

LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中奥贝胆酸的浓度

张如月^{1,2}, 谷元², 张爱杰², 董世奇³, 李全胜², 魏广力², 司端运^{2*}

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津药物研究院新药安全评价有限公司, 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193; 3. 天津大学, 天津 300191)

摘要: 本文建立了一种快速、灵敏、准确、可靠的 LC-MS/MS 分析方法测定大鼠血浆中奥贝胆酸浓度, 并应用于奥贝胆酸大鼠灌胃给药后的药动学研究。血浆样品以甲基叔丁基醚提取后, 经 ACE Excel 2 Super C18 色谱柱 (50 mm×2.1 mm ID, 1.7 μm) 分离, 以乙腈-2 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液 (含 10% 乙腈) 作为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min⁻¹。电喷雾离子化源 (ESI) 负离子条件下, 采用多反应监测模式 (MRM) 进行定量分析, 监测离子对分别为奥贝胆酸 m/z 418.9 [M-H]⁻→401.2, 内标甘草次酸 m/z 469.0 [M-H]⁻→425.2。大鼠血浆中奥贝胆酸在 5~5 000 ng·mL⁻¹ 浓度内线性关系良好 ($r^2>0.99$), 定量下限为 5 ng·mL⁻¹; 日内、日间精密度 (RSD) 小于 9.82%, 准确度 (RE) 在 ±6.90% 以内; 血浆中无内源性物质干扰, 内标归一化后的基质效应为 78.9%~82.5%, 提取回收率为 85.4%~88.5%; 奥贝胆酸的血浆样品经室温放置 24 h、-70 °C 3 次冻融循环、-70 °C 冻存 1 个月, 处理后的样品在进样器内放置 24 h 均稳定; 药物浓度超出曲线范围的样品经空白血浆稀释 10 倍后, 其准确度在 ±11.2% 以内, 精密度为 7.25%。本方法经验证后, 成功应用于大鼠灌胃给予奥贝胆酸后的药动学研究。

关键词: 奥贝胆酸; LC-MS/MS; 血药浓度; 药代动力学; 原发性胆汁性胆管炎

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 02-0271-07

Determination of obeticholic acid in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

ZHANG Ru-yue^{1,2}, GU Yuan², ZHANG Ai-jie², DONG Shi-qi³, LI Quan-sheng², WEI Guang-li², SI Duan-yun^{2*}

(1. Tianjin Medical University Graduate School, Tianjin 300070, China; 2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. Tianjin University, Tianjin 300191, China)

Abstract: A simple and sensitive method was developed for quantitation of obeticholic acid in rat plasma with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). After liquid-liquid extraction by methyl *tert*-butyl ether, the chromatographic separation was carried out on an ACE Excel 2 Super C18 column (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm) with a gradient mobile phase consisting of acetonitrile and 2 mmol·L⁻¹ ammonium formate at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. The quantitation analysis was performed using multiple reaction monitoring (MRM) at the specific ion transitions of m/z 418.9 [M-H]⁻→401.2 for obeticholic acid and m/z 469.0 [M-H]⁻→425.2 for glycyrrhetic acid (internal standard) in the negative ion mode with electrospray ionization (ESI) source. This validated LC-MS/MS method yielded a good linearity over the range of 5–5 000 ng·mL⁻¹ with the lower limit of quantitation (LLOQ) of 5 ng·mL⁻¹. The intra and inter-assay precisions (RSD) were all less than

收稿日期: 2017-09-15; 修回日期: 2017-11-07.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81503154).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-22-84845261, E-mail: sidy@tjipr.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0841

9.82% and the accuracy (RE) was within $\pm 6.90\%$. The extraction recovery of obeticholic acid was from 85.4% to 88.5%, and the matrix effect of obeticholic acid ranged from 78.9% to 82.5%. Stability test suggest that obeticholic acid in rat plasma was stable for 24 h on workbench, up to 1 month at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, and after three cycles of freeze-thaw. Extracted samples were stable for more than 24 h in an auto-sampler at $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. The precision was less than 7.25%, and the accuracy was within $\pm 11.2\%$, after being diluted 10 times by blank rat plasma. The method has been successfully applied to a pharmacokinetic study of obeticholic acid in rats following oral administration at the dose of $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Key words: obeticholic acid; LC-MS/MS; plasma concentration; pharmacokinetics; primary biliary cholangitis

原发性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC) 又称原发性胆汁性肝硬化, 是一种慢性、进行性自身免疫性胆汁淤积性肝病^[1, 2], 其发病机制尚不完全清楚, 大部分学者认为遗传和环境因素相互作用导致免疫耐受丧失^[3–6], 从而启动了针对胆管上皮细胞的免疫反应^[7]。PBC 表现为肝脏小胆管缓慢进行性破坏, 引起胆汁和其他毒素在肝脏中郁积, 导致肝组织进一步损伤及瘢痕形成, 最终导致肝硬化、纤维变性以及肝坏死^[3, 8]。PBC 在 40 岁以上的中年女性发病率较高, 患者往往伴有瘙痒、疲劳等临床症状^[9, 10]。

FDA 在 1997 年批准的熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 是 PBC 的主要治疗药物。UDCA 主要通过上调胆汁酸转运体的表达和抗凋亡的作用, 保护肝细胞和胆管细胞的功能, 从而有效改善肝脏异常生化指标的水平、降低肝纤维化和肝硬化的发病率^[11, 12]。PBC 患者服用 UDCA 可以明显提高生存率, 但有高达 40% 的患者对 UDCA 治疗反应不佳^[13], 与 UDCA 应答良好的患者相比生存率明显下降^[14]。

FDA 于 2016 年 5 月 27 日批准 Intercept 公司开发的 Ocaliva (obeticholic acid, 奥贝胆酸) 上市, 成为时隔近 20 年后首个批准的 PBC 治疗药物。奥贝胆酸 (obeticholic acid, OCA, 也称 6-ECDCA 或 INT-747) 是人体初级胆汁酸——鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) 的半合成衍生物。它是一种具有选择性的法尼酯衍生物 X 受体 (FXR) 激动剂, 其活性要比 CDCA 高出 100 倍, 具有抗胆汁淤积性和保护肝脏的特性^[15, 16]。FXR 是一种参与胆汁酸稳态的核受体, 在胆汁酸和胆固醇代谢中发挥重要作用^[17]。奥贝胆酸通过活化 FXR, 间接抑制胆汁酸生物合成的限速酶 CYP7A1 的基因表达; 同时胆汁淤积也可激活 FXR 通过调节小异源二聚体 (small heterodimer partner, SHP) 的活性, 抑制胆汁酸的摄取^[18–22]。因此, FXR 激动剂奥贝胆酸可以调节胆汁酸的合成、分泌、转运等, 缓解 PBC 的症状^[23]。临床研究结果表明, PBC 患者单独服用奥贝胆酸或是 UDCA 与奥贝胆酸合用,

都会使胆汁淤积、炎症情况得到改善^[2, 24]。因此, 奥贝胆酸可与 UDCA 联合应用治疗 UDCA 反应不足的 PBC 患者, 也可单独应用治疗 UDCA 不能耐受的成年 PBC 患者^[9, 11]。

随着奥贝胆酸在美国的成功上市, 对奥贝胆酸的 me-too 药、仿制药的研发已经成为国内外许多研究机构的热点, 有关奥贝胆酸的药效学、毒理学、药代动力学的的数据也逐渐披露或可以从 FDA 的官网查到, 但是有关生物样品中奥贝胆酸含量的分析方法研究尚未见报道。Lu 等^[25]采用 HPLC-UV 法测定奥贝胆酸片含量, 定量下限为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 该方法对奥贝胆酸的检测灵敏度太低, 不能满足其体内药理学、毒代动力学分析的需要。本文的目的是研究基于 LC-MS/MS 技术的准确、灵敏的定量分析方法, 用于大鼠血浆中奥贝胆酸浓度的测定和药代动力学、毒代动力学研究。

材料与方法

药品与试剂 奥贝胆酸对照品 (纯度: 99.1%; LOT: 140103), 由丽珠集团丽珠医药研究所提供。甘草次酸 (内标, 纯度: 99.3%; LOT: 110723-201514), 由北京科诺德医药科技有限公司提供。甲醇、乙腈 (HPLC 级), Thermo Fisher 公司。甲酸铵 (分析纯), 天津市光复精细化工研究所。分析纯甲基叔丁基醚 (分析纯), 美国, Tedia 公司。去离子水由实验室自制。

实验动物 健康 Sprague Dawley (SD) 大鼠 6 只, 体重 180~220 g, 雌雄各半, 由北京维通利华实验技术有限公司提供。实验动物由天津药物研究院新药评价有限公司动物室饲养, 饲养室的温度保持在 $(22\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度保持在 $(60\pm 5)\%$, 自由摄食饮水。本研究的动物使用方案已获得天津药物研究院新药评价有限公司 IACUC 批准。

仪器 LCMS-8060 超快速三重四极杆液质联用仪, 配有 LC-30AD 二元输送泵, SIL-30AC 自动进样器, DGU-20A5R 真空脱气机和 CTO-20A 柱温箱, 日本

Shimadzu 公司。Sorvall Legend Micro 17R 台式高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; TARGINTM VX-II 型涡旋混合器, 北京踏锦科技有限公司; Turbo Vap LV 型样品浓缩仪, 美国 Caliper 公司; BM-40 型纯水制备系统, 北京中盛茂源科技发展有限公司。

色谱条件 色谱柱为 ACE Excel 2 Super C18 (50 mm×2.1 mm ID, 1.7 μm) (厂家), 柱温 50 °C。流动相为乙腈 (A)-2 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液 (含 10% 乙腈) (B)。梯度洗脱, 0~0.5 min, 55% B; 0.5~4.0 min, 55%~10% B; 4.0~5.5 min, 10% B; 5.5~5.6 min, 10%~55% B; 5.6~7.5 min, 55% B, 流速为 0.2 mL·min⁻¹。

质谱条件 电喷雾离子化源 (ESI) 负离子模式扫描; 离子源电压: 10 kV; 雾化气流: 3 L·min⁻¹; 加热气流: 10 L·min⁻¹; 接口温度: 300 °C; 干燥气流: 10 L·min⁻¹; 加热块温度: 300 °C; 脱溶剂管温度: 250 °C; 碰撞气: 270 kPa。采用多反应监测模式 (MRM) 进行定量分析 (驻留时间 200 ms), 奥贝胆酸: m/z 418.9 [M-H]⁻→401.2, 碰撞能: 35 V; 内标甘草次酸: m/z 469.0 [M-H]⁻→425.2, 碰撞能: 39 V。

储备液、工作液及校正标样的制备 将精确称量的奥贝胆酸及甘草次酸 (内标) 对照品溶解在适量甲醇中制备储备液, 分别获得质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 奥贝胆酸、内标储备液。用甲醇梯度稀释奥贝胆酸储备液, 得 0.1、0.2、1、4、20、80 和 100 μg·mL⁻¹ 系列标准工作液, 用同样的方式稀释奥贝胆酸储备液得质量浓度为 0.25、5 和 75 μg·mL⁻¹ 的质控工作液。取奥贝胆酸系列标液或质控工作液 25 μL, 加入大鼠空白血浆 475 μL, 涡旋混匀, 配成质量浓度为 5、10、50、200、1 000、4 000 和 5 000 ng·mL⁻¹ 校正标样及 5 (LLQC)、12.5 (LQC)、250 (MQC)、3 750 (HQC) ng·mL⁻¹ QC 样品。稀释内标储备液至 50 ng·mL⁻¹ 作为内标工作液。所有储备液和工作液 4 °C 储存备用。

血浆样品处理 取大鼠含药血浆 50 μL, 加入内标 (甘草次酸, 50 ng·mL⁻¹) 甲醇工作液 50 μL、0.1 mol·L⁻¹ 盐酸 50 μL、甲基叔丁基醚 1 mL, 涡旋 2 min, 离心 5 min, 分取有机层 800 μL 经氮气吹干。加入复溶液 (50% 甲醇水) 200 μL, 进样 5 μL 进行 LC-MS/MS 定量分析。

方法学考察

选择性/特异性 选取 6 个不同来源的大鼠空白血浆, 除不加内标溶液 (改加同体积甲醇溶液) 外, 其余按“血浆样品处理”项下操作, 进行 LC-MS/MS 分析。

线性范围 配制并处理校正标样进行 LC-MS/MS 分析, 记录奥贝胆酸及内标甘草次酸 MRM 检测的色谱图峰面积, 用加权最小二乘法 (权重为 $1/x^2$) 进行回归运算, 得到大鼠血浆校正曲线, 考察 3 个分析批, 每批测定双样本。

准确度和精密度 配制并处理定量下限、低、中、高浓度水平的 QC 样品, 按“血浆样品处理”项下操作, 进行 LC-MS/MS 分析。考察 3 个分析批, 每批、每个浓度 6 样本。应用当日校正曲线计算各 QC 样品浓度, 考察分析方法的准确度和精密度。

基质效应 样品 A: 取奥贝胆酸工作液 25 μL, 加入甲醇 475 μL, 涡旋混匀, 配成质量浓度为 12.5、3 750 ng·mL⁻¹ LQC、HQC 样品。取上述 QC 样品 80 μL 加入内标 (甘草次酸, 50 ng·mL⁻¹) 甲醇工作液 80 μL、甲醇 40 μL、超纯水 200 μL, 涡旋混匀, 进样 5 μL 进行 LC-MS/MS 定量分析, 记录待测物和内标的色谱峰面积 A。样品 B: 选取 6 个不同来源的大鼠空白血浆, 除不加内标溶液 (改加同体积甲醇溶液) 外, 其余按“血浆样品处理”项下操作 (200 μL 复溶液由样品 A 代替), 进行 LC-MS/MS 定量分析, 记录待测物和内标的色谱峰面积 B。样品 C: 按“血浆样品处理”项下操作处理样品 LQC、HQC 各 6 样本, 进样 5 μL 进行 LC-MS/MS 定量分析, 记录待测物和内标的色谱峰面积 C。峰面积 B 与相应浓度的峰面积 A 的比值, 为待测物和内标的基质因子, 待测物的基质因子与内标的基质因子之比, 为内标归一化的基质效应因子; 峰面积比 $C/B \times 100\%$ 即为奥贝胆酸和内标的提取回收率。

稳定性 配制 12.5、3 750 ng·mL⁻¹ LQC、HQC 稳定性样品, 按“血浆样品处理”项下处理, 进行室温放置、-70 °C 冻存 1 个月、-70 °C 室温 3 次冻融循环稳定性考察, 各浓度水平均为三样本。低、高两个浓度水平处理后的大鼠血浆样品, 考察进样器中放置 24 h 稳定性。应用新鲜制备处理的随行校正曲线, 计算稳定性样品的实测浓度。

稀释效应 制备奥贝胆酸质量浓度为 50 000 ng·mL⁻¹ 的生物样品, 用大鼠空白血浆稀释 10 倍后, 按“血浆样品处理”项下处理并分析, 考察稀释效应。测定结果与稀释因子相乘后的实际浓度和理论浓度进行对比。

药动学研究 6 只健康颈静脉插管 SD 大鼠, 禁食 12 h 以上, 灌胃给药奥贝胆酸 (2.5 mg·kg⁻¹) 0.5% CMC-Na 混悬液。清醒状态下于给药前和给药后

0.167、0.5、1、2、3、4、6、9、12、24、30、48 和 72 h 从颈静脉采血 0.25 mL 左右 (各时间点采血后补充相应体积的生理盐水, 确保大鼠具有正常的生理功能), 肝素抗凝, 离心分离血浆, -70°C 冰箱冻存至 LC-MS/MS 定量分析。

数据处理 使用 LabSolutions 软件进行数据采集和处理, 求得血浆校正曲线并且计算每只动物的奥贝胆酸浓度数据; 血浆药物浓度数据应用 WinNonlin6.3 药代软件拟合, 选择非房室模型统计矩法计算药代参数 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 、 MRT_{0-t} 、 $\text{MRT}_{0-\infty}$ 、 V_d 和 CL 。

结果

1 质谱分析

待测物奥贝胆酸及内标甘草次酸在 ESI 源负离子条件下信号强度优于正离子条件。一级全扫描模式下, 待测物奥贝胆酸及内标甘草次酸分别主要生成准分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 418.9、469.0。对相应的准分子离子进行二级质谱全扫描分析 (图 1), 待测物奥贝胆酸及内标甘草次酸生成的主要产物离子分别为 m/z 401.2 和 m/z 355.2、425.2, 进一步优化后分别选取 m/z 401.2、 m/z 425.2 作为定量分析时检测的产物离子。

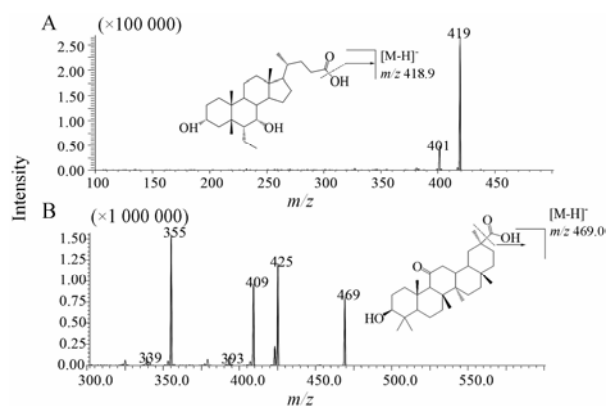


Figure 1 The chemical structures and product ion mass spectrum of the $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions of obeticholic acid (A), glycyrrhetic acid (B, internal standard)

2 方法学验证

2.1 选择性/特异性 空白血浆样品的色谱图见图 2A; LLOQ 样品分析的色谱图见图 2B; 大鼠灌胃给药后血浆样品的色谱图见图 2C。待测物奥贝胆酸及内标甘草次酸色谱保留时间分别为 3.79 和 4.21 min。干扰组分的响应低于当批次定量下限响应的 20% 及内标响应的 5%, 表明大鼠血浆中的内源性物质不干扰分析物和内标的定量分析, 方法具有良好的专属性。

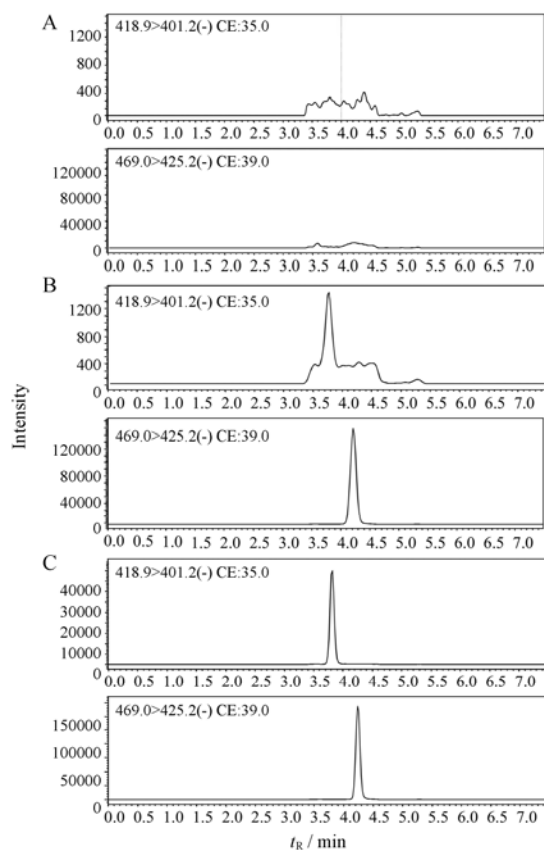


Figure 2 Representative MRM chromatograms of obeticholic acid (m/z 418.9→401.2) and glycyrrhetic acid (m/z 469.0→425.2) in rat plasma. A: Blank rat plasma sample; B: Blank rat plasma spiked with obeticholic acid (LLOQ, $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and IS ($50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); C: A rat plasma sample collected at 0.5 h after the oral administration of obeticholic acid ($2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

2.2 线性范围 线性范围为 $5\sim 5000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。典型回归方程为: $y=0.00112x+0.000168$, $r^2=0.998$ 。结果表明, 奥贝胆酸在 $5\sim 5000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好。

2.3 准确度和精密度 结果见表 1。大鼠血浆中奥贝胆酸在定量下限的批内、批间精密度 (RSD) 分别为 6.63%、18.1%, 准确度 (RE) 为 0.896%; 低、中、高浓度水平 QC 样品的准确度 (RE) 在 $-6.90\%\sim 5.54\%$ 之间, 批内、批间精密度 (RSD) 分别在 $3.32\%\sim 6.58\%$ 、 $6.54\%\sim 9.82\%$ 之间, 符合有关生物样品分析方法验证的要求^[26, 27]。

Table 1 Precision and accuracy for the analysis of obeticholic acid in rat plasma. $n=18$, $\bar{x}\pm s$

Spiked	Concentration/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		Precision (RSD, %)		Accuracy (RE, %)
	Measured		Inter-day	Intra-day	
5	5.04 ± 0.444		18.1	6.63	0.896
12.5	11.6 ± 0.765		6.54	6.58	-6.90
250	260 ± 10.7		7.75	3.32	4.04
3 750	$3 958\pm 185$		9.82	3.45	5.54

2.4 基质效应 结果表明,待测物奥贝胆酸在低、高浓度水平上的内标归一化的基质效应为 78.9% 和 82.5%,基质效应的 RSD 在 2.59%~8.00% 之间,基质效应不会对样品的分析产生明显影响。奥贝胆酸的回收率为 88.5% 和 85.4%;内标的回收率为 84.3%。

2.5 稳定性 结果见表 2,表明奥贝胆酸的含药血浆在以上贮存条件下及处理后自动进样器放置 24 h,稳定性良好。

Table 2 Stability of obeticholic acid in rat plasma. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

Storage condition	Concentration/ng·mL ⁻¹		Precision (RSD, %)	Accuracy (RE, %)
	Spiked	Measured		
At ambient temperature	12.5	11.1 ± 0.713	6.44	-11.5
for 24 h	3 750	3 904 ± 100	2.57	4.12
Three freeze-thaw cycles	12.5	12.2 ± 0.944	7.75	-2.56
	3 750	3 868 ± 91.5	2.37	3.15
At -70 °C for a month	12.5	12.7 ± 0.301	2.37	1.45
	3 750	3 748 ± 115	3.06	-0.053 0
At 6 °C in the autosampler for 24 h	12.5	11.3 ± 0.306	2.70	-9.32
	3 750	3 832 ± 155	4.03	2.19

2.6 稀释效应 结果显示,准确度在 88.8%~108% 之间,精密度的 7.25%。表明对大鼠血浆样品进行稀释后分析,经校正计算后的结果能够准确反映超出曲线范围的药物浓度。

3 SD 大鼠灌胃给药后的药动学研究

以 2.5 mg·kg⁻¹ 剂量给 SD 大鼠灌胃给药后,6 只大鼠的平均药时曲线图见图 3,相应的药动学参数见表 3。结果表明,奥贝胆酸灌胃给药后吸收迅速, t_{max} 为 0.167 h 左右, C_{max} 为 2180±904 ng·mL⁻¹。而后血药浓度迅速下降,至药后 6 h 出现第二个吸收峰,血药浓度约为 40 ng·mL⁻¹ 左右,随后缓慢消除, $t_{1/2}$ 为 17.2±7.03 h。

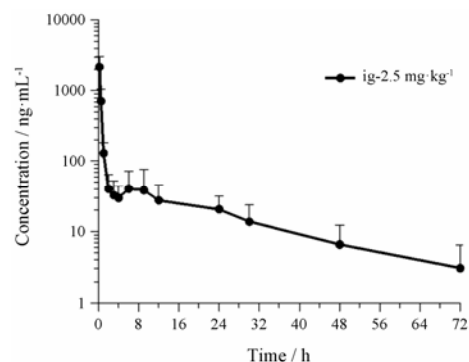


Figure 3 Mean plasma concentration-time profile of obeticholic acid after oral administration of obeticholic acid (2.5 mg·kg⁻¹) in rats. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

Table 3 The pharmacokinetic parameters of obeticholic acid after oral administration of obeticholic acid (2.5 mg·kg⁻¹) in rats. $n=6$, $\bar{x} \pm s$

Parameter	Plasma obeticholic acid
C_{max} /ng·mL ⁻¹	2 180 ± 904
t_{max} /h	0.167 ± 0
AUC _{0-72h} /h·ng·mL ⁻¹	1 960 ± 645
AUC _{0-∞} /h·ng·mL ⁻¹	2 160 ± 721
MRT _{0-72h} /h	11.3 ± 7.09
MRT _{0-∞} /h	17.7 ± 10.4
V_d /L·kg ⁻¹	30.3 ± 13.1
CL /ng·mL ⁻¹	1.27 ± 0.435
$t_{1/2}$ /h	17.2 ± 7.03

讨论

奥贝胆酸属于胆酸类化合物,分析检测时容易受内源性胆酸类化合物的干扰,因此,在建立 LC-MS/MS 定量分析方法时,对色谱、质谱及样品处理方法进行了优化。

考察了 Symmetry C8、Diamonsil C18、Agilent C8 和 ACE Excel 2 Super C18 等色谱柱,显示 1.7 μm 小粒径的 ACE Excel 2 Super C18 色谱柱可以提供更快的分离效率、对称的色谱峰形以及更高的灵敏度。选择流动相中有机相时,与乙腈相比,采用甲醇洗脱,响应提高 2 倍左右,但基线提高约 4~5 倍,信噪比较低;尝试乙腈与甲醇按不同比例混合 (1:2、1:3、2:3) 作为有机相,信噪比无明显改善,故最后选用乙腈作为有机相。对于流动相中缓冲盐以及酸碱的加入也进行了优化,通常在负离子检测模式下,流动相中加入氨水会提高待测物的检测灵敏度,但本研究中加入 0.5% 氨水时,导致奥贝胆酸成盐极性变大,色谱保留较弱,难以与内源性干扰实现良好分离;采用纯水不加缓冲或酸碱体系时,色谱峰较宽;综合考虑色谱峰形、保留时间以及响应等方面,经考察加入 2 mmol·L⁻¹ 甲酸铵较为合适。并对流速 (0.1、0.2 mL·min⁻¹) 及洗脱方式 (等度、梯度) 进行了优化,显示 0.2 mL·min⁻¹ 的流速下进行梯度洗脱,可减少内源性物质的共流出。

奥贝胆酸属于胆酸类甾体化合物,负离子模式下信号强度优于正离子模式,生成准分子离子 [M-H]⁻ m/z 418.9,且该类化合物结构中的“环戊烷并多氢菲”母核较稳定,很难经碰撞诱导裂解 (CID) 产生碎片,只有 C17 侧链中的羰基位点经 CID 裂解产生碎片 m/z 401.2。选择 m/z 418.9 [M-H]⁻→401.2 作为 MRM 定量分析离子对,并优化质谱源及碰撞相关参数,提高质谱检测灵敏度。

对比了血浆蛋白沉淀及液-液萃取这两种样品处理方法的基质效应程度, 证明后者残留的内源性干扰更少。并对提取溶剂 (甲基叔丁基醚、乙酸乙酯、正己烷等)、pH 条件 (不加酸、1% 磷酸、10% 磷酸、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸) 进行了考察, 最终采用甲基叔丁基醚作为提取溶剂, 加入 $50 \mu\text{L}$ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸, 实现较高的提取回收率及较小的基质效应影响。

在生物样品分析过程中, 内标的选择对于保证测定结果的准确性尤其重要。甘草次酸的结构、理化性质与奥贝胆酸接近, 具有相似的色谱、质谱行为以及相近的提取回收率, 故选为本方法的内标。

许多研究显示^[28–30], 胆汁酸类药物口服给药后吸收迅速, 较短时间达峰, 随后血药浓度在很长一段时期内维持在较低水平下波动, 出现高低起伏的现象。这可能与胆汁酸类药物进入小肠后在回肠末端重吸收, 经门静脉返回肝脏再利用, 形成肠肝循环有关。奥贝胆酸为鹅去氧胆酸 (CDCA) 的半合成衍生物, 其血药浓度-时间曲线也呈现相似的趋势。另外, 胆汁酸类药物由于肠肝循环的存在, 药物在血浆中持续时间延长, 因此在给药方案设计时应充分考虑是否可能产生蓄积中毒。

本文建立了一种快速、灵敏、准确的 LC-MS/MS 方法, 经过全面的分析方法验证, 符合生物样品分析方法指导原则的要求^[26, 27], 可以准确测定原形药物奥贝胆酸在大鼠体内的血药浓度, 成功应用于奥贝胆酸灌胃给药后在大鼠体内的药动学研究, 揭示奥贝胆酸在大鼠体内的暴露水平、吸收及清除特点, 对后期毒代动力学研究及药物评价提供参考依据。

References

- [1] Zhang AP, Yang JH. Advances in understanding pathogenesis of primary biliary cholangitis [J]. *World Chin J Digestol* (世界华人消化杂志), 2016, 24: 169–175.
- [2] Silveira MG, Lindor KD. Obeticholic acid and budesonide for the treatment of primary biliary cirrhosis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2014, 15: 365–367.
- [3] Parés A. Old and novel therapies for primary biliary cirrhosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2014, 34: 341–351.
- [4] Selmi C, Mayo MJ, Bach N, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127: 485–492.
- [5] Poupon R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update [J]. *J Hepatol*, 2010, 52: 745–758.
- [6] Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8: 303–330.
- [7] Duan WJ, Tian QJ, You H. Research advances in primary biliary cholangitis [J]. *J Clin Hepatol* (临床肝胆病杂志), 2016, 32: 2062–2065.
- [8] Corrigan M, Hirschfield GM. Primary biliary cirrhosis [J]. *Medicine*, 2015, 43: 645–647.
- [9] Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2009, 50: 291–308.
- [10] Ali AH, Carey EJ, Lindor KD. The management of autoimmunity in patients with cholestatic liver diseases [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 10: 73–91.
- [11] Rudic JS, Poropat G, Krstic MN, et al. Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis [DB/OL]. (2015-12-23) [2016-03-15]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000551.pub3/abstract>.
- [12] Zhu SC, Zheng XM, Zhang Y, et al. A farnesoid X receptor agonist: obeticholic acid [J]. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2016, 31: 396–400.
- [13] Parés A, Caballería L, Rodés J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 715–720.
- [14] Abenavoli L, Corpechot C, Rabahi N, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2008, 41: 871–877.
- [15] Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, et al. 6α -Ethylchenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity [J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 3569–3572.
- [16] Pellicciari R, Costantino G, Camaioni E, et al. Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure-activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 4559–4569.
- [17] Forman BM, Goode E, Chen J, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites [J]. *Cell*, 1995, 81: 687–693.
- [18] Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313: 604–612.
- [19] Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, et al. Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis [J]. *Hepatology*, 2005, 41: 1160–1172.
- [20] Schaap FG. High expression of the bile salt-homeostatic hormone fibroblast growth factor 19 in the liver of patients

- with extrahepatic cholestasis [J]. *Hepatology*, 2009, 49: 1228 – 1235.
- [21] Bävner A, Sanyal S, Gustafsson JA, et al. Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16: 478 – 488.
- [22] Zhang Y, Hagedorn CH, Wang L. Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812: 893–908.
- [23] Schaap FG, Trauner M, Jansen PL. Bile acid receptors as targets for drug development [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11: 55–67.
- [24] Invernizzi P, Pencek R, Marmon T, et al. P1137: integrated efficacy summary for obeticholic acid in subjects with primary biliary cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2015, 62: S778–S778.
- [25] Lu YX, Pan XY, Yao J. Content determination of obeticholic acid tablets by HPLC [J]. *J Hebei Univ Sci Technol (河北科技大学学报)*, 2017, 38: 158–162.
- [26] National Food and Drug Administration. Technical Guidelines for Nonpharmacologic Pharmacokinetics of Drugs (药物非临床药代动力学研究技术指导原则) [S]. CFDA, 2014. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=191>.
- [27] Chinese Pharmacopoeia Commission. Guiding Principles for Quantitative Analysis of Biological Samples [S] // Chinese Pharmacopoeia (中国药典), 2015ed. Beijing: China Medicine Science and Technology Press, 2015.
- [28] Crosignani A, Setchell KDR, Invernizzi P, et al. Clinical pharmacokinetics of therapeutic bile acids [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 30: 333–358.
- [29] Xiang X, Vakkilainen J, Backman JT, et al. No significant effect of the SLCO1B1, polymorphism on the pharmacokinetics of ursodeoxycholic acid [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67: 1159–1167.
- [30] Hou XQ. Studies on Pharmacokinetics of Taurocholic Acids in Rats (牛磺胆酸在大鼠体内的药代动力学研究) [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2007.