

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.17.004

# 超高效液相色谱串联质谱法测定 2 型糖尿病大鼠血浆阿托伐他汀和沙格列汀的浓度

董洁<sup>1,2</sup>, 汤道权<sup>2</sup>, 肖冰心<sup>1</sup>, 王添艳<sup>1,2</sup>, 孙增先<sup>1△</sup>

(1. 徐州医科大学附属连云港医院·连云港市第一人民医院, 江苏 连云港 222000; 2. 徐州医科大学, 江苏 徐州 221004)

**摘要:**目的 建立同时测定 2 型糖尿病(T2DM)大鼠血浆中阿托伐他汀和沙格列汀及其代谢物 5-羟基-沙格列汀含量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 Waters BEH Shield RP<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相采用乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液(梯度洗脱), 流速为 0.2 mL/min, 柱温为 30℃。质谱条件为电喷雾离子源(ESI 源), 正离子模式检测, 多反应监测模式扫描(MRM)。检测离子  $m/z$  分别为 559.3→440.2(阿托伐他汀钙)、316.2→180.2(沙格列汀)、332.3→196.2(5-羟基沙格列汀)、304.2→153.9(维格列汀, 内标)。结果 阿托伐他汀、沙格列汀、5-羟基-沙格列汀质量浓度分别在 1~500, 2~1 000, 1~500 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好; 日内、日间 RSD 均低于 10%, 基质效应及提取回收率范围分别为 84%~107%, 89%~103%, RSD<11% ( $n=5$ ); T2DM 大鼠同时灌胃给予阿托伐他汀及沙格列汀, 阿托伐他汀、沙格列汀及 5-羟基-沙格列汀的药代动力学参数峰浓度( $C_{max}$ )分别为 (49.17±2.76) ng/mL, (1 155.97±144.96) ng/mL, (376.54±21.87) ng/mL,  $t_{1/2}$  分别为 (4.08±1.64) h, (1.84±0.47) h, (1.70±0.55) h, 药-时曲线下面积 ( $AUC_{0-12h}$ ) 分别为 (112.38±20.97) ng/mL, (1 475.50±337.23) ng/mL, (700.91±147.62) ng/mL。结论 该方法操作简单, 专一性强, 稳定性好, 可用于测定阿托伐他汀、沙格列汀及其代谢物 5-羟基-沙格列汀的浓度。

**关键词:** 沙格列汀; 阿托伐他汀; 5-羟基-沙格列汀; 超高效液相色谱串联质谱法

中图分类号: R965; R977.1\*5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)17-0013-05

第一作者: 董洁, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析, (电话)0518-85605518(电子信箱)dongjie0922@163.com。

△通信作者: 孙增先, 男, 博士研究生, 主任药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)sunzx715@163.com。

是除蛋白质外含量最丰富的含氮高分子,也是宇宙中唯一带正电的阳性食物纤维,被科学界誉为“第六生命要素”,被欧美国家认定为机能性免疫物质<sup>[9]</sup>。基础研究表明,甲壳素具有良好的生物相容性和生物可降解性,同时还具有促进伤口愈合、抗菌抗感染、止痛止血<sup>[10]</sup>,促进人体皮肤细胞(特别是角质细胞和成纤维细胞)的生长调节免疫、增强机体免疫、体内可降解等优点<sup>[11]</sup>。鼻腔黏膜修复敷料为水凝胶,柔软、弹性好<sup>[12]</sup>,可与伤口更有效、严密接触,能吸收大量伤口渗液,为伤口提供良好的湿润环境,且不会造成敷料与创面之间的积液,更益于伤口愈合<sup>[13]</sup>。本研究中按照 GB/T16886 及 GB/T14233 的系列标准,对 3 批鼻腔黏膜修复敷料进行了生物安全性评价,结果显示,无豚鼠皮肤致敏反应,对家兔鼻腔黏膜仅有极轻度刺激,细胞毒性不大于 2 级,均在标准规定的可接受范围内。初步认为 3 批鼻腔黏膜修复敷料毒性较低,有望用于临床。

## 参考文献:

- [1] GB/T16886.10-2005, 医疗器械生物学评价第 10 部分: 刺激与迟发型超敏反应试验[S].
- [2] GB/T16886.12-2005, 医疗器械生物学评价第 12 部分: 样品制备与参照样品[S].
- [3] GB/T16886.5-2003, 医疗器械生物学评价第 5 部分: 体外细胞毒性试验[S].

- [4] GB/T14233.2-2005, 医用输液、输血、注射器具检验方法第 2 部分: 生物学试验方法[S].
- [5] 汪蓉, 沈晨, 吴虹, 等. 牛膝不同提取部位抗炎镇痛及抗迟发型超敏反应的作用[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(3): 71-75.
- [6] 史爽, 包志凡, 陈旭, 等. 新型牙髓治疗材料 iRoot BP Plus 对人牙龈成纤维细胞的细胞毒性[J]. 上海口腔医学, 2014, 23(6): 681-684.
- [7] 凌丽, 沈俊逸, 陈森, 等. 复元醒脑汤对糖尿病脑梗死大鼠脑组织梗死体积及形态学影响的实验研究[J]. 中国中医急症, 2018, 27(2): 189-193.
- [8] 张凯, 薛康. 甲壳素敷料用于鼻内镜鼻窦术后鼻腔填塞的疗效观察[J]. 西南国防医药, 2015, 25(4): 418-420.
- [9] 黄瑶. 基于甲壳素新材料的构建及生物医用评价[D]. 武汉: 武汉大学, 2016.
- [10] 刘丽英, 遆新院. 鼻出血的止血材料学研究[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(21): 3967-3974.
- [11] 倪天庆, 胡思源. 甲壳素及其衍生物壳聚糖的药理作用和临床应用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(3): 313-316.
- [12] 杨欣, 杜田. 壳聚糖在伤口敷料中的应用研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2017, 25(3): 42-45.
- [13] 白妙琴. 水胶体敷料在新生儿鼻塞式持续气道正压通气中的应用[J]. 中国伤残医学, 2014, 22(5): 240.

(收稿日期: 2018-03-06)

## Simultaneous Determination of Atorvastatin and Saxagliptin in T2DM Rats Plasma by UPLC-MS/MS

Dong Jie<sup>1,2</sup>, Tang Daoquan<sup>2</sup>, Xiao Bingxin<sup>1</sup>, Wang Tianyan<sup>1,2</sup>, Sun Zengxian<sup>1</sup>

(1. Lianyungang Hospital Affiliated of Xuzhou Medical University, The First People's Hospital of Lianyungang City, Lianyungang, Jiangsu, China 222000;

2. Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China 221004)

**Abstract: Objective** To establish an UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of atorvastatin, saxagliptin and its metabolite 5-hydroxy saxagliptin in T2DM rats plasma. **Methods** The chromatographic column was Waters BEH Shield RP<sub>18</sub> column(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate (gradient elution) at a flow rate of 0.2 mL/min, the column temperature was 30 °C. Mass spectrometry conditions were electrospray ion source (ESI source), positive ion mode detection, multi-reaction monitoring (MRM) mode scanning. The ion of monitor was  $m/z$  559.3 → 440.2 (atorvastatin calcium),  $m/z$  316.2 → 180.2 (saxagliptin),  $m/z$  332.3 → 196.2 (5-hydroxy saxagliptin),  $m/z$  304.2 → 153.9 (viglitine, internal standard). **Results** The linear ranges of atorvastatin, saxagliptin and 5-hydroxy saxagliptin were 1-500, 2-1 000, 1-500 ng/mL, respectively. The intra-day and the inter-day precision RSDs were less than 10% ( $n=5$ ). The matrix effects and extraction recovery rates were 84%-107%, 89%-103%,  $RSD < 11%$  ( $n=5$ ). Atorvastatin and saxagliptin, atorvastatin, saxagliptin and 5-hydroxy saxagliptin were given to T2DM rats by intragastric administration, the peak concentration of pharmacokinetic parameters ( $C_{max}$ ) were (49.17 ± 2.76) ng/mL, (1 155.97 ± 144.96) ng/mL, (376.54 ± 21.87) ng/mL,  $t_{1/2}$  was (4.08 ± 1.64) h, (1.84 ± 0.47) h, (1.70 ± 0.55) h, the area under the drug-time curve ( $AUC_{0-12 h}$ ) was (112.38 ± 20.97) ng/mL, (1 475.50 ± 337.23) ng/mL, (700.91 ± 147.62) ng/mL. **Conclusion** The method is simple, highly specific and stable, it is suitable for concentration determination of atorvastatin, saxagliptin and its metabolite 5-hydroxy saxagliptin in T2DM rats plasma.

**Key words:** saxagliptin; atorvastatin; 5-hydroxy saxagliptin; UPLC-MS/MS

沙格列汀(SAX)为二肽基肽酶(DPP-4)抑制剂,单一或与其他降糖药联合使用,可控制患者血糖<sup>[1]</sup>。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂(他汀类药物)可降低2型糖尿病(T2DM)患者心血管事件风险<sup>[2]</sup>。2013年版美国心脏病学院/美国心脏病协会(ACC/AHA)指南推荐<sup>[3]</sup>,40~75岁的T2DM患者需服用中等强度或高强度的他汀类药物。沙格列汀经肝脏代谢酶CYP3A4代谢生成5-羟基-沙格列汀(5-OH SAX)<sup>[4]</sup>,两者都能选择性抑制DPP-4活性,增强其降糖效果。阿托伐他汀(ATO)在体内代谢也需要CYP3A4酶参与。目前尚未见报道沙格列汀及阿托伐他汀联合用药的相互作用,本研究中建立超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定ATO,SAX,5-OH SAX的药物浓度,用于T2DM大鼠体内药代动力学研究。现报道如下。

### 1 仪器、试剂与动物

仪器:Waters ACQUITY Sample Manager-FIN型液相色谱仪(美国Waters公司);AB Qtrap 4500型质谱仪,Analyst 1.6.2数据处理软件(美国Applied Biosystems公司);T1型氮气发生器(德国普利赛斯公司);AE-240型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);Peglab多功能高速离心机(德国Deutschland公司);Vortex-genie 2漩涡混合器(美国Scientific Industries公司)。

试剂:阿托伐他汀钙(批号为20170320,纯度为99.9%,浙江海正药业股份有限公司);沙格列汀水合物对照品(批号为SG-31204001,纯度为94.36%,郑州华文化学品有限公司);5-羟基-沙格列汀(批号为

20160303,纯度为95.6%),维格列汀(批号为20151203,纯度为99.5%),均由江苏豪森药业有限公司提供;乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);醋酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);Millipore超纯水。

实验动物:SD大鼠,雄性,SPF级,体质量80~120 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号为SCXK(沪)2013-0016,饲养于徐州医科大学实验动物中心。所有动物实验均按徐州医科大学动物饲养和使用指南进行。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件与质谱条件

色谱柱:Waters BEH Shield RP<sub>18</sub>柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:10 mmol/L 乙酸铵水溶液(A),乙腈(B),梯度洗脱,0~2.2 min,30%~70% B,2.2~3.1 min,70%~30% B,3.1~5.0 min,30% B;流速:0.2 mL/min;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

采用电喷雾电离源(ESI),以多反应监测(MRM)模式扫描,正离子方式检测。离子化电压:5 500 V;温度:350 °C;喷雾气(N<sub>2</sub>)压力:60 psi;辅助加热气(N<sub>2</sub>)压力:50 psi;气帘气体(N<sub>2</sub>)压力:35 psi;碰撞气模式:Medium;扫描时间:100 ms。用于定量分析的离子反应  $m/z$  分别为559.3 → 440.2(ATO),316.2 → 180.2(SAX),332.3 → 196.2(5-OH SAX),304.2 → 153.9(维格列汀,内标)。

#### 2.2 溶液制备与血浆样品处理

对照品溶液:取ATO,SAX,5-OH SAX对照品,精

密称定,ATO用水-甲醇(50:50)溶解并稀释,SAX及5-OH SAX用水-乙腈(50:50)溶解并稀释,配成质量浓度皆为1 g/L的混合对照品贮备液。用水-甲醇(50:50)将ATO及5-OH SAX依次稀释成质量浓度为10,25,50,100,250,500,1 000,2 500,5 000 ng/mL的溶液,SAX质量浓度为20,50,100,200,500,1 000,2 000,5 000,10 000 ng/mL的对照品工作液。

内标(IS)溶液:取维格列汀对照品,精密称定,用水-乙腈(50:50)溶解并稀释,配成质量浓度为1 g/L的内标贮备液。临用前,用水-甲醇(50:50)稀释定容至500 ng/mL。配置好的对照品贮备液及内标贮备液置-20℃冰箱贮存,备用。

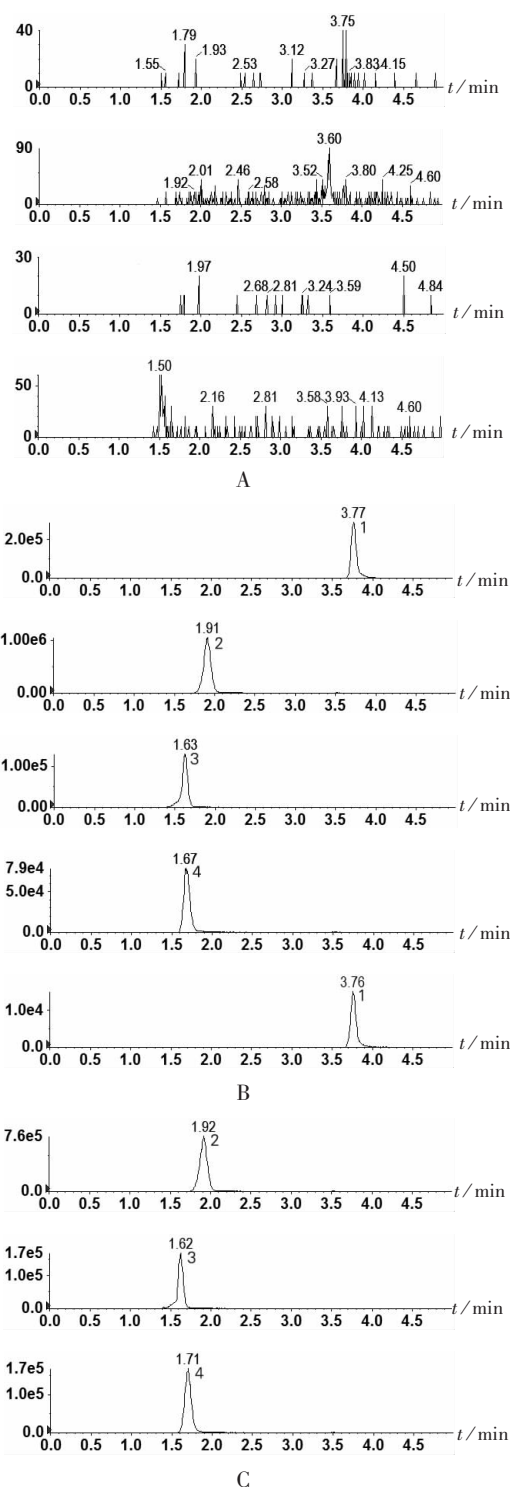
混合血浆样品:取适量ATO,SAX,5-OH SAX标准工作液,加入空白血浆,配制含ATO及5-OH SAX质量浓度为1,2.5,5,10,25,50,100,250,500 ng/mL的溶液,SAX质量浓度为2,5,10,20,50,100,200,500,1 000 ng/mL的系列混合血浆样品溶液。同法制备定量下限、低、中、高质量浓度的质控血浆样品溶液,即ATO及5-OH SAX(1,2.5,50,250 ng/mL),SAX(2,5,100,500 ng/mL),-20℃贮存,备用。

血浆样品处理:取空白血浆50 μL,加入500 ng/mL内标工作液10 μL、乙腈250 μL,涡旋振荡3 min,13 500 r/min离心10 min,移取上清液,在室温下氮气吹干。残留物用100 μL水-甲醇(50:50)复溶,涡旋振荡1 min,13 500 r/min离心5 min,取上清液10 μL,进样。

### 2.3 方法学考察

专属性考察:分别取6个SD大鼠空白血浆样品;空白血浆加入ATO,SAX,5-OH SAX及内标溶液;大鼠给药0.5 h后收集血浆样品,按照2.2项下血浆样品操作,行UPLC-MS/MS分析,色谱图见图1。ATO,SAX,5-OH SAX及IS的保留时间分别为3.77,1.91,1.63,1.67 min,保留时间1.01 min处发现内源性物质峰,但不干扰ATO,SAX,5-OH SAX及内标溶液的测定,为了尽量减少内源性物质对仪器的污染,将1.40 min之前的组分切外,结果见图1。

标准曲线制备及定量下限考察:取2.2项下混合血浆样品溶液,按血浆样品处理方法处理,并按拟订色谱及MS条件进样测定,记录色谱图。分别以待测物质量浓度( $X$ )为横坐标、待测物峰面积与内标峰面积比值( $Y$ )为纵坐标,用加权( $W=1/X^2$ )最小二乘法进行回归运算。ATO标准曲线为 $Y=0.00144X+0.00742(r=0.9986)$ ,定量限为1 ng/mL;SAX标准曲线方程为 $Y=0.00466X+0.00212(r=0.9995)$ ,定量下限为2 ng/mL;5-OH SAX标准曲线方程为 $Y=0.00907X+0.000473(r=$



1. ATO 2. SAX 3. 5-OH SAX 4. IS  
A. 空白血浆 B. 空白血浆加入ATO,SAX,5-OH SAX及IS  
C. SD大鼠灌胃ATO,SAX 0.5 h后的血浆样品加IS

图1 T2DM大鼠血浆中ATO,SAX,5-OH SAX典型色谱图

0.9965),定量下限为1 ng/mL。结果表明,ATO,SAX,5-OH SAX质量浓度在1~500,2~1 000,1~500 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度及准确度试验:分别制备含ATO,SAX,5-OH SAX定量下限、低、中、高4个质量浓度的混合

QC 血浆样品溶液,各 5 份,按 2.2 项下方法处理,进样测定,并记录色谱图。连续测定 3 d。采用当日所建立的标准曲线计算样品测定浓度,根据测定值与实际值进行

计算,考察方法的精密度与准确度。结果显示,3 d 内、日间  $RSD < 9.34\%$ , 准确度为  $92\% \sim 110\%$ , 符合生物样品分析的要求。结果见表 1。

表 1 ATO, SAX, 5-OH SAX 日内及日间精密度与准确度实验结果

| 成分       | 理论质量浓度<br>(ng/mL) | 日内 ( $n=5$ )                      |           |                            | 日间 ( $n=3$ )                      |           |                            |
|----------|-------------------|-----------------------------------|-----------|----------------------------|-----------------------------------|-----------|----------------------------|
|          |                   | 测定质量浓度 ( $\bar{X} \pm s$ , ng/mL) | $RSD(\%)$ | 准确度 ( $\bar{X} \pm s$ , %) | 测定质量浓度 ( $\bar{X} \pm s$ , ng/mL) | $RSD(\%)$ | 准确度 ( $\bar{X} \pm s$ , %) |
| ATO      | 1                 | 1.10 $\pm$ 0.01                   | 0.87      | 109.79 $\pm$ 0.96          | 0.97 $\pm$ 0.07                   | 7.57      | 97.30 $\pm$ 7.37           |
|          | 2.5               | 2.51 $\pm$ 0.00                   | 0.18      | 100.42 $\pm$ 0.18          | 2.32 $\pm$ 0.13                   | 5.43      | 92.89 $\pm$ 5.04           |
|          | 50                | 50.34 $\pm$ 0.43                  | 0.86      | 100.67 $\pm$ 0.87          | 51.41 $\pm$ 4.71                  | 9.17      | 92.89 $\pm$ 5.04           |
|          | 250               | 252.02 $\pm$ 1.33                 | 0.53      | 100.81 $\pm$ 0.53          | 246.01 $\pm$ 10.80                | 4.40      | 98.41 $\pm$ 4.32           |
| SAX      | 2                 | 2.01 $\pm$ 0.4                    | 2.04      | 100.39 $\pm$ 2.04          | 2.03 $\pm$ 0.08                   | 4.08      | 101.81 $\pm$ 4.16          |
|          | 5                 | 4.96 $\pm$ 0.4                    | 0.81      | 99.21 $\pm$ 0.80           | 4.81 $\pm$ 0.21                   | 4.29      | 96.20 $\pm$ 4.12           |
|          | 100               | 102.91 $\pm$ 0.80                 | 0.78      | 102.91 $\pm$ 0.80          | 100.51 $\pm$ 2.70                 | 2.69      | 100.51 $\pm$ 2.70          |
|          | 500               | 502.52 $\pm$ 0.38                 | 0.08      | 100.50 $\pm$ 0.08          | 486.61 $\pm$ 17.26                | 3.54      | 97.32 $\pm$ 3.45           |
| 5-OH SAX | 1                 | 1.05 $\pm$ 0.03                   | 2.74      | 104.55 $\pm$ 2.87          | 1.02 $\pm$ 0.03                   | 3.38      | 102.16 $\pm$ 3.45          |
|          | 2.5               | 2.51 $\pm$ 0.01                   | 0.43      | 100.59 $\pm$ 0.43          | 2.38 $\pm$ 0.08                   | 3.54      | 95.13 $\pm$ 3.37           |
|          | 50                | 50.28 $\pm$ 0.56                  | 1.11      | 100.55 $\pm$ 1.11          | 51.21 $\pm$ 4.78                  | 9.34      | 102.41 $\pm$ 9.57          |
|          | 250               | 250.83 $\pm$ 1.13                 | 0.45      | 100.33 $\pm$ 0.45          | 247.34 $\pm$ 13.57                | 5.49      | 98.94 $\pm$ 5.43           |

提取回收率和基质效应试验:取 ATO, SAX, 5-OH SAX 混合 QC 血浆样品 ( $n=5$ ), 按 2.2 项下方法操作, 进样分析, 记录相应分面积 ( $A$ )。取空白血浆 50  $\mu$ L, 加入乙腈 250  $\mu$ L, 涡旋, 离心, 吹干上清液, 在残渣中加入 5  $\mu$ L 含 ATO, SAX, 5-OH SAX 的混合标样溶液 (浓度与相应的质控样品一致), 10  $\mu$ L 内标, 溶液 100  $\mu$ L 水-甲醇 (50:50) 涡旋混匀, 离心, 取上清液进样分析, 记录各组分峰面积 ( $B$ )。以纯水代替空白血浆, 进行上述操作, 进样分析, 记录各组分峰面积 ( $C$ )。基质效应 =  $A/C \times 100\%$ , 提取回收率 =  $A/B \times 100\%$ 。结果表明, ATO, SAX, 5-OH SAX 及内标的基质效应为  $84\% \sim 107\%$ , 提取回收率为  $89\% \sim 103\%$  ( $n=5$ ),  $RSD < 11\%$ 。表明在本试验所选择的色谱条件下, 可忽略基质效应影响。

稳定性试验:分别考察混合质控血浆样品在不同保存条件下的稳定性 ( $n=3$ )。血浆样品在室温下放置 24 h,  $-80^\circ\text{C}$  保存 60 d 及反复冻融 3 次等处理后, 按 2.2 项下方法操作, 进样分析。结果 ATO, SAX, 5-OH SAX 的相对误差 ( $RE$ ) 值分别为  $0.7 \sim 10.6$ ,  $0.8 \sim 8.7$ ,  $2.1 \sim 10.1$ 。

#### 2.4 药代动力学研究

取 6 只 SD 大鼠, 普通饲料适应性喂养 1 周, 给以高脂饲料喂养 4 周, 大鼠禁食、不禁饮 12 h, 给以链脲佐菌素 (STZ, 40 mg/kg) 腹腔注射, 诱导糖尿病模型, 选择造模成功的大鼠模型进行实验。T2DM 大鼠同时给予 SAX 及 ATO 各 10 mg/kg 灌胃。分别于给药前后 0, 0.25,

0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 时采血, 各 0.5 mL, 置 EP 管, 血样在  $4^\circ\text{C}$  下, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上层血浆于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。采用 UPLC-MS/MS 法测定不同时间点的 ATO, SAX, 5-OH SAX 的血药浓度和药-时曲线, 详见图 2。采用 Win Nolin 6.1 软件按照非房室模型进行处理, 计算药代动力学参数, 结果见表 2。

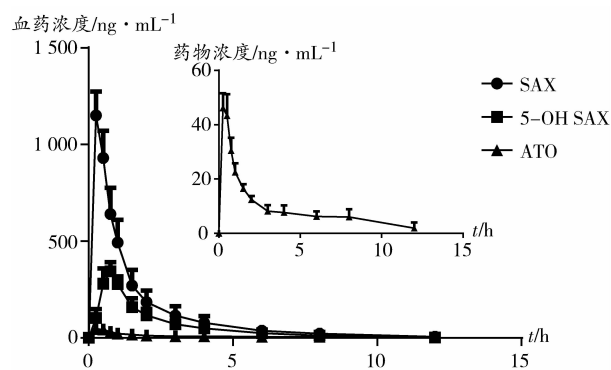


图 2 T2DM 大鼠体内 ATO, SAX, 5-OH SAX 的药-时曲线

表 2 ATO, SAX, 5-OH SAX 在 T2DM 大鼠体内的药代动力学参数 ( $\bar{X} \pm s$ )

| 药代动力学参数                                                      | ATO                | SAX                   | 5-OH-SAX            |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
| 生物半衰期 ( $t_{1/2}$ , h)                                       | 4.08 $\pm$ 1.64    | 1.84 $\pm$ 0.47       | 1.70 $\pm$ 0.55     |
| 达峰时间 ( $T_{max}$ , h)                                        | 0.25 $\pm$ 0.00    | 0.25 $\pm$ 0.00       | 0.65 $\pm$ 0.12     |
| 峰浓度 ( $C_{max}$ , ng/mL)                                     | 49.17 $\pm$ 2.76   | 1 155.97 $\pm$ 144.96 | 376.54 $\pm$ 21.87  |
| 药-时曲线下面积 ( $AUC_{0-12h}$ , h $\cdot$ ng $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | 112.38 $\pm$ 20.97 | 1 475.50 $\pm$ 337.23 | 700.91 $\pm$ 147.62 |
| 药-时曲线下面积 ( $AUC_{inf}$ , h $\cdot$ ng $\cdot$ mL $^{-1}$ )   | 135.79 $\pm$ 19.62 | 1 496.09 $\pm$ 348.83 | 707.34 $\pm$ 145.20 |
| 平均驻留时间 ( $MRT_{inf}$ , h)                                    | 5.84 $\pm$ 0.85    | 2.02 $\pm$ 0.46       | 2.51 $\pm$ 0.46     |

### 3 讨论

T2DM 患者需服用调脂药及降糖药,以预防心血管疾病风险,故可同时测定 ATO 及 SAX 药物浓度的方法对其药代动力学研究至关重要。目前,国内外与 ATO 及 SAX 血药浓度测定的方法有很多,可采用 RP-HPLC/UV<sup>[5]</sup>,LC-ESI-MS,GC-MS<sup>[6]</sup>及 HPTLC-UV<sup>[7]</sup>等方法测定血浆中 ATO 浓度,SAX 的测定主要采用 GC<sup>[8]</sup>,LC-MS/MS<sup>[9]</sup>等方法。相对于本研究中所描述的方法,均具有检测灵敏度不足、采集样本量大、出峰时间长等缺点,且不能同时测定血浆样品中 ATO 及 SAX 药物浓度。故对其作适当改进,增强检测灵敏度,样品保留时间缩短到 5 min,提高了分析准确度、灵敏度及分析效率。

优化固定相时,曾尝试 Acquity UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱、Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱及 Waters shield RP C<sub>18</sub> 色谱柱,结果发现,ATO 在 Acquity UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱无吸收峰,使用 Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱,待测物都能检测出,但其中 5-OH SAX 的响应值过低,但这些问题在 Waters shield RP C<sub>18</sub> 色谱柱上均能改善,待测物具有很好的灵敏度及峰形。在流动相条件优化时,曾采用 10 mmol/L 乙酸铵-乙腈为流动相,开始时尝试等度洗脱,大水相条件下,SAX 及其代谢物 5-OH SAX 能分开,但 ATO 不能很好地分离,随着有机相比比例的增加,最终在有机相为 70% 时,ATO 被很好地分离出来。故待测物在梯度洗脱条件下,有很好的响应值及峰形。

血浆样品前处理对于色谱方法的建立至关重要,将直接影响待测物的可靠性及准确性。通过查阅文献<sup>[10-11]</sup>发现,ATO 及 SAX 都有采用乙腈沉淀蛋白的方法提取样品,由于 SAX 极性大,而 ATO 极性小,因而在吹干后的复溶采用 50% 的甲醇。结果表明,采用乙腈蛋白质沉淀法处理血浆样品,待测物的基质效应及提取回收率均符合规定<sup>[12]</sup>。

本研究中采用 UPLC-MS/MS 法同时测定 T2DM 大鼠灌胃给药后血浆中 ATO,SAX 及 5-OH SAX 的含量,以维格列汀为内标,在正离子模式下检测。结果表明,此方法具有良好的精密度与准确度,符合生物样品分析方法要求,灵敏度和专属性高。研究了 ATO 联合 SAX 在 T2DM 大鼠体内的药代动力学过程,确定了本研究中所建立的方法在非临床药代动力学研究中的适用性,可为其非临床药代动力学及毒理学等研究提供分析方法。

### 参考文献:

- [1] Wang A, Dorso C, Kopcho L, et al. Potency, selectivity and prolonged binding of saxagliptin to DPP4: maintenance of DPP4 inhibition by saxagliptin in vitro and ex vivo when compared to a rapidly - dissociating DPP4 inhibitor[J]. BMC Pharmacol, 2012, 12(2): 1 - 11.
- [2] Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo - controlled trial[J]. Lancet, 2004, 364(9435): 685 - 696.
- [3] Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(25 Pt B): 2889 - 2934.
- [4] Fonseca SAV. Saxagliptin overview: special focus on safety and adverse effects[J]. Drug Safety Evaluation, 2013, 12(1): 103 - 109.
- [5] Shah Y, Iqbal Z, Ahmad L, et al. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP - HPLC/UV detection: method development, validation and optimization of various experimental parameters[J]. J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879 (9 - 10): 557 - 563.
- [6] Ma L, Dong J, Chen XJ, et al. Development and validation of atorvastatin by LC - ESI - MS and application in bioequivalence research in healthy Chinese volunteers[J]. Chromatographia, 2007, 65(11 - 12): 737 - 741.
- [7] Jamshidi A, Nateghi AR. HPTLC determination of atorvastatin in plasma[J]. Chromatographia, 2007, 65(11 - 12): 763 - 766.
- [8] 郑飞, 华国栋. 气相色谱法测定沙格列汀原料药中基因毒性杂质残留量[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 575 - 577.
- [9] Xu XS, Demers R, Gu H, et al. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of saxagliptin and its major pharmacologically active 5 - monohydroxy metabolite in human plasma: method validation and overcoming specific and non - specific binding at low concentrations[J]. J Chromatography. B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 889 - 890: 77 - 86.
- [10] Yacoub M, Awwad AA, Alawi M, et al. Simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin with its metabolites; ortho and para hydroxy atorvastatin; in human plasma by LC - MS/MS[J]. J Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013, 917 - 918: 36 - 47.
- [11] 倪善红, 汤道权, 董洁, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定糖尿病模型大鼠血浆中沙格列汀及其代谢产物 5 - 羟基沙格列汀浓度[J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2201 - 2204.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 363 - 368.

(收稿日期: 2018 - 01 - 10)