

HPLC 法测定注射用比伐芦定的含量及有关物质

段银 张睿懿 孙继福 李勇 张伟 (昆明龙津药业股份有限公司 昆明 650503)

摘要 **目的:** 建立测定注射用比伐芦定含量和有关物质的 HPLC 方法。**方法:** 方法采用 Phenomenex Kinetex XB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,2.6 μm) 色谱柱,以三氟乙酸-水-四氢呋喃-乙腈(2:800:100:100)为流动相,流速0.6 ml·min⁻¹,柱温 50℃,检测波长 210 nm,进样体积 10 μl。**结果:** 在该色谱条件下,主峰与有关物质均能得到良好分离,主峰和各有关物质在测定的浓度范围内线性关系良好(*r* 值范围0.999 1~1.000 0);比伐芦定和 5 种有关物质(BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA、Plus-Gly-BIVA、Des-Gly-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA、Alpha-Asp⁹-BIVA)的检测限分别为0.238 9,0.166 4,0.297 3,0.309 1,0.312 7,0.410 7 μg·ml⁻¹,平均回收率分别为99.8%,99.6%,99.1%,93.1%,97.5%,102.3%,*RSD* 分别为0.6%,4.1%,2.7%,3.4%,4.3%,1.7%(*n*=9~12)。**结论:** 该方法重复性好、专属性强,可以更加有效控制注射用比伐芦定的质量。

关键词 高效液相色谱法;注射用比伐芦定;含量;有关物质

中图分类号:R927.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2022)12-2255-05

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.12.035

Determination of Content and Related Substances of Bivalirudin for Injection by HPLC

Duan Yin, Zhang Ruiyi, Sun Jifu, Li Yong, Zhang Wei (Kunming Longjin Pharmaceutical Co. Ltd., Kunming 650503, China)

ABSTRACT **Objective:** To establish an HPLC method for the determination of content and related substances of bivalirudin for injection.**Methods:** The analytical column was Phenomenex Kinetex XB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,2.6 μm), and the mobile phase consisted of trifluoroacetic acid-water-tetrahydrofuran-acetonitrile (2:800:100:100) at the flow rate of 0.6 ml·min⁻¹. The column temperature was 50℃ and the detection wavelength was 210 nm. The injection volume was 10 μl. **Results:** Under above conditions, the main peak and the peaks of the related substances were well separated, and they all had good linear relationships (*r* = 0.999 1-1.000 0). The detection limit of bivalirudin and five related substances (BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA, Plus-Gly-BIVA, Des-Gly-BIVA, Beta-Asp⁹-BIVA, Alpha-Asp⁹-BIVA) was 0.238 9, 0.166 4, 0.297 3, 0.309 1, 0.312 7 and 0.410 7 μg·ml⁻¹, respectively; the average recovery was 99.8%, 99.6%, 99.1%, 93.1%, 97.5% and 102.3% with the *RSDs* of 0.6%, 4.1%, 2.7%, 3.4%, 4.3% and 1.7% (*n* = 9-12), respectively. **Conclusion:** The method is reproducible and specific, and can effectively control the quality of bivalirudin for injection.

KEY WORDS HPLC; Bivalirudin for injection; Content; Related substances

比伐芦定(bivalirudin)是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的新型胃肠外抗凝药^[1],是由 20 个氨基酸组成的多肽,氨基酸序列为:D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu,相对分子质量为 2 180^[2]。注射用比伐芦定是一种冻干粉针剂,临床用于经皮冠状动脉介入术(PCI)中的抗凝治疗,与常规肝素相比,注射用比伐芦定用于 PCI 术中起效更快、效果更强^[3],且显著降低大出血风险^[4-6]。国内外各大权威指南对比伐芦定有较高的推荐级别^[7]。目前,中国药典和美国药典(*USP*)均未收载注射用比伐芦定的质量标准,仅有一个论坛标准 PF Online 48 (2)^[8]。该标准采用醋酸钠缓冲溶液在 215nm 进行梯度洗脱,仅定性了 3 个杂质碎片(Fragment [1-11]、Fragment [2-20]和[Asp⁹]-bivalirudin),有关物质种类不全面,而且由于合成工艺不同,产生的有关

物质也不完全相同。本文通过对所测比伐芦定样品杂质谱研究,确定 5 种可能存在的有关物质,分别是 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA、Plus-Gly-BIVA、Des-Gly-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA、Alpha-Asp⁹-BIVA,其氨基酸序列见表 1。建立 HPLC 法同时测定注射用比伐芦定的含量及有关物质的方法,以用于其质量控制。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪、安捷伦 1260 型高效液相色谱仪;梅特勒托利多 XSE105DU 型电子天平、ME104E 电子天平、赛多利斯 SECURA225D-1CN 型电子天平。

比伐芦定对照品(成都圣诺生物制药有限公司提供,批号:C1-006/D1801F02,含量 90.1%);BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 对照品(批号:C1-006a/D1701F04,含量 87.2%)、Plus-Gly-BIVA 对照品(批号:C1-006b/D1902F01,含量 82.1%)、Des-Gly-BIVA 对照品(批

表 1 注射用比伐芦定中各有关物质氨基酸序列及分子式		
名称	氨基酸序列	分子式
BIVA ⁽¹²⁻²⁰⁾ -BIVA	Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH	C ₅₅ H ₇₇ N ₉ O ₁₉
Plus-Gly-BIVA	D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH	C ₁₀₀ H ₁₄₁ N ₂₅ O ₃₄
Des-Gly-BIVA	D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH	C ₉₆ H ₁₃₅ N ₂₃ O ₃₂
Beta-Asp ⁹ -BIVA	D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-β-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH	C ₉₈ H ₁₃₇ N ₂₃ O ₃₄
Alpha-Asp ⁹ -BIVA	D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-α-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH	C ₉₈ H ₁₃₇ N ₂₃ O ₃₄

号; C1-006c/D1701F03, 含量80.8%)、Beta-Asp⁹-BIVA 对照品 (批号: C1-006d/D1803F01, 含量83.3%); Alpha-Asp⁹-BIVA 对照品 (批号: C1-006e/D1801F02, 含量81.4%)均由成都圣诺生物制药有限公司提供;注射用比伐芦定(昆明龙津药业股份有限公司,批号:20190604、20190612、20190614);注射用比伐芦定空白辅料(昆明龙津药业股份有限公司,批号:20190409)乙腈、三氟乙酸、四氢呋喃为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Kinetex XB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 2.6 μm);流动相:三氟乙酸-水-四氢呋喃-乙腈(2 : 800 : 100 : 100);柱温:50℃;流速:0.6 ml · min⁻¹;检测波长:210 nm;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 取比伐芦定对照品、Alpha-Asp⁹-BIVA 对照品、Beta-Asp⁹-BIVA 对照品、Plus-Gly-BIVA 对照品、Des-Gly-BIVA 对照品、BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 各对照品适量,加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含比伐芦定 2mg, Alpha-Asp⁹-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA、Plus-Gly-BIVA、Des-Gly-BIVA、BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 各 10μg 的溶液,作为系统适用性溶液。

2.2.2 混合对照品溶液 精密称取比伐芦定对照品、Alpha-Asp⁹-BIVA 对照品、Beta-Asp⁹-BIVA 对照品、Plus-Gly-BIVA 对照品、Des-Gly-BIVA 对照品与 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 对照品各适量,加水溶解并稀释制成约含比伐芦定 4 μg · ml⁻¹、Alpha-Asp⁹-BIVA10μg · ml⁻¹、Beta-Asp⁹-BIVA4 μg · ml⁻¹、Plus-Gly-BIVA4 μg · ml⁻¹、Des-Gly-BIVA4 μg · ml⁻¹与 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA4 μg · ml⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 有关物质

2.3.1 供试品溶液的配制 取本品适量,加水溶解

并稀释制成每 1ml 中含比伐芦定 2.0mg 的溶液,摇匀,即得。

2.3.2 对照溶液的配制 精密量取供试品溶液 1.0 ml,置 50 ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,精密量取上述溶液2.0 ml,置 20 ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 系统适用性试验 取系统适用性溶液 10 μl,按“2.1”项下的色谱条件进样,记录色谱图,见图 1。BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 与 Plus-Gly-BIVA、比伐芦定与 Des-Gly-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA 与 Alpha-Asp⁹-BIVA 峰之间的分离度应不小于 1.5, Plus-Gly-BIVA 峰高与 Plus-Gly-BIVA 和比伐芦定峰之间的峰谷比应大于 2.0、Des-Gly-BIVA 与 Beta-Asp⁹-BIVA 峰之间的分离度应不小于1.0。

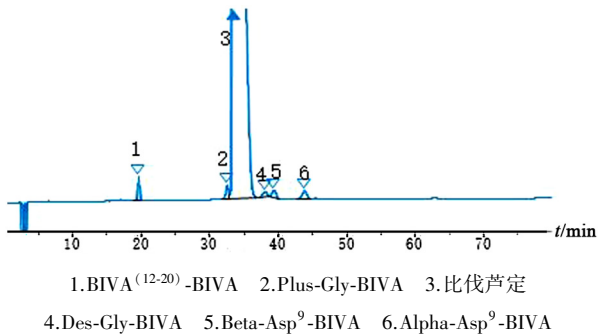


图 1 系统适用性图谱

2.3.4 专属性试验

(1)空白溶剂和辅料:以水为空白溶剂,按照供试品溶液配制的方法制备空白辅料溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图见图 2。结果空白溶剂、空白辅料均不干扰有关物质测定。

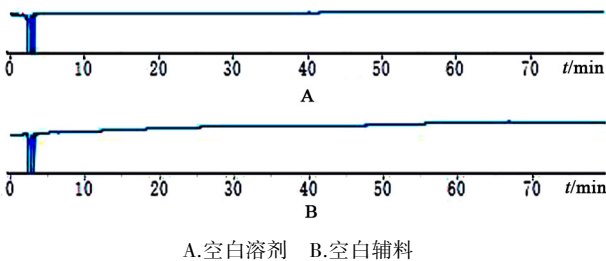


图 2 专属性试验色谱图

(2)强制降解试验:取本品适量(约相当于比伐芦定 20 mg),精密称定,置 10 ml 量瓶中,分别进行如下试验:酸破坏:加入0.1 mol · L⁻¹盐酸溶液1.0 ml,室温放置 1 h,加0.1 mol · L⁻¹的氢氧化钠溶液1.0 ml中和,加水使比伐芦定溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。碱破坏:加入0.1 mol · L⁻¹氢氧化钠1.0 ml,室温放置 5 min,加0.1 mol · L⁻¹的盐酸溶液1.0 ml中和,加水使比伐芦定溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。氧化破坏:加入 30%的过氧化氢溶液1.0 ml,室温避光放置 3 h,

加水稀释至刻度。另取本品适量,分别于高温(60℃)、光照(5 000 lx)条件下放置 8 d 后,精密称取适量(约相当于比伐芦定 20 mg)分别置 10 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度。分别按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。结果表明各降解条件下主峰与降解产物良好分离,物料守恒,均在 90%~110%范围内,方法专属性良好。

2.3.5 定量限和检测限 取比伐芦定、Alpha-Asp⁹-BIVA 对照品、Beta-Asp⁹-BIVA 对照品、Plus-Gly-BI-VA 对照品、Des-Gly-BIVA 对照品与 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BI-VA 对照品适量,精密称定,加溶剂溶解并稀释制成检测信噪比约为 10 倍的溶液,作为定量限溶液;稀释制成检测信噪比约为 3 倍的溶液,作为检测限溶液。试验结果见表 2。

表 2 定量限和检测限试验结果

化合物	定量限		检测限	
	浓度 (μg·ml ⁻¹)	相当于主成分浓度 (%)	浓度 (μg·ml ⁻¹)	相当于主成分浓度 (%)
BIVA ⁽¹²⁻²⁰⁾ -BIVA	0.3328	0.0166	0.1664	0.0083
Plus-Gly-BIVA	0.5946	0.0297	0.2973	0.0149
比伐芦定	0.4778	0.0239	0.2389	0.0119
Des-Gly-BIVA	0.6183	0.0309	0.3091	0.0155
Beta-Asp ⁹ -BIVA	0.6254	0.0313	0.3127	0.0156
Alpha-Asp ⁹ -BIVA	0.8213	0.0411	0.4107	0.0205

2.3.6 溶液稳定性 照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,混合对照品溶液于室温放置的第 0,2,4,17,20,24,45 h,供试品溶液于低温 5℃条件下放置的 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18 h,按“2.1”项下色谱条件进样分析,结果混合对照品溶液于室温放置的 45 h 内稳定,各杂质对照品峰面积的 *RSD* 在 0.54%~1.06%之间(*n*=7);供试品溶液在低温 5℃条件下 18 h 时,未增加新杂质,含量最大差值在 0.007%~0.032%范围内,均小于 0.05%,说明供试品溶液于低温 5℃条件下放置的 18 h 内稳定。

2.3.7 线性关系试验 精密称取 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA

对照品,Plus-Gly-BIVA 对照品,比伐芦定对照品,Des-Gly-BIVA 对照品、Beta-Asp⁹-BIVA 对照品与 Alpha-Asp⁹-BIVA 对照品各约 12 mg,置 100 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为线性储备液。精密量取线性储备液 0.5,0.8,1.0,1.2 和 1.5 ml,各置 10 ml 量瓶中,加水定容至刻度,再分别配制一份各对照品的定量限浓度。按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。以各色谱峰面积(*Y*)为纵坐标,样品浓度(*X*)为横坐标,进行线性回归,试验结果见表 3。

2.3.8 校正因子试验 取线性方程斜率进行校正因子计算,杂质 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA, Plus-Gly-BIVA, Des-Gly-BIVA, Beta-Asp⁹-BIVA 与 Alpha-Asp⁹-BIVA 的校正因子均为 1.0。

2.3.9 重复性试验 取本品,按“2.2”项下方法配制供试品溶液和对照溶液,平行制备 6 份,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。已知杂质按外标法以峰面积计算,未知杂质和总杂按主成分自身对照法进行计算。测得 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA、Alpha-Asp⁹-BIVA 和其他总杂的平均含量分别为 0.100%,0.034%和 0.371%, Plus-Gly-BIVA、Des-Gly-BIVA 和 Beta-Asp⁹-BIVA 未检出,*RSD* 小于 2.0% (*n*=6),表明方法重复性良好。

2.3.10 中间精密度 另一实验员于不同日期,采用不同液相色谱仪,照“2.3.9”项下配制同一批供试品溶液,进行测定,各杂质含量的 *RSD* 最大值为 6.4% (*n*=12),含量最大差值为 0.011%,表明该方法中间精密度良好。

2.3.11 回收率试验 杂质对照品贮备液:取对照品 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 对照品、Plus-Gly-BIVA 对照品、Des-Gly-BIVA 对照品、Beta-Asp⁹-BIVA 对照品、Alpha-Asp⁹-BIVA 对照品各适量,分别配制成含杂质 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA、Plus-Gly-BIVA、Des-Gly-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA 各约 40 μg·ml⁻¹ 的溶液,含杂质 Alpha-Asp⁹-BIVA 约 100 μg·ml⁻¹ 的溶液。

取注射用比伐芦定适量(约相当于比伐芦定 20 mg),置 10 ml 量瓶中,分别加杂质对照品贮备液各 0.8,1.0,1.2 ml,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,平行配制 3 份。

表 3 线性关系考察及校正因子试验结果

化合物	线性方程	<i>r</i>	线性范围(μg·ml ⁻¹)	校正因子
BIVA ⁽¹²⁻²⁰⁾ -BIVA	$Y=2.111\times10^4X+1.169\times10^3$	0.9999	0.4811~16.04	1.0
Plus-Gly-BIVA	$Y=2.129\times10^4X+6.063\times10^2$	0.9998	0.9000~15.00	1.0
比伐芦定	$Y=2.066\times10^4X+4.017\times10^3$	0.9993	0.4922~16.41	/
Des-Gly-BIVA	$Y=2.125\times10^4X+3.785\times10^2$	0.9996	0.8835~14.73	1.0
Beta-Asp ⁹ -BIVA	$Y=2.067\times10^4X+2.724\times10^3$	0.9991	0.9154~15.26	1.0
Alpha-Asp ⁹ -BIVA	$Y=2.026\times10^4X-7.747$	0.9995	1.490~14.90	1.0

回收率浓度 4 杂质对照品贮备液: 取 BI-VA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 对照品、Plus-Gly-BIVA 对照品、Des-Gly-BIVA 对照品、Beta-Asp⁹-BIVA 对照品各适量, 分别配制成含杂质 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA、Plus-Gly-BI-VA、Des-Gly-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA 各约 100 μg · ml⁻¹的溶液, 作为回收率浓度 4 贮备液。

回收率浓度 4 溶液: 取注射用比伐芦定适量 (约相当于比伐芦定 40 mg), 置 20 ml 量瓶中, 精密量取各回收率浓度 4 贮备液 2.4 ml 置同一 20 ml 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 平行配制 3 份。

按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 计算回收率。测得 BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA、Plus-Gly-BI-VA、Des-Gly-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA、Alpha-Asp⁹-BI-VA 的平均回收率分别为 99.6%, 99.1%, 93.1%, 97.5%, 102.3%, *RSD* 分别为 4.4% (*n* = 12), 2.7% (*n* = 12), 3.4% (*n* = 12), 4.3% (*n* = 12), 1.7% (*n* = 9)。

2.3.12 有关物质测定 取本品, 分别按“2.3.1”“2.3.2”项下制方法配制供试品溶液和对照溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。同时采用论坛标准 PF Online 48(2)^[8]的色谱条件对 Alpha-Asp⁹-BIVA 进行测定, 结果无明显差异。有关物质测定结果见表 4。

表 4 注射用比伐芦定有关物质测定结果 (% , *n* = 2)

批号	BIVA ⁽¹²⁻²⁰⁾ -BIVA	Plus-Gly-BIVA	Des-Gly-BIVA	Beta-Asp ⁹ -BIVA	Alpha-Asp ⁹ -BIVA
20190604	0.04	—	—	—	0.01/0.02 *
20190612	0.06	—	—	—	0.03/0.04 *
20190614	0.07	—	—	—	0.04/0.04 *

注: —表示未检出; * 为采用论坛标准 PF Online 48(2)的测定结果。

2.4 含量测定

2.4.1 对照品溶液的配制 精密称取比伐芦定对照品适量, 加水稀释制成每 1ml 约含比伐芦定 0.1 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.4.2 供试品溶液的配制 取本品 1 瓶, 加水适量使溶解并定量稀释制成每 1ml 约含比伐芦定 0.1mg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.4.3 系统适用性试验 取“2.2”项下混合对照品溶液 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。BIVA⁽¹²⁻²⁰⁾-BIVA 与 Plus-Gly-BIVA、Plus-Gly-BIVA 与比伐芦定、比伐芦定与 Des-Gly-BIVA、Beta-Asp⁹-BIVA 与 Alpha-Asp⁹-BIVA 峰之间的分离度应不小于 1.5, Des-Gly-BIVA 与 Beta-Asp⁹-BIVA 峰之间的分离度应不小于 1.0, 理论板数按比伐芦定计算应不低于 5 000。

2.4.4 线性关系试验 精密称取比伐芦定对照品适量, 精密称定, 加溶剂溶解并稀释制成每 1 ml 约

含 0.5, 50, 100, 150, 200 μg 的溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进样, 记录色谱图。以各色谱峰面积 (*Y*) 为纵坐标, 样品浓度 (*X*) 为横坐标, 进行线性回归, $Y = 2.235 \times 10^4 X - 5.151 \times 10^4$, *r* = 1.000 0。试验结果表明, 比伐芦定在 0.449 5 ~ 179.8 μg · ml⁻¹ 浓度范围内, 峰面积与浓度线性关系良好。

2.4.5 稳定性试验 分别于室温 0, 8, 17, 21, 25, 28 与 48 h 精密量取对照品溶液、供试品溶液各 10 μl, 按“2.1”项下的色谱条件进样, 记录色谱图。峰面积的 *RSD* 分别为 0.66% 和 0.69% (*n* = 7), 说明对照品溶液与供试品溶液于室温放置的 48h 内稳定性良好。

2.4.6 重复性试验 分别按“2.4.1”“2.4.2”项下方法制备对照品溶液和供试品溶液, 供试品溶液制备 6 份, 按“2.1”项下的色谱条件进样分析, 比伐芦定平均含量为 106.7%, *RSD* 为 0.2% (*n* = 6)。表明方法重复性良好。

2.4.7 中间精密度 另一名实验员于不同日期, 采用不同仪器, 按“2.4.6”项下方法配制同一批供试品溶液, 进行测定, 平均含量为 106.7%, *RSD* 为 0.3% (*n* = 12), 表明该方法中间精密度良好。

2.4.8 回收率试验 分别精密称取比伐芦定对照品约 10, 12, 14 mg 各 3 份, 分别置 100 ml 量瓶中, 再加入处方量的空白辅料, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。按“2.1”项下的色谱条件测定, 计算回收率。结果平均回收率为 99.8%, *RSD* 为 0.6% (*n* = 9)。表明该方法准确度良好。

2.4.9 含量测定 取本品, 分别按“2.4.1”“2.4.2”项下方法配制供试品溶液和对照溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。同时采用论坛标准 PF Online 48(2)^[8]的色谱条件对进行含量测定, 结果无明显差异。见表 5。

表 5 注射用比伐芦定含量测定结果 (% , *n* = 5)

批号	本文方法	论坛标准 PF Online 48(2) 方法
20190604	108.3	108.51
20190612	99.4	101.09
20190614	99.9	100.47

3 讨论

采用 USP PF Online 48(2) 和相关文献^[9,10] 的色谱条件, 以醋酸钠缓冲溶液在 215 nm 梯度洗脱或以磷酸二氢钠溶液在 210 nm 进行梯度洗脱, 5 个有关物质间的分离较差, 且柱效降低较快, 色谱柱使用寿命较短。各杂质与主成分浓度较低时分离良好; 提高主成分浓度, 杂质在限度浓度时, 主峰前后杂质峰与主峰间的分离较差, 杂质与主成分同时洗脱。

多肽是由氨基酸组成, 用 HPLC 进行分离时最

常用的酸是三氟乙酸,三氟乙酸可以改善峰形、降低短波长处的背景吸收^[11],改善多肽对色谱柱的吸附问题^[12];同时加入四氢呋喃,可以改善峰形与分离度^[11]。故本文采用三氟乙酸-乙腈-水系统进行方法摸索,发现三氟醋酸-水-四氢呋喃-乙腈(2:800:100:100)作为流动相时,杂质分离效果好,色谱峰基线平稳,故确定将该流动相用于其含量及有关物质测定。

本试验建立的 HPLC 测定注射用比伐芦定中比伐芦定含量及有关物质方法,操作简单,准确度高,选择性好,可用于注射用比伐芦定的质量控制。

参 考 文 献

1 尤国皎,都丽萍,陈跃鑫,等.我国已上市新型抗凝药物的特点及临床应用进展[J].临床药物治疗杂志,2017,15(1):1-7
2 边素艳,盖鲁粤.直接凝血酶抑制剂比伐芦定临床研究进展[J].中国介入心脏病学杂志,2007,15(3):178-180
3 马岚,姚义安,李继敏,等.国产注射用比伐芦定对冠状动脉介入治疗患者凝血功能的影响[J].中国心血管杂志,2012,17(3):189-192
4 Stone GW, Witzenbichler B, Guagliumi G, et al. Bivalirudin dur-

ingprimary PCI in acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2008, 358(21): 2218-2230
5 Stone GW, White HD, Ohman EM, et al. Bivalirudin inpatients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: A subgroup analysis from the acute catheterization and urgent intervention triage strategy (ACUITY) trial[J]. Lancet, 2007, 369(9565): 907-919
6 Lincoff AM, Bittl JA, Harrington RA, et al. Bivalirudin andprovisional glycoprotein II b/III a blockade compared with heparin and planned glycoprotein II b/III a blockade during percutaneous coronary intervention: REPLACE-2 randomized Trial[J]. JAMA, 2003, 289(7): 853-863
7 秦珊,胡欢,李屏.比伐芦定在急性冠脉综合征介入治疗中的意义[J].世界最新医学信息文摘,2020,20(39):34-35
8 USP. PF Online 48(2).Bivalirudin for Injection[S].2022
9 王长平,张莉,王森,等.反相 HPLC 法测定注射用比伐芦定中 6 种有关物质[J].沈阳药科大学学报,2018,35(5):367-372
10 张勇纯,周剑波,衣春,等.反相高效液相色谱法测定注射用比伐芦定中的[Asp9]-比伐芦定[J].临床医药文献杂志,2018,5(75):8-11
11 Lloyd RS,Joseph JK,John WD.现代液相色谱技术导论[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2012:285,142
12 刘翻,熊志超,张凌怡,等.高效液相色谱柱清洗与再生[J].分析测试技术与仪器,2010,16(2):71-77

(2022-05-19 收稿 2022-09-14 修回)

HPLC-MS/MS 法测定人血清中达托霉素的方法研究及临床应用

郑香宜 吴建华 张柳 吴东方 (武汉大学中南医院 武汉 430071)

摘 要 目的:建立 HPLC-MS/MS 法测定人血清中达托霉素浓度,并应用于临床患者达托霉素血药浓度监测。**方法:**以达托霉素-d5 为内标,甲醇、乙腈沉淀蛋白法处理样品。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC C₈柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm)柱;流动相为 A 相:水+0.1%甲酸、B 相:1:1 甲醇:乙腈+0.1%甲酸;流速0.4 ml·min⁻¹;柱温 45℃;电喷雾离子化正离子模式,多反应离子监测(MRM)扫描方式进行监测,用于定量分析的离子反应分别是达托霉素 m/z 810.70→m/z 159.05、m/z 810.70→m/z 313.30、m/z 810.70→m/z 341.05,达托霉素-d5(内标物)m/z 813.50→m/z 163.2、m/z 813.50→m/z 317.2;进样量 2 μl;分析时间为 4 min。**结果:**人血清中达托霉素浓度在 1~200 μg·ml⁻¹线性关系良好(r=0.999 5),定量下限为0.05 μg·ml⁻¹。低、中、高浓度达托霉素的提取回收率均>90%,方法回收率>80%,日内、日间精密度 RSD 均<15%。**结论:**本研究建立的检测达托霉素在血清中浓度的 LC/MS-MS 方法符合生物样品测定要求,适用于临床达托霉素血药浓度检测。

关键词 达托霉素;高效液相色谱串联质谱;血药浓度

中图分类号:R969.1 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2022)12-2259-06

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.12.036

Validation of HPLC-MS/MS for the Determination of Daptomycin in Human Serum and Its Clinical Application

Zheng Xiangyi, Wu Jianhua, Zhang Liu, Wu Dongfang (Department of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC-MS/MS method for the determination of daptomycin in human serum and apply it to clinical detection. **Methods:** Serum samples were analyzed by LC-MS/MS after protein precipitation by methanol and acetonitrile, and daptomycin-d5 was used as the internal standard. A Waters ACQUITY UPLC C₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm) column was used for the separation. The mobile phase consisted of phase A: water (0.1% formic acid) and phase B: 1:1 methanol: acetonitrile (0.1% formic acid) at a flow rate of 0.4 ml·min⁻¹, the column temperature was at 45℃, the injection volume was 2 μl and the analysis time

通信作者:吴东方 Tel:(027)67813548 E-mail:dfwu2010@ whu.edu.cn