

HPLC-MS/MS 法测定人血浆中达比加群的浓度

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院药学部 (福州 350001) 陈 敏 阳丽梅 罗冬梅 王长连¹

【摘 要】 目的 建立人血浆中达比加群 (dabigatran) 浓度的 HPLC-MS/MS 测定法, 并对该方法进行方法学验证。**方法** 血浆样品采用甲醇直接沉淀, 选择盐酸苯海拉明作为内标物。色谱柱采用 InertSustainC18 HP (3.0 mm×100 mm, 3 μm), 流动相采用甲醇-5%甲醇水溶液 (含有 10 mmol/L 甲酸铵及 0.1%甲酸) 进行梯度洗脱。**结果** 达比加群在 10~500 ng/mL 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 5$), 定量下限是 10 ng/mL; 保留时间是 1.8 min, 日内、日间精密度 (RSD) 小于 6.75%, 准确度在 ±4.12% 以内, 基质效应在 92.68%~94.37% 以内, 提取回收率为 90.95%~93.83%, 血浆内源性物质对分析方法不干扰。**结论** 本实验建立了一种简单、高效的 HPLC-MS/MS 法检测人血浆中的达比加群浓度。具有特异

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01249)

1 福建医科大学药学院

性强、专属性高、操作简便、灵敏准确等特点。

【关键词】达比加群; HPLC-MS/MS 法; 血药浓度

【中图分类号】R927.2 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2018)06-0118-06

Determination of dabigatran in human plasma by HPLC-MS/MS

CHEN Min, YANG Limei, LUO Dongmei,

WANG Changlian. Department of Pharmacy, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 **Objective** To establish a sensitive and specific method for determination of dabigatran in human plasma by HPLC-MS/MS and validated the methods systematically. **Methods** The plasma samples were precipitated by methanol, and diphenhydramine hydrochloride was selected as the internal standard (IS). The analyte dabigatran and IS were separated on InertSustain C18 HP (3.0×100 mm, 3μm) with mobile phase of methanol-5% methanol aqueous solution (including 10 mmol/L ammonium formate and 0.1% formic acid) in gradient elution. **Results** The method exhibited a good linearity over the concentration range of 10~500 ng/mL ($r=0.999\ 5$). The quantification lower limit of dabigatran was 10 ng/mL, and the retention time was 1.8 min. The values on both the occasion (intra- and inter-day) were all within 6.75%, and the accuracy was within $\pm 4.12\%$. The matrix effect was within 92.68%-94.37%, and the extraction recoveries were 90.95%-93.83%. There was absent of the interference of endogenous substances in plasma. **Conclusion** A simple and efficient HPLC-MS/MS method applied to the determination of dabigatran concentration has been established by this study, which is characterized by prominent specificity, simplicity, rapidity, high specificity, sensitivity as well as accuracy.

【Key words】 dabigatran; HPLC-MS/MS; plasma drug concentration

达比加群酯是一种人工合成的新型口服抗凝抑制剂,它能可逆地竞争性抑制凝血酶活性,属于非肽类凝血酶抑制剂^[1]。其口服后通过消化道迅速吸收,在血浆和肝脏内通过酯酶水解可以产生活性代谢产物达比加群,通过抑制凝血酶发挥抗凝活性^[2-4]。RE-LY 研究发现,缺血性中风及严重出血的发生率与达比加群的血药浓度高低显著相关^[5]。因此,检测达比加群酯的活性代谢产物—达比加群的血药浓度可作为其疗效及不良反应发生的一项重要预测指标。目前国内研究大多集中在动物(如大鼠^[6]、犬^[7])中达比加群血药浓度的检测方法,本论文选择 HPLC-MS/MS 法,创建人血浆中达比加群血药浓度的检测方法,并对其进行方法学验证,为后续的研究提供技术支持。

1 实验材料

1.1 药品和试剂: 达比加群标准品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度 99%,批号 D1028A);盐酸苯海拉明标准品(纯度 99%,上海源叶生物科技有限公司,批号 L12J7X8944);甲醇(色谱纯,上海试一化学试剂有限公司,批号 150325);乙腈(色谱纯,上海试一化学试剂有限公司,批号 160720);盐酸(分析纯,上海试一化学试剂有限公司,批号 131106);甲酸(分析纯,宜兴市第二化学试剂厂,批号 20000301);甲酸铵(分析纯,湖州化学试剂厂,批号 130401);乙酸铵(分析纯,湖州化学试剂厂,批号 130722)。

1.2 仪器和设备: 岛津 30A-ABSCIEX QTRAP 5500 高效液相-质谱联用仪(含双高压泵,自动进样器,柱温箱,电喷雾离子化接口);色谱柱: InertSustain C18 HP (3.0 mm×100 mm, 3 μm); 高速冷冻离心机(H1850R 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);电子分析天平[AL204 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];涡旋混合器(XW-80A,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);超纯水仪[默克密理博实验室设备(上海)有限公司];氮气吹干仪(杭州聚同电子有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件: 色谱柱为 InertSustain C18 HP (3.0 mm×100 mm, 3 μm); 流动相[流动相 A: 甲醇, B: 5% 甲醇水溶液(10 mmol/L 甲酸铵及 0.1% 甲酸)] 梯度洗脱(0~0.3 min, 40% A; 0.3~2.5 min, 40% A→85% A; 2.5~4.5 min, 85% A; 4.5~6.0 min, 85% A→40% A; 6.0~8.0 min, 40% A); 流速 0.3 mL/min; 柱温 40℃; 进样量 3 μL。

2.2 质谱条件: 碰撞气(CAD) High; 气帘气(CUR) 20 psi; 雾化气(GS1) 55 psi; 辅助气(GS2) 60 psi; 电喷雾电压(IS) 5 500 V; 去溶剂温度(TEM) 550℃; 入口电压(EP) 10 V; 碰撞室出口电压(CXP) 13 V。检测方式: 正离子检测; 扫描方式: 多反应监测(MRM)形式; 离子

源：气动辅助电喷雾离子化 (ESI) 源；去簇电压 (DP)：达比加群 60 V，盐酸苯海拉明 90 V；碰撞能量 (CE)：达比加群 288.7-53 V、306.2-36 V，盐酸苯海拉明 18 V。

2.3 溶液的配制：

2.3.1 标准液的配制：精密称取达比加群 10.0 mg，置于 100 mL 容量瓶中，用甲醇：0.1 mol/L 盐酸 (90 : 10) 溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，即为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的达比加群储存液。用甲醇逐级稀释配制成 10、25、50、100、250、500 ng/mL 的达比加群标准溶液，避光，密闭，冷藏备用。

2.3.2 内标盐酸苯海拉明的制备：精密称取盐酸苯海拉明 10.0 mg，置于 50 mL 容量瓶，甲醇定容至刻度，即得 200 $\mu\text{g/mL}$ 内标储存液。用甲醇稀释至 100 ng/mL，避光，密闭，冷藏备用。

2.3.3 血浆样品的处理：移液枪量取血浆样品 200 μL 置于 1.5 mL EP 管中，移取内标 200 μL (100 ng/mL)、甲醇 400 μL 加入其中，涡旋混合 1 min，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液过滤于自动进样器样品瓶中，进样。

2.4 方法学验证：

2.4.1 专属性考察：分别取 6 名不同受试者的空白血浆 200 μL ，除不加内标外 (甲醇补足)，按照“2.3.3”项下操作，进行 HPLC-MS/MS 分析，得到空白血浆样品色谱图。另取空白血浆，先后加入一定浓度的达比加群、内标及达比加群+内标 200 μL ，涡旋 1 min，配成空白及血浆中分别含达比加群、内标及达比加群+内标的血浆样品，从“血浆样品的处理”项下“加入甲醇 400 μL ”起操作处理，测定。

2.4.2 线性范围及定量下限：取 EP 管数支，精密加入不同浓度的达比加群标准溶液及内标 200 μL ，加入空白血浆 200 μL ，涡旋混匀，配成 10、25、50、100、250、500 ng/mL 的标准含药血浆，每个浓度平均配制 6 份，从“血浆样品处理”项下“加入甲醇 400 μL ”起操作，处理后测定。记录色谱图，计算线性回归方程及其相关系数 r ，并绘制标准曲线。按“血浆样品处理”方法项制备定量下限 10 ng/mL (LLOQ)，进行 HPLC-MS/MS 分析，测定信噪比。

2.4.3 准确度和精密度：取人空白血浆将达比加群稀释成 25、100、400 ng/mL 的质控样品，按“血浆样品处理”项方法操作后测定，每个浓度测定 6 个样品，连续测定 3 d，根据当天的标准曲线

求得质控样品浓度，考察本法的准确度与日内和日间精密度。

2.4.4 基质效应：用超纯水替换人血浆并按“血浆样品处理”方法操作，将达比加群浓度分别稀释为 25、100、400 ng/mL (含内标 100 ng/mL) 的质控样品，每种浓度各 6 个样本，进样 3 μL 并记下达比加群和内标的峰面积 A；分别移取 6 个不一样批次的人空白血浆 200 μL 于 1.5 mL EP 管中，再加入 600 μL 甲醇，涡旋 1 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min，将上清液 100 μL 移取至 EP 管中，38 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干，量取上述样品溶液 100 μL ，涡旋 1 min 复溶并离心，过滤后进样 3 μL ，记下达比加群和内标的峰面积 B。以 $B/A \times 100\%$ 计算基质效应。

2.4.5 提取回收率：取人空白血浆，加入达比加群制备 25、100、400 ng/mL 的质控样品 ($n=6$)，按“血浆样品处理”项方法操作，处理完测定，每个样品分析测定 1 次。另取人空白血浆，先按“血浆样品处理”项方法处理，再加入达比加群制备相同的 25、100、400 ng/mL 的标准对照样品 ($n=6$)，同法测定。将测得的质控样品的峰面积与标准对照样品的峰面积比较，计算提取回收率。内标 (100 ng/mL) 提取回收率测定法同达比加群的测定。

2.4.6 稀释效应：制备 1 $\mu\text{g/mL}$ 的质控人血浆样品，用空白血浆稀释 10 倍后进行测定，研究稀释效应。

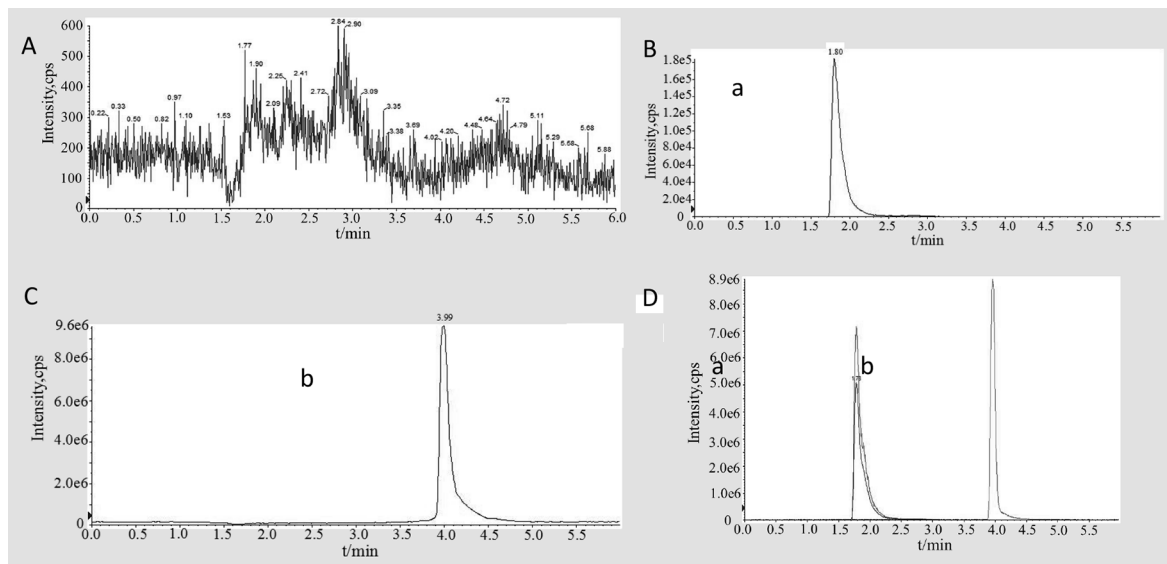
2.4.7 稳定性：1) 短期放置稳定性：制备达比加群浓度为 25、100、400 ng/mL 的标准样品 ($n=3$)，室温放置 4 h 后，按照“血浆样品处理”项方法操作并进行测定与分析。2) 冷冻和融化稳定性：取人空白血浆制备达比加群浓度为 25、100、400 ng/mL 的质控样品 ($n=3$)，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 情况下先冷冻 24 h，然后在室温下融化，融化后的样品在相同条件下重新冷冻，即为 1 个冷冻和融化循环，如此反复冻融 3 次，按“血浆样品处理”项方法操作并进行测定与分析。3) 长期冷冻放置稳定性：取空白血浆制备达比加群浓度为 25、100、400 ng/mL 的质控样品 ($n=3$)，在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 2 周后，按“血浆样品处理”项方法操作并进行测定与分析。4) 处理过的血浆中达比加群的稳定性：取空白血浆制备达比加群浓度为 25、100、400 ng/mL 的质控样品 ($n=3$)，按“血浆样品处理”项方法操作，处理后于进样瓶保存，24 h 测定 1 次，可得 3 个浓

度样品测定值的精密度 (RSD)。

3 结果

3.1 专属性考察：达比加群和盐酸苯海拉明在空

白血浆中的色谱峰见图 1，达比加群色谱保留时间约为 1.80 min，盐酸苯海拉明的保留时间约为 3.99 min。



注：A，空白血浆；B，空白血浆加入 10 ng/mL 达比加群；C，空白血浆加入 100 ng/mL 盐酸苯海拉明；D，空白血浆加入 10 ng/mL 达比加群和 100 ng/mL 盐酸苯海拉明 (1:1)；a，达比加群；b，苯海拉明。

图 1 达比加群和盐酸苯海拉明在空白血浆中的色谱峰

3.2 线性范围和定量下限：血浆样品中达比加群的标准曲线回归方程为 $Y=0.000\ 07X+0.000\ 898$ ， $r=0.999\ 5$ 。结果表明，达比加群在 10~500 ng/mL 浓度范围内有良好的线性范围。定量下限可达到 10 ng/mL (以信噪比 ≥ 10 计)，检测限可低至 0.25 ng/mL (以信噪比 ≥ 3 计)。

3.3 准确度和精密度：人血浆中达比加群各浓度水平质控样品的准确度以相对误差 (RE) 表示，RE 均在 $\pm 4.12\%$ 以内，对应日内、日间精密度 (RSD) 均小于 6.75%，结果详见表 1。

表 1 人血浆中达比加群的日内和日间精密度与准确度 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

实际浓度/ (ng/mL)	测定浓度/ (ng/mL)	RE/%	RSD/%	
			日内	日间
25	23.97 \pm 0.66	-4.12	2.75	6.75
100	101.13 \pm 3.19	1.13	3.15	4.77
400	401.08 \pm 4.50	0.27	1.12	1.16

3.4 基质效应和提取回收率：人血浆中达比加群及内标的基质效应及提取回收率详见表 2。

3.5 稀释效应：在达比加群的实验中，稀释 10 倍的达比加群测试结果经乘稀释倍数后的实际值与 10

倍浓度测定结果进行比较，准确度 (RE) 在 4.4% 以内，计算后所得精密度 (RSD) 为 4.07%。

表 2 人血浆中达比加群及内标的基质效应及提取回收率 ($n=6$)

实际浓度/ (ng/mL)	基质效应		提取回收率	
	$\bar{x} \pm s$ /%	RSD/%	$\bar{x} \pm s$ /%	RSD/%
达比加群				
25	93.40 \pm 5.75	6.18	90.95 \pm 5.27	5.79
100	92.68 \pm 4.72	5.10	93.83 \pm 4.07	4.34
400	94.37 \pm 2.63	2.78	91.77 \pm 2.09	2.28
内标				
100	97.17 \pm 2.60	2.37	96.36 \pm 2.50	2.59

3.6 稳定性考察：达比加群在人血浆中的稳定性考察见表 3。

4 讨论

4.1 检测方法及内标的选择：目前有关达比加群血浆浓度检测方法的研究，国外主要采用放射性标记法、HPLC-MS/MS 法、UPLC-MS/MS 和 HPLC-UV 法。本实验采用 HPLC-UV 法进行预实验，但其样品峰和杂质峰无法分开，灵敏度低；而 HPLC-MS/MS 法因其高灵敏度、高选择性和快速的特点已经成为达比加群血浆浓度检测的首选方

表 3 达比加群在人血浆中的稳定性考察 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

存放条件	测定值	准确度/%
浓度 25 ng/mL		
室温放置 4 h	25.43±0.81	1.73
-20℃冻融 3 次	24.70±1.45	-1.20
-20℃冷冻 2 周	25.20±0.92	0.80
进样瓶放置 24 h	25.10±0.97	1.40
浓度 100 ng/mL		
室温放置 4 h	101.33±3.06	1.33
-20℃冻融 3 次	99.33±4.16	-0.67
-20℃冷冻 2 周	98.73±4.03	-1.27
进样瓶放置 24 h	100.56±3.23	1.56
浓度 400 ng/mL		
室温放置 4 h	401.92±1.65	0.48
-20℃冻融 3 次	401.81±2.36	0.45
-20℃冷冻 2 周	401.19±1.90	0.30
进样瓶放置 24 h	399.77±1.59	-0.06

法,故最终选用 HPLC-MS/MS 法进行检测。文献[8]对多个化合物进行考察,最终选定与达比加群具有类似的色谱、质谱特性的盐酸苯海拉明作为内标,故本实验参考文献选择盐酸苯海拉明为内标物。

4.2 质谱条件的优化:本实验用达比加群标准品配制出 1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,使用针泵进样挑选质谱条件,研究了正、负离子的扫描形式,研究结果显示正离子模式响应值比负离子更高。达比加群在一级全扫描形式下,主要生成 $[M+H]^+$ m/z 472.2 准分子离子;再对其进行二级全扫描分析,主要分析离子有 m/z 288.7、 m/z 306.2、 m/z 324.1。对各反应离子对的质谱响应研究和比较,最终定量分析的离子对选定为 m/z 472.2 \rightarrow 288.7。对其质谱检测条件进行优化,其优化后的主要质谱条件有:气帘气(CUR) 20 psi,雾化气(GS1) 55 psi,辅助气(GS2) 60 psi,电喷雾电压(IS) 5500 V,去溶剂温度(TEM) 550℃,入口电压(EP) 10 V,碰撞室出口电压(CXP) 13 V。

4.3 色谱条件的优化:在对等度和梯度洗脱方式的选择中,本实验在相同条件下进行了实验对比,HPLC-MS/MS 法下梯度洗脱的色谱峰更尖锐,灵敏度更好,最终选择了梯度洗脱。本实验出于对色谱柱和质谱检测器的保护未采用酸或者盐来沉淀蛋白,考虑选取直接沉淀蛋白质进样的方法。我们比较了在相同条件下不同沉淀试剂(甲醇、乙腈)的沉淀效率,发现以甲醇为沉淀试剂时,达比加群血浆溶液经提取回收率较高,受干扰更小。在选择溶剂方面,尝试对比乙腈、乙腈加少量水、甲醇以及

甲醇:0.1 mol/L 盐酸(90:10)溶液为溶剂,结果表明以甲醇:0.1 mol/L 盐酸(90:10)溶液为溶剂时溶解度最好。为了获得足够的灵敏度,改良色谱峰型并减少分析时间,实验分别采取了甲醇、乙腈作为流动相的有机相,结果表明甲醇的响应值更高,但峰型较差,因此加入缓冲溶液改善峰型。考虑到质谱检测器对缓冲溶液浓度的要求以及色谱柱的适用范围,尝试在流动相中加入甲酸铵、乙酸铵,但甲酸铵的效果较乙酸铵更显著;最后,在流动相中再加入 0.1% 甲酸,形成缓冲体系,结果表明系统的缓冲能力和达比加群响应值都有所提高,与文献所得结论吻合^[9]。

本实验建立 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中达比加群血药浓度的方法,其专属性较强,灵敏度更高,准确性较好,选择性更高,定量迅速,该方法可以在一般实验室普遍应用,为未来的临床应用研究打下基础。

参考文献

- [1] Stangier J, Stahle H, Rathgen K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor, are not affected by moderate hepatic impairment [J]. J Clin Pharmacol, 2008, 48 (12): 1411-1419.
- [2] Liesenfeld K H, Lehr T, Dansirikul C, et al. Population pharmacokinetic analysis of the oral thrombin inhibitor dabigatran etexilate in patients with non-valvular atrial fibrillation from the RE-LY trial [J]. J Thromb Haemost, 2011, 9 (11): 2168-2175.
- [3] 屠莹,陈丽娟,王平. HPLC 测定达比加群酯中的有关物质 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33 (9): 1165-1170.
- [4] Go AS, Hylek E M, Phillips K A, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study [J]. JAMA, 2001, 285 (18): 2370-2375.
- [5] Reilly P A, Lehr T, Haertter S, et al. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY trial (randomized evaluation of long-term anticoagulation therapy) [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63 (4): 321-328.
- [6] 孙敏,刘鹏,付晓丽,等. HPLC 测定大鼠血浆中达比加群的浓度 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22 (10): 1206-1209, 1221.
- [7] 向志雄,马文狄,夏广新. Beagle 犬血浆中达比加群的 UPLC-MS/MS 法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2015, 46 (10): 1096-1099.
- [8] 韩舒,谷元,张爱杰,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中的达比加群 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20 (12): 1354-1359, 1372.
- [9] Delavenne X, Moracchini J, Laporte S, et al. UPLC MS/MS as-

say for routine quantification of dabigatran-a direct thrombin in- (1): 152-156.
hibitor-in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 58
