·论　著·

辛伐他汀在人、食蟹猴和大鼠血浆中稳定性的种属差异

杨宗涛[1,2,3]，刘爱明[1]，刘飞[4]，戴仁科[1*]（1. 中国科学院广州生物医药与健康研究院，广州 510663；2. 中国科学院华南植物园，广州 510650；3. 中国科学院研究生院，北京 100037；4. 中国科学技术大学，合肥 230026）

摘要：目的　建立 LC-MS/MS 法测定辛伐他汀在食蟹猴血浆中的检测方法学，并比较其在人、食蟹猴和大鼠 3 种动物血浆中的稳定性差异。**方法**　建立 LC-MS/MS 分析食蟹猴血浆辛伐他汀药物浓度的方法学；配制辛伐他汀 3 种动物血浆样品，分别于室温放置 4 h、24 h 及 -80 ℃冻存 1 个月，并定量检测。**结果**　辛伐他汀线性范围为 0.5 ~ 50 μg·L^{-1}，定量下限为 0.5 μg·L^{-1}，相对回收率 99 ~ 109%，日内、日间精密度均小于 6.67%；辛伐他汀在食蟹猴血浆中室温放置 24 h 样品的药物浓度降低 70% 左右；在 SD 大鼠血浆中室温放置 4 h 和 24 h 样品的药物浓度分别降低 75% 和 80% 左右；在人血浆中室温放置 24 h 的样品的药物浓度降低 30% 左右；-80 ℃冻存条件下，除大鼠血浆样品外，其他样品基本稳定。**结论**　所建立的方法适用于小体积实验动物辛伐他汀药动学研究；辛伐他汀在不同动物种属血浆中的稳定性存在很大差异。

关键词：辛伐他汀；血浆稳定性；种属差异；LC-MS/MS
中图分类号：R972.6　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2009)04-0261-04

Species-related Stability Difference of Simvastatin in Human, Cynomolgus Monkey and Rat Plasma

YANG Zongtao[1,2,3], LIU Aiming[1], LIU Fei[4], DAI Renke[1*] (1. *Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, CAS, Guangzhou* 510663, *China*; 2. *South China Botanical Garden, CAS, Guangzhou* 510650, *China*; 3. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100037; 4. *University of Science and Technology of China, Hefei* 230026, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To establish an LC-MS/MS method for the determination of simvastatin in cynomolgus monkey plasma, and compare its stability differences in three species of human, cynomolgus monkey and rat plasma. **METHODS**　Validated LC-MS/MS method was established and used for analysis of simvastatin samples which were prepared in the plasma of three species and stored under different conditions. **RESULTS**　The linearity of calibration curve was 0.5-50 μg·L^{-1} and the limit of quantitation was 0.5 μg·L^{-1}. The inter- and inner- day precision were below 6.67% and the accuracy of the method was 99-109%. Drug concentration of cynomolgus monkey plasma samples being placed 24 h at room temperature decreased 70%, drug concentration of SD rat plasma samples being placed 4 h and 24 h at room temperature decreased 75% and 80%, drug concentration of human plasma samples being placed 24 h at room temperature decreased 30%. Samples frozen at -80 ℃ were mostly stable, except for that of rat plasma samples. **CONCLUSION**　The established method is suitable for the determination of simvastatin in cynomolgus monkey plasma. Stability of simvastatin varies greatly in different plasma and shows species-related differences.

KEY WORDS: simvastatin; plasma stability; species difference; LC-MS/MS

辛伐他汀是 3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶 A 还原酶（3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, HMG-CoA）的竞争性抑制剂，能够减少胆固醇合成，从而降低低密度脂蛋白胆固醇；还能够一定程度的降低甘油三酯和升高高密度胆固醇，临床常用于调整血脂异常[1-2]。除了常规肝脏毒性，其单独应用以及与贝特类药物联合应用临床可以导致肌肉酸痛甚至横纹肌溶解导致死亡[3-4]；其中西立伐他汀就是由于这种肌肉毒性于 2001 年被撤市。为了研究他汀类药物剂量和暴露水平与肌肉毒性发生之间的关系，笔者开展了辛伐他汀在食蟹猴体内药动学研究；研究过程中发现辛伐他汀在不同动物种属中的血浆稳定性存在一定差异。虽然已有大量研究报道了其在人体内的药动学特征，并建立了相应的方法学[5-7]；但

基金项目：国家高技术研究发展(863)计划(2006AA02Z339)、广州市科技局(2006Z1-E4031)和广州经济技术开发区(2006Ss-P067)资助项目

作者简介：杨宗涛，男，硕士，助理研究员　Tel：(020)32290426　E-mail：yang_zongtao@gibh.ac.cn　***通讯作者：**戴仁科，男，博士，研究员　Tel：(020)32290616　E-mail：dai_renke@gibh.ac.cn

关于其在食蟹猴体内药物浓度分析方法学以及稳定性种属差异等问题尚未见报道。由于种属差异在动物模型的选择和药物毒性中扮演重要的角色,因此本文基于食蟹猴血浆建立了辛伐他汀的检测方法学,并深入研究了其在人、食蟹猴和大鼠3个动物种属血浆中的稳定性种属差异,为毒性机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

SCL-10Avp 高效液相系统(Shimadzu),MPS 3C 自动进样器(Gerstel),API 3000 三重四极杆串联质谱仪(Applied Biosystem),SPD2010 离心浓缩系统(Thermo),Analyst1.4.2 数据采集软件(Applied Biosystem),Gerstel Master 1.83b 自动进样器控制软件(Gerstel)。

1.2 试药

辛伐他汀(浙江普洛康裕制药有限公司,批号:KY-SI-M20060502,纯度≥98.5%);洛伐他汀(广东新北江制药股份有限公司,批号:LV0506011,纯度≥99%);甲醇(B&J 公司)、甲酸(Dima 公司)为色谱纯;水为 Millipore 水;人血浆由南方医院血库提供,食蟹猴血浆采自于健康成年食蟹猴(广东蓝岛生物技术有限公司,许可证号:SCXK(粤)2004-001020066025号),大鼠血浆采自于 SD 大鼠(南方医科大学实验动物中心提供,许可证号:粤 20060015)。

2 方法

2.1 LC-MS/MS 条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex(50 mm × 2 mm,5 μm);流速 0.2 mL · min^{-1};进样量为 20 μL;流动相:甲醇(10% 水,0.1% 甲酸)-水(10% 甲醇,0.1% 甲酸);梯度设定:45∶55→100∶0(0.2 ~ 1.2 min),100∶0(1.2 ~ 3.6 min),100∶0→45∶65(3.6 ~ 3.8 min)。

2.1.2 质谱条件

采用 MRM 检测方式;离子源温度 350 ℃;雾化气:12 L · min^{-1};辅助气:6 L · min^{-1};离子喷雾电压:4 500 V;CUR:8 L · min^{-1};DP:39 V(辛伐他汀),51 V(内标);EP:8 V(辛伐他汀),7 V(内标);CE:18(辛伐他汀),17(内标);采集离子对(m/z):419.2/199.1(辛伐他汀),405.3/199.1(内标)。

2.2 溶液的配制

精密称取辛伐他汀、洛伐他汀适量,加乙腈溶解,配成 1 g · L^{-1}的储备液,置于冰箱冷藏备用。

2.3 血浆样品处理

向 150 μL 血浆样品中加入 15 μL 内标洛伐他汀溶液(100 μg · L^{-1}),然后加入 1 mL 乙酸乙酯,涡旋震荡 1.5 min,4 ℃下12 000 r · min^{-1}离心 10 min,取上清 0.8 mL,真空吹干,加入 80 μL 的甲醇-水(50∶50)重溶,4 ℃下 12 000 r · min^{-1}离心 10 min,取上清进样 20 μL。

2.4 人、食蟹猴和大鼠血浆样品的制备

以人、食蟹猴和大鼠空白血浆制备 1、10、40 μg · L^{-1}3 种浓度的辛伐他汀血浆样品($n=9$),并各分为 3 组($n=3$)于室温放置 4 h,24 h 以及在超低温冰箱(-80 ℃)冻存 1 个月,然后按“2.3”项下的方法处理后进样分析,与新鲜配制的样品进行比较。

3 结果

3.1 方法专属性

分别取 6 只食蟹猴的空白血浆 150 μL,不加入内标,按“2.3”项下方法处理,进样 20 μL 分析;将一定浓度的辛伐他汀和内标加入空白血浆中,按照相同的方法操作,进样分析,辛伐他汀的保留时间为 2.92 min,内标保留时间 2.72 min。结果表明,空白血浆中的内源性物质不干扰辛伐他汀及内标的测定。

3.2 线性与范围

取 150 μL 空白血浆 7 份,分别至于 EP 管中,精密加入适量辛伐他汀溶液,配成血浆药物浓度为 0、0.5、1、2、5、10、20、50 μg · L^{-1}的血浆样品,按“2.3”项下的方法处理后进样分析。以辛伐他汀的浓度为横坐标,辛伐他汀与内标洛伐他汀的峰面积比值为纵坐标,用加权法($W=1/x^2$)进行回归运算,典型的线性回归方程为:$Y = 0.111X - 0.000\ 36$,($r = 0.997\ 3$)。结果表明,辛伐他汀的线性范围是 0.5 ~ 50 μg · L^{-1},定量下限浓度为 0.5 μg · L^{-1}。

3.3 准确度和精密度

按“3.2”项下方法制备辛伐他汀高、中、低 3 种浓度的质控(QC)样品($n=5$),连续测定 3 d,并与标准曲线同时进行。以当日标准曲线计算 QC 样品的浓度,将 QC 样品的结果进行方差分析,求算本法的准确度和精密度,结果见表 1。

3.4 提取回收率和基质效应

按“3.2”项下方法制备辛伐他汀高、中、低 3 种浓度的 QC 样品($n=5$)。同时另取空白血浆 150 μL,除不加对照溶液和内标外,按“2.3”项下方法处理,向残渣中加入 15 μL 内标溶液和 15 μL 相应质量浓度的辛伐他汀溶液以及 70 μL 甲醇-水(50∶

50),涡旋混合,制备高、中、低 3 种浓度的基质样品($n=5$),4 ℃下 12 000 r·min^{-1}离心 10 min,进样分析。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率,结果见表 1。

表 1 准确度、精密度、回收率及基质效应试验结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Accuracy, precision, extraction recovery and matrix effect of simvastatin in cynomolgus monkey plasma($n=5, \bar{x} \pm s$)

血浆药物浓度/μg·L^{-1}	准确度/%	精密度		提取回收率/%	基质效应/%
		日内 RSD/%	日间 RSD/%		
1	106 ± 3	3.05	4.74	72 ± 4	60 ± 6
10	101 ± 2	4.99	6.67	68 ± 10	69 ± 4
40	103 ± 1	3.39	3.61	68 ± 3	74 ± 1

取 15 μL 内标溶液,15 μL 相应质量浓度的辛伐他汀溶液以及 70 μL 甲醇-水(50∶50),涡旋混合,制备高、中、低 3 种浓度的标准样品($n=5$),4 ℃下 12 000 r·min^{-1}离心 10 min,进样分析。以与相应浓度基质样品的峰面积比值计算基质效应,结果见表 1。

3.5 稳定性种属差异

在人与食蟹猴血浆中,室温放置 24 h 样品分别约降低了 30% 和 70%,室温放置 4 h 和 -80 ℃冻存 1 个月的样品基本稳定。在大鼠血浆中,4 h 和 24 h 样品分别降低了 75% 和 80% 左右,-80 ℃冻存 1 个月条件下中、低浓度样品降低了 30% 左右,而高浓度样品下降不明显,结果见图 1。

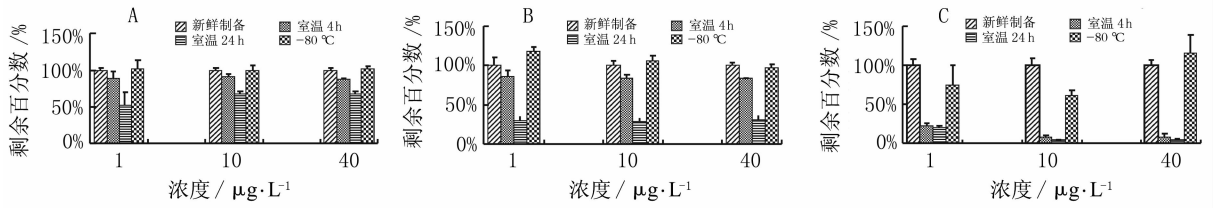

图 1 不同条件下 3 种动物血浆中辛伐他汀稳定性

A - 人血浆;B - 食蟹猴血浆;C - 大鼠血浆

Fig 1 Plasma stability of simvastatin in plasma of different species

A - human plasma; B - cynomolgus monkey plasma; C - rat plasma

4 讨论

辛伐他汀临床应用已有多年历史,人体药动学研究中,方法大多基于 0.4 ~ 1 mL 的血浆样品,方法学灵敏度可达到 0.05 ~ 0.5 μg·L^{-1}[5-7]。但辛伐他汀动物体内药动学少见报道,其方法学有待建立。常见的实验动物(如大鼠、食蟹猴等)个体小,血容量均较低,实验中为了防止实验动物失血过多,采血量均不宜过大。本研究建立的辛伐他汀在食蟹猴血浆中的 LC-MS/MS 的检测方法,使用小体积的血浆样品(150 μL),即可达到较高的检测灵敏度(0.5 μg·L^{-1}),且准确度、精密度、线性、专属性等均符合要求,适用于辛伐他汀动物体内药动学研究。

实验数据表明,辛伐他汀在血浆中的稳定性具有明显的种属差异。多数文献报道辛伐他汀在人血浆中稳定[5-7],在本实验中,辛伐他汀在人血浆中室温放置 24 h 也有一定的降解。在大鼠血浆中辛伐他汀浓度下降幅度最大,表现极不稳定。在食蟹猴血浆中,辛伐他汀稳定性不及人血浆,但较大鼠血浆中稳定。样品保存在低温条件下可以明显抑制药物降解,保持辛伐他汀稳定。因此在灵长类动物中进行辛伐他汀的药动学研究时,血液采集后应及时分离血浆并于低温冻存,样品解冻后也应及时进行前处理并进样分析;在大鼠中做类似研究时,应当充分验证现实条件下的方法学,避免不稳定性对结果的影响。

辛伐他汀作为临床上常用的治疗药物,其产生的肌肉毒性是近几年来广泛关注的安全性问题之一。由于这种不良反应,其同类药物西立伐他汀于 2001 年被撤市。部分文献报道了他汀类药物肌肉毒性实验研究结果,并多以大鼠、小鼠和新西兰大白兔等为动物模型;并对毒性机制提出了多种观点,但尚没有统一的结论[8-11]。非人灵长类动物遗传学上与人接近,其病理生理过程与人极为相似,是重要的药物临床前实验动物,因此以食蟹猴作为动物模型研究他汀类药物肌肉毒性具有重要意义。

本研究结果表明辛伐他汀在 3 种动物血浆中稳定性有显著的差异,这种差异对于该药肌肉毒性发生的贡献有待研究。由于稳定性差必然带来大量新的代谢物,而许多毒性是由代谢物引起的,因此在建立毒性动物模型和毒性机制研究中,应当重视药动学相关的种属差异。

REFERENCES

[1] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis[J]. Science, 1986, 232(4746): 34-47.

[2] HOEG J M, BREWERrewer HB Jr. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of

hypercholesterolemia[J]. JAMA, 1987, 258(24): 3532-3536.

[3] Christopher-Stine L. Statin myopathy: an update[J]. Curr Opin Rheumatol, 2006, 18(6): 647-653.

[4] ANTONS KA, WILLIAMS CD, BAKER SK, et al. Clinical perspectives of statin-induced rhabdomyolysis[J]. Am J Med, 2006, 119(5): 400-409.

[5] SHI P, CHEN X P. Bioequiavailability of simvastatin orally disintegrating tablets in healthy volunteers[J]. J China Pharm(中国药房), 2007, 18(35): 2757-2759.

[6] FENG F, TIAN Y, DAI H. Pharmacokinetics and relative bioavailability of simvastatin chew tablet in healthy volunteers after a single oral administration [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2002, 18(6): 441-444.

[7] WENG J Y, HANG T J, GU J et al. Determination of pharmacokinetics and bioequivalence of simvastatin tablets with LC-MS/MS in Chinese healthy volunteers[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2007, 26(5): 347-351.

[8] BERGMAN M, SALMAN H, DJALDETTI M, et al. Ultrastructure of mouse striated muscle fibers following pravastatin administration[J]. J Muscle Res Cell Motil, 2003, 24(7): 417-420.

[9] SMITH PF, EYDELLOTH RS, GROSSMAN SJ, et al. HMG-CoA reductase inhibitor-induced myopathy in the rat: cyclosporine A interaction and mechanism studies[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 257(3): 1225-1235.

[10] SONODA Y, GOTOW T, KURIYAMA M, et al. Electrical myotonia of rabbit skeletal muscles by HMG-CoA reductase inhibitors[J]. Muscle Nerve, 1994, 17(8): 891-897.

[11] NAKAHARA K, KURIYAMA M, YOSHIDOME H, et al. Experimental simvastatin-induced myopathy in rabbits[J]. J Neurol Sci, 1992, 113(1): 114-117.

收稿日期:2008-03-24