

LC-ESI-MS/MS 快速测定人血浆中匹伐他汀浓度

陈楚雄¹, 李国成¹, 温预关^{2*} (1.中山大学孙逸仙纪念医院药学部, 广州 510120; 2.广州市脑科医院国家药品临床研究基地, 广州 510370)

摘要: 目的 建立一种快速灵敏测定人体血浆中匹伐他汀浓度的高效液相色谱串联质谱检测方法。方法 以 Agilent C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm)为色谱柱, 流动相为甲醇-0.005 mol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液-乙腈-1%甲酸水溶液(7.5:2.5:70:20); 流速: 0.5 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C。采用选择反应监测(SRM)对匹伐他汀(m/z 422.2→290.2)和内标瑞舒伐他汀(m/z 482.2→258.2)进行测定。结果 匹伐他汀高(80 μg·L⁻¹)、中(50 μg·L⁻¹)、低(0.25 μg·L⁻¹)3个浓度的平均回收率 RSD 均小于 15%; 线性范围为: 0.1~100 μg·L⁻¹, 回归方程为 $Y=1.222\ 6X-1.056\ 1\times 10^{-4}$, $r=0.996\ 0$ 。结论 该方法灵敏、准确、简单、快速, 可用于匹伐他汀临床血药浓度监测和药动力学研究。

关键词: 匹伐他汀; 血药浓度; 高效液相色谱串联质谱检测法

中图分类号: R917.103; R972.6

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)07-0642-04

Rapid Determination of Pitavastatin in Plasma by LC-ESI-MS/MS

CHEN Chuxiong¹, LI Guocheng¹, WEN Yuguan^{2*} (1. Department of Pharmacy, The Sun Yatsen Hospital of Sun Yatsen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, Guangzhou Brain Hospital, Guangzhou 510370, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To set up a rapid and sensitive LC-ESI-MS/MS method for the determination of pitavastatin in plasma. **METHODS** Pitavastatin was extracted with ethyl acetate-dichloromethane. The residues were analyzed with a LC-MS/MS system (Agilent Eclipse Plus C₁₈ column, 4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) with the mobile phase of methanol-0.005 mol·L⁻¹ ammonium formate aqueous solution-acetonitrile-1% formic acid(7.5:2.5:70:20), with a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹, temperature: 40 °C. Selected reaction monitoring (SRM) using the precursor to production combinations of m/z 422.2→290.2 and m/z 482.2→258.2 was performed to detect pitavastatin and the internal standard, respectively. **RESULTS** The RSDs of average recovery of different concentration of pitavastatin(80, 50, 0.25 μg·L⁻¹) were less than 15%. The calibration curves for pitavastatin had good linearity over the range of 0.1~100 μg·L⁻¹, $r=0.996\ 0$. **CONCLUSION** The method provides a sensitive, accurate, precise and reliable analytical procedure for clinical monitoring of pitavastatin plasma and its pharmacokinetic studies.

KEY WORDS: pitavastatin; plasma concentration; LC-ESI-MS/MS

匹伐他汀(pitavastatin)是新一代 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 通过抑制 HMG-CoA 还原酶的水解, 阻止胆固醇的合成, 临床用于治疗高脂血症和冠心病^[1]。匹伐他汀能显著降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)及升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 药动学性质优良, 具有肝细胞选择性, 且用量少, 作用强, 安全性好^[2]。其检测方法文献报道采用高效液相色谱法-荧光检测法^[3]和 LC-MS/MS 检测法^[4-5]。为便于进行血药浓度监测和药动力学研究, 本试验参照文献[4-5]建立了以瑞舒伐他汀为内标的测定人血浆中匹伐他汀浓度的 LC-ESI-MS/MS。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 包括 G1379B 自动脱气机, G1310A 自动调配四元泵, G1329A 自动进样器, G1316A 可调柱温箱; Agilent 6410 triple quad LC/MS; XW-80A 型旋涡混合器(原上海医科大学仪器厂); BP110S 型电子分析天平(德国 Sartorius); MIKRO12-24 型高速离心机(德国 Hettich); 22 型真空干燥箱(德国 MMM-GROUP)。

1.2 试剂

匹伐他汀钙对照品(海南双成药业有限公司, 批号: 090101, 含量: 99.8%); 瑞舒伐他汀钙对照品(阿斯利康制药有限公司, 批号: FY803, 含量

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(8151037001000001); 广东省医学科研基金立项(A2008559); 广东省医院药学研究基金资助项目(2008B001)

作者简介: 陈楚雄, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (020)81332978

E-mail: ccx1101@163.com

*通信作者: 温预关, 男, 主任药师

Tel: 13711603273 E-mail: wenyuguande@163.com

99.5%); 甲醇和乙腈(色谱纯, Sigma 公司); 水为重蒸去离子水; 醋酸乙酯和二氯甲烷(分析纯, 广州化学试剂厂)。

1.3 对照品和内标溶液的配制

分别精确称取匹伐他汀钙、瑞舒伐他汀钙对照品(内标)11.8 mg 和 11.3 mg(分别含匹伐他汀、瑞舒伐他汀各 10 mg), 分别置于 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解定容至刻度, 即配制成浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液, 贮存于 4°C 冰箱避光保存备用。试验前按试验所需稀释成相应浓度的标准工作液。另稀释配置浓度为 $800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标瑞舒伐他汀流动相溶液。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse plus- C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μm); 流动相: 甲醇-0.005 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液-乙腈-1%甲酸水溶液=(7.5:2.5:70:20); 流速: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 40°C 。质谱条件: 电喷雾电离源(ESI), 正离子化, 扫描方式为选择性离子监测, 瑞舒伐他汀 m/z 482.2 $\rightarrow$ 258.2, 匹伐他汀 m/z 422.2 $\rightarrow$ 290.2, 毛细管电压 4 000 V, 喷雾气压力 50 psi, 干燥气流速 $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 干燥气温度 350°C , 四级杆捕捉时间 0.2 s。瑞舒伐他汀

碰撞能量 35 单位, 裂解电压 120 V; 匹伐他汀碰撞能量 20 单位, 裂解电压 125 V。进样量为 $25 \mu\text{L}$ 。

2.2 样品处理

取含药血浆 0.5 mL 置 10 mL 的带塞磨口锥形玻璃离心管中, 加入 $800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的瑞舒伐他汀流动相溶液 $50 \mu\text{L}$, 快速振荡 3 s, 再加醋酸乙酯: 二氯甲烷(4:1)3 mL 密塞, 旋涡振荡 1 min, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 吸取有机层置 3 mL 的带塞磨口锥形玻璃离心管内, 42°C 真空干燥至干。进样前加入流动相混合溶液 $200 \mu\text{L}$, 快速振荡 15 s 使残渣溶解, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 吸取上清液 $25 \mu\text{L}$ 进样。

2.3 方法专属性

分别取 6 名受试者的空白血浆 1.0 mL 置 10 mL 的带塞锥形玻璃离心管中, 除不加内标外, 按“2.2”项下方法处理, 进样 $25 \mu\text{L}$; 将一定浓度的标准溶液($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和内标溶液($40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)加入空白血浆中, 同法操作, 匹伐他汀、瑞舒伐他汀的出峰时间分别约为 4.0 min 和 3.4 min; 取健康受试者给药后收集的血浆样品, 同法操作。结果表明, 空白血浆中内源性物质不干扰匹伐他汀及内标瑞舒伐他汀的测定, 见图 1。

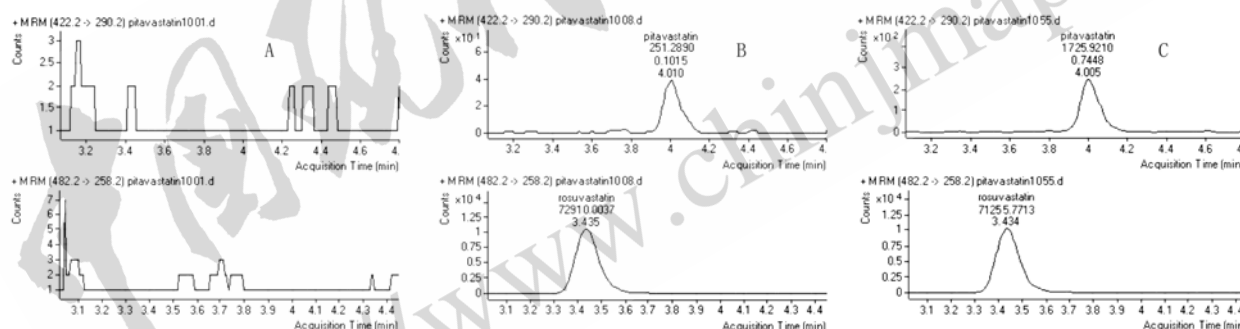


图 1 LC-MS/MS 测定血浆中匹伐他汀的典型色谱图

A—空白血浆; B—空白血浆+匹伐他汀($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)+瑞舒伐他汀($40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); C—一受试者服药 48 h 后采血时间点血药浓度

Fig 1 LC-MS/MS chromatogram of pitavastatin

A—blank plasma; B—blank plasma of pitavastatin($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and rosuvastatin($40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); C—plasma sample collected from subject 48 h after a oral single dose of pitavastatin calcium tablet

2.4 介质效应考察

取 20 管空白血浆各 1 mL 平分为 4 组, 每组 5 管, 除不加标准系列溶液和内标外, 按“2.3”处理后, 于上清液中分别加入低($5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、中($1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、高浓度($1\ 600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的匹伐他汀和内标瑞舒伐他汀($800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $50 \mu\text{L}$, 42°C 真空干燥至干。进样前加入流动相混合溶液 $200 \mu\text{L}$, 快速振荡

15 s 使残渣溶解, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 吸取上清液 $5 \mu\text{L}$ 进样。以此种处理方法测得的匹伐他汀和内标峰面积与空白试管中加入 0.5 mL 水后再加入相应浓度的匹伐他汀和内标测得的峰面积的比值计算百分比。结果低($0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、中($50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、高浓度($80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的匹伐他汀和内标瑞舒伐他汀($40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的介质影响百分比分别为

83.60%, 84.21%, 83.45%, 82.12%, 血浆介质对低、中、高 3 种浓度药物的测定影响程度没有统计学差异, 可认为对定量检测无影响。

2.5 标准曲线的制备

取空白血浆 1 mL, 分别加入浓度为 0, 2, 5, 10, 20, 100, 200, 1 000 和 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的匹伐他汀对照品溶液 50 μL , 振荡 3 s, 使血浆药物浓度分别相当于 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 按“2.2”项下方法处理。经 LC-MS/MS 分析, 以匹伐他汀峰面积与内标峰面积之比(Y)为纵坐标, 以血浆匹伐他汀浓度与内标浓度之比(X)为横坐标, 权重系数为 $1/x^2$, 血浆中匹伐他汀浓度在 0.1~100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内呈良好的线性关系, 典型代表方程为: $Y=1.222\ 6X-1.056\ 1\times 10^{-4}$, $r=0.996\ 0$ 。

表 1 回收率与日内、日间精密度($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Recovery rate and and between-day precision($\bar{x}\pm s$)

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度($n=5$)		日间精密度($n=3$)		方法回收率($n=5$)/%	RSD/%	提取回收率($n=3$)/%	RSD/%
	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	实测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%				
0.25	0.25 $\pm$ 0.03	11.17	0.25 $\pm$ 0.02	9.18	98.87	7.98	70.59	11.51
50	49.51 $\pm$ 2.68	5.42	49.22 $\pm$ 2.63	5.34	99.02	3.15	66.93	4.27
80	78.25 $\pm$ 2.24	3.95	78.65 $\pm$ 3.01	3.82	97.81	2.58	65.72	10.64

2.7 血浆样品的稳定性试验

按“2.5”项下方法分别配制低(0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和高浓度(80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的质控血浆样品, 每个浓度 18 份样品分析, 分为 3 组。分别考察了样品经室温避光放置 1 h 和 24 h, 冻融 1 次和 3 次, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 1 d 和 14 d 的稳定性。3 种条件下中、高 2 个浓度样品检测结果的 RSD 均小于 15%, 3 种条件下低浓度样品检测结果的 RSD 均小于 20%。

2.8 质控样品的监控

按“2.5”项下方法分别配制低(0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和高浓度(80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的匹伐他汀血浆样品置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用, 此即为血浆质控样品。检测每批血浆样品前需做随行标准曲线, 并随行检测质控样品低、中、高 3 个浓度, 每个浓度至少双样本, 并应均匀分布在未知样品测试顺序中; 结果质控样品检测结果其 RSD 在 15%(低浓度在 20%)内, 可认为仪器检测正常。

2.9 临床应用

10 名健康志愿者, 男女各半, 年龄为 20~25 岁, 身高 165~179 cm, 体重 55~68 kg, 单次空腹口服 1 mg 匹伐他汀钙片后 0~48 h 平均药时曲线见图

2.6 回收率及精密度试验

按“2.5”项下方法分别配制低(0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和高浓度(80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的匹伐他汀血浆溶液各 15 份, 分为 3 批, 每批 5 份, 并于每批的标准曲线同时进行, 按照“2.2”项下方法处理后取 25 μL 进样, 计算质控样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的准确度和精密度。同法以空白血浆, 除不加标准系列溶液和内标外, 按“2.5”项下方法处理后, 再加入相应浓度的匹伐他汀和瑞舒伐他汀, 取 5 μL 上清液进样, 以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。结果匹伐他汀低(0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、中(50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和高浓度(80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和内标的提取回收率分别为 70.59%, 66.93%, 65.72%, 69.93%。精密度和提取回收率见表 1。

2. 主要药动学参数如下: $T_{\max}$ 为(0.78 $\pm$ 0.18)h, $C_{\max}$ 为(30.89 $\pm$ 11.05) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $T_{1/2}$ (9.80 $\pm$ 3.33)h, $\text{AUC}_{(0-48)}$ 为(90.51 $\pm$ 31.10) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ 为(93.72 $\pm$ 32.72) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

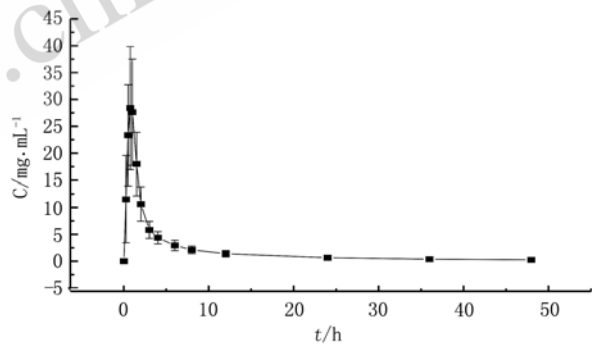


图 2 10 名健康志愿者单剂量口服匹伐他汀钙片 1 mg 后的平均药时曲线($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time of pitavastatin calcium tablets after a single oral dose of 1 mg in 10 volunteers($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

笔者试用正离子模式对匹伐他汀分别进行 ESI 离子扫描和碎片离子扫描, 选择 m/z 422.2 $\rightarrow$ 290.2 为检测离子对, 再对干燥气流速、干燥气温度、雾

化气压力、毛细管电压,以及四级杆停留时间、裂解电压和裂解能量等质谱条件进行优化,同样做法优化内标瑞舒伐他汀的质谱条件。与 HPLC 相比,本试验所建立的 LC-MS/MS 显示了较强的抗干扰优势,由于采用了 SRM 扫描方法,血浆中的其他杂质均不干扰待测物的测定。

笔者在文献[4]流动相的基础上添加甲醇和甲酸铵,通过比较甲醇浓度以及在流动相中的比例,以甲醇-0.005 mol·L⁻¹ 甲酸铵甲酸铵水溶液-乙腈-1%甲酸水溶液=(7.5:2.5:70:20)为流动相色谱峰形较好,加入甲酸的目的是提高待测物的灵敏度,检测限低,最低检测限为 0.1 μg·L⁻¹,低于文献[4]报道的 0.23 μg·L⁻¹。

笔者先使用乙腈蛋白沉淀法^[5],发现介质效应很大,杂质干扰药物的检测,灵敏度达不到试验要求,故改用液液萃取法。通过对乙醚、醋酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、乙酯乙酯-二氯甲烷混合提取剂比较发现,采用醋酸乙酯-二氯甲烷(4:1)混合溶剂提取回收率最高。经过对替米沙坦、地西洋、瑞舒伐他汀等药物的比较发现,瑞舒伐他汀与匹伐他汀的提取条件相似,且出峰时间相近,内源性物质不

干扰,故选择瑞舒伐他汀为内标物。

匹伐他汀在人体中血药浓度较低,仪器条件要求高,本实验采用 LC-ESI-MS/MS 检测,方法灵敏且样品处理相对简单,将该法应用于临床血药浓度的测定,能够满足实验条件,可应用于临床血药浓度监测和药动力学研究。

REFERENCES

- [1] MUKHTAR R Y, REID J, RECKLESS J P. Pitavastatin [J]. Int J Clin Pract, 2005, 59(2): 239-252.
- [2] XU X, SHENTU J Z, HU Y J. Pharmacological effects and clinical application of pitavastatin [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2009, 18(5): 383-386.
- [3] OJHA A, GUTTIKAR S, VAYEDA C, et al. Determination of pitavastatin from human plasma using high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2007, 25(5): 715-718.
- [4] DENG S, YIN T, TANG L, et al. A simple and sensitive LC-MS/MS method for determining the concentration of pitavastatin in human plasma [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2009, 18(12): 1113-1115.
- [5] WANG L L, CHEN X Y, SONG B, et al. Determination of pitavastatin in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2007, 26(11): 805-808.

收稿日期: 2009-10-30