

代谢分析

人血浆中阿托伐他汀和 5 个代谢产物 LC-MS/MS 分析
方法的建立及在药代动力学研究中的应用*宋玉晨¹, 宫晓², 易欢¹, 张颖^{1**}, 郭春莉^{2**}

(1. 中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所 北京市中药药理重点实验室, 北京 100091;

2. 中国中医科学院西苑医院 脑病科, 北京 100091)

摘要 目的: 建立液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法同时测定人血浆中阿托伐他汀及 2 个活性相关的羟基他汀酸代谢物和 3 个毒性相关的他汀内酯型代谢物的浓度, 并应用于健康人药代动力学研究和患者血药浓度分析。方法: 血浆样本酸化后通过蛋白沉淀法处理。液相色谱分离采用 Zorbax SB-C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 5 μm) 色谱柱, 以含 0.05% 甲酸的甲醇-乙腈(1:1) 和水-甲醇-乙腈(9:0.5:0.5) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.35 mL · min⁻¹。采用电喷雾电离源, 正离子模式、多反应监测扫描; 检测离子对 *m/z* 分别为阿托伐他汀 559.3 → 440.2、邻羟基阿托伐他汀酸(2-HAT) 和对羟基阿托伐他汀酸(4-HAT) 575.1 → 440.3、阿托伐他汀内酯(ATL) 540.9 → 448.2、邻羟基阿托伐他汀内酯(2-HATL) 和对羟基阿托伐他汀内酯(4-HATL) 557.2 → 448.2 及内标匹伐他汀 422.2 → 290.0。对分析方法进行全面验证后检测健康受试者及临床患者服用阿托伐他汀钙片后血浆样品, 分析阿托伐他汀和 5 个代谢产物的药代动力学特征。结果: 阿托伐他汀及其代谢物浓度在 0.1 ~ 25 nmol · L⁻¹ 范围内线性关系良好, 日内、日间精密度的 RSD 及准确度的 RE 均 < 15%, 各种条件下稳定性良好。健康受试者口服 20 mg 阿托伐他汀钙片后, 阿托伐他汀、2-HAT、4-HAT、ATL、2-HATL 和 4-HATL 的 C_{max} 均值分别为 11.48、4.71、0.28、1.71、2.52 和 2.31 nmol · L⁻¹; AUC_{0-∞} 均值分别为 87.31、58.79、8.60、28.75、45.76、31.49 nmol · h · L⁻¹; t_{1/2} 均值分别为 7.96、7.93、19.58、8.76、8.98 和 21.37 h。患者服药 12 h 后阿托伐他汀、2-HAT、4-HAT、ATL、2-HATL 和 4-HATL 的血药浓度分别为 (4.16 ± 1.31) nmol · L⁻¹、(2.65 ± 1.33) nmol · L⁻¹、(1.15 ± 1.16) nmol · L⁻¹、(2.96 ± 1.83) nmol · L⁻¹、(4.27 ± 2.00) nmol · L⁻¹ 和 (3.70 ± 1.74) nmol · L⁻¹。结论: 本研究建立的人血浆中阿托伐他汀及 5 个代谢物同时定量检测方法准确、快捷、灵敏、稳定, 可用于临床药代动力学研究和血药浓度监测。临床试验结果表明毒性相关内酯型代谢物具有较高暴露水平, 需关注可能带来的副反应风险。

关键词: 人血浆; 阿托伐他汀; 阿托伐他汀内酯; 代谢产物; 液相色谱串联质谱; 健康受试者; 患者; 药代动力学

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)01-0058-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.01.06

* 国家自然科学基金项目(81873179); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04906, CI2021A01303)

** 通信作者 张颖 Tel: (010)62835639; E-mail: zhyingde@sina.com

郭春莉 Tel: (010)62835301; E-mail: guospringry@163.com

第一作者 Tel: 18510100379; E-mail: 1980919247@qq.com

Establishment of an LC – MS/MS method for the determination of atorvastatin and five metabolites in human plasma and its application in pharmacokinetics*

SONG Yu – chen¹, GONG Xiao², YI Huan¹, ZHANG Ying^{1**}, GUO Chun – li^{2**}

(1. Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Department of Neurology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To establish a liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) method for the simultaneous determination of atorvastatin, two activity – related hydroxy statin metabolites and three toxicity – related statin lactones in human plasma, and its application to the study of pharmacokinetics in healthy subjects and the analysis of concentrations in patients. **Methods:** After acidification, plasma samples were treated by protein precipitation. The LC separation was performed on a Zorbarx SB – C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 5 μm) column. Methanol – acetonitrile (1:1) water – methanol – acetonitrile (9:0.5:0.5) containing 0.05% formic acid were used as the mobile phases for gradient elution, and the flow rate was 0.35 mL · min⁻¹. The electric spray ionization source, positive ion mode and multi – reaction monitoring scanning were adopted for MS detection. The *m/z* of each targeted analyte was 559.3 → 440.2 for atorvastatin, 575.1 → 440.3 for 2 – hydroxy atorvastatin acid (2 – HAT) and 4 – hydroxy atorvastatin acid (4 – HAT), 540.9 → 448.2 for atorvastatin lactone (ATL), 557.2 → 448.2 for 2 – hydroxy atorvastatin lactone (2 – HATL) and 4 – hydroxy atorvastatin lactone (4 – HATL), and 422.2 → 290.0 for the internal standard of pitavastatin. After a full method validation, the developed LC – MS/MS method was used to determine the plasma samples of healthy subjects and patients after taking atorvastatin calcium tablets, and the pharmacokinetic characteristics of atorvastatin and five metabolites were analyzed. **Results:** The calibration curves of atorvastatin and its metabolites presented a good linear relationship in the range of 0.1 – 25 nmol · L⁻¹. The RSD of intra – and inter – day precision and the RE of accuracy were all less than 15%, and the stability was well tolerated under different conditions. In healthy subjects after oral administration of 20 mg atorvastatin calcium tablets, the respective mean values of *C*_{max} for atorvastatin, 2 – HAT, 4 – HAT, ATL, 2 – HATL and 4 – HATL were 11.48, 4.71, 0.28, 1.71, 2.52 and 2.31 nmol · L⁻¹, *AUC*_{0–∞} were 87.31, 58.79, 8.60, 28.75, 45.76, 31.49 nmol · h · L⁻¹, *t*_{1/2} were 7.96, 7.93, 19.58, 8.76, 8.98 and 21.37 h. After 12 h of administration, the average blood concentrations of atorvastatin, 2 – HAT, 4 – HAT, ATL, 2 – HATL and 4 – HATL in the patient were (4.16 ± 1.31) nmol · L⁻¹, (2.65 ± 1.33) nmol · L⁻¹, (1.15 ± 1.16) nmol · L⁻¹, (2.96 ± 1.83) nmol · L⁻¹, (4.27 ± 2.00) nmol · L⁻¹ and (3.70 ± 1.74) nmol · L⁻¹. **Conclusion:** The method for the simultaneous quantitative determination of atorvastatin and five metabolites in human plasma established in this study is accurate, rapid, sensitive and stable, and can be used for clinical pharmacokinetics research and plasma drug concentration monitoring. The clinical studies revealed that toxicity related lactone metabolites have a high level of exposure in humans, which requires attention to the possible risk of side effects.

Keywords: human plasma; atorvastatin; atorvastatin lactone; metabolites; LC – MS/MS; healthy subjects; patients; pharmacokinetics

阿托伐他汀(atorvastatin)是3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMG-CoA)还原酶抑制剂,能有效降低血胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平,是临床首选的降脂药,用于心脑血管病的防治^[1]。

虽然阿托伐他汀在心血管疾病的临床预防和治疗中应用广泛,但在临床长期应用过程中也出现了关于服用阿托伐他汀导致的包括横纹肌溶解在内的肌肉不良反应^[2-3]。阿托伐他汀以活性酸形式给药,主要通过肝脏中的代谢酶CYP3A4大量首过代谢,产生2个活性代谢物邻羟基阿托伐他汀酸(2-hydroxy atorvastatin acid, 2-HAT)和对羟基阿托伐他汀酸(4-hydroxy atorvastatin acid, 4-HAT),以及3个相应的无活性内酯代谢物阿托伐他汀内酯(atorvastatin lactone, ATL)、邻羟基阿托伐他汀内酯(2-hydroxy atorvastatin lactone, 2-HATL)和对羟基阿托伐他汀内酯(4-hydroxy atorvastatin lactone, 4-HATL)^[4]。此前有文献报道服用阿托伐他汀导致的肌肉不良反应与阿托伐他汀内酯型代谢物的体内暴露量密切相关^[5],因此全面解析阿托伐他汀在人体的代谢物暴露水平和药代特性对于保障阿托伐他汀在临床中的有效性和安全性具有重要意义。

目前关于人血浆中阿托伐他汀活性代谢物2-HAT和4-HAT的测定方法及药代动力学特征已有较多报道^[6-10],但未见关于3个内酯代谢物在中国健康人群中的体内药代动力学数据发表。因此本研究基于LC-MS/MS建立了人血浆中阿托伐他汀及其5个代谢物的准确、快速、灵敏检测方法,应用于阿托伐他汀及其活性和毒性代谢物在中国健康男性受试者的药代动力学研究及临床患者服药后的血药浓度分析,为临床更安全有效地应用阿托伐他汀提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 药品与试剂

对照品阿托伐他汀钙(批号LR9024,规格1g,购自Sigma公司)、2-HAT(批号7-MHP-82-2,规格100mg,购自TRC公司)、4-HAT(批号1-TKA-22-2,规格100mg,购自TRC公司)、内标匹伐他汀钙(pitavastatin calcium,批号H29A7B20167,规格250mg,购自源叶生物科技有限公司)、ATL(批号B3DDA,购自TCL公司),纯度均>98%;阿托伐

他汀钙片(批号EP8450,规格为每片20mg,购自辉瑞公司)。色谱-质谱分析用甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂为分析纯。空白血浆(来自课题组健康男性)。

1.2 仪器

高效液相色谱质谱联用仪的质谱系统为API 4000QTRAP,配有Turbo M™离子源仓,离子喷雾和大气压电离离子源,以及Analysis 1.4.2数据处理系统(Applied Biosystem公司);高效液相色谱系统为Agilent 1200,配置包括G1322A脱气机,G1311A四元梯度泵,G1329A自动进样器,G1316A柱温箱,G1330B进样盘温控器,G1314B检测器(Agilent公司);MIKRO 22R台式高速冷冻离心机(Hettich公司)。

1.3 试验对象

健康受试者药代动力学研究方案和知情同意书获河北省中医院临床研究伦理委员会批准[伦理批号HBZY2021-KY-094-01],筛选8例汉族健康男性受试者,年龄(26.6±5.36)岁,体质量(67.9±5.43)kg;受试者试验当日服药前空腹至少10h,每名受试者口服阿托伐他汀钙片20mg。于药前和药后0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、24、36和48h自肘静脉采集全血,在4000r·min⁻¹,4℃条件下离心10min,分离出血浆样品,保存于-80℃冰箱。

患者临床实验方案经中国中医科学院西苑医院伦理委员会批准[伦理批号:2021XLA065-2]。筛选8名肝肾指标正常、已采用阿托伐他汀钙片预防心脑血管疾病超过1个月的脑病科就诊患者,年龄(65.96±8.56)岁。试验前1天20:00口服阿托伐他汀钙片20mg,试验当天8:00抽取空腹血样,在4000r·min⁻¹,4℃条件下离心10min,分离出血浆样品,保存于-80℃冰箱。

研究严格遵守赫尔辛基宣言的有关伦理准则。所有受试者均在试验开始前获取知情同意并签署知情同意书。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用Zorbarx SB-C₁₈(50mm×2.1mm,5μm)色谱柱,以水-甲醇-乙腈(9:0.5:0.5,含0.05%甲酸)为流动相A,甲醇-乙腈(1:1,含0.05%甲酸)为流动相B,梯度洗脱(0~0.3min,40%B;0.3~1.7min,100%B;1.7~1.8min,40%

B), 流速 $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样体积 $4 \mu\text{L}$ 。

2.1.2 质谱条件 质谱离子源为电喷雾离子源 (ESI), 源内温度 $500 \text{ }^\circ\text{C}$, 离子喷射电压 (IS) $5\ 000 \text{ V}$,

碰撞气 (CAD) 为中等强度 Medium, 在正离子模式下检测, 扫描方式选择反应监测 (MRM) 方式, 待测物及内标的其他参数见表 1。

表 1 质谱检测参数

Tab. 1 Mass spectrometry detection parameters

待测物 (analyte)	定量离子对 (quantitative ion pair) m/z	解簇电压 (seclustering potential)/V	碰撞能量 (collision energy)/eV
阿托伐他汀 (atorvastatin)	559.3/440.2	106	31
2-HAT	575.1/440.3	91	33
4-HAT	575.1/440.2	91	33
ATL	540.9/448.2	91	25
2-HATL	557.2/448.2	91	33
4-HATL	557.2/448.2	91	33
匹伐他汀 (pitavastatin)	422.2/290.0	121	39

2.2 溶液和样品的配制

2.2.1 混合对照品储备液 精密称取阿托伐他汀、2-HAT、4-HAT、ATL 和匹伐他汀 (内标) 的对照品适量, 分别加甲醇溶解并稀释成浓度均为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单一对照品储备液和内标储备液, 再分别吸取阿托伐他汀、2-HAT、4-HAT、ATL 的单一对照品储备液各 $250 \mu\text{L}$, 用甲醇配制成各成分浓度均为 $250 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品储备液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2.2 标准曲线血浆样品和质控血浆样品 精密吸取混合对照品储备液适量, 制成浓度分别为 1.0 、 2.5 、 6.4 、 16.40 、 100 和 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准曲线工作液, 再以空白血浆稀释 10 倍, 混匀, 配制成质量浓度分别为 0.10 、 0.25 、 0.64 、 1.6 、 4 、 10 和 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准曲线血浆样品。另取空白血浆适量, 加入混合对照品储备液配制成质量浓度为 0.10 、 0.25 、 1.6 和 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的定量限 (LOQ)、低、中和高浓度的质控血浆样品。

2.3 血浆样品处理

精密吸取血浆样品 $50 \mu\text{L}$, 加入 10% 甲酸 $1.5 \mu\text{L}$ 混匀, 再加入含内标匹伐他汀 $22 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙腈溶液 $150 \mu\text{L}$, 涡旋混匀 2 min 后在 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心 5 min , 取上清液加入内插样品瓶进样分析。

2.4 药动学数据处理

用 WinNonlin 6.3 (Certara), 采用非房室模型方法计算药代动力学参数。主要药代动力学参数包括

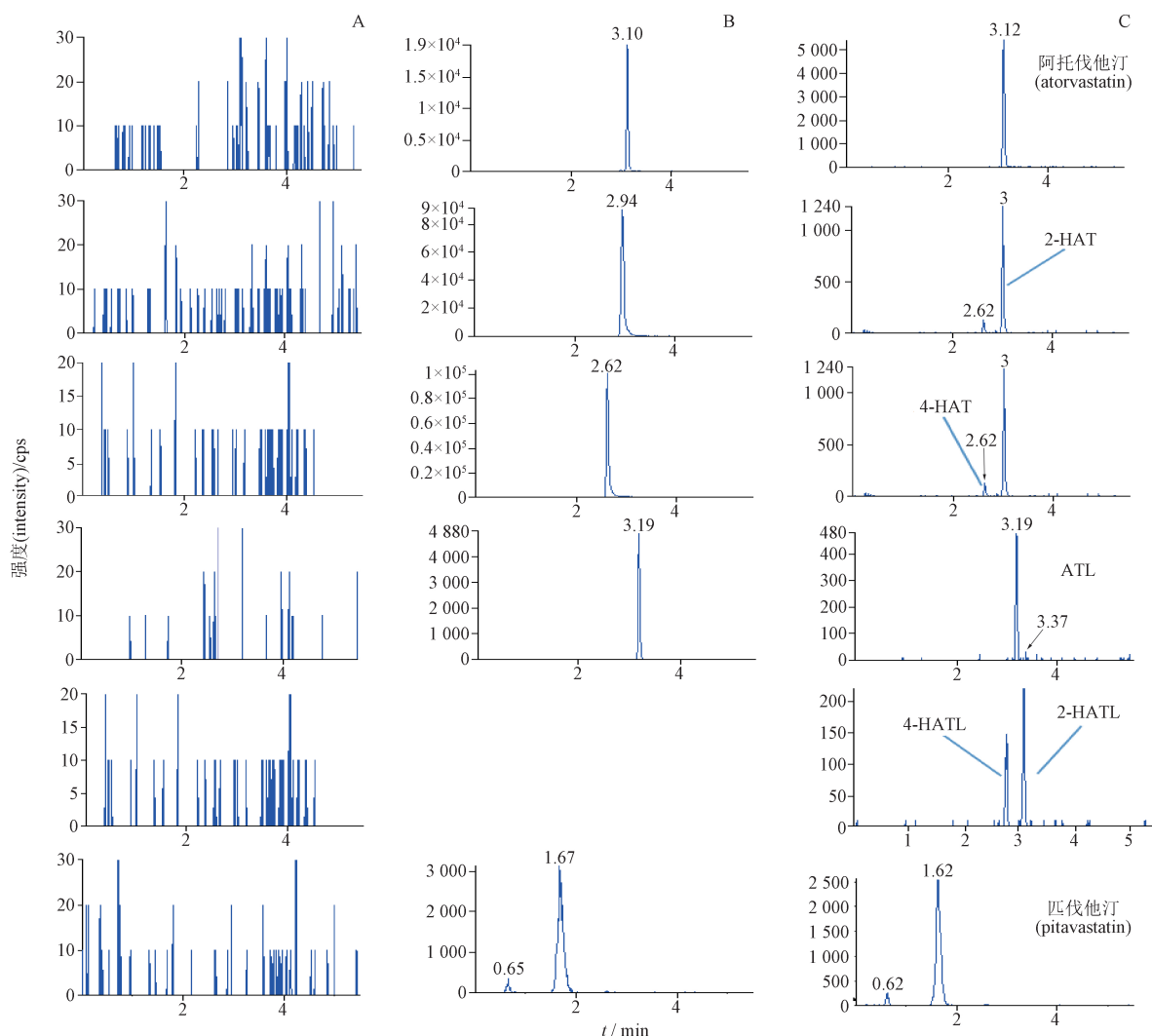
达峰时间 (T_{max})、最大血药浓度 (C_{max})、血浆药物浓度-时间曲线下面积 ($\text{AUC}_{0-\text{last}}$)、半衰期 ($t_{1/2}$) 和清除率 (CL/F)。并进行统计分析。组间各代谢物与阿托伐他汀的血药浓度比值经对数转换后, 采用非成对 t 检验进行显著性检验, 统计软件为 SPSS 17.0, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性分析 取 5 个不同来源的空白血浆, 按照“2.3”项下方法前处理后进行分析, 见图 1-A (由于 5 个不同来源的空白血样专属性结果均满足要求, 因此本文选取其中 1 个加以说明); 空白血浆外加对照品 ($1.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准曲线血浆样品) 经处理后分析, 见图 1-B; 健康受试者临床血浆样品按照同样方法处理后分析, 见图 1-C。结果表明, 空白血浆的内源性物质不干扰阿托伐他汀及 2-HAT、4-HAT 和 ATL 的测定, 且给药后生物样品和外加样品在相同位置出峰。2-HATL 与 4-HATL 无对照品, 二者相对位置依据 2-HAT 和 4-HAT 的出峰先后顺序确定, 未见其他内源性干扰峰。以上结果说明该分析方法对这些待测成分的分析有专属性。

2.5.2 线性关系考察 取系列标准曲线血浆样品, 按“2.3”项方法处理后进样分析, 以待测成分与内标的峰面积比和浓度做线性相关分析, 权重因子 $1/y^2$ 。得到阿托伐他汀、2-HAT、4-HAT、ATL 回归方程分别为

$$Y = 0.139X + 0.0155 \quad r = 0.9980$$



A. 空白血浆 (blank blood) B. 加标样品 (spiked sample) C. 临床样品 (clinical sample)

图 1 阿托伐他汀及其代谢物的 LC-MS/MS 图谱

Fig. 1 Representative LC-MS/MS chromatograms of atorvastatin and its metabolites

$$Y = 0.114X + 0.00216 \quad r = 0.9965$$

$$Y = 0.131X + 0.00394 \quad r = 0.9990$$

$$Y = 0.26X + 0.00681 \quad r = 0.9960$$

结果表明各待测成分浓度均在 $0.1 \sim 20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性良好,以信噪比为 10 时的浓度推算定量限,最终以 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为各待测成分的定量限。

2.5.3 精密度和准确度考察 取质控血浆样品 6 份,分别按“2.3”项下方法操作,测定 3 d,根据当日标准曲线,分别计算质控血浆样品的测定浓度,以 RSD 来评价测定方法的批内和批间精密度。以测定浓度与配制浓度之比,评价测定方法的准确度,分析结果见表 2。各成分 4 个浓度质控血浆样品的批内

和批间 RSD $< 15\%$,准确度在 $-0.29\% \sim 9.50\%$ 。结果表明测定方法精密度及准确度符合生物样本分析要求。

2.5.4 基质效应和提取回收率 取来自 6 个不同个体的空白血浆,分别按照“2.3”项下方法处理,以处理后空白血浆和 50% 甲醇为溶剂,10 倍稀释浓度为 $2.5, 16$ 或 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准曲线工作液,配制成低、中和高浓度血浆基质样品和无基质标准样品。按“2.1”项下条件测定相关待测成分峰面积,以血浆基质样品与无基质标准样品中待测成分峰面积之比 (A_M/A_N) 评价基质效应;以质控血浆样品中待测成分与血浆基质样品对应浓度的相应待测成分峰面积之比 (A/A_M) 评价提取回收率。基质效应与回收率

表 2 血浆中待测成分的精密度和准确度

Tab. 2 Precision and accuracy of the analytical method for targeted analytes

待测物 (analyte)	质控样品 (QC samples)/(nmol · L ⁻¹)	实测浓度 (detected)/(nmol · L ⁻¹)	精密度(precision)RSD/%		准确度 (accuracy)/%
			批内(intra - batch)	批间(inter - batch)	
阿托伐他汀(atorvastatin)	0.102	0.10 ± 0.01	13.9	13.9	1.41
	0.25	0.27 ± 0.02	5.8	3.8	4.08
	1.6	1.63 ± 0.08	4.9	3.7	1.98
	10	10.90 ± 0.68	4.4	13.7	9.48
2 - HAT	0.102	0.10 ± 0.01	14.8	14.8	-4.24
	0.25	0.26 ± 0.03	12.1	3.9	3.34
	1.6	1.59 ± 0.08	5.1	4.4	-0.76
	10	9.97 ± 0.32	3.3	3.1	-0.29
4 - HAT	0.102	0.11 ± 0.01	11.6	11.6	7.15
	0.25	0.28 ± 0.01	5.0	5.5	9.20
	1.6	1.65 ± 0.07	4.2	4.5	3.37
	10	9.45 ± 0.66	5.5	14.8	-5.55
ATL	0.102	0.11 ± 0.01	11.6	11.6	7.15
	0.25	0.28 ± 0.01	5.0	5.5	9.20
	1.6	1.65 ± 0.07	4.2	4.5	3.37
	10	9.45 ± 0.66	5.1	14.8	-5.53

结果见表 3。各待测成分的 A_M/A_N 平均值在 85% ~ 112% 范围内, RSD < 13%; 各成分的 A/A_M 平均值在

88% ~ 107% 范围内, RSD < 13%。结果表明基质效应和提取回收率满足生物样品测定要求。

表 3 各待测成分的基质效应和回收率

Tab. 3 Matrix effects and recoveries of each analyte

待测物 (analyte)	质控血浆样品 (QC plasma sample)/(nmol · L ⁻¹)	回收率(recovery)		基质效应(matrix effect)	
		A_M/A_N	RSD/%	A/A_M	RSD/%
阿托伐他汀(atorvastatin)	10	97.06	4.1	110.91	2.5
	1.6	95.80	3.1	89.61	4.5
	0.25	94.90	1.2	95.15	11.0
ATL	10	89.55	5.6	102.20	11.0
	1.6	111.08	12.0	105.90	12.0
	0.25	92.64	5.9	89.89	5.0
2 - HAT	10	101.36	8.1	94.55	7.6
	1.6	93.16	6.3	90.95	3.0
	0.25	86.45	6.1	101.11	5.2
4 - HAT	10	105.71	11.0	105.40	12.0
	1.6	96.42	0.80	89.66	6.6
	0.25	89.93	3.3	102.05	8.2

2.5.5 稳定性考察 取定量限、低、中、高浓度的质控血浆样品各 6 份, 分别测定短期稳定性: 冰盒中放置 2 h; 进样器稳定性: 处理完于 4 °C 进样器中放置 24 h; 长期稳定性: -80 °C 放置 3 个月; 冻融稳定性: -80 °C 反

复冻融 3 次。按“2.3”项下方法处理样品后测定, 当日随行标准曲线计算浓度。分析结果见表 4, 结果被测分析物的 RE 与 RSD 均在 15% 范围内, 表明阿托伐他汀和代谢物在上述放置和储存条件下稳定性良好。

表 4 人血浆中各待测成分不同条件下的稳定性 ($n=6$)

Tab. 4 Stability of each component to be tested in human plasma under different conditions

待测物 (analyte)	浓度 (concentration)/ ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	短期稳定性 (short-term stability)		反复冻融 (freeze/throw cycles)		长期稳定性 (long storage at -80°C)		进样器 24 h (autosampler 24 h)	
		RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%
		阿托伐他汀 (atorvastatin)	0.102	10.5	-8.2	7.4	6.5	14.4	-12.7
	0.25	10.5	-1.9	12.3	3.0	14.9	13.0	9.2	2.1
	1.6	12.7	0.2	3.4	-7.0	7.2	4.5	11.3	0.2
	10	3.5	-7.2	5.6	7.2	7.1	10.3	3.4	2.6
2-HAT	0.102	7.0	2.3	9.3	6.7	14.8	1.2	9.0	-5.4
	0.25	8.9	3.1	3.5	-5.0	10.8	9.4	13.4	-1.2
	1.6	8.0	9.5	2.7	-6.6	14.7	5.1	8.9	-2.4
	10	3.2	8.0	8.9	9.8	4.2	14.0	8.3	3.9
4-HAT	0.102	9.7	0.1	14.0	-0.3	14.4	-14.2	13.9	9.4
	0.25	13.9	-0.3	8.6	-4.3	12.3	8.1	8.8	4.5
	1.6	8.3	3.8	3.5	7.6	5.2	14.8	2.8	1.6
	10	3.2	-14.4	5.9	3.4	6.4	5.9	5.0	5.8
ATL	0.102	10.0	1.4	10.7	7.3	14.8	1.2	5.4	5.6
	0.25	12.1	-0.9	-7.8	-5.0	10.8	12.1	11.2	-6.2
	1.6	4.4	12.2	5.8	5.8	12.9	14.3	14.6	6.9
	10	5.4	3.0	5.5	7.3	2.7	14.5	5.3	4.7

2.6 健康人药代动力学研究

采用已建立的方法对健康人服用阿托伐他汀钙后不同时间点的血浆样品进行分析。基于阿托伐他汀与相应内酯型产物 ATL 在同浓度下具有相近的质谱响应强度,对没有对照品的 2-HATL 和 4-HATL, 分别采用 2-HAT 和 4-HAT 的标准曲线进行了相对定量。阿托伐他汀及 5 个代谢物血药浓度-时间曲线见图 2, 计算得到各成分药代动力学参数结果见

表 5。结果显示代谢物的血浆暴露量均低于阿托伐他汀, 活性代谢物中 2-HAT 的 C_{\max} 及 $AUC_{0-\infty}$ 最高, 4-HATL 次之; 毒性代谢物中 2-HATL 的 C_{\max} 及 $AUC_{0-\infty}$ 最高, ATL 与 4-HATL 相近。4-HAT 及 4-HATL 的半衰期长达 20 h 左右, 其余成分的则均在 7~9 h。虽然 ATL 的暴露水平约为阿托伐他汀的 1/3, 但是 2 种羟基内酯型代谢物的暴露量之和远高于羟基酸型代谢物。

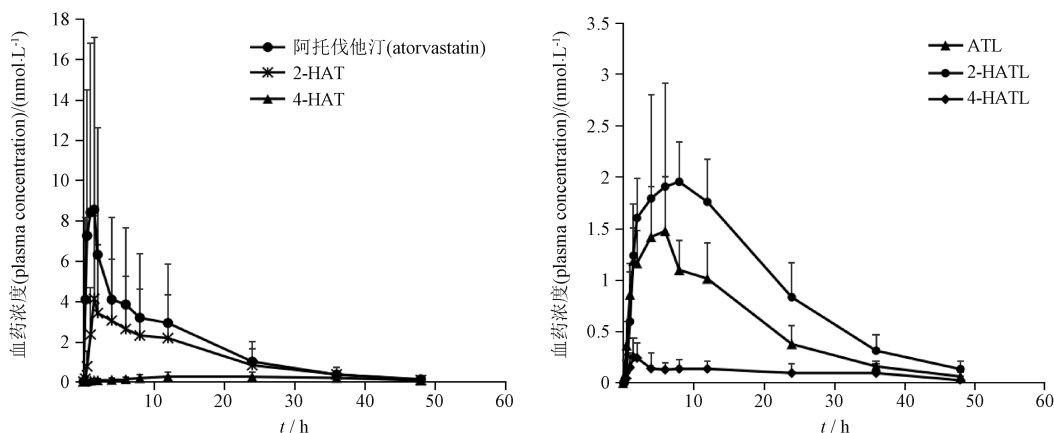


图 2 阿托伐他汀及其代谢物药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Mean plasma drug concentration-time curves of atorvastatin and its metabolites

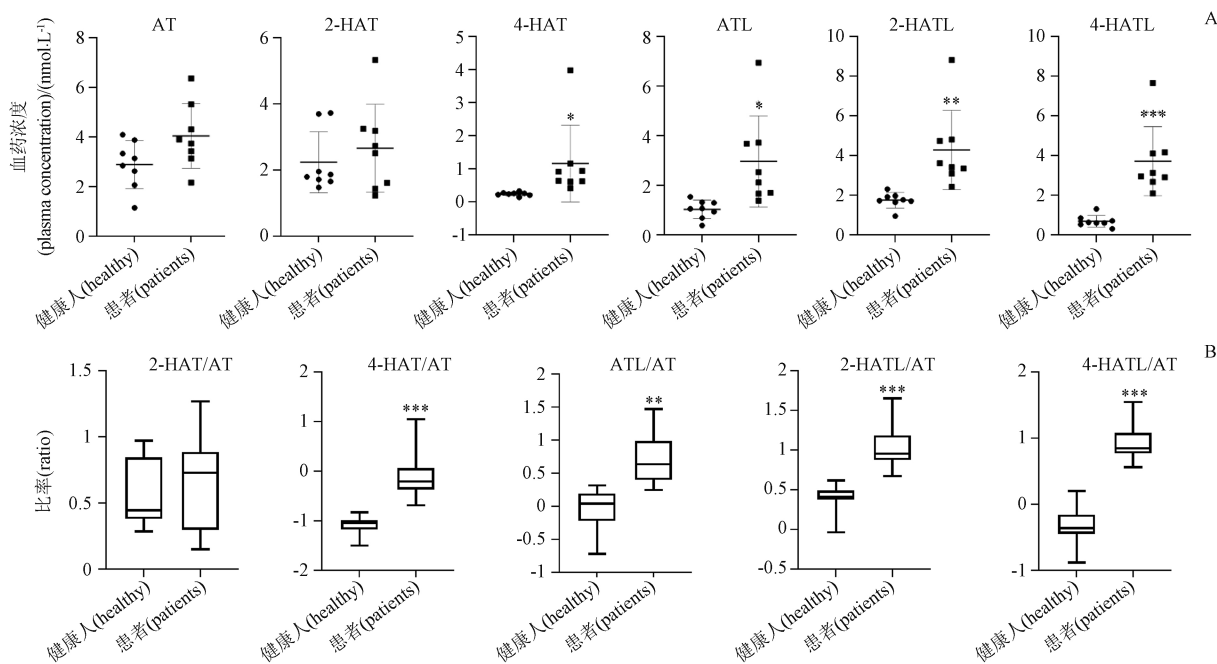
表 5 主要药代动力学参数
Tab. 5 The main pharmacokinetic parameters

参数 (parameter)	阿托伐他汀 (atorvastatin)	2-HAT	4-HAT	ATL	2-HATL	4-HATL
$C_{max}/(nmol \cdot L^{-1})$	11.48 ± 4.73	4.71 ± 1.84	0.28 ± 0.09	1.71 ± 0.48	2.52 ± 0.49	2.31 ± 0.83
T_{max}/h	1.10 ± 0.60	3.05 ± 3.32	16.80 ± 6.32	5.60 ± 1.26	5.75 ± 1.67	2.07 ± 0.89
$AUC_{0-last}/(nmol \cdot h \cdot L^{-1})$	84.97 ± 23.38	57.63 ± 18.80	8.41 ± 3.16	27.86 ± 7.84	44.05 ± 9.76	25.26 ± 9.61
$AUC_{0-\infty}/(nmol \cdot h \cdot L^{-1})$	87.31 ± 24.26	58.79 ± 18.94	8.60 ± 2.73	28.75 ± 8.12	45.76 ± 10.62	31.49 ± 15.20
$t_{1/2}/h$	7.96 ± 2.07	7.931 ± 2.50	19.58 ± 6.63	8.76 ± 4.85	8.98 ± 1.40	21.37 ± 10.31
$CL/F(L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1})$	0.25 ± 0.10	-	-	-	-	-

2.7 临床患者血药浓度分析

采用已建立分析方法测定了服用阿托伐他汀钙片进行治疗的脑病科门诊患者的血浆样品,患者服用剂量 20 mg 每天 1 次。结果显示高血脂患者体内阿托伐他汀及代谢物血药浓度水平分别为 $(4.16 \pm 1.31) nmol \cdot L^{-1}$ 、 $(2.65 \pm 1.33) nmol \cdot L^{-1}$ 、 $(1.15 \pm 1.16) nmol \cdot L^{-1}$ 、 $(2.96 \pm 1.83) nmol \cdot L^{-1}$ 、 (4.27 ± 2.00)

$nmol \cdot L^{-1}$ 和 $(3.70 \pm 1.74) nmol \cdot L^{-1}$ 。与同时点健康受试者的血药浓度进行对比,结果显示患者体内 4 种代谢产物浓度水平显著高于健康受试者(图 3-A)。通过计算各代谢物与阿托伐他汀的血药浓度之比评价代谢率,结果见图 3-B。可见患者体内 3 种内酯型代谢物的代谢率显著高于健康受试者,显示患者体内具有更高的内酯型代谢物的转化率。



AT. 阿托伐他汀 (atorvastatin)

A. 血药浓度 (the plasma drug concentration) B. 各代谢物与阿托伐他汀血药浓度比 (the ratio of plasma concentration of each metabolite to atorvastatin)

图 3 健康受试者和患者单次服用 20 mg 阿托伐他汀钙片 12 h 后阿托伐他汀和代谢物的血药浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Plasma drug concentrations of 20 mg atorvastatin calcium tablets and its metabolites in healthy subjects and patients at 12 h after single administration of atorvastatin

3 分析与讨论

文献报道阿托伐他汀、2-HAT 和 4-HAT 在常温下与其相应内酯型处于一种动态转化状态,这对

其药代动力学研究提出了挑战。目前已报道的分析方法表明当 pH 在 4~6 范围内时,酸和内酯之间的转化程度最低。因此本研究在获取受试者药代动力

学血样过程中,血浆样品一直保持在低温条件下,同时用 10% 甲酸调整血浆样品 pH 在 5 左右,方法学考察结果表明该处理方法能有效抑酸和内酯间的相互转化。部分研究未在分析方法中考虑到构型转化的防止措施^[16-18],可能造成结果与真实体内浓度的偏差。目前已报道的测定阿托伐他汀及其代谢物分析方法多采用液液萃取的提取方法^[19-21],本研究在样品前处理过程中采用乙腈一步沉淀法对受试者血浆样品进行处理,有效缩短了样品理时间,操作更加简单、快速。

本研究针对流动相中甲酸浓度进行了考察,结果发现在 0.01% 的低甲酸浓度下各待测物的响应信号会相应提高,但是抗基质效应能力较差。在 0.1% 的较高甲酸浓度下,抗基质效应显著增强,但灵敏度有所下降。最终选择流动相甲酸浓度为 0.05%,能够达到较为理想的抗基质效应和灵敏度。

本研究测定了健康中国人服用阿托伐他汀后体内的 3 个内酯型代谢物的血药浓度,并计算了相应的药代动力学参数,进一步完善了阿托伐他汀在健康中国人体内的药代动力学数据,也为分析阿托伐他汀在临床治疗中的有效性和安全性提供了依据。研究发现在健康受试者中阿托伐他汀和各代谢物的暴露量由大到小的顺序为阿托伐他汀、2-HAT、2-HATL、4-HATL、ATL、4-HAT,阿托伐他汀和活性代谢物 AUC 之和为 $154.7 \text{ nmol} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$,3 种内酯型代谢物则达到 $106 \text{ nmol} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$,可见内酯型代谢物具有相当的暴露水平。且内酯型代谢物更易在肌肉中蓄积,这可能是它们显示更长半衰期的原因^[22]。此外,Lins 等^[23]报道了 40 mg 剂量下阿托伐他汀和 2-HAT 的 AUC 分别为 54.2 和 $86.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$;Hermann 等^[24]报道了 10 mg 剂量下阿托伐他汀、2-HAT 和 4-HAT 的 AUC 分别为 22、19 和 $3.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ 。与已发表的其他国家健康人数据对比,发现,同等剂量下本研究中汉族健康人具有更高的阿托伐他汀和代谢物暴露水平。

将所建立分析方法应用于临床患者的血药浓度分析,对比了阿托伐他汀及 5 个代谢物在健康受试者与高血脂患者中暴露水平的差异。与单剂量的健康人数据相比,高血脂患者血药浓度更高。患者已有较长服药时间,药物蓄积能升高血药浓度,通过计算代谢物与阿托伐他汀的血药浓度比值可排除绝对药物浓度的影响,反映出代谢水平的差异。代谢比

分析结果表明高血脂患者具有较健康人显著升高的内酯型代谢物转化率。与本研究结果相似,Lins 等^[25]也发现阿托伐他汀内酯/阿托伐他汀浓度比值在患者更高^[24]。出现这种结果的原因可能与高血脂患者年龄偏高有关,有报道老年人体内阿托伐他汀的暴露量要高于年轻人。但由于内酯型代谢物是导致横纹肌溶解等肌性不良反应的危险因素^[26-28],本研究提示高龄患者服用阿托伐他汀钙片后可能具有更高的不良反应风险,更应引起临床用药安全的重视。

上述实验结果表明,本研究建立的人血浆中阿托伐他汀及 5 个代谢物同时定量检测方法准确、快捷、灵敏、稳定,可用于临床药代动力学研究和血药浓度监测,为阿托伐他汀在心脑血管疾病防治中的安全和有效应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 孙哲,杨文娟,王瑞麟,等. 基于回顾性队列的阿托伐他汀钙仿制药与原研药安全性和经济性评价及危险因素评估[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(14): 1447
SUN Z, YANG WJ, WANG RL, *et al.* Retrospective comparative study on safety economy and risk assessment of the generic and branded atorvastatin calcium[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2022, 42(14): 1447
- [2] 惠春,林大专,孙莹. 阿托伐他汀致不良反应 24 例文献分析[J]. 中国药房, 2010, 21(44): 4189
HUI C, LIN DZ, SUN Y. Literature analysis of 24 adverse drug reactions cases caused by atorvastatin[J]. *China Pharm*, 2010, 21(44): 4189
- [3] GHIM JL, PHUONG NTT, KIM MJ, *et al.* Pharmacokinetics of fixed-dose combination of atorvastatin and metformin compared with individual tablets[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 1623
- [4] TURNER RM, 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
- [5] HERMANN M, BOGSRUD MP, MOLDEN E, *et al.* Exposure of atorvastatin is unchanged but lactone and acid metabolites are increased several-fold in patients with atorvastatin-induced myopathy[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 79(6): 532
- [6] 易志恒,李筱旻,申秋莹,等. LC-MS-MS 法测定人血浆中阿托伐他汀、邻位阿托伐他汀和对位阿托伐他汀的浓度[J]. 中南药学, 2021, 19(12): 2564
YI ZH, LI YW, SHEN QY, *et al.* LC-MS-MS determination of atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma[J]. *Cent South Pharm*, 2021, 19(12):

- 2564
- [7] CHOI YK, PARK SE, KIM EY, *et al.* Pharmacokinetics of atorvastatin and sustained - release metformin fixed - dose combination tablets: two randomized, open - label, 2 - way crossover studies in healthy male subjects under fed conditions [J]. *Transl Clin Pharmacol*, 2017, 25(4): 190
- [8] 梁美芳, 陈庆状, 杨沛群, 等. 基于真实世界的阿托伐他汀仿制药和原研药防治缺血性卒中/短暂性脑缺血发作的有效性和安全性比较 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2022, 27(7): 785
- LIANG MF, CHEN QZ, YANG PQ, *et al.* Efficacy and safety of generic and branded atorvastatin in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack: a real - world study [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 27(7): 785
- [9] KNEBEL W, GASTONGUAY MR, MALHOTRA B, *et al.* Population pharmacokinetics of atorvastatin and its active metabolites in children and adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia: selective use of informative prior distributions from adults [J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53(5): 505
- [10] 吕斌, 寻添荣, 吴树龙, 等. HPLC - MS/MS 同时检测大鼠血浆中阿托伐他汀和伏立康唑的浓度 [J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(3): 337
- LÜ B, XUN TR, WU SL, *et al.* Interaction between atorvastatin and voriconazole in rat plasma: a HPLC - MS/MS based study [J]. *J South Med Univ*, 2019, 39(3): 337
- [11] 易小翠. 基于液相色谱 - 质谱联用法的苯二氮革类药物分析方法的建立及在大鼠体内药代动力学的研究 [D]. 宜春: 宜春学院, 2021
- YI XC. Establishment of Analytical Method for Benzodiazepine and Study of Pharmacokinetics in Rats by LC - MS [D]. Yichun: Yichun University, 2021
- [12] HWANG JG, YU KS, LEE S. Comparison of the pharmacokinetics of highly variable drugs in healthy subjects using a partial replicated crossover study: a fixed - dose combination of fimasartan 120 mg and atorvastatin 40 mg versus separate tablets [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1953
- [13] ANDERSON K, NELSON CH, GONG Q, *et al.* Assessment of the effect of filgotinib on the pharmacokinetics of atorvastatin, pravastatin, and rosuvastatin in healthy adult participants [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2022, 11(2): 235
- [14] FDA. Bioanalytical - Method - Validation - Guidance - Industry [S]. 2018
- [15] HUANG F, MARZIN K, KOENEN R, *et al.* Effect of steady - state faldaprevir on pharmacokinetics of atorvastatin or rosuvastatin in healthy volunteers: a prospective open - label, fixed - sequence crossover study [J]. *J Clin Pharmacol*, 2017, 57(10): 1305
- [16] 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
- LUO N, TAN L, ZHANG M, *et al.* Determination of atorvastatin and its active metabolites in plasma of rat by LC - MS/MS [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2019, 36(9): 1029
- [17] 孙斌, 魏振满, 郭晓东, 等. LC - MS/MS 定量测定人体血浆中阿托伐他汀浓度 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(13): 2565
- SUN B, WEI ZM, GUO XD, *et al.* Quantitative determination of the atorvastatin concentration in healthy human plasma by LC - MS/MS [J]. *Prog Mod Biomed*, 2013, 13(13): 2565
- [18] 姜楠, 杨永革, 许雪廷, 等. LC - MS - MS 法测定人血浆中阿托伐他汀浓度 [J]. *药学实践杂志*, 2011, 29(1): 15
- JIANG N, YANG YG, XU XY, *et al.* Determination of atorvastatin in human plasma by LC - MS - MS [J]. *J Pharm Pract*, 2011, 29(1): 15
- [19] 陈菡菁, 徐红蓉, 苑菲, 等. LC - MS/MS 法同时测定人血浆中阿托伐他汀及其活性代谢物的浓度 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(6): 542
- CHEN HQ, XU HR, YUAN F, *et al.* Simultaneous determination of atorvastatin and its active metabolites in human plasma by LC - MS/MS [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2017, 33(6): 542
- [20] 丁杨明, 王晓雪, 陈瑶, 等. UPLC - MS/MS 法同时测定人血浆样本中瑞舒伐他汀、阿托伐他汀及其代谢物的浓度 [J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47(3): 236
- DING YM, WANG XX, CHEN Y, *et al.* Simultaneous determination of rosuvastatin, atorvastatin and their metabolites in human plasma by UPLC - MS/MS [J]. *J Int Pharm Res*, 2020, 47(3): 236
- [21] BAGGETT MC, NYKAMP D. Statin - associated bilateral foot myopathy [J]. *J Pharm Pract*, 2020, 33(6): 899
- [22] LINS RL, MATTHYS KE, VERPOOTEN GA, *et al.* Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(5): 967
- [23] HERMANN M, BOGSRUD MP, MOLDEN E, *et al.* Exposure of atorvastatin is unchanged but lactone and acid metabolites are increased several - fold in patients with atorvastatin - induced myopathy [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 79(6): 532
- [24] GIBSON DM, BRON NJ, RICHENS A, *et al.* Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans [J]. *J Clin Pharmacol*, 1996, 36(3): 242
- [25] SKOTTHEIM IB, BOGSRUD MP, HERMANN M, *et al.* Atorvastatin metabolite measurements as a diagnostic tool for statin - induced myopathy [J]. *Mol Diagn Ther*, 2011, 15(4): 221
- [26] AMSDEN GW, KUYE O, WEI GC. A study of the interaction potential of azithromycin and clarithromycin with atorvastatin in healthy volunteers [J]. *J Clin Pharmacol*, 2002, 42(4): 444
- [27] PATEL AM, SHARIFF S, BAILEY DG, *et al.* Statin toxicity from macrolide antibiotic coprescription: a population - based cohort study [J]. *Ann Intern Med*, 2013, 158(12): 869
- [28] LENNERNÄS H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(13): 1141

(本文于 2023 年 12 月 17 日修改回)