

- 2007, 34(4): 238-244.
- [3] LI L M, XIA J, WANG X M, et al. Speciations of soluble arsenic in five Chinese patent medicines by HPLC-ICP-MS [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(11): 2118-2123.
- [4] JIN P F, WU X J, ZOU D, et al. Study on arsenic speciation changes in crude and processed traditional Chinese medicines by HPLC-ICP-MS [J]. Spectrosc Spec Anal(光谱学与光谱分析), 2011, 31(3): 816-819.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 180, 205, 212.
- [6] Dietary Supplement-Standard 173: Metal Contaminant Acceptance Level [S]. 2003: 1.
- [7] WU Q, LIANG Q L, LUO G A, et al. Speciation analysis of solvable arsenic in Liushen pills by HPLC-ICP-MS [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2007, 38(4): 332-335.
- [8] ZHAO H F, HUANG B K. Heavy metal stress on medicinal plant and its resistance and hyper accumulation mechanism [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2010, 28(6): 406-409.
- [9] JIN H Y, WANG Y, SUN L, et al. Current situation and suggestions on control of extrinsic harmful residues in Chinese medicinal materials [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2009, 23(7): 639-642.
- [10] JIN H Y, DAI B, TIAN JG, et al. Control of extrinsic harmful residues in yraditional Chinese medicine [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2007, 21(12): 1013-1018.

收稿日期: 2015-06-30

### 3 种抗菌药物对辛伐他汀在人肝微粒体中代谢的影响

张俊, 朱振峰, 张晓坚\*, 孙雅, 赵咏梅(郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450000)

**摘要:** 目的 体外研究人肝微粒体中罗红霉素、左氧氟沙星和氟康唑分别对辛伐他汀代谢的影响。方法 分别将罗红霉素、左氧氟沙星、氟康唑与辛伐他汀在人肝微粒体中共孵育, 采用 UPLC-MS/MS 测定辛伐他汀的浓度。结果 罗红霉素和左氧氟沙星对辛伐他汀的代谢没有影响, 氟康唑剂量依赖性抑制辛伐他汀的代谢, 其  $IC_{50}$  值为  $36.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论 氟康唑显著抑制辛伐他汀的代谢, 罗红霉素与左氧氟沙星对辛伐他汀在人肝微粒体中代谢无明显药物相互作用。

**关键词:** 辛伐他汀; 人肝微粒体; 超高效液相串联质谱; 相互作用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1363-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.018

#### Effects of 3 Kinds of Antibacterial Agents on Metabolism of Simvastatin in Human Liver Microsome

ZHANG Jun, ZHU Zhenfeng, ZHANG Xiaojian\*, SUN Ya, ZHAO Yongmei(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the effects of roxithromycin, levofloxacin and fluconazole on the metabolism of simvastatin in human liver microsome respectively. **METHODS** Simvastatin was incubated with roxithromycin, levofloxacin and fluconazole in human liver microsome. The residual concentration of simvastatin in human liver microsome incubates was determined by UPLC-MS/MS. **RESULTS** The roxithromycin and levofloxacin had no significant influence on the metabolism of simvastatin. The  $IC_{50}$  of fluconazole for the metabolism of simvastatin was  $36.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the inhibit intension was dose dependent. **CONCLUSION** The fluconazole significantly inhibits the metabolism of simvastatin. The roxithromycin and levofloxacin have no significant drug interactions on the metabolism of simvastatin.

**KEY WORDS:** simvastatin; human liver microsome; UPLC-MS/MS; interactions

辛伐他汀为 3-羟-3 甲基戊二酸辅酶 A 还原酶抑制剂, 是一种临床常用的调脂药<sup>[1]</sup>, 被广泛应用于高血脂和心血管事件的预防和治疗<sup>[2]</sup>。辛伐他汀在临床上需要长期服用, 与其他药物联合用药的机率较高。辛伐他汀在肝脏主要经 CYP3A4 代谢

是 CYP3A4 的底物<sup>[3-4]</sup>。CYP3A 参与了临床上约 50%药物的代谢<sup>[5]</sup>, 本研究建立了体外人肝微粒体中辛伐他汀浓度的 UPLC-MS/MS 测定方法, 进行罗红霉素、左氧氟沙星、氟康唑对辛伐他汀代谢活性影响的体外评价, 给临床上辛伐他汀与上述 3

基金项目: 常州四药临床药学科研基金(CZSYJJ11002)

作者简介: 张俊, 女, 硕士, 药师 Tel: (0371)66862570

E-mail: zjedu408@126.com

\*通信作者: 张晓坚, 男, 主任药师

Tel:

(0371)66913047 E-mail: zhxj0524@sina.com

种药物的合理联用提供参考依据。

## 1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪, Xevo TQD 串联质谱检测器, Masslynx 4.1 工作站(美国 Waters 公司); AL 104-IC 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); QL-901 漩涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Sorvall Legend Micro17 微量高速离心机(Thermo Fisher); BCD-539WT 型医用冷藏箱(青岛海尔股份有限公司); Master-E 型超纯水仪(上海和泰仪器有限公司); WS17-2 型电热恒温振荡水槽(上海精密仪器设备有限公司)。

辛伐他汀对照品(纯度: 99.0%, 批号: 100601-201003)、内标洛伐他汀对照品(纯度: 99.4%, 批号: 100600-201003)均购自中国药品生物制品检定所; 氟康唑、罗红霉素、左氧氟沙星均由中国食品药品检定研究院提供; 乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯, 由美国 Tedia Company 生产; 二重蒸馏水自制; NADPH 购自上海翊圣生物科技有限公司; 人肝微粒体购自 Sigma 公司。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 柱温: 40 °C, 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸溶液 (88 : 12), 流速: 0.20 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 2 μL。

### 2.2 质谱条件

采用电喷雾电离源(ESI<sup>+</sup>), 离子源温度 120 °C, 去溶剂氮气的温度为 400 °C, 流速为 750 L·h<sup>-1</sup>, 锥孔气流速为 50 L·h<sup>-1</sup>。辛伐他汀的监测离子为 *m/z* 419.0→198.9, 锥孔电压为 34 V, 碰撞电压 14 V; 洛伐他汀的监测离子为 *m/z* 405.0→198.9, 锥孔电压为 28 V, 碰撞电压为 18 V。

### 2.3 样品处理方法

取 200 μL 人肝微粒体温孵液, 涡旋混匀 3 min, 加入冷乙酸乙酯 0.8 mL, 再加入 20 μL 内标洛伐他汀(1 μg·mL<sup>-1</sup>), 加入 20 μL 1%甲酸, 混匀 3 min, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 收集上清液, 40 °C 氮气挥干, 用 150 μL 乙腈复溶, 混匀 3 min, 13 300 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液 100 μL 转移到进样瓶中, 2 μL 进样分析辛伐他汀的浓度。

### 2.4 反应体系

孵育混合液包括终浓度为 0.05 mg·mL<sup>-1</sup> 的人

肝微粒体稀释液, 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(pH 7.4), MgCl<sub>2</sub> 终浓度 0.25 mmol·L<sup>-1</sup> 和终浓度为 2 μmol·L<sup>-1</sup> 的辛伐他汀, 辛伐他汀用乙醇配制, 每次加入反应体系中的乙醇终浓度为 1.0%, 在人肝微粒体孵育液中分别加入不同浓度的罗红霉素、左氧氟沙星、氟康唑, 37 °C 水浴先预孵育 3 min, 反应从加入终浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> NADPH 再生系统开始, 整个反应体系共 0.2 mL, 孵育 15 min, 各管加入冷乙酸乙酯 0.8 mL 结束反应, 其余按“2.3”项下方法处理。依据 3 种抗菌药物临床推荐的常用剂量计算药物在肝微粒体中的浓度, 均以 0 μmol·L<sup>-1</sup> 做对照, 同时为了避免低估 3 种抗菌药物对辛伐他汀在人肝微粒体中代谢的影响, 均选用 50 μmol·L<sup>-1</sup> 做为最高浓度, 据此调整所选抑制剂的浓度范围, 即 0, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 μmol·L<sup>-1</sup> 进行反应, 测定剩余辛伐他汀的浓度。

### 2.5 数据处理和统计学分析

UPLC-MS/MS 测定辛伐他汀的浓度, IC<sub>50</sub> 由抑制率(以代谢后剩余辛伐他汀浓度计)对抑制剂浓度做线性回归得到; 数据采用 SPSS (version 11.5, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 统计软件进行统计学分析, 采用多因素方差分析比较对照组与加药组剩余辛伐他汀的浓度, *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 专属性考察

按“2.1”、“2.2”项下色谱、质谱条件, 在各自的离子通道上采集数据, 辛伐他汀的保留时间约为 1.02 min, 内标的保留时间约为 0.98 min, 辛伐他汀及内标峰形良好, 且无杂峰干扰测定。

### 3.2 线性范围和最低定量浓度

用人肝微粒体加辛伐他汀标准系列溶液, 配制成相当于辛伐他汀人肝微粒体浓度为 0.10, 0.20, 0.50, 1.50, 5.00, 15.00 μmol·L<sup>-1</sup> 的样品, 按“2.3”项下方法操作, 分别以辛伐他汀峰面积与内标峰面积的比值 *Y* 对辛伐他汀浓度 *X* 作线性回归(权重为 1/*x*), 得回归方程为  $Y=0.721\ 8X+1.649\ 5$ , 相关系数  $R^2=0.999\ 0$ 。结果辛伐他汀在 0.10~15.00 μmol·L<sup>-1</sup> 线性关系良好, 最低定量浓度为 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>。

### 3.3 回收率和精密度

取人肝微粒体及对照品溶液按“2.3”项下方

法制备辛伐他汀系列样品各 5 份, 每个浓度平行操作, 按回归方程计算浓度, 分别在同一个分析批次内测定 5 次, 连续制备并测定 3 个分析批, 分别考察方法回收率、提取回收率、日内及日间精密度。结果方法回收率为 91.01%~99.03%, 提取回收率为 80.59%~96.12%。批间 RSD 为 6.13%~10.11%( $n=15$ ); 批内 RSD 为 3.93%~5.77% ( $n=5$ )。

### 3.4 基质效应

空白人肝微粒体按“2.3”项下方法操作, 所得的提取液为溶剂, 加入标准储备液配制低、中、高 3 个浓度(0.20, 1.50, 12.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )进样分析, 得峰面积  $A_1$ ; 以流动相为溶剂, 加入标准储备液配制成的相应浓度的标准品溶液进样分析, 得峰面积  $A_2$ 。其基质效应平均值在 91.67%~101.92%, 表明本试验方法学不受基质效应干扰。

### 3.5 稳定性试验

用空白人肝微粒体配制相当于辛伐他汀低、中、高 3 个浓度(0.20, 1.50, 12.00  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的样品, 分别进行辛伐他汀人肝微粒体室温放置稳定性试验, 结果辛伐他汀室温放置 0, 6, 12 h 稳定。其各项稳定性试验 RSD 均小于 13.21%。辛伐他汀和内标标准液于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷藏 30 d 稳定。

### 3.6 不同浓度罗红霉素、左氧氟沙星、氟康唑对辛伐他汀代谢的影响

以不加入其他药物的人肝微粒体孵育辛伐他汀 15 min 为对照组, 结果显示不同浓度的罗红霉素和左氧氟沙星对辛伐他汀的代谢没有影响, 且人肝微粒体对辛伐他汀的代谢活性与罗红霉素和左氧氟沙星的浓度没有关系; 氟康唑可明显抑制辛伐他汀的代谢, 与对照组相比, 在氟康唑浓度为 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 对辛伐他汀代谢有轻微的抑制作用, 差异无统计学意义, 浓度  $>1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 且随着氟康唑浓度的增加, 其对辛伐他汀的代谢的抑制也随之增强(抑制率为 4.8%~66.1%), 其  $\text{IC}_{50}$  值为 36.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 氟康唑对 CYP3A4 的抑制具有浓度依赖性。结果见图 1。

## 4 讨论

本研究采用 UPLC-MS/MS 测定人肝微粒体辛伐他汀浓度, 与其他 HPLC 测定方法相比, 此法提高了方法灵敏度及专属性, 大大缩短了分析时间。目前文献报道辛伐他汀的血浆浓度测定方法有 LC-MS/MS<sup>[6]</sup>、UPLC-MS/MS 等<sup>[7-8]</sup>, 与上述文

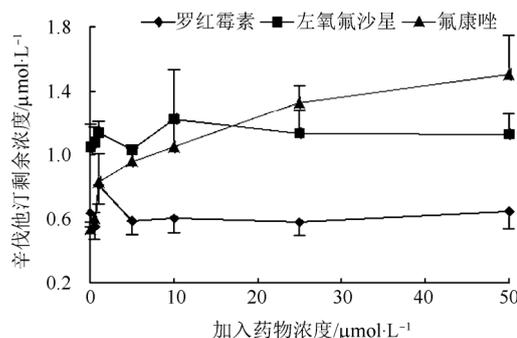


图 1 分别加入 3 种药物后剩余辛伐他汀平均人肝微粒体浓度-加入药物浓度曲线

Fig. 1 Mean concentration of simvastatin in human liver microsomes concentration versus adding drug concentration curve of 3 drugs

献中方法相比, 本课题探索的测定方法采用乙酸乙酯液液萃取的处理方法, 操作简单, 重复性好, 处理中添加 1% 的甲酸后, 信号响应提高 20 倍, 能够满足本课题对辛伐他汀人肝微粒体测定的需要。

辛伐他汀在人肝微粒体中被迅速代谢, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中温孵振荡 5~25 min 呈线性消除, 在 25~40 min 消除呈现饱和现象, 故本实验所选的温孵时间为 15 min, 当 NADPH 浓度为 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 温孵时间为 15 min 时, 人肝微粒体终浓度为 0.05  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 辛伐他汀的消除呈线性增加, 因此确定实验中人肝微粒体终浓度为 0.05  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

肝微粒体酶法通过观察不同 CYP 特异性化学抑制药对药物代谢的抑制程度, 确定参与药物代谢的 CYP 同工酶的类型, 同时预测可能产生的药物相互作用, 为临床前药物代谢研究的常用方法。本研究采用此法, 探讨了辛伐他汀与临床常见合用药物在 CYP 代谢水平上的相互作用。

结果表明, 氟康唑对体外辛伐他汀的人肝微粒体代谢有抑制作用, 当氟康唑浓度  $>1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 其对辛伐他汀代谢的抑制程度与对照组相比差异有统计学意义。辛伐他汀在人肝脏主要由 CYP3A4 代谢<sup>[3]</sup>, 氟康唑是 CYP3A4 的抑制剂<sup>[9]</sup>, 与辛伐他汀共同竞争 CYP3A4, 抑制辛伐他汀的代谢。文献报道左氧氟沙星对 CYP2D6 和 CYP1A 亚家族的底物的代谢有抑制作用<sup>[10]</sup>, 本研究发现与对照组相比, 左氧氟沙星对辛伐他汀代谢没有影响。文献报道连续 7 d 给予大鼠 400  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  罗红霉素, 并未对 CYP450 产生诱导作用, 也没有形成 CYP450 代谢物的复合物<sup>[11]</sup>, 大环内酯类药物是否容易与 CYP450 形成抑制性复合物, 主要与其疏水

性、分子结构的立体状态及离子化状态有关<sup>[12]</sup>，疏水性大者更易进入酶的活性部位，与红霉素相比，罗红霉素较难接近酶蛋白的活性位点，因此对 CYP450 酶的抑制作用相对较弱。研究中未观察到罗红霉素对辛伐他汀代谢的抑制作用，与文献报道的罗红霉素对 CYP450 几乎没有诱导作用，也很少形成抑制性复合物，因此引起药物相互作用的可能性较小相一致<sup>[11]</sup>。药物间相互作用是影响药物在体内浓度水平的一个重要因素，CYP3A 抑制剂与辛伐他汀之间存在着潜在的相互作用，这些药物在临床合用中应引起重视。体外研究与体内有一定的差异，人体中各种药物对辛伐他汀代谢的影响尚待进一步研究证实。

## REFERENCES

- [1] KASHANI A, PHILLIPS C O, FOODY J M, et al. Risks associated with statin therapy: a systematic overview of randomized clinical trials [J]. *Circulation*, 2006, 114(25): 2788-2797.
- [2] XU Z, LIU Y, GU W F. Effect of Simvastatin on Hs-CRP, MMP-9 and TGF- $\beta$ 1 in patients with coronary heart disease [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(6): 759-762.
- [3] FOTI R S, ROCK D A, WIENKERS L C, et al. Selection of alternative CYP3A4 probe substrates for clinical drug interaction studies using *in vitro* data and *in vivo* simulation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(6): 981-987.
- [4] BJORNSSON T D, CALLAGHAN J T, EINOLF H J, et al. The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of

- America (PHARMA) perspective [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31 (7): 815-832.
- [5] LEWIS D F, IOANNIDES C, PARKE D V, et al. Quantitative structure-activity relationships in a series of endogenous and synthetic steroids exhibiting induction of CYP3A activity and hepatomegaly associated with increased DNA synthesis [J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 74(4): 179-185.
- [6] ZHAI X J, LIU J M, SHI F, et al. Determination of simvastatin and its active metabolite simvastatin acid in rat plasma by HPLC-MS/MS [J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2013, 33(2): 121-125.
- [7] WANG J C, MENG X H, YANG D J, et al. UPLC-MS/MS determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2012, 32(9): 1628-1633.
- [8] LUCIE N, HANA V, DALIBOR S, et al. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(22): 2093-2103.
- [9] MORITA K, KONISHI H, SHIMAKAWA H. Fluconazole: a potent inhibitor of cytochrome P-450-dependent drug metabolism in mice and humans *in vivo*. Comparative study with ketoconazole [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(5): 1247-1251.
- [10] 张沂, 王洪武, 费宇行, 等. 美托洛尔在经左氧氟沙星诱导的大鼠肝微粒体 P450 系统中代谢特征[J]. *中国抗生素杂志*, 2003, 28(7): 418-420.
- [11] VILLA P, SASSELLA D, CORADA M, et al. Effects of roxithromycin, a new semisynthetic macrolide, and two erythromycins on drug metabolizing enzymes in rat liver [J]. *J Antibiot*, 1988, 41(4): 563-569.
- [12] DELAFORGE M, LADAM P, BOUILLE G, et al. pH effects on the N-demethylation and formation of the cytochrome P-450 iron II nitrosoalkane complex for erythromycin derivatives [J]. *Chem-Biol Interact*, 1992, 85(2): 215-227.

收稿日期: 2015-04-09

## 加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸普拉克索的有关物质

李晶<sup>1,2</sup>, 石森林<sup>1\*</sup>, 杨继斌<sup>2</sup>(1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.上海昕盛医药科技有限公司, 上海 200233)

**摘要:** 目的 建立盐酸普拉克索原料药中有关物质的含量测定方法。方法 采用 HPLC 建立盐酸普拉克索及其杂质 A、B、C、E 的线性方程, 以斜率计算杂质相对于主成分的校正因子, 并用该校正因子测定有关物质的含量。通过方法学考察证明此方法的可行性。结果 盐酸普拉克索杂质 A、B、C、E 的校正因子分别为 0.642, 0.999, 0.796, 0.999; 相对保留时间为 0.703, 1.512, 1.733, 0.522; 方法学考察验证该方法符合要求; 3 批样品中杂质 A、B、E 均未检出, 杂质 C 的含量分别为 0.013%, 0.013%, 0.012%。结论 加校正因子的主成分自身对照法能够准确测定盐酸普拉克索原料药中有关物质的含量。

**关键词:** 盐酸普拉克索; 高效液相色谱法; 有关物质; 校正因子

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1366-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.019

作者简介: 李晶, 女, 硕士生 Tel: 13512119482 E-mail: 1007000516@qq.com

\*通信作者: 石森林, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

(0571)86613524 E-mail: pjstone@163.com