

LC-MS/MS 测定大鼠血浆中阿托伐他汀及其活性代谢产物

罗楠^{1a,2}, 谭力², 张玫², 阿基业^{1b}, 孙润彬^{1b}, 冯冬^{1b}, 齐谢敏³, 邹秉杰³, 周国华³, 黄青^{2*}, 宋沁馨^{1a*} (1.中国药科大学, a.药物质量与安全预警教育部重点实验室, b.药物代谢与药理学重点实验室, 南京 210009; 2.江苏省食品药品监督检验研究院检验技术研究中心, 南京 210000; 3.南京大学医学院附属金陵医院药理科, 南京 210002)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中阿托伐他汀、邻羟基阿托伐他汀及对羟基阿托伐他汀的方法, 并应用于 CYP3A 酶诱导模型大鼠和正常大鼠体内阿托伐他汀的药动力学研究。方法 采用甲基叔丁基醚-乙酸乙酯(50:50)液液萃取法提取大鼠血浆中药物。使用 XBridge C₁₈(2.1 mm×250 mm, 3.5 μm)色谱柱, 柱温 35 ℃; 流动相为 0.1%甲酸-乙腈(40:60), 等度洗脱 4.4 min, 流速 0.2 mL·min⁻¹; 进样体积 10 μL。质谱采用电喷雾离子(ESI)源, 以正离子多反应监测(MRM)模式进行定量分析, 选择 m/z 559.1→440.1(阿托伐他汀), m/z 575.3→440.2(邻羟基阿托伐他汀/对羟基阿托伐他汀), m/z 564.3→445.3(阿托伐他汀-d₅, 内标)作为检测离子对。以地塞米松 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 连续灌胃给药 4 d, 建立 CYP3A 酶诱导模型, 取正常及模型大鼠给药后 0, 0.083, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 h 血样于肝素抗凝管中, 离心收集血浆, 冷冻保存直到进行测定。结果 阿托伐他汀及其 2 种代谢产物在 0.49~500.00 ng·mL⁻¹ 内均有良好的线性关系($r^2>0.99$); 批内、批间精密度的 RSD<15%($n=6$); 方法的提取回收率和基质效应均满足生物样品的检测要求; 含药血浆在室温放置 4, 24 h、4 ℃放置 3 d 稳定。诱导组大鼠血浆中阿托伐他汀血药浓度达峰时间(T_{max})提前, 血药浓度-时间曲线下面积(AUC₀₋₄)显著低于正常组, 消除速率常数 K 和清除率 CL 略高于正常组。结论 新建立的方法简便、稳定、灵敏, 能够用于大鼠血浆内阿托伐他汀及其活性代谢产物的浓度测定和药动力学研究。进入 CYP3A 酶诱导模型大鼠与正常大鼠体循环的活性药物成分差异显著。

关键词: 阿托伐他汀; 羟基阿托伐他汀; 液相色谱-串联质谱法; 药动力学; CYP3A 酶; 液液萃取法

中图分类号: R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)09-1029-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.09.001

引用本文: 罗楠, 谭力, 张玫, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中阿托伐他汀及其活性代谢产物[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1029-1036.

Determination of Atorvastatin and Its Active Metabolites in Plasma of Rat by LC-MS/MS

LUO Nan^{1a,2}, TAN Li², ZHANG Mei², A Jiye^{1b}, SUN Runbin^{1b}, FENG Dong^{1b}, QI Xiemin³, ZOU Bingjie³, ZHOU Guohua³, HUANG Qing^{2*}, SONG Qinxin^{1a*} (1.China Pharmaceutical University, a.Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, b.Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Nanjing 210009, China; 2.Center of Inspection and Technical Research, Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210000, China; 3.Department of Pharmacology, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC-MS/MS method for simultaneous determination of atorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin and *p*-hydroxyatorvastatin in rat plasma, and apply to the pharmacokinetic study of atorvastatin in CYP3A-induced model rats and normal rats. **METHODS** MTBE-ethyl acetate(50:50) was used to extract the drug in rat plasma in addition to the selection of XBridge C₁₈(2.1 mm×250 mm, 3.5 μm) as the HPLC column. The column was kept at a constant temperature(35 ℃). The mobile phase was 0.1% formic-acetonitrile(40:60), isocratic elution for 4.4 min at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹ and the injection volume was 10 μL. The detection of analytes was achieved by tandem mass spectrometry with electrospray ionization(ESI) interface in positive ion mode. The following multiple reaction monitoring(MRM) transitions were selected: m/z 559.1→440.1(atorvastatin), m/z 575.3→440.2(*o*-hydroxyl atorvastatin/*p*-hydroxyl atorvastatin), m/z 564.3→445.3(atorvastatin-d₅, IS). The rats randomly selected as CYP3A-induced models were administrated with an oral dose of 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹ dexamethasone for 4 d. Blood samples of normal and model rats were collected in heparinized tubes before, and at 0.083, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 h after atorvastatin administration. Plasma was harvested by centrifugation

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603196, 81673390); 江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2016745); 药物质量与安全预警教育部重点实验室资助项目(DQCP2017MS01); 江苏省青蓝工程

作者简介: 罗楠, 女, 硕士生 Tel: 15298358958 E-mail: 15298358958@163.com *通信作者: 黄青, 女, 博士, 副主任药师 Tel: 15850506183 E-mail: 67658869@qq.com 宋沁馨, 女, 博士, 教授 Tel: 13337800527 E-mail: songqinxin@cpu.edu.cn

and stored frozen until analysis. **RESULTS** Atorvastatin and its metabolites showed a wide linear range from 0.49–500.00 ng·mL⁻¹ ($r^2 > 0.99$). The analytical method presented the RSD of intra-day precision and inter-day precision were <15% ($n=6$); the extraction recovery and matrix effect satisfied the determination standard for biological samples. Furthermore, the drug contained plasma samples stayed stable in 4, 24 h in room temperature and 3 d in 4 °C. In pharmacokinetic parameters, the T_{max} and AUC_{0-t} of rats in induced group were lower than those of normal group, while the K and CL were higher. **CONCLUSION** The newly developed method is convenient, stable and sensitive. It can be applied to the simultaneous determination of atorvastatin and its active metabolites in rat plasma for the pharmacokinetics study. The active atorvastatin components entering the general circulation demonstrated significant differences between the CYP3A-induced model rats and normal rats.

KEYWORDS: atorvastatin; hydroxyl atorvastatin; LC-MS/MS; pharmacokinetics; CYP3A enzyme; liquid-liquid extraction

阿托伐他汀是第 2 代 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂。作为临床首选的降脂药,阿托伐他汀能够显著降低胆固醇、低密度脂蛋白及三酰甘油水平,具有降脂作用强、维持时间长的优点,同时能够显著降低冠心病和其他心脑血管疾病的发生率及病死率,被广泛用于心血管疾病的预防和治疗^[1-4]。然而阿托伐他汀代谢、疗效、不良反应的个体间差异很大,长期临床应用结果显示,阿托伐他汀对不同患者的调脂作用存在 10%~70%的个体差异^[5-6]。本课题组曾对 48 例健康受试者阿托伐他汀的药动学行为进行研究,发现相同剂量给药后,血药浓度峰值(C_{max})、药时曲线下面积(AUC)的个体间差异分别高达 15, 12 倍^[7]。阿托伐他汀的药效和不良反应,与其血药浓度直接相关。因此,如此大的药动学个体差异,可能导致很多患者无法达到有效治疗剂量,或遭受严重的药物不良反应^[3,8]。

阿托伐他汀以其钙盐口服给药,母药及代谢产物可以通过被动扩散和 ABC、SLC 等转运体的主动转运由小肠细胞吸收入血,再被摄取至肝,见图 1^[8-11]。其代谢主要由肝脏的 CYP3A4 酶代谢成邻羟基阿托伐他汀(*ortho*-hydroxyatorvastatin, *o*-HAT)、对羟基阿托伐他汀(*para*-hydroxyatorvastatin, *p*-HAT)及其他 β 氧化产物(包括母药在内的 3 个相对应的非活性内酯衍生物)^[10]。消除的主要途径是通过转运蛋白 MDR1、BCRP 等介导的胆汁排泄与肾脏消除^[12]。目前的研究表明^[5,8,13],阿托伐他汀药动学的个体差异,主要与编码药物代谢酶(主要是 CYP3A)和负责药物转运的基因多态性相关。

笔者所在课题组前期的研究证明了血浆基础代谢组水平能够在一定程度上表征 CYP3A4 酶的体内活性,进而对阿托伐他汀给药后的药动学行为进行预测^[7],这对阿托伐他汀的临床个体化给药的实践有着重要的指导作用。在后续实验中,本课题组仍需要合并酶的抑制剂、诱导剂,在动物

模型以及临床志愿者体内模拟 CYP3A 酶不同的活性状态,进行进一步验证。而阿托伐他汀经肝脏首过效应后到达体循环的药物浓度很低^[14],因此,建立灵敏度高、特异性好的血浆中阿托伐他汀及其活性代谢产物同时定量检测的方法具有重要意义。

目前已有一些阿托伐他汀及其代谢物检测方法的文献报道,如 Hayes 等^[14]提出的 GC-MS,虽然灵敏度高,但由于阿托伐他汀检测需要历经 2 个衍生化步骤,前处理繁琐且样品间的结果偏差较大,并不能满足检测要求。基于 LC-MS/MS 的一些方法存在以下的问题:部分方法^[15-16]仅对阿托伐他汀的母药进行检测,缺少对其活性代谢产物的考察,而阿托伐他汀在体内迅速代谢为羟化代谢产物,并以其为主要形式起效。笔者所在课题组前期的实验发现,其活性代谢物的提取回收率与部分已报道的文献结果^[17-18]有较大出入,因此需要对现有方法进行优化。除此之外,文献报道阿托伐他汀酸和内酯结构随 pH 变化处于一种动态转化的状态,当 pH 为 4~6 时,酸和内酯的转化程度最低,是提取阿托伐他汀及其代谢物的最佳 pH 范围^[19]。但部分文献^[20-22]的方法未考虑到这一点,在其报道的检测条件下,未考虑到酸和内酯的转化状态,其检测出的含量可能与采血时活性成分的真实存在含量有较大偏差。同时,阿托伐他汀的仿制药一致性评价工作正在进行,也需要更加灵敏的方法。

因此,本研究基于 LC-MS/MS 建立了灵敏、稳定、准确的大鼠血浆内阿托伐他汀及其活性代谢物同时测定的方法,并对 CYP3A 酶诱导模型大鼠及正常大鼠体内的药动学进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

TSQ Vantage 三重四极杆质谱仪、Biofuge® Stratos 全能高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific

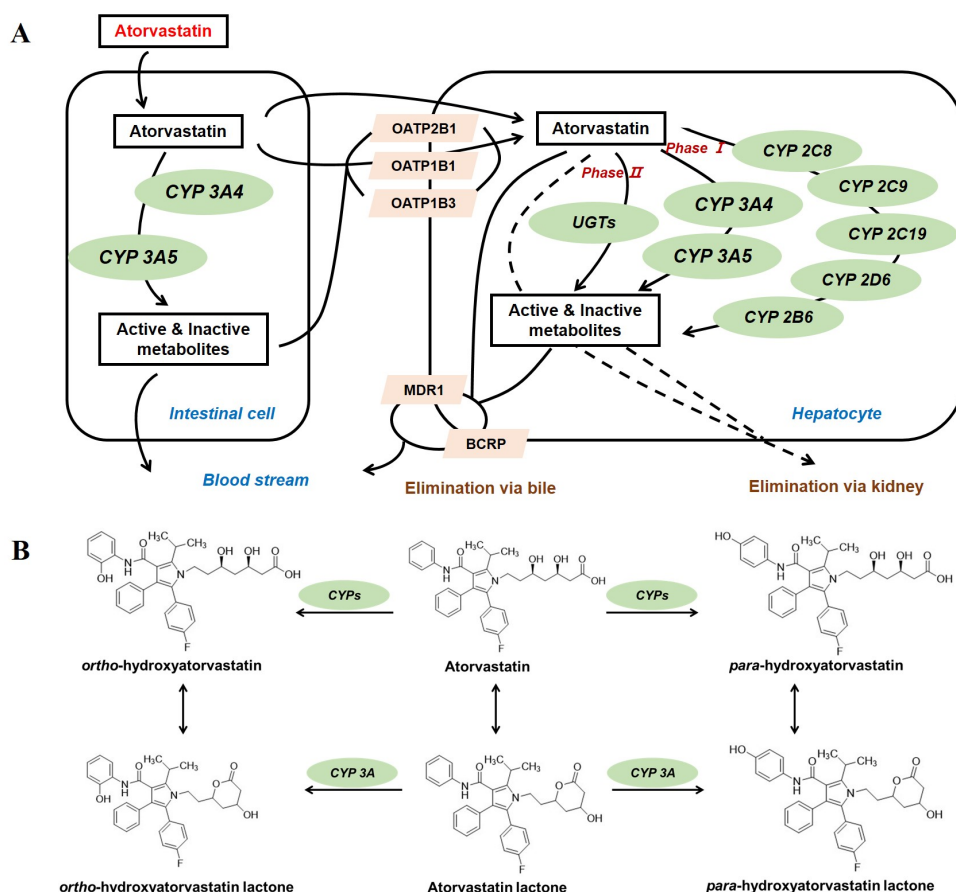


图1 阿托伐他汀在体内吸收、分布、代谢、排泄(ADME)过程示意图

A-阿托伐他汀 ADME 过程中的关键转运体和酶; B-阿托伐他汀的代谢途径。

Fig. 1 Schematic diagram of atorvastatin ADME

A-key transporters and enzymes in atorvastatin ADME; B-metabolism scheme of atorvastatin.

公司); CentriVap[®] Complete[™] 真空离心浓缩仪(美国 Labconco 公司); Talboys 945066 振荡器(美国 Troemner 公司); MDF-U74V 超低温冰箱和 MPR-1411-PC 4 °C 冰箱(日本 Panasonic 公司); Research plus 移液器(德国 Eppendorf 公司); Milli-Q[®] Academic 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

阿托伐他汀对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100590-201303; 含量 95.3%); *o*-HAT 对照品(批号: H828950; 含量 95%)、*p*-HAT 对照品(批号: H-828960; 含量 95%)、阿托伐他汀-*d*₅(内标, 批号: 1512-054A5; 含量>96.0%)均购自于上海安谱实验科技股份有限公司; 地塞米松(上海阿拉丁试剂公司, 批号: B1704084; 含量 98%); 立普妥(阿托伐他汀, 辉瑞制药有限公司, 批号: T45616; 规格: 每片 20 mg); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 批号: 20170110)和甲基叔丁基醚、乙酸乙酯均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有

限公司; 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯, 购自美国赛默飞公司; 实验用水为超纯水。

1.3 动物

Wistar 大鼠 10 只, ♀, 体质量(200±20)g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司提供, 动物合格证号: 11400700287815; 使用许可证号: SCXK(苏)2017-0063; 实验前动物禁食 12 h。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

液相色谱条件: 色谱柱: Waters XBridge C₁₈(2.1 mm×250 mm, 3.5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 0.1%甲酸-乙腈(40:60); 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 等度洗脱。

质谱条件: 离子源为电喷雾离子(ESI)源; 喷雾电压: 3 800 V; 毛细管温度: 350 °C; 辅助气压力: 7 V; 检测方式为正离子多反应监测模式(MRM); 检测离子: *m/z* 559.1→440.1(阿托伐他汀);

m/z 575.3 $\rightarrow$ 440.2(*o*-HAT/*p*-HAT); m/z 564.3 $\rightarrow$ 445.3 (内标); 碰撞能量(CE)分别为 19, 20, 19 V。

2.2 血浆样品处理方法

血浆样品于室温复溶, 精密吸取血浆样品 90 μL 至 1.5 mL 离心管中, 加入 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 10 μL , 涡旋混匀。再加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(冰醋酸调 pH 至 5.0)100 μL , 涡旋 20 s 后, 加入甲基叔丁基醚-乙酸乙酯(50:50)600 μL , 振荡 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 精密吸取上清液 500 μL 至干净离心管中, 减压挥干 1 h。挥干后的残渣用 0.1%甲酸-乙腈(40:60)110 μL 复溶, 振荡 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 10 μL 进样。

2.3 标准曲线和质控样品的制备

精密称取阿托伐他汀、*o*-HAT 和 *p*-HAT 对照品粉末适量, 用甲醇梯度稀释为 4.88, 9.77, 19.53, 39.06, 78.13, 156.25, 312.50, 625.00, 1 250.00, 2 500.00, 5 000.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。取大鼠空白血浆(肝素钠作为抗凝剂)80 μL , 分别加入相应浓度的对照品溶液和 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液各 10 μL , 按“2.2”项下方法制备终浓度为 0.49, 0.98, 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125.00, 250.00, 500.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准含药血浆样品。

取空白血浆 80 μL , 加入相应浓度的混合对照品溶液 10 μL , 再加入 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 10 μL , 按“2.2”项下方法制成低、中、高(0.98, 31.25, 400.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个浓度的质控样品(QC)。

2.4 大鼠酶诱导造模及药动学实验设计

Wistar 大鼠, ♀, 10 只适应性喂养 3 d 后, 按体质量随机分为 2 组, 每组 5 只, 即对照组和诱导组。每天早晨诱导组大鼠灌胃地塞米松混悬液 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 对照组大鼠灌胃 2 mL 的 0.5% CMC-Na, 连续 4 d。末次给药后, 动物禁食不禁水过夜, 次日早晨灌胃阿托伐他汀混悬液 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 并于给药前和给药后 0.083, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 h 眼眶取血约 0.3 mL 置于肝素钠抗凝管中, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 转移上层血浆至新的 EP 管中, 立即置 -80°C 冰箱保存待测。室温解冻后样本按“2.2”项下方法处理, 测定, 采用 WinNonlin(美国 Certara 公司)软件计算药动学参数。

3 结果

3.1 血浆样品前处理方法的优化

3.1.1 蛋白沉淀再浓缩 阿托伐他汀 pK_a 为

4.46^[13], 易溶于甲醇, 不溶于 $\text{pH}<4$ 的水溶液中, 理论上酸性体系可使阿托伐他汀易溶于有机相中从而被提取出来, 而有机溶剂沉淀法步骤简单且文献报道的回收率高, 因此预实验首先考察了乙腈或甲醇作为沉淀剂在加酸和不加酸环境的提取回收率, 结果显示阿托伐他汀的提取回收率为 68.91%~93.53%, *o*-HAT 稍低, 但 *p*-HAT 的提取回收率 $<20\%$, 且基质对待测物信号的影响较大, 这与部分文献报道的结果^[20-23]有较大出入, 不能满足检测要求, 结果见表 1。

3.1.2 液液萃取 液液萃取法的优点在于选择性更强, 能够有效去除血浆中内源性杂质, 并对待测物有浓集的作用。根据文献报道^[19], 阿托伐他汀酸(活性形式)和内酯(非活性形式)结构随 pH 变化处于一种动态转化的状态, $\text{pH}<4$ 的环境有利于酸和内酯的相互转化; $\text{pH}>6$ 的环境会使内酯不可逆地转化为酸; 只有当提取 pH 处于最适范围(pH 4~6), 才能尽可能真实地反映阿托伐他汀活性形式在体内的实际水平。因此, 本研究共考察了 0.1%甲酸(pH 2.69)和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵(pH 5.0)2 个水平酸化试剂, 甲基叔丁基醚萃取、甲基叔丁基醚-乙酸乙酯(50:50)萃取和甲基叔丁基醚-异丙醇-二氯甲烷(60:30:10)3 种萃取剂的提取回收率, 整体实验设计见表 1。

结果显示, 乙酸铵酸化(pH 5.0)的提取回收率显著高于 0.1%甲酸酸化和不酸化的提取回收率。经测定 0.1%甲酸的 pH 约为 2.69, 在最适 pH 的范围之外, 实验结果与理论一致。于是在确定酸化试剂为 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵(pH 5.0)的基础上考察了 3 种萃取剂的提取回收率。结果显示甲基叔丁基醚作为单独萃取剂的提取回收率较低, 甲基叔丁基醚-乙酸乙酯(50:50)萃取的提取回收率与甲基叔丁基醚-异丙醇-二氯甲烷(60:30:10)萃取的提取回收率相近。但实际操作中发现, 甲基叔丁基醚-异丙醇-二氯甲烷(60:30:10)萃取时的乳化现象更明显, 离心后出现的凝胶状中间层大小不一, 造成了提取回收率的不稳定。

因此, 综合上述实验结果, 最终确定本实验的血浆样品前处理方法为 100 μL 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵(pH 5.0)酸化后, 加入 6 倍体积的甲基叔丁基醚-乙酸乙酯(50:50)进行萃取, 提取过程可在 1.5 mL EP 管中完成。

表 1 不同前处理方法的提取回收率

Tab. 1 Extraction recoveries of different extraction methods

酸化剂	萃取剂	沉淀剂	提取回收率/%		
			阿托伐他汀	<i>o</i> -HAT	<i>p</i> -HAT
—	—	乙腈	72.83~73.49	53.18~55.00	14.69~18.20
0.1%冰醋酸	—	乙腈	71.67~93.53	49.62~66.73	9.48~16.41
—	—	甲醇	69.06~75.50	52.30~53.91	10.78~17.05
0.1%冰醋酸	—	甲醇	68.91~75.23	51.21~52.65	9.32~14.12
—	甲基叔丁基醚	—	15.63~19.24	17.11~21.17	4.36~5.29
0.1%甲酸	甲基叔丁基醚	—	18.98~26.03	19.82~29.17	4.84~6.92
0.1 mol·L ⁻¹ 乙酸铵(pH 5.0)	甲基叔丁基醚	—	60.71~85.22	62.46~94.05	55.05~80.67
0.1 mol·L ⁻¹ 乙酸铵(pH 5.0)	甲基叔丁基醚-乙酸乙酯(50 : 50)	—	72.59~77.05	76.43~90.12	65.70~83.29
0.1 mol·L ⁻¹ 乙酸铵(pH 5.0)	甲基叔丁基醚-异丙醇-二氯甲烷(60 : 30 : 10)	—	73.47~85.43	75.81~91.63	58.61~82.90

3.2 方法学验证

3.2.1 特异性 分别取 6 只大鼠的空白血浆 90 μL , 加 10 μL 甲醇补足体积, 按照“2.2”项下方法操作, 进样 10 μL 进行分析, 得到空白基质的色谱图 2A; 取空白血浆 80 μL , 分别加入混合对照品溶液(4.88 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)和内标(2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)各 10 μL , 同法操作, 得到空白血浆添加阿托伐他汀及其代谢物(0.49 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的色谱图 2B。在本实验的检测条件下, 阿托伐他汀、内标、*o*-HAT、*p*-HAT 的出峰时间分别为 3.79, 3.82, 3.33, 2.17 min 左右。再与采样点的样品结果(图 2C)对比, 所有待测物的峰形良好, 等度洗脱 4.4 min 即可完成 1 个样品的检测, 耗时短, 血浆中内源性物质对阿托伐他汀及其代谢物的测定无干扰。

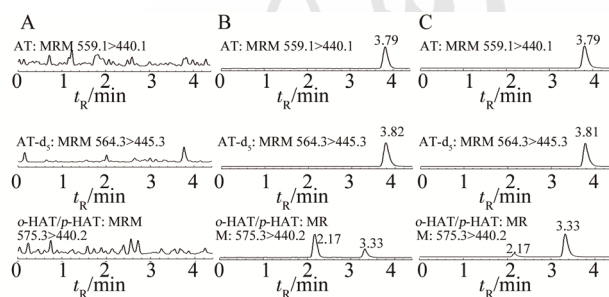


图 2 血浆样品的典型 LC-MS/MS 色谱图

A-空白基质; B-空白血浆+阿托伐他汀+代谢物(0.49 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-大鼠血浆样品。

Fig. 2 Representative LC-MS/MS chromatograms in plasma A-blank; B-blank plasma + atorvastatin + metabolites(0.49 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-plasma sample of rats.

3.2.2 线性范围和定量下限 标准含药血浆样品按照“2.2”项下方法操作, 以阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 的峰面积和内标的峰面积比值 A_s/A_i 为纵坐标, 阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 的浓度为横坐标进行 $1/x^2$ 线性权重回归, 得到线性回归方程分别为 $y=5.36\times 10^{-3}x-3.32\times 10^{-4}$, $r^2=0.998\ 7$ (阿托伐他汀); $y=2.29\times 10^{-1}x-4.02\times 10^{-4}$, $r^2=0.998\ 8$ (*o*-HAT);

$y=6.25\times 10^{-3}x-6.56\times 10^{-4}$, $r^2=0.998\ 8$ (*p*-HAT)。结果显示, 阿托伐他汀及其代谢产物的血浆浓度与响应值在 0.49~500.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内有良好的线性关系 ($r^2>0.99$), 各浓度的准确度均在 $\pm 15\%$ 之内, LLOQ 均为 0.49 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.2.3 精密度和准确度 制备含阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 的 0.49(LLOQ), 0.98, 31.25, 400.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4 个浓度的 QC 样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 用随行标准曲线计算 QC 样品浓度, 经方差分析求得本法的精密度, 考察批内精密度和 3 个批次间的批间精密度; 将测定结果代入随行标准曲线得到测得浓度, 以多次测定结果的平均值与加入浓度比较计算得准确度。结果显示, 本方法的批内、批间精密度 RSD 均 $<15\%$, 准确度为 $85\%\sim 115\%$, 证明了本方法能够准确而稳定地定量检测阿托伐他汀及其活性代谢产物。结果见表 2。

3.2.4 提取回收率和基质效应 制备 0.98, 31.25, 400.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 QC 样品。每一浓度进行 6 样本分析获得阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 峰面积的平均值 A_1 ; 另取空白血浆 80 μL , 按照“2.2”项下方法操作后加入内标和相应浓度的混合对照品溶液, 制成低、中、高 3 个浓度(分别为 0.98, 31.25, 400.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)未经提取的对照样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 获得阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 峰面积的平均值 A_2 , 以 A_1/A_2 计算提取回收率。

取不同浓度的对照品溶液, 加入内标溶液, 用流动相稀释成低、中、高 3 个浓度(分别为 0.98, 31.25, 400.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的混合对照品溶液, 每一浓度进行 6 样本分析, 获得阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 相应峰面积的平均值 A_3 , 以 A_2/A_3 计算基质效应。

提取回收率的考察结果为 $69.10\%\sim 80.80\%$, 血浆基质在 $85\%\sim 115\%$ 内, 对样品的检测信号无干扰, 符合生物样品分析方法要求。结果见表 2。

表2 精密度、准确度、提取回收率和基质效应的考察结果($n=6$)

Tab. 2 Results of precision, accuracy, extraction recovery and matrix effect($n=6$)

化合物	浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	批间精密度		批内精密度		准确度	提取回收率		基质效应	
		浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%	浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%		%	RSD/%	%	RSD/%
阿托伐他汀	0.49	0.47 $\pm$ 0.00	1.04	0.48 $\pm$ 0.01	2.56	98.45	—	—	—	—
	0.98	0.98 $\pm$ 0.02	2.31	0.97 $\pm$ 0.05	4.86	98.96	72.69	5.50	101.96	4.35
	31.25	30.76 $\pm$ 0.26	0.86	30.58 $\pm$ 1.46	5.00	97.85	72.15	4.04	100.86	5.42
	400.00	415.61 $\pm$ 6.98	1.68	414.36 $\pm$ 17.50	4.22	103.59	79.27	3.95	90.69	3.97
<i>o</i> -HAT	0.49	0.49 $\pm$ 0.01	2.24	0.49 $\pm$ 0.04	7.65	100.56	—	—	—	—
	0.98	0.97 $\pm$ 0.06	6.53	0.96 $\pm$ 0.05	5.34	97.99	79.72	4.08	100.65	4.32
	31.25	30.82 $\pm$ 0.23	0.74	30.66 $\pm$ 1.56	5.65	98.11	69.39	6.22	96.67	8.92
	400.00	429.08 $\pm$ 3.94	0.92	428.36 $\pm$ 15.44	3.61	107.09	80.37	4.39	96.52	2.70
<i>p</i> -HAT	0.49	0.50 $\pm$ 0.01	1.60	0.51 $\pm$ 0.02	3.21	105.19	—	—	—	—
	0.98	1.00 $\pm$ 0.04	3.92	1.00 $\pm$ 0.05	4.67	102.37	69.10	3.68	110.45	4.12
	31.25	31.07 $\pm$ 0.24	0.76	31.27 $\pm$ 1.50	4.79	100.06	80.80	7.68	98.04	8.35
	400.00	424.08 $\pm$ 0.72	0.17	421.64 $\pm$ 14.91	3.54	105.41	76.51	7.00	94.24	2.41

3.2.5 稳定性 制备 0.98, 31.25, 400.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 QC 样品, 每一浓度进行 5 样本分析, 分别考察处理后的血浆样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 d、室温放置 4 h 和室温放置 24 h 的稳定性。结果显示, 按本法制备的样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 d、室温放置 4 h 和 24 h, 阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 均稳定, 可以保证样品的有效分析测定, 结果见表 3。

3.2.6 残留效应 制备 400.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度 QC 样本和空白血浆样本, 按照空白血浆、高浓度 QC 样本、空白血浆样本、高浓度 QC 样本、空白血浆、高浓度 QC 样本、空白血浆样本的顺序, 每样本重复 2 次进样, 测得空白血浆样本中阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 的峰面积均为 0, 阿托伐他汀- d_5 的平均峰面积为 LLOQ 峰面积的 0.19%, 表明高浓度样本对低浓度样本的测定无残留效应。

3.3 药动力学应用

按照“2.4”项中的实验方案造模并依法采取大鼠眼眶血样。10 只大鼠的血浆样本按本研究所建立方法, 检测血中阿托伐他汀、*o*-HAT、*p*-HAT 的药物经时浓度。结果显示对照组和诱导组大鼠灌胃给予阿托伐他汀后, 体内药动力学过程均符合二房室一级吸收模型, 药时曲线见图 3, 主要的药

动力学参数见表 4。对照组大鼠在灌胃给药阿托伐他汀后, 母药的血药浓度在 18 min 左右达到峰值后迅速消除; 主要活性代谢产物 *o*-HAT 达到血药浓度峰值时间更晚, 并且消除缓慢, 在体内驻留时间长; 另一个活性代谢产物 *p*-HAT 在体内的含量很低, 但仍可观察到其血药浓度曲线呈消除慢、驻留时间长的趋势。阿托伐他汀的活性主要由活性代谢产物产生, 其药效持续时间久的优点也与活性代谢产物的半衰期长相关, 这与本实验中观察到的现象一致。

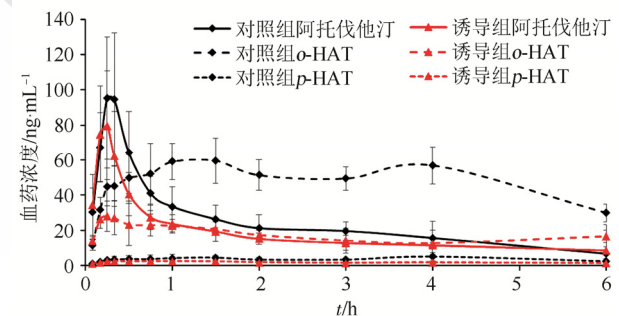


图3 大鼠灌胃给药 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 阿托伐他汀的药时曲线
Fig. 3 Plasma concentrations of atorvastatin in rat subjects following oral administration of a single 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ atorvastatin dose

表3 血浆样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 d、室温放置 4 h 和 24 h 的稳定性结果($n=5$)

Tab. 3 Stability results of plasma sample in 4 $^{\circ}\text{C}$ for 3 d, room temperature for 4 h, and room temperature for 24 h($n=5$)

化合物	浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	检测浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (RSD/%)		
		室温 4 h	室温 24 h	4 $^{\circ}\text{C}$ 3 d
阿托伐他汀	0.98	0.99 $\pm$ 0.05(4.66)	0.97 $\pm$ 0.05(4.94)	0.99 $\pm$ 0.11(10.88)
	31.25	31.05 $\pm$ 1.14(2.71)	30.99 $\pm$ 1.43(4.52)	30.23 $\pm$ 0.87(3.33)
	400.00	427.20 $\pm$ 10.88(2.55)	408.99 $\pm$ 12.92(3.16)	412.77 $\pm$ 20.84(5.05)
<i>o</i> -HAT	0.98	0.99 $\pm$ 0.05(4.73)	0.98 $\pm$ 0.03(3.12)	1.03 $\pm$ 0.058(7.56)
	31.25	30.12 $\pm$ 0.89(3.38)	30.14 $\pm$ 1.29(4.95)	31.01 $\pm$ 1.16(3.82)
	400.00	431.60 $\pm$ 18.24(4.23)	430.23 $\pm$ 16.49(3.83)	422.78 $\pm$ 21.34(5.05)
<i>p</i> -HAT	0.98	1.01 $\pm$ 0.06(6.21)	1.01 $\pm$ 0.05(5.28)	1.01 $\pm$ 0.10(10.35)
	31.25	31.60 $\pm$ 1.51(4.77)	31.36 $\pm$ 1.32(4.20)	30.75 $\pm$ 0.92(2.99)
	400.00	417.62 $\pm$ 13.33(3.19)	416.82 $\pm$ 17.30(4.15)	426.68 $\pm$ 12.52(2.93)

表 4 大鼠灌胃给药 10 mg·kg⁻¹ 阿托伐他汀的药动学参数

Tab. 4 Pharmacokinetic parameters for atorvastatin after oral administration of 10 mg·kg⁻¹ in rats

分组	化合物	K/h^{-1}	$t_{1/2}/h$	T_{max}/h	$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	$AUC_{0-t}/h \cdot ng \cdot mL^{-1}$	$CL/mL \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$
对照组	阿托伐他汀	0.22	4.66	0.30	98.66	139.94	49 750.37
	<i>o</i> -HAT	0.13	7.64	2.40	72.17	291.68	20 157.88
	<i>p</i> -HAT	0.15	5.41	3.00	5.54	21.60	264 692.74
诱导组	阿托伐他汀	0.17	4.82	0.22	82.45	106.81	61 906.54
	<i>o</i> -HAT	0.15	6.18	0.25	31.37	100.79	44 573.04
	<i>p</i> -HAT	0.10	7.89	1.02	2.93	10.40	425 639.96

与对照组大鼠的药动学参数相比,诱导组大鼠体内阿托伐他汀的 T_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 均小于对照组,而清除率 CL 和消除速率常数 K 值均大于对照组。说明诱导组大鼠体内的阿托伐他汀在更短的时间内达到血药浓度峰值,然后迅速地代谢为活性产物 *o*-HAT 和 *p*-HAT。由于地塞米松诱导 CYP3A 酶表达后产生的代谢加速,使诱导组的母药阿托伐他汀在大鼠体内的清除率增加、驻留时间变短, AUC 也相对降低。

4 讨论

地塞米松是一种长效的糖皮质激素,能够特异性地诱导 CYP3A 酶活性表达,近年有研究者将其应用于动物体内 CYP3A 酶诱导模型研究,并且在 mRNA 和蛋白水平上得到证明^[24-25],但其用于酶诱导模型的体内验证少见报道。人体内经由 CYP3A4 酶代谢的药物,在雄性大鼠体内实际多由 CYP2C 代谢,在雌性大鼠中才通过 CYP3A 酶代谢^[26]。此外,雌性大鼠体内 CYP2C 酶对药物氧化代谢的影响远小于雄性大鼠,更适用于建立与 CYP3A 酶抑制诱导相关的药物相互作用模型^[27]。因此,笔者所在课题组以地塞米松为诱导剂,雌性大鼠为研究对象,尝试建立 CYP3A 酶诱导模型,并进行体内验证。

核受体(Pregnane X receptor, PXR)在诱导 CYP3A 酶中起重要作用^[11,28],其与配体结合后被激活,能够直接结合 DNA 区段并调节相邻基因如 CYP3A、MDR1 等的表达,同时与 CYP3A 基因的调节区结合增加酶的转录和表达。糖皮质激素药物地塞米松正是 PXR 的配体,能够激活糖皮质激素受体,进而诱导 PXR 增加 CYP3A 酶的表达倍数^[29]。此外,地塞米松对阿托伐他汀的 II 相代谢酶 UGT 有 3~4 倍的诱导作用^[30],也可一定程度上促进阿托伐他汀的代谢。因此,诱导组大鼠体内阿托伐他汀消除加快,可能受到 CYP3A 酶活性增加和 UGT 酶表达增加的双重促进代谢作用。

除 CYP3A 酶外, PXR 还与上调 II 相代谢酶和

转运蛋白(P-gp)相关。P-gp 是 ABC 转运蛋白超家族的主要成员,受到多药耐药基因编码,而 MDR1 直接介导阿托伐他汀代谢产物的胆汁排泄^[13],地塞米松被证实对肝内 P-gp 的活性诱导可高达 4.8 倍^[31],因此,诱导组阿托伐他汀活性代谢产物的外排速率也应明显高于对照组。这一推测与本实验结果相符,由于诱导组代谢产物的 AUC 小于对照组,2 组大鼠的代谢率(代谢产物 AUC/母药 AUC)与诱导组代谢率应高的理论期望相反,其原因可以由地塞米松引起的肝小管 MDR1 的表达量增加促进阿托伐他汀代谢产物排泄增加来解释。

从实验结果可以看出, CYP3A 代谢酶以及外排转运体等的个体差异,会导致阿托伐他汀入血后活性成分(AUC 之和)的显著差异($P=0.027$,空白组 AUC 之和为诱导组的 2.1 倍),从而造成机体药效的个体差异。这不是一个单基因水平能解释的问题,而与机体整体的基础代谢状态相关。

阿托伐他汀的仿制药一致性评价工作正在进行,可以从源头上保障国产制剂与进口药一致的体内行为,但是对于复杂的个体,还需寄希望于多组学结合的精准医学的发展,实现针对个体的精准用药,才能真正地把好药用好。

本研究基于液液萃取法建立了简便、稳定、灵敏的 LC-MS/MS 方法,能在 0.49~500.00 ng·mL⁻¹ 线性范围内准确定量检测大鼠血浆中阿托伐他汀及 *p*-HAT 和 *o*-HAT 的含量;采用了地塞米松作为造模药物成功建立了 CYP3A 酶诱导动物模型。本研究检测了阿托伐他汀活性成分在大鼠体内的真实含量,为 CYP3A 酶活性表征实验和仿制药临床前一致性评价提供了可靠的定量方法。

REFERENCES

- [1] PATEL M, KOTHARI C. Critical review of statins: a bio-analytical perspective for therapeutic drug monitoring [J]. TrAC, 2016(86): 206-221.
- [2] KEARNEY P M, BLACKWELL L, COLLINS R, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18 686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis [J].

- Lancet, 2008, 371(9607): 117-125.
- [3] NIEMI M. Transporter pharmacogenetics and statin toxicity [J]. Clin Pharmacol Ther, 2010, 87(1): 130-133.
 - [4] CHEN M, WANG X Q, XU Y Y, et al. Effect of atorvastatin and coenzyme Q10 on hs-CRP, ET-1 and BNP level in chronic heart failure patients [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(7): 1042-1045.
 - [5] KOSTAPANOS M S, MILIONIS H J, FILIPPATOS T D, et al. A 12-week, prospective, open-label analysis of the effect of rosuvastatin on triglyceride-rich lipoprotein metabolism in patients with primary dyslipidemia [J]. Clin Ther, 2007, 29(7): 1403-1414.
 - [6] DEGORTER M K, TIRONA R G, SCHWARZ U I, et al. Clinical and pharmacogenetic predictors of circulating atorvastatin and rosuvastatin concentrations in routine clinical care [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2013, 6(4): 400-408.
 - [7] HUANG Q, AA J Y, JIA H N, et al. A pharmacometabonomic approach to predicting metabolic phenotypes and pharmacokinetic parameters of atorvastatin in healthy volunteers [J]. J Proteome Res, 2015, 14(9): 3970-3981.
 - [8] TALAMEH J A, KITZMILLER J P. Pharmacogenetics of statin-induced myopathy: a focused review of the clinical translation of pharmacokinetic genetic variants [J]. J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics, 2014, 5(2): 128.
 - [9] FEIDT D M, KLEIN K, HOFMANN U, et al. Profiling induction of cytochrome P450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38(9): 1589-1597.
 - [10] FUJINO H, SAITO T, TSUNENARI Y, et al. Metabolic properties of the acid and lactone forms of HMG-CoA reductase inhibitors [J]. Xenobiotica, 2004, 34(11-12): 961-971.
 - [11] KORHONOVA M, DORICAKOVA A, DVORAK Z. Optical isomers of atorvastatin, rosuvastatin and fluvastatin enantiospecifically activate pregnane x receptor p_{ar} and induce CYP2A6, CYP2B6 and CYP3A4 in human hepatocytes [J]. Plos One, 2015, 10(9): e0137720.
 - [12] WU X, WHITFIELD L R, STEWART B H. Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter [J]. Pharm Res, 2000, 17(2): 209-215.
 - [13] BECKER M L, VISSER L E, SCHAIK R H N V, et al. Influence of genetic variation in CYP3A4, and ABCB1, on dose decrease or switching during simvastatin and atorvastatin therapy [J]. Pharmacoevidenc Drug Saf, 2010, 19(1): 75-81.
 - [14] NIROGI R, MUDIGONDA K, KANDIKERE V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(2): 379-387.
 - [15] REZK M R, BADR K A. Quantification of amlodipine and atorvastatin in human plasma by UPLC-MS/MS method and its application to a bioequivalence study [J]. Biomed Chromatogr, 2018(5 Pt 2): e4224.
 - [16] TURNER R M, FONTANA V, BAYLISS M, et al. Development, validation and application of a novel HPLC-MS/MS method for the quantification of atorvastatin, bisoprolol and clopidogrel in a large cardiovascular patient cohort [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018(159): 272-281.
 - [17] CREVAR-SAKAC M, VUJIC Z, VUJICIC Z, et al. LC-MS/MS method for quantification of atorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin, *p*-hydroxyatorvastatin, and atorvastatin lactone in rat plasma [J]. Acta Chromatographica, 2016, 28(3): 281-298.
 - [18] CAI L Y, ZHENG Z J, WANG X P, et al. Simultaneous determination of atorvastatin and its metabolites in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. Anal Methods, 2017, 9(6): 1038-1045.
 - [19] JEMAL M, XIA Y Q. Bioanalytical method validation design for the simultaneous quantitation of analytes that may undergo interconversion during analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2000, 22(5): 813-827.
 - [20] YACOB M, AWWAD A A, ALAWI M, et al. Simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin with its metabolites; ortho and para hydroxy atorvastatin; in human plasma by LC-MS/MS [J]. J Chromatogr B, 2013, 917(4): 36-47.
 - [21] MACWAN J S, IONITA I A, DOSTALEK M, et al. Development and validation of a sensitive, simple, and rapid method for simultaneous quantitation of atorvastatin and its acid and lactone metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(2): 423-433.
 - [22] WANG J, LUZUM J A, PHELPS M A, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of simvastatin, lovastatin, atorvastatin, and their major metabolites in human plasma [J]. J Chromatogr B, 2015(983/984): 18-25.
 - [23] CHEN H L, ZHANG W P, YANG F Y, et al. Concentration determination of atorvastatin calcium and pioglitazone hydrochloride in Beagle dog plasma by LC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(8): 1311-1321.
 - [24] XUE C M, ZHANG B, JIN R. et al. Study on activity changes of CYP3 and GST in glucocorticoid induced different states in rats [J]. Chin Bas Med TCM(中国中医基础医学杂志), 2011(11): 1204-1206.
 - [25] WANG Q X, WU C Q, SHI C, et al. Effects of dexamethasone on liver microsomal cytochrome P450 in male Wistar rats [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2005, 14(6): 705-708.
 - [26] XIA Z L, CHEN R, WANG M L. Establishment and verification of cytochrome P450 3A enzyme induction model in female rats [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2013, 48(12): 995-999.
 - [27] KANAZU T, YAMAGUCHI Y, OKAMURA N, et al. Model for the drug-drug interaction responsible for CYP3A enzyme inhibition. II: establishment and evaluation of dexamethasone-pretreated female rats [J]. Xenobiotica, 2004, 34(5): 403-413.
 - [28] XIE W, BARWICK J L, DOWNES M, et al. Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR [J]. Nature, 2000, 406(6794): 435-439.
 - [29] EL-SANKARY W, BOMBAIL V, GIBSON G G, et al. Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element [J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(30): 1029-1034.
 - [30] KANOU M, USUI T, UEYAMA H, et al. Stimulation of transcriptional expression of human UDP-glucuronosyl transferase 1A1 by dexamethasone [J]. Mol Biol Rep, 2004, 31(3): 51-158.
 - [31] DEMEULE M, JODOIN J, BEAULIEU E, et al. Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues [J]. Febs Letters, 1999, 442(2/3): 208-214.

收稿日期: 2018-08-31
(本文责编: 李艳芳)