

# LC-MS/MS法测定人血浆中匹伐他汀代谢物匹伐他汀内酯浓度及其药动学研究

唐思<sup>1,2\*</sup>, 夏素霞<sup>1,2#</sup>, 董晓茜<sup>2</sup>, 张世良<sup>2</sup>, 杨瑞<sup>2</sup>(1. 辽宁中医药大学药学院, 沈阳 110032; 2. 辽宁省中医药研究院临床药理实验室, 沈阳 110034)

中图分类号 R969.1; R972<sup>6</sup> 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)02-0219-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.02.26

**摘要** 目的: 建立灵敏、快速的测定人血浆中匹伐他汀代谢物匹伐他汀内酯浓度的方法, 并用于药动学研究。方法: 血浆样品以乙腈处理后, 采用液相色谱串联质谱法进样测定, 其中色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub>, 流动相为水(含 0.2% 甲酸)-乙腈(31:69), 流速为 0.3 ml/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 10 μl。采用电喷雾电离源(ESI), 以多反应监测(MRM)方式进行正离子检测, 用于定量分析的离子分别为  $m/z$  404.2 →  $m/z$  290.2(匹伐他汀内酯)和  $m/z$  350.2 →  $m/z$  127.0(内标, 伏立康唑)。结果: 匹伐他汀内酯血药浓度在 0.708~142 μg/L 范围内线性关系良好, 定量下限为 0.708 μg/L。日内、日间 RSD < 8%, 方法回收率、提取回收率分别为 94.43%~106.81%、85.41%~100.82%。单剂量口服匹伐他汀钙片受试制剂与参比制剂 2 mg 后代谢物匹伐他汀内酯的主要药动学参数  $c_{max}$ 、 $t_{max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0-48 h}$  分别为 (46.14 ± 13.34)、(46.81 ± 15.12) μg/L, (0.88 ± 0.19)、(1.03 ± 0.38) h, (17.26 ± 6.68)、(15.97 ± 6.19) h, (241.04 ± 77.44)、(239.06 ± 81.16) μg·h/L。结论: 该方法灵敏、简便、重复性好, 适用于匹伐他汀代谢物匹伐他汀内酯的临床药动学研究。

**关键词** 匹伐他汀; 匹伐他汀内酯化合物; 液相色谱串联质谱法; 药动学

## Determination of Pitavastatin Lactone Concentration in Human Plasma by LC-MS/MS and Its Pharmacokinetic Study

TANG Si<sup>1,2</sup>, XIA Su-xia<sup>1,2</sup>, DONG Xiao-qian<sup>2</sup>, ZHANG Shi-liang<sup>2</sup>, YANG Rui<sup>2</sup>(1. College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China; 2. Laboratory of Clinical Pharmacology, Liaoning Academe of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a sensitive and rapid method for the concentration determination of pitavastatin lactone in human plasma and study its pharmacokinetics. METHODS: After treated with acetonitrile, the plasma sample was determined by LC-MS. The determination was performed on Agilent Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of water (containing 0.2% formic acid)-acetonitrile (31:69) at the flow rate of 0.3 ml/min. The column temperature was 40 °C, and sample size was 10 μl. Pitavastatin lactone ( $m/z$  404.2 →  $m/z$  290.2) and internal standard voriconazole ( $m/z$  350.2 →  $m/z$  127.0) were quantified by electrospray ionization (ESI) in positive MRM mode. RESULTS: The linear range of pitavastatin lactone was 0.708-142 μg/L. The lower limit of quantification was 0.708 μg/L. RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 8%. Method recovery rate and extraction recovery rate were 94.43%-106.81% and 85.41%-100.82%, respectively. Main pharmacokinetic parameters of pitavastatin lactone after oral single dose of pitavastatin lactone test preparation vs. reference preparation were as follows:  $c_{max}$  (46.14 ± 13.34) μg/L vs. (46.81 ± 15.12) μg/L;  $t_{max}$  (0.88 ± 0.19) h vs. (1.03 ± 0.38) h;  $t_{1/2}$  (17.26 ± 6.68) h vs. (15.97 ± 6.19) h;  $AUC_{0-48 h}$  (241.04 ± 77.44) μg·h/L vs. (239.06 ± 81.16) μg·h/L. CONCLUSIONS: The method is sensitive, simple and reproducible, and can be used for clinical pharmacokinetic study of pitavastatin metabolite pitavastatin lactone.

**KEYWORDS** Pitavastatin; Pitavastatin lactone; LC-MS/MS; Pharmacokinetics

匹伐他汀是日产化学公司和三共公司研究并与诺华公司共同开发的他汀类化合物, 于 1999 年 11 月在日本注册, 属于第三代他汀类化合物。与已上市的其他他汀类药物相比, 匹伐他汀具有更强的降低胆固醇和低密度脂蛋白的作用, 仅有少量的匹伐他汀被细胞色素 P<sub>450</sub>(CYP)2C9 同功酶代谢。匹伐

他汀的主要代谢产物为内酯。在体外, 内酯代谢物又可以水解并开环形成匹伐他汀原型。本试验建立了一种灵敏、简便、快速的液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法, 测定健康受试者在服用匹伐他汀钙片后其代谢物匹伐他汀内酯的血药浓度, 并用于匹伐他汀内酯临床药动学的研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

API 3200 LC-MS/MS 仪, 包括 Analyst Software 数据处理系统(美国 AB SCIEX 公司); XW-80A 微型涡旋混合仪(上海

\* 助理研究员, 硕士研究生。研究方向: 临床药理学。电话: 024-86803171。E-mail: tangsi81@163.com

# 通信作者: 研究员, 硕士生导师。研究方向: 临床药理学。电话: 024-86803043。E-mail: xiasuxiazfq@163.com

沪西分析仪器厂);XS105分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);Sigma3-18k低温高速离心机(德国Sigma公司,离心半径:10 cm)。

## 1.2 药品与试剂

受试制剂:匹伐他汀钙片(四川维奥制药有限公司,规格:每片2 mg,批号:120901);参比制剂:匹伐他汀钙片(Kowa Company, Ltd, Nagoya Factory,规格:每片2 mg,批号:FQ20);匹伐他汀内酯化合物标准品(合肥合源医药科技股份有限公司,批号:20111212,含量:97.25%);内标:伏立康唑标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100862-200701);甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,水为自制超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Agilent Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub>(75 mm×4.6 mm, 2.7 μm);流动相:水(含0.2%甲酸)-乙腈(31:69);流速:0.3 ml/min;柱温:40 ℃;进样量:10 μl。

电喷雾电离源(ESI);气帘气(CUR):20 kPa;离子喷雾电压(IS):3 000 V;碰撞气(CAD):5 kPa;干燥气温度(TEM):700 ℃;正离子方式检测,扫描方式为选择反应监测(MRM),用于定量的离子分别为匹伐他汀内酯化合物[M+H]<sup>+</sup> *m/z* 404.2 → *m/z* 290.2,离子去簇电压(DP):70V,入口电压(EP):4V,碰撞能(CE):38 V;内标伏立康唑[M+H]<sup>+</sup> *m/z* 350.2 → *m/z* 127.0,DP:75 V,EP:12 V,CE:45 V;扫描时间:200 ms。

### 2.2 血浆样品处理

根据文献报道<sup>[1-3]</sup>,匹伐他汀内酯样品处理过程需在避光冰水浴下进行。精密量取血浆100 μl,依次精密加入内标(伏立康唑)溶液10 μl,涡旋混匀,加入乙腈200 μl,涡旋混匀2 min,14 000 r/min离心10 min,取上清液10 μl进样分析。

### 2.3 方法专属性考察

精密量取6名健康受试者的空白血浆100 μl,除不加内标外,按“2.2”项方法操作;将一定浓度的匹伐他汀内酯化合物标准溶液(283.38 μg/L)加入空白血浆100 μl,按“2.2”项方法操作,得匹伐他汀内酯化合物、伏立康唑的保留时间分别为4.8 min和3.7 min左右;取健康受试者口服受试制剂后收集的血浆样品,按“2.2”项方法操作。结果表明,血浆中内源性物质不干扰匹伐他汀内酯化合物和内标的测定。液-质图谱见图1。

### 2.4 标准曲线及定量下限考察

精密量取不同浓度的匹伐他汀内酯化合物标准溶液各10 μl,加入空白血浆100 μl配成血浆中药物浓度分别为0.708、2.83、7.08、14.2、35.4、70.8、142 μg/L的样品,再按“2.2”项方法操作进行检测,记录匹伐他汀内酯化合物峰面积(*A<sub>s</sub>*)与内标峰面积(*A<sub>i</sub>*)。以峰面积比 $y(A_s/A_i)$ 为纵坐标,待测物浓度为横坐标*x*,用最小加权法进行回归计算,求得标准曲线方程为 $y=0.003x+0.036(r=0.9950)$ 。结果表明,匹伐他汀内酯化合物血浆浓度在0.708~142 μg/L范围线性关系良好。在血浆浓度0.708 μg/L水平下,得到信噪比(*S/N*)>10,日内RSD=

5.06%。结果表明,本方法测定血浆中匹伐他汀的定量下限可达0.708 μg/L。

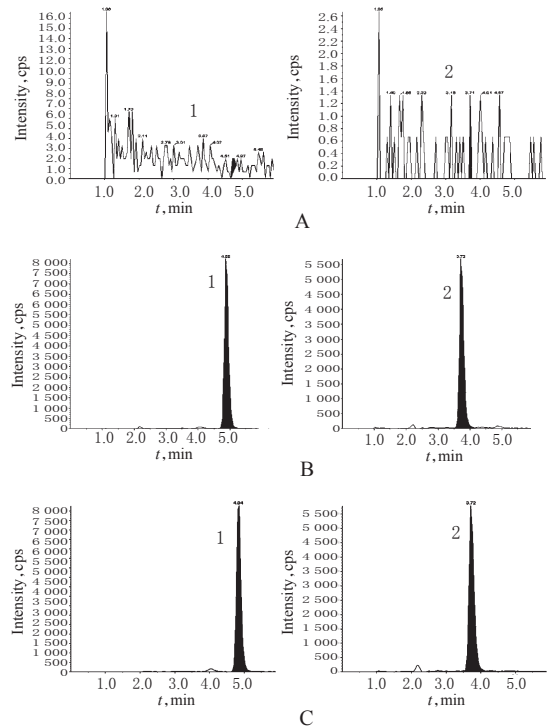


图1 液-质图谱

A. 空白血浆;B.空白血浆+匹伐他汀内酯化合物标准品和伏立康唑化合物标准品;C.1号健康受试者口服受试制剂2 h后的血浆样品;1.匹伐他汀内酯;2.伏立康唑

Fig 1 LC-MS

A. blank plasma; B. blank plasma+ pitavastatin lactone standard+ voriconazole standard; C. 2-hour-plasma sample of healthy volunteer No.1 after oral test preparation; 1. pitavastatin lactone; 2. voriconazole

### 2.5 介质效应

取不同来源的空白血浆100 μl,除不加内标溶液,按“2.2”项方法操作,向获得的上清液中加入匹伐他汀内酯化合物标准溶液(血浆浓度分别为1.42、28.3、113.4 μg/L)10 μl和内标溶液10 μl,混合后取10 μl进行分析(*n*=3);同时另取乙腈加入相同浓度的匹伐他汀内酯化合物标准溶液和内标溶液各10 μl,混合后取10 μl进行分析(*n*=3)。比较两种处理方式下匹伐他汀和内标的峰面积的比值百分比。结果,介质对低、中、高梯度浓度的测定影响百分比均在85%~115%范围内,表明选定的质谱和色谱条件有效地避免了介质效应。

### 2.6 精密度及回收率试验

量取不同浓度的匹伐他汀内酯化合物标准溶液各10 μl,加入空白血浆100 μl配成血浆低、中、高梯度浓度(分别为1.42、28.3、113.4 μg/L)的质控(QC)样品,按“2.2”项方法操作,每一浓度各配制6份样品,测定3 d,根据当日的标准曲线计算QC样品的测得浓度,将QC样品的结果进行方差分析,计算日内与日间精密度。同法以空白血浆,除不加标准系列溶液和

内标外,按“2.2”项下方法处理后,再加入相应浓度的匹伐他汀内酯化合物和伏立康唑,取上清液 10  $\mu\text{l}$  进样,以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。采用 1 天的数据,将匹伐他汀内酯化合物峰面积和内标峰面积的比值代入随行标准曲线,计算所得浓度和加入浓度的比值,计算方法回收率。回收率及精密度试验结果见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果

Tab 1 Results of recovery and precision tests

加入量, $\mu\text{g/L}$	测定量, $\mu\text{g/L}$	回收率		精密度	
		提取回收率, %	方法回收率, %	日内 RSD, %	日间 RSD, %
1.42	1.43 $\pm$ 0.11	85.41	105.62	6.87	7.94
28.34	30.07 $\pm$ 1.24	100.82	106.81	3.89	4.14
113.4	111.34 $\pm$ 6.08	94.21	94.43	6.32	5.46

### 2.7 稳定性考察

经过匹伐他汀内酯化合物低、中、高梯度浓度血浆样品考察发现,避光冰水浴放置 6 h,血浆样品预处理后避光于低温下放置 12 h、反复冻融 3 次及在  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  长期冷冻 39 d,在本试验条件下均保持稳定且 RSD < 15%,符合方法学要求。

### 2.8 临床应用

24 名健康男性受试者,年龄 21~30 岁,试验前经病史询问、体格检查和实验室检查未发现异常,2 周内未服用任何药物。受试期间统一清淡饮食。本试验获得了医学伦理委员会的同意,受试者均签署知情同意书。受试者于试验前 12 h 空腹,随机分为两组,分别于清晨口服参比制剂或受试制剂匹伐他汀片 2 mg,于 0 h 和服药后 20、30、45 min 及 1、1.5、2、4、6、8、15、24、36、48 h,从静脉采血 5 ml。立即低温离心,血浆于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。试验期间无不良事件发生。比较两种制剂主要药动学参数(见表 2)和平均药-时曲线(见图 2),说明这两种制剂匹伐他汀受试制剂的代谢物匹伐他汀内酯在人体的吸收速度和吸收量差异无显著性意义。

表 2 24 名受试者单剂量口服匹伐他汀钙片受试制剂与参比制剂 2 mg 后代谢物匹伐他汀内酯的主要药动学参数 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=24$ )

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters of pitavastatin lactone after single dose of pitavastatin lactone test preparation and reference preparation 2 mg ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=24$ )

药动学参数	受试制剂	参比制剂
$c_{\text{max}}$ , $\mu\text{g/L}$	46.14 $\pm$ 13.34	46.81 $\pm$ 15.12
$t_{\text{max}}$ , h	0.88 $\pm$ 0.19	1.03 $\pm$ 0.38
$t_{1/2}$ , h	17.26 $\pm$ 6.68	15.97 $\pm$ 6.19
$\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	241.04 $\pm$ 77.44	239.06 $\pm$ 81.16
$\text{AUC}_{0-\infty}$ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	267.58 $\pm$ 80.87	266.08 $\pm$ 94.33
$F$ , %	101.99 $\pm$ 9.06	

## 3 讨论

匹伐他汀的主要代谢途径是在 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶存在下发生葡萄糖醛酸化,然后自然脱去葡萄糖苷酸,形成内酯。但人血浆样品的体外研究表明,内酯代谢物在室温条件下极易水解,开环生成匹伐他汀原型<sup>[2]</sup>。匹伐他汀内酯化合物的检

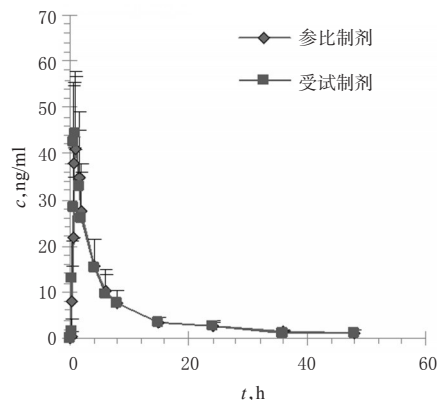


图 2 24 名受试者单剂量口服匹伐他汀钙片受试制剂与参比制剂 2 mg 后代谢物匹伐他汀内酯的平均药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of pitavastatin lactone after single dose of pitavastatin lactone test preparation and reference preparation 2 mg

测方法有文献报道<sup>[1-3]</sup>,但样品处理程序较烦琐,为了保证样品稳定,节省样品预处理的时间,本研究采用沉淀蛋白法对血浆样品进行预处理,上清液不需浓缩,提高了样品分析通量,更适合于大批量生物样品的测定。此外,试验中还考察了甲醇、乙腈为沉淀剂时的回收率,发现乙腈为沉淀剂时回收率高,且与所选用流动相一致,峰形较好。因此,本方法可以进行匹伐他汀内酯化合物的临床药动学研究。

在药动学研究中,本研究结果与文献报道<sup>[1-3]</sup>存在个体差异,据文献报道<sup>[4-5]</sup>可能系受试人群的基因突变的差异导致。

### 参考文献

- [1] Lv H, Sun JG, Wang GJ, *et al.* Determination of pitavastatin in human plasma via HPLC-ESI-MS/MS and subsequent application to a clinical study in healthy Chinese volunteers[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 386(1/2): 25.
- [2] 田蕾,黄一玲,韩璐璐,等.高脂餐对匹伐他汀及其内酯代谢物的人体药动学影响[J]. *中国新药与临床杂志*, 2009, 28(6): 435.
- [3] Tian L, Huang Y, Jia Y, *et al.* Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for pitavastatin and its lactone in human plasma and urine[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 865(1/2): 127.
- [4] 秦小清,曲恒燕,高洪志,等. OATP1B1 基因多态性对匹伐他汀钙在中国汉族健康受试者体内的药代动力学影响[J]. *中国药物应用与监测*, 2011, 8(3): 147.
- [5] Wen J, Xiong Y. OATP1B1 388A > G polymorphism and pharmacokinetics of pitavastatin in Chinese healthy volunteers[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2010, 35(1): 99.

(收稿日期:2014-04-14 修回日期:2014-08-18)

(编辑:李 劲)