

- chronic hepatitis B-related liver damage by promoting hepatocyte growth via ACVR2B [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22 (9): 4534-4544.
- [10] Mahkamova K, Latar N M, Aspinall S, et al. Side population cells in anaplastic thyroid cancer and normal thyroid [J]. Exp Cell Res, 2019, 374 (1): 104-113.
- [11] Hotfilder M, Mallela N, Seggewi J, et al. Defining a characteristic gene expression set responsible for cancer stem cell-like features in a sub-population of ewing sarcoma cells CADO-ES1 [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (12): E3908.
- [12] Xu Y, Xie Y, Wang X, et al. Identification of cancer stem cells from hepatocellular carcinoma cell lines and their related microRNAs [J]. Oncol Rep, 2013, 30 (5): 2056-2062.
- [13] Huang K, Zhu Y, Ma Y, et al. BMI1 enables interspecies chimerism with human pluripotent stem cells [J]. Nat Commun, 2018, 9 (1): 4649.
- [14] Zhang X, Wei C, Li J, et al. MicroRNA-194 represses glioma cell epithelial to mesenchymal transition by targeting Bmi1 [J]. Oncol Rep, 2017, 37 (3): 1593-1600.
- [15] 张杨, 杨琰, 曹钧. 微小 RNA-194 对肝癌细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35 (5): 842-844.

• 基础研究 •

HPLC-MS/MS 法测定人血浆中利伐沙班的浓度

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 高红瑾 阳丽梅

【摘 要】 目的 建立人血浆中利伐沙班 (rivaroxaban) 的高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 法测定的方法, 并对其进行方法学验证。**方法** 血浆样品采用乙腈直接沉淀, 选择盐酸氨溴索作为内标物。采用菲罗门 Kinetex 2.6u C18 100A (50×2.10 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈: 水 (30: 70) 用甲酸调 pH 至 3.0, 流速 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 电喷雾离子源 (ESI) 正离子检测方式, 选择多重反应监测模式进行测定, 用于定量的离子对分别为利伐沙班质荷比 (m/z) 436.0/144.9、盐酸氨溴索 m/z 379.0/263.9。**结果** 利伐沙班在 2.5~500 ng/mL 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 定量下限是 2.5 ng/mL; 日内、日间相对标准偏差 (RSD) 0.29%~2.38%, 相对误差 (RE) -0.59%~0.90%, 基质效应 97.76%~100.41%, 提取回收率为 98.64%~102.84%。血浆样品在室温放置 24 h、-20 °C 反复冻融 3 次以及 -80 °C 冷冻 30 d, 不影响利伐沙班含量测定。**结论** 本研究建立的 HPLC-MS/MS 法测定利伐沙班血药浓度, 具有简便、快速、准确, 适用于临床常规监测及药动力学研究等特点。

【关键词】 利伐沙班; HPLC-MS/MS 法; 血药浓度

【中图分类号】 R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)06-0145-04

Determination of rivaroxaban concentration in human plasma by HPLC-MS/MS CHEN Min, GAO Hongjin, YANG Limei. Department of Pharmacy, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To establish a HPLC-MS/MS method to determinate rivaroxaban concentration in human plasma, and the method was verified by methodology. **Methods** Plasma samples by acetonitrile precipitation were to be determined by using ambroxol hydrochloride as Internal Standard (IS). The chromatographic column was Kinetex 2.6u C18 100A (50×2.10 mm, 1.8 μm), and the mobile phase using water (adjust pH to 3.0 with formic acid)-acetonitrile (70: 30) with flow rate of 0.3 mL/min. The mass spectrometer was operated in positive electron spray ionization (ESI) and multiple response monitoring patterns, m/z 436.0/144.9 and m/z 379.0/263.9 were used for the measurement of rivaroxaban and ambroxol hydrochloride, respectively. **Results** Rivaroxaban was linear in the range of 2.5 to 500 ng/mL, and the quantification lower limit of rivaroxaban was 2.5 ng/mL. The intra-day and inter-day precisions (relative standard deviation, RSD) were 0.29% to 0.38%, the accuracy was between -0.59% and 0.90%. The matrix effect was in the range of 97.76% to 100.41%, and the absolute recovery was in the range of 98.64% to 102.84%. The plasma samples were stable under conditions including placing at room temperature for 24 h, repeated freezing and thawing at -20 °C for 3 times, and freezing at -80 °C for 30 days. **Conclusion** The HPLC-MS/MS method established in our study is convenience, accurate and rapid for the determination of rivaroxaban in blood, which is applicable for the routine monitoring and PK study of rivaroxaban.

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

利伐沙班 (rivaroxaban) 即 5-氯-N-(((5S)-2-氧代-3-(4-(3-氧代吗啉-4-基)苯基)-1,3-噁唑啉-5-基)甲基)

噻吩-2-甲酰胺, 属于直接 Xa 因子抑制剂, 由拜耳医药保健有限公司开发用于抗凝治疗, 预防血栓形成, 与传统抗凝药

相比,其疗效确切、使用方便,有望作为肝素和维生素 K 拮抗剂的替代药物。主要用于防治各种急、慢性血栓栓塞性疾病,以及心房颤动患者脑卒中的预防、急性冠状动脉综合征二级预防、内科住院患者静脉血栓栓塞(VTE)的预防等。为了解利伐沙班的药代动力学特征,准确地测定患者的血药浓度至关重要,需要建立一个快速、准确、稳定的定量分析方法。本试验采用直接沉蛋白法,建立高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)方法测定利伐沙班的血药浓度,为将来进一步开展体内研究提供技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与设备:美国 Agilent 高效液相色谱仪,1200;美国 Agilent 三重四级杆质谱仪,6410B;色谱柱:菲罗门 Kinetex 2.6u C18 100A (50×2.10 mm, 1.8 μm);美国 Eppendorf 台式离心机,Centrifuge 5430;德国 Sartorius 百万分之一天平, MCM36;美国 Talboys 涡旋混合器, Standard;美国 Millipore 纯水仪, Milli-Q。

1.2 药品与试剂:利伐沙班,批号 D1209AS,纯度>98%,购于大连美仑生物技术有限公司;盐酸氨溴索,批号 D0405AS,购于大连美仑生物技术有限公司;乙腈,色谱纯, J. T. Baker 公司;甲酸,质谱纯, ACS 公司;超纯水为试验室自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:菲罗门 Kinetex 2.6u C18 100A (50×2.10 mm, 1.8 μm);流动相:水:乙腈(70:30)用甲酸调节 pH 至 3.0;流速:0.3 mL/min;柱温:35℃;分析时间:3 min;进样量:5 μL。

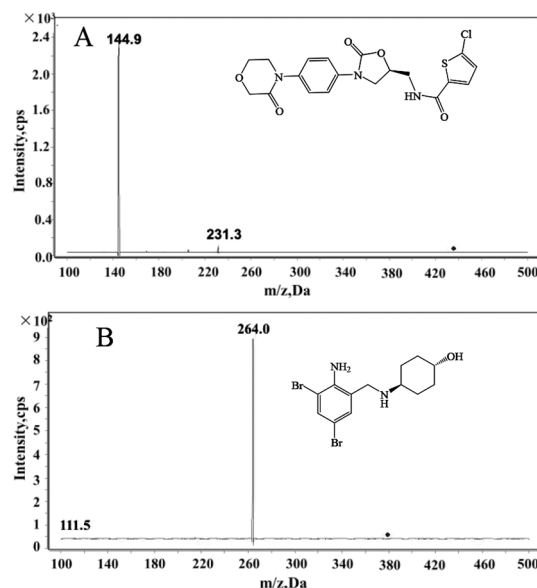
2.2 质谱条件:1) 离子源:电喷雾离子源(ESI);2) 离子检测方式:多重反应监测模式(MRM);3) 离子极性:正离子;离子源电压:4 000 V;干燥气温度 350℃;干燥气为氮气,压力 40 psi,流速 9 L/min。用于定量的离子对分别为利伐沙班质荷比(m/z) 436.0/144.9,碰撞能 33 eV,碎裂电压 153 V;盐酸氨溴索 m/z 379.0/263.9,碰撞能 25 eV,碎裂电压 79 V。利伐沙班和盐酸氨溴索的二级质谱(MS2)图谱见图 1。

2.3 溶液的配制:

2.3.1 标准液的配制:精密称取利伐沙班标准品 1.134 mg 至 10 mL 容量瓶中,加入二甲基亚砜(DMSO)适量溶解并定容至刻度,得到 113.4 μg/mL 的溶液,精密量取 1 mL,加 DMSO 稀释至 100 mL,得到 1.134 μg/mL 的母液。准确量取利伐沙班母液,用健康人枸橼酸抗凝空白血浆为溶剂,逐级稀释配制成 2.5、5、10、25、50、100、250、500 ng/mL 的利伐沙班标准溶液。

2.3.2 内标盐酸氨溴索的配制:精密称取盐酸氨溴索 1.433 mg 至 10 mL 容量瓶中,加入 DMSO 适量溶解并定容至刻度,得到 143.3 μg/mL 的溶液,精密量取 1 mL,加 DMSO 逐级稀释至浓度为 143.3 ng/mL 的内标溶液。

2.3.3 血浆样品处理方法:将血浆样品置于室温下溶解并充分混匀,取 100 μL 血浆样品及 100 μL 内标溶液置于 1.5 mL 聚丙烯离心(EP)管中,加入 300 μL 乙腈,涡旋震荡 30 s,在室温下,10 000 rpm 离心 10 min,取上清进样分析。



注: A, 利伐沙班; B, 盐酸氨溴索

图 1 利伐沙班和盐酸氨溴索 MS2 图谱

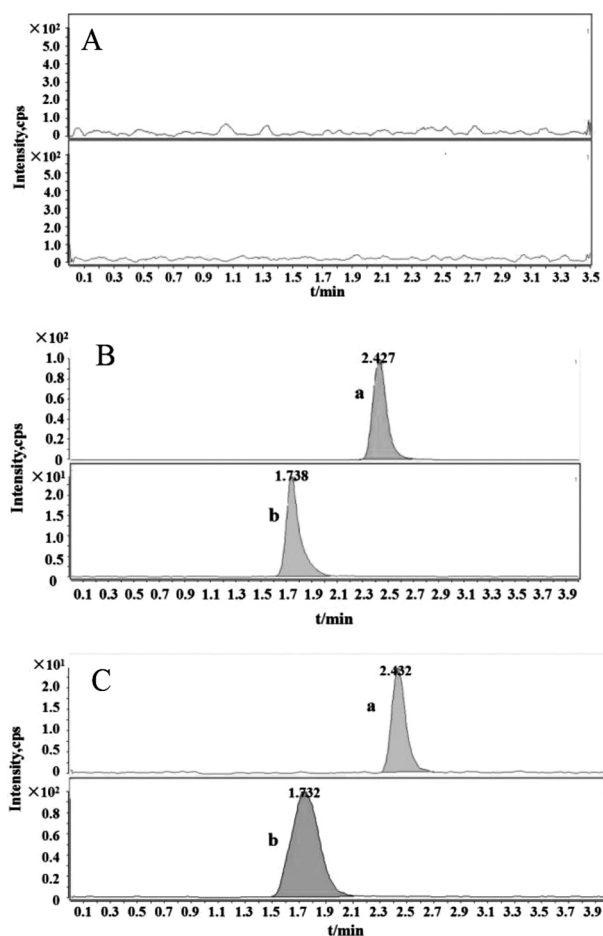
2.4 方法学验证:

2.4.1 专属性考察:分别取 6 名来源不同的空白人血浆 100 μL,除不加待测物和内标外(乙腈补足),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利伐沙班、内标 100 μL,涡旋 30 s,配成空白及血浆中分别含利伐沙班、内标血浆样品,按照“血浆样品处理方法”项下“加入 300 μL 乙腈”起操作处理,测定。利伐沙班和盐酸氨溴索的典型多重反应监测(MRM)色谱图如图 2 所示,在本试验条件下,空白血浆样品对利伐沙班和盐酸氨溴索不存在内源性干扰,专属性良好。

2.4.2 线性范围和定量下限:精密加入不同浓度的利伐沙班标准溶液及内标 100 μL,加入空白血浆 100 μL,涡旋混匀,配成 2.5、5、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,按“血浆样品处理”项下“加入 300 μL 乙腈”起操作,处理后测定。记录色谱图,计算利伐沙班与内标物盐酸氨溴索的峰面积比值,以其比值(Y)为纵坐标,血药浓度(X, ng/mL)为横坐标,用加权最小二乘法(权重为 1/x²)进行线性回归,可得线性回归方程及其相关系数(r),并绘制标准曲线。结果表明:利伐沙班浓度在 2.5~500 ng/mL 范围内,与峰面积比值有良好的线性关系,线性方程为:Y = 0.003 3X - 0.002 1, r 值为 0.999 9。将利伐沙班和盐酸氨溴索溶液用乙腈稀释至不同浓度,通过信噪比(SNR)确定最低检测浓度(LLQ),结果利伐沙班在浓度为 0.1 ng/mL 时 SNR = 9;盐酸氨溴索在浓度为 0.2 ng/mL 时 SNR = 7.9。

2.4.3 准确度和精密度:按“2.3.3”项下制备血浆浓度为 5、100、400 ng/mL 的质量控制(QC)样品(分别为样品 1、样品 2、样品 3),每一个浓度进行 6 个样本分析,连续测定 3 天,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精密度,准确度用相对误差(RE)表示,精

确度用相对标准偏差 (RSD) 表示。日内、日间 RSD 值在 0.29%~2.38% 之间, 精密密度良好, RE 在 -0.59%~0.90% 之间, 结果见表 1。



注: A, 空白血浆; B, 空白血浆+利伐沙班 (a)+盐酸氨溴索 (b); C, 服用利伐沙班患者血浆血样+盐酸氨溴索; a, 利伐沙班; b, 盐酸氨溴索。

图 2 利伐沙班和盐酸氨溴索的典型 MRM 色谱图

表 1 人血浆中利伐沙班的日内和日间精密密度与准确度 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

名称	实际浓度/ (ng/mL)	测定浓度/ (ng/mL)	RE/ %	RSD/%	
				日内	日间
样品 1	5	5.03±0.11	0.60	2.27	2.38
样品 2	100	99.41±1.68	-0.59	1.69	1.21
样品 3	400	403.58±2.48	0.90	0.61	0.29

2.4.4 基质效应: 用超纯水替换人体血浆并按“2.3.3”项方法操作, 分别将利伐沙班制备成 5、100、400 ng/mL (含 143.3 ng/mL 的内标) 的质控样品各 6 份后, 测定并记录利伐沙班和内标的峰面积 A; 分别取 6 个不同批次的空白血浆 100 μ L 置于 1.5 mL EP 管中, 不加标准溶液及内标溶液, 按“2.3.3”项方法操作, 取血液上清, 分别加入低、中、高 3 个浓度标准溶液 100 μ L 和内标溶液 100 μ L, 涡旋震荡 30 s, 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清液进样分析, 记录待

测物和内标的色谱峰面积 B, 以 $B/A \times 100\%$ 计算基质效应。试验结果见表 2。

2.4.5 提取回收率: 按“2.3.3”项方法操作制备利伐沙班 5、100、400 ng/mL (含 143.3 ng/mL 的内标) 的质控样品 (n=6), 取 5 μ L 进样, 记录待测物和内标的色谱峰面积 C, 以 $C/A \times 100\%$ 计算回收率。试验结果见表 2。

表 2 人血浆中利伐沙班及内标的基质效应及提取回收率 (n=6)

名称	基质效应		提取回收率	
	B/A	RSD/	C/A	RSD/
	%, $\bar{x} \pm s$	%	%, $\bar{x} \pm s$	%
利伐沙班				
5 ng/mL	100.29±3.16	3.15	98.64±3.98	4.04
100 ng/mL	97.76±1.16	1.19	102.84±2.12	2.06
400 ng/mL	100.41±0.57	0.56	102.42±1.64	1.60
内标				
143.3 ng/mL	99.00±1.69	1.71	103.34±1.54	1.49

2.4.6 稀释效应: 制备浓度为 1 μ g/mL 的质控人血浆样品, 用空白血浆稀释 10 倍进行测定, 其余按“2.3.3”项下处理并进样分析, 重复操作测定 6 次。对其稀释效应进行研究。结果显示稀释 10 倍后 (浓度 113.9 ng/mL, 重复测定 6 次, 测得值平均 109.42 ng/mL, RSD 为 0.92%, RE 为 3.51%)。

2.4.7 样品稳定性: 制备 5、100、400 ng/mL 的利伐沙班血浆样品 (分别为样品 1、样品 2、样品 3), 分别考察室温放置 24 h、-20 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次、-80 $^{\circ}$ C 冷冻 30 d 的稳定性, 按“2.3.3”项下方法操作后测定, 以标准曲线计算利伐沙班浓度。利伐沙班在室温放置 24 h、-20 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次、-80 $^{\circ}$ C 冷冻 30 d, 结果见表 3。

表 3 利伐沙班在人血浆中的稳定性考察 (n=6)

名称	测定值 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)	准确度/%
样品 1		
室温放置 24 h	4.87±0.07	-2.60
-20 $^{\circ}$ C 冻融 3 次	5.17±0.25	3.40
-80 $^{\circ}$ C 冷冻 30 d	5.22±0.06	4.40
样品 2		
室温放置 24 h	103.07±0.09	3.07
-20 $^{\circ}$ C 冻融 3 次	100.14±0.33	0.14
-80 $^{\circ}$ C 冷冻 30 d	99.87±0.38	-0.13
样品 3		
室温放置 24 h	398.10±0.15	-0.48
-20 $^{\circ}$ C 冻融 3 次	400.72±2.46	0.18
-80 $^{\circ}$ C 冷冻 30 d	402.62±2.46	0.66

3 讨论

关于利伐沙班血药浓度测定, Elebier 等^[1]报道采用 HPLC-UV, 但其灵敏度有限, 亦无法适应药代动力学分析; 与之相比, HPLC-MS/MS 具备特异性高, 选择性和灵敏度好, 线性范围广且操作简便等特点^[2-3], 能快速测定人

血浆中利伐沙班的浓度。因此,本文在综合以上参考文献报道的基础上加以改良,应用 HPLC-MS/MS 法检测利伐沙班血药浓度,为后续临床研究奠定基础。

本研究在预试验过程中,参考相关文献报道^[4-5],选择不同比例的乙腈、甲醇和甲酸水溶液为流动相,结果表明采用乙腈:水(30:70)用甲酸调节 pH 至 3.0,色谱峰峰形良好,响应值高。在血浆提取方法上,固相萃取法^[1]成本高且操作较繁琐而本试验直接采用乙腈沉淀血浆蛋白的方法操作简单且灵敏度可满足要求。此外,由于盐酸氨溴索与利伐沙班具有相似的色谱特性,本试验选用盐酸氨溴索作为内标物,在分离度以及保留时间方面均优于文献报道的茶苯海明^[6]。

本试验所建立的 HPLC-MS/MS 法测定利伐沙班血药浓度,简便、快速、准确,适用于临床常规监测和药动学研究。

参考文献

[1] elebier M, Reber T, Koak E, et al. Determination of Rivaroxaban in Human Plasma by Solid-Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography [J]. J Chromatogr Sci, 2015, 54

(2): 216-220.

[2] Lagoutte-Renosi J, Le Poupon J, Girard A, et al. A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, rivaroxaban in human plasma [J]. J Chromatogr B, 2018, 1100-1101: 43-49.

[3] Shaikh K, Mungantiwar A, Halde S, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of rivaroxaban in human plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. Eur J Mass Spectrom, 2019 (9): 1-15.

[4] Matos D P B, Rentas S L, Fernandes D A V, et al. Determination of rivaroxaban in patient's plasma samples by anti-Xa chromogenic test associated to High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) [J]. PLoS One, 2017, 12 (2): e0171272.

[5] Rohde G. Determination of rivaroxaban-a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor-in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2008, 872: 43-50.

[6] 朱逢佳,沈琦,黄越,等.利伐沙班在老年非瓣膜性房颤患者中的药动学研究[J].中国现代应用药理学,2016,23(8): 978-981.

• 基础研究 •

IL-10 对脓毒症大鼠心肌损伤保护作用的实验研究

福建省肿瘤医院 ICU (福州 350014) 翁金森 林静萍 叶 勇¹ 黄洁萍² 林 艳 王 锋³ 刘景福

【摘要】 目的 探讨 IL-10 对脓毒症大鼠心肌损伤保护作用及其机制。方法 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组(sham 组)、模型对照组(CLP 组)和 IL-10 干预组各 16 只。采用盲肠结扎穿刺法(CLP)造模。IL-10 干预组于造模成功后 0.5 h 经尾静脉注入重组人 IL-10 1 μg,术后 12、24 h 用 ELISA 法检测血浆中 TNF-α、IL-1 及 cTnI 的含量,术后 24 h 取大鼠心肌组织,用 Tunel 法检测心肌细胞凋亡。结果 脓毒症大鼠血浆中 TNF-α、IL-1 及 cTnI 表达明显增多,并于 12 h 达高峰;IL-10 干预组术后 12、24 h 血浆中 TNF-α、IL-1 及 cTnI 表达较 CLP 组明显降低 ($P < 0.01$)。IL-10 干预组术后 24 h 心肌细胞凋亡明显高于 sham 组,但低于 CLP 组 ($P < 0.05$)。结论 脓毒症可诱导大鼠 TNF-α、IL-1 的表达,导致其心肌损伤的发生,cTnI 表达的上调,使大鼠心肌细胞的凋亡增加;IL-10 可通过下调脓毒症大鼠 TNF-α、IL-1 表达,减轻炎症反应,减少心肌细胞损伤及凋亡,从而保护心肌组织。

【关键词】 IL-10; 脓毒症心肌损伤; TNF-α; IL-1; cTnI; 细胞凋亡

【中图分类号】 R542.2 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2019)06-0148-03

脓毒症是由细菌、创伤等因素引发并导致的全身炎症反应综合征,常引起多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)及机体的内环境紊乱。据报道,全球每年新发脓毒症患者约 3 150 例,其中死亡约 530 万例。据我国流行病学调查显示,ICU 患者的脓毒症患病率为 37.3%。脓毒症不仅是 ICU 患者主要死亡因素之一,而且严重影响存活脓毒症患者的远期生活质量。心肌损伤及继发的功能不全为脓毒症严重的并发症之一,具有高发病率、

高致死率的特点,对人类的健康造成严重的危害。脓毒症心肌损伤机制复杂,目前普遍认为炎症反应是脓毒症心肌损伤的一个重要因素。研究发现,TNF-α、IL-1 等多种炎症因子参与了心肌损伤^[1]。IL-10 是一种重要的细胞因子,其主要功能为限制及终止炎症反应,即通过抑制 TNF-α 及 IL-1 等炎症因子的分泌从而对炎症反应有抑制作用^[2];但 IL-10 对脓毒症心肌损伤的影响尚不清楚。本研究建立大鼠脓毒症模型,经尾静脉注射 IL-10,采用 ELISA 法检测大鼠血浆 TNF-α、IL-1 及 cTnI 含量,Tunel 法检测其心肌细胞凋亡情

1 通信作者,副主任医师,Email: wjs5227705@sina.com.cn; 2 福建医科大学附属协和医院急诊内科; 3 福建医科大学神经生物学中心