的配制和处理 取200 μ L受试者血浆样品,置于2 mL具塞离心管中,分别加入20 μ L乙腈-水(50:50),涡旋混匀30 s,再依次加入20 μ L内标工作液和500 μ L乙腈,摇床1 500 r/min振荡混匀2 min,12 000 r/min离心5 min,取上清5 μ L进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别取健康志愿者空白血浆样品、LLOQ血浆样品和受试者服药后的血浆样品,按“血浆样本处理方法”项下方法分别处理后进样分析。在所建立的HPLC-MS/MS条件下,血浆样

品中瑞格列奈和内标那格列奈的保留时间分别约为 5.5、4.4 min。将 6 份不同来源的健康志愿者空白样品中干扰信号的峰面积与定量下限样品中瑞格列奈和内标峰面积的比值进行比较, 空白样品中干扰信

号与瑞格列奈和内标峰的比值均小于 10%, 瑞格列奈最低定量限色谱峰的信噪比大于 10, 且峰形良好。人空白血浆中的内源性物质和代谢物等均不影响瑞格列奈测定的准确度, 见图 1。

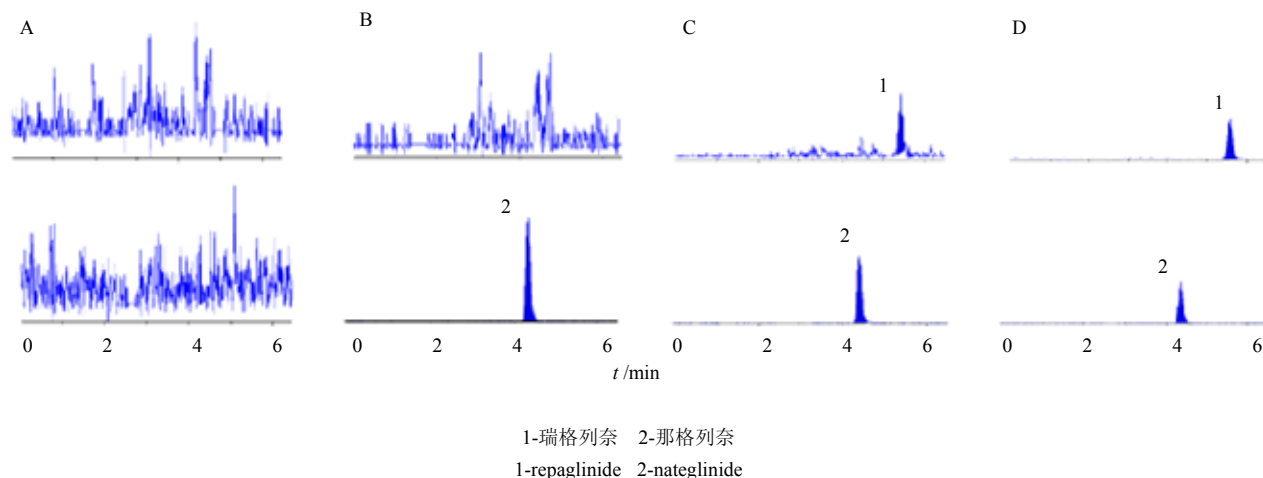


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆加内标 (B)、LLOQ 血浆样品 (C) 和口服 0.2 mg 瑞格列奈 16 h 后血浆样品 (D) MRM 图谱
Fig. 1 MRM chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with internal standards (B), LLOQ plasma sample (C), and plasma sample collected at 16 h after oral administration 0.2 mg repaglinide (D)

2.4.2 线性范围和定量限 取健康志愿者空白血浆 200 μL , 分别加入系列标准工作液, 按 2.3.1 项下方法处理, 建立标准曲线。以瑞格列奈峰面积与内标峰面积的比值对质量浓度作加权线性回归, 得回归方程 $Y=0.0184X+0.0000792$ ($r=0.9949$)。结果表明, 瑞格列奈在 0.1~50 ng/mL 时线性关系良好, 全部校正标样回算浓度均落在标示值的 $\pm 15\%$ 范围

内。最低定量限为 0.1 ng/mL, 信噪比大于 10。

2.4.3 精密度和准确度试验 按 2.3.1 项下方法配制 LLOQ 血浆样品 (0.1 ng/mL) 及低、中、高 (0.3、3、30 ng/mL) 浓度的质控血浆样品并处理, 计算精密度和准确度; 同一批样品测定 6 次, 计算批内变异; 连续测定 3 批样品, 计算批间变异。批内、批间 RSD 值均小于 10%, 结果见表 1。

表 1 精密度和准确度试验结果 ($n=6$)
Table 1 Results of precision and accuracy tests ($n=6$)

质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内			日间		
	测量值/(ng·mL ⁻¹)	精密度 RSD/%	准确度/%	测量值/(ng·mL ⁻¹)	精密度 RSD/%	准确度/%
0.1	0.10±0.01	6.73	101.58±6.83	0.10±0.01	7.10	103.67±7.36
0.3	0.27±0.019	7.04	91.71±6.45	0.28±0.02	6.50	94.52±6.14
3	2.94±0.083	2.83	98.11±2.78	3.02±0.09	3.02	100.82±3.05
30	30.18±0.26	0.85	100.61±0.86	30.09±0.55	1.84	100.31±1.85

2.4.4 基质效应 取 6 份不同来源的人空白血浆, 涡旋混匀 30 s。每个批次的血浆各取 2 份, 每份 200 μL , 分别置于 2 mL 具塞离心管中, 每份分别加乙腈 500 μL , 振荡混匀 30 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取全部上清液, 置于新的 2 mL 具塞离心管, 再分别依次加入内标工作液 20 μL 、精密吸取低、高 2

种浓度瑞格列奈的质控工作液各 20 μL , 振荡混匀 30 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进样 5 μL 分析。在色谱图中瑞格列奈与内标峰面积分别记为 B_1 、 B_2 。用 50% 乙腈-水代替空白血浆, 其余操作同上, 计算基质效应。在色谱图中瑞格列奈和内标峰面积分别记为 A_1 、 A_2 。按照基质效应 (ME) =

$B_1/A_1 \times 100\%$ 计算瑞格列奈的基质效应, 按基质效应 (ME) $= B_2/A_2 \times 100\%$ 计算内标的基质效应。空白血浆提取物即基质对对照品的色谱响应信号没有明显的抑制或增强倾向, 不影响血浆中瑞格列奈的测定, 结果见表 2。

2.4.5 提取回收率试验 用人空白血浆分别制备瑞格列奈低、高浓度 (0.3、30 ng/mL) 样本, 按 2.3.1 项下方法处理血浆样品; 另用乙腈沉淀过的空白血浆提取液制备低、高浓度 (0.3、30 ng/mL) 样本, 进样分析, 得相应提取液的峰面积。上述样品每个浓度各配制 6 份测定, 用空白血浆配制低、高浓度样品的峰面积与乙腈提取液平均峰面积比值计算提

取回收率。按 2.4.3 项方法平行配制瑞格列奈低、高浓度 (0.3、30 ng/mL) 血浆质控样本各 6 份并测定。在色谱图中瑞格列奈和内标峰面积分别记为 C_1 、 C_2 。按提取回收率 (REC) $= C_1/B_1 \times 100\%$ 计算提取回收率, 结果见表 2。

2.4.6 稳定性试验 按 2.4.3 项方法配制瑞格列奈低、高浓度 (0.3、30 ng/mL) 的血浆质控样品, 各 6 份, 分别考察血浆样品在室温放置 4 h、样品处理后自动进样器放置 20 h、 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中反复冻融 3 次、 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存 90 d 的稳定性情况。结果瑞格列奈在上述条件下保存条件下的稳定性较好, 见表 3。

表 2 基质效应和回收率试验结果 ($n = 6$)
Table 2 Results of matrix effect and extraction recovery ($n = 6$)

质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	基质效应		提取回收率	
	数值/%	RSD/%	数值/%	RSD/%
0.3	97.62±7.27	7.44	81.22±9.63	11.86
30	96.96±3.13	3.23	93.94±4.45	4.74

表 3 稳定性试验结果 ($n = 6$)
Table 3 Results of stability test ($n = 6$)

保存条件	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	准确度/%
室温 4 h	0.3	0.29±0.02	8.12	96.91±7.87
	30	30.55±0.60	1.97	101.83±2.01
自动进样器放置 20 h	0.3	0.29±0.02	7.65	97.43±7.45
	30	28.35±0.78	2.74	94.51±2.59
冻融 3 次	0.3	0.28±0.01	5.35	92.87±4.97
	30	30.98±0.87	2.80	103.27±2.89
长期冻存	0.3	0.28±0.03	10.71	90.07±9.65
	30	30.47±0.72	2.36	102.46±2.42

2.5 2 型糖尿病患者瑞格列奈血药浓度

根据 FDA 群体药动学研究指导原则^[13], 本研究在通过皖南医学院弋矶山医院药物、器械与新技术伦理委员会审核, 所有受试者均签订知情同意书。受试者口服瑞格列奈片 2 mg/次, 3 次/d, 收集规律服用瑞格列奈片至少 3 d ($t_{1/2} \approx 1\text{ h}$, 4~5 个半衰期后血药浓度达稳) 的 2 型糖尿病患者 79 例。采集患者服药前 (达稳态) 或服药后静脉血约 4 mL, 置于 EDTA 抗凝管中, 然后离心 10 min 分取血浆, 采用 HPLC-MS/MS 法测定患者血药浓度, 结果见图 2。所有受试者服用瑞格列奈后体内的稳态血药浓度差

异较大, 可能进一步造成低血糖反应。

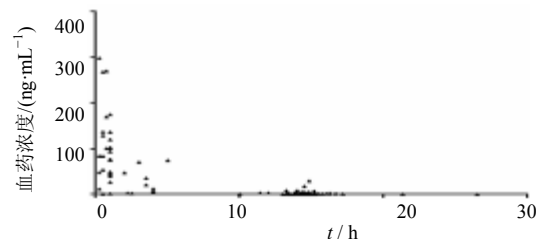


图 2 受试者血浆样本中瑞格列奈的药物浓度
Fig. 2 Reglinide concentration in plasma samples of subjects

3 讨论

瑞格列奈是一种新型的速效促胰岛素分泌剂,

临床上广泛用于 2 型糖尿病的控制。研究表明患者间的用药差异性很大^[14-15]。本实验在参考国内外相关文献的基础上,进一步改善色谱、质谱条件建立了 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中瑞格列奈血药浓度的方法。

在优化色谱条件时,由于瑞格列奈具有弱酸性,在水相中加入 0.1%甲酸出峰时间加快,水相中 5 mmol 醋酸铵可以使色谱峰形保持良好;有机相比例提高至 90%时出峰时间提前,色谱峰形良好;分别考察甲醇、乙腈作为有机相时的色谱峰形和响应值,结果发现使用乙腈的条件下峰形较好、响应较强;同时本研究分别考察了在不同柱温条件下的色谱峰形和响应值,发现柱温为 35 ℃时峰形和响应值俱佳;选择内标时,本研究首先考虑选择待测物的相似物那格列奈。尽管有文献报道使用同位素内标^[12],但是同位素内标价格较贵,同时本研究使用那格列奈作为内标进行方法学考察时,待测物和内标的基质效应较小、回收率稳定;两者的响应值相差不大,且那格列奈稳定,不干扰样品的测定。另外,分别考察甲醇、乙腈沉淀蛋白进行样本前处理,发现乙腈沉淀蛋白的方法有更好的峰形和响应值。本研究所建方法的方法学考核指标均符合《中国药典》2015 年版《9012 生物样本定量分析方法验证指导原则》规定^[16]。近年来质谱检测器在药物浓度测定中的应用越来越普及。与文献比较,本实验所用仪器、耗材价格相对便宜、进样量少、分析时间短,可以节约成本、减少环境污染。实验结果表明,本方法简单、经济、快速、灵敏,适用于瑞格列奈人体血药浓度分析和群体药动力学研究。

综上所述,本研究所建方法可以准确、高效地测定人血浆中瑞格列奈浓度。本实验定量下限可低至 0.1 ng/mL,可以满足一般的药动力学和生物样品分析测定,尤其适用于群体药动力学分析的要求。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 [J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10(1): 2-67.
- [2] 龚志成. NeuroD1/BETA2、PAX4 和 KCNQ1 基因多态性与 2 型糖尿病易感性的关系及其对瑞格列奈疗效的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [3] 裴奇. SLC01B1 基因多态性对瑞格列奈药动学的影响以及 PPAR- γ 2 和 PTPRD 基因多态性对吡咯列酮疗效的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [4] He J K, Qiu Z X, Li N, *et al.* Effects of SLC01B1 polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide in healthy Chinese volunteers [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67(7): 701-707.
- [5] Grant R W, Wexler D J. Personalized medicine in Type 2 diabetes: what does the future hold [J]. *Diabetes Manag*, 2012, 2(3): 199-204.
- [6] Zhu Z, Yang T, Zhao Y, *et al.* A simple method to improve the dissolution of repaglinide and exploration of its mechanism [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2014, 9(4): 218-225.
- [7] El-Zaher A A, Elkady E F, Elwy H M, *et al.* Simultaneous determination of metformin, glipizide, repaglinide, and glimepiride or metformin and pioglitazone by a validated LC method: Application in the presence of metformin impurity (1-cyanoguanidine) [J]. *J AOAC Int*, 2016, 99(4): 957-963.
- [8] Keyur B A, Emanuel M P, Arpit S. Simultaneous estimation of metformin hydrochloride and repaglinide in pharmaceutical formulation by HPTLC-Densitometry method [J]. *J Chromat Separation Techniq*, 2013, 4(1): 1-5.
- [9] Fayyad M K, Ghanem E H. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of anti-diabetic drug repaglinide in human plasma [J]. *Am J Anal Chem*, 2014, 5(4): 281-290.
- [10] 屠婕红, 盛静, 丁宝月, 等. UPLC-MS/MS 法测定中成药及保健品中添加的 16 种降糖类化学药物 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1823-1829.
- [11] 马彦荣, 周燕, 张国强, 等. LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中瑞格列奈和普伐他汀钠的浓度及其在药理学相互作用研究中的应用 [J]. 药学报, 2014, 49(1): 72-77.
- [12] Liang X R, Dai X J, Zhang Y F, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry simultaneous determination of repaglinide and metformin in human plasma and its application to bioequivalence study [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(4): 547-553.
- [13] FDA. *Guidance for Industry: Population Pharmacokinetics* [M]. 1999: 12214.
- [14] Song J, Wang T, Zhu J, *et al.* PPARG rs2016520 polymorphism affects repaglinide response in Chinese Han patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(1): 27-32.
- [15] Yu L, Shi D, Ma L, *et al.* Influence of CYP2C8 polymorphisms on the hydroxylation metabolism of paclitaxel, repaglinide and ibuprofen enantiomers *in vitro* [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2013, 34(5): 278-287.
- [16] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 363-368.