

# LC-MS/MS 测定人血浆中依折麦布和总依折麦布的含量及其应用

郭建军<sup>1,2</sup>, 陈波<sup>3</sup>, 陈波<sup>1</sup>, 游宇<sup>2</sup>, 宋天铭<sup>2</sup>, 郑海燕<sup>2</sup>, 何卓宏<sup>2</sup>(1.湖南方盛制药股份有限公司, 长沙 410205; 2.湖南恒兴医药科技有限公司, 长沙 410205; 3.湖南师范大学“植化单体开发与利用”湖南省重点实验室, 长沙 410081)

**摘要:** 目的 建立人血浆中依折麦布(ezetimibe, EZE)和总依折麦布(total ezetimibe, EZE-T)的 LC-MS/MS 测定方法, 并用于依折麦布片人体生物等效性(bioequivalency, BE)研究。方法 分别采用直接沉淀法和酶解后沉淀法处理血浆样品。内标为依折麦布-d4(EZE-d4), 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 乙酸-乙腈(A), 0.1% 乙酸-水(B), 梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>。在 ESI 源负离子模式下使用离子对 *m/z* 408.2→271.0(EZE)和 *m/z* 412.2→271.1(EZE-d4)进行 MRM 定量分析。对口服相同剂量受试制剂或参比制剂依折麦布片的健康受试者的血药浓度进行定量分析。结果 血浆中内源性物质不干扰待测物定量, EZE、EZE-T 及 EZE-d4 不存在相互干扰和/或相互转化。人血浆中 EZE 和 EZE-T 的线性范围分别为 0.1~20, 1~200 ng·mL<sup>-1</sup>, 线性关系良好。待测物与内标提取回收率均为 102.4%~109.8%; 内标归一化基质效应因子均为 98.5%~99.4%, 变异系数(CV)均<5%; 批内、批间准确度偏差均<15%, CV 均<10%。用本法测定得到的 EZE 和 EZE-T 的浓度水平及获取的药动参数与文献报道一致, 生物样品再分析复测值与原测值的偏差均<10%。结论 本法特异性强、灵敏、准确, 重复性好, 所需样本体积小, 满足依折麦布片人体 BE 研究的定量分析需求。

**关键词:** 依折麦布; 依折麦布葡萄糖醛酸结合物; 总依折麦布; 生物等效; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)15-1856-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.010

引用本文: 郭建军, 陈波, 陈波, 等. LC-MS/MS 测定人血浆中依折麦布和总依折麦布的含量及其应用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1856-1861.

## Determination of Ezetimibe and Total Ezetimibe in Human Plasma by LC-MS/MS and Its Application

GUO Jianjun<sup>1,2</sup>, CHEN Bo<sup>3</sup>, CHEN Bo<sup>1</sup>, YOU Yu<sup>2</sup>, SONG Tianming<sup>2</sup>, ZHENG Haiyan<sup>2</sup>, HE Zhuohong<sup>2</sup>(1.Hunan Fangsheng Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410205, China; 2.EverPro Medical Co., Ltd., Changsha 410205, China; 3.Key Laboratory of Phytochemistry R&D of Hunan Province, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish LC-MS/MS methods for the determination of concentration of ezetimibe(EZE) and total ezetimibe(EZE-T) in human plasma and to use for a bioequivalence(BE) study of ezetimibe tablet formulations. **METHODS** Plasma samples were pre-treated by direct precipitation and post-enzyme precipitation for quantification of EZE and EZE-T, respectively. Ezetimibe-d4(EZE-d4) was used as the internal standard(IS). The analyte was retained and eluted using a Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), with a binary mobile phase system consisting of 0.1% acetic acid-acetonitrile(A) and 0.1% acetic acid-water(B) at a flow rate of 0.2 mL·min<sup>-1</sup>. EZE and EZE-d4 were detected in an ESI source under negative ion mode, used the ion transitions of *m/z* 408.2→271.0 and *m/z* 412.2→271.1 for EZE and EZE-d4, respectively. The quantitation method was applied to analyze the blood drug concentration of healthy subjects after oral administration of the same dose of test or reference preparation ezetimibe tablets. **RESULTS** Endogenous substances in plasma did not interfere with the quantitative determination of the analyte, and EZE, EZE-T, EZE-d4 had no mutual interference and/or mutual transformation. The quantitative ranges of EZE and EZE-T in human plasma were 0.1–20 and 1–200 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively, with good linearity. The recoveries of the analytes and IS were recorded between 102.4% and 109.8%. The IS-normalized matrix effect factors were recorded between 98.5% and 99.4% with coefficient of variation(CV) <5%. Intra- and inter-batch accuracy and precision were <15% with CV<10%. The plasma concentrations of EZE and EZE-T determined by the method and the pharmacokinetic parameters calculated there after in the BE study were in accordance with those found in previous reports. The deviation between the re-measured value of incurred sample reanalysis and the original measured value was <10%. **CONCLUSION** The method is specific, sensitive, accurate, reproducible requiring small sample volumes, and comfortably meets the requirements of ezetimibe BE studies.

**KEYWORDS:** ezetimibe; ezetimibe glucuronic acid; total ezetimibe; bioequivalence; LC-MS/MS

基金项目: 长沙市科技计划项目(kh1801217)

作者简介: 郭建军, 男, 博士 Tel: (0731)88419866 E-mail: pharma\_guojianjun@163.com

依折麦布(etetimibe, EZE)是 FDA 首个获批的选择性胆固醇吸收抑制剂<sup>[1-2]</sup>, 属于生物药剂学分类系统 2 类低溶解性、高渗透性药物。口服吸收入血后, 大部分 EZE 在肝脏与葡萄糖醛酸结合(Ⅱ相反应)而快速代谢为有药理活性的依折麦布葡萄糖醛酸结合物(etetimibe glucuronic acid, EZE-G, 图 1), 而仅有极少量 EZE 进行氧化代谢(Ⅰ相反应)<sup>[3-4]</sup>。EZE-G 生成后, 从循环系统中经由胆汁大量排出至小肠, 并在小肠处发生脱葡萄糖醛酸反应而回转为 EZE, 继而又可经由小肠上皮细胞被再次吸收入血。如此反复, 使得肠黏膜绒毛上总是保持有一定浓度水平的 EZE-G 和 EZE, 持续发挥抑制肠道吸收胆固醇的作用。服药后, 血浆中的 EZE 和 EZE-G 分别占总活性分子(总依折麦布, total ezetimibe, EZE-T, 即 EZE+EZE-G)浓度的 10%~20%和 80%~90%。文献报道<sup>[5]</sup>, 在标准剂量(即 10 mg)下, 空腹及餐后服药后血浆样品中的 EZE 浓度分别仅为约 3~4 和 6~8 ng·mL<sup>-1</sup>。另外, FDA 针对依折麦布片的特定药物生物等效性(bioequivalency, BE)指导原则中建议, 检测血浆中 EZE 和 EZE-T 的浓度并同时基于二者的药动参数来进行最终的 BE 评价<sup>[6]</sup>。因此, 建立可同时或分别检测血浆中 EZE 和 EZE-T 的灵敏可靠的生物方法系统, 就成为了依折麦布片 BE 研究的一项关键任务。

目前, 已有一些文献报道了可同时定量分析人血浆中 EZE 和 EZE-G 的 LC-MS/MS 方法<sup>[3-8]</sup>。采用这类方法, 研究者们通过 1 次进样就获得人血浆样品中 EZE 和 EZE-G 的浓度, 并对 EZE 和 EZE-G 浓度进行加和而获得 EZE-T 浓度值。而在另一些报道中, 研究者们对 EZE 和 EZE-T 则进行分开的样品处理和定量分析。其中, 针对 EZE-T, 先采用葡萄糖苷酶水解的方式将血浆中的 EZE-G 完全转化为 EZE, 然后再对水解后混合物中的 EZE 总量(即 EZE-T)进行定量<sup>[9-13]</sup>。从 BE 研究的角度来看, 后一种方式显然更合适, 因为这种分析方式可以更为直接地定量 EZE-T 血药浓度, 从而有效减少检测和统计上的误差。在这些直接测定 EZE-T 及原型药 EZE 的研究中, 前处理环节均采用了较为繁琐的固相萃取或液液萃取法, 且分析时间普遍在 6 min 左右甚至更长。本研究建立了一套 LC-MS/MS 生物分析方法系统, 即分别采用了直接蛋白沉淀法和酶解后蛋白沉淀法

来对 EZE 和 EZE-G 进行定量分析。其中, EZE 和 EZE-T 的定量下限(lower limit of quantification, LLOQ)分别达到了 0.1 和 1 ng·mL<sup>-1</sup>。相比于已经报道过的方法, 本方法处理过程简单, 分析时间缩短到 4 min, 适用于 BE 研究中大量样品的高通量分析。

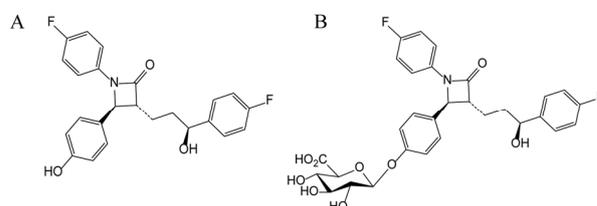


图 1 分子结构式  
A-依折麦布; B-依折麦布葡萄糖醛酸。  
Fig. 1 Molecular structure  
A-ezetimibe; B-ezetimibe glucuronic acid.

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

AB5500 三重四级杆质谱仪(美国 AB Sciex 公司), 配 Waters ACQUITY UPLC I-CLASS 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); MS205DU 型十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-250E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器); Medium-S800GUVF 型超纯水仪(上海和泰仪器); SCDEALL<sup>®</sup> VX-II 多管道涡旋振荡器[安简(北京)科技有限公司]。

### 1.2 药品和试剂

试验制剂: 依折麦布片(湖南方盛制药股份有限公司, 批号: 180501; 规格: 每片 10 mg)。参比制剂: 依折麦布片[MSD Pharma(Singapore) Pte. Ltd.公司生产, 批号: 6EZPA43002; 规格: 每片 10 mg]; EZE 对照品(USP, 批号: F028D0; 含量: 99.7%); EZE-G 对照品(批号: 19-BHW-53-4; 纯度: 98%); 内标 EZE-d4 对照品(批号: 5-ELZ-179-2; 化学纯度\*同位素纯度: 98%\*99.2%)均购自 TRC; 乙腈、甲醇(色谱级, 默克公司); 乙酸(分析纯, 天津光复精细化工研究所); 水为自制超纯水; 其余试剂均为分析纯;  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶溶液(活性  $\geq 100\,000$  units·mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, 批号: SLBR7753V)。

### 1.3 液-质联用条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.7  $\mu$ m); 流动相 0.1%乙酸-乙腈(A), 0.1%乙酸-水(B), 梯度洗脱

0~2.50 min, 45%→95%A, 2.50~3.30 min, 95%A, 3.30~4.00 min, 95%→45%A; 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 5 μL。

**1.3.2 质谱条件** 使用 ESI(-)进行检测; 扫描方式: 多重反应监测; 离子对:  $m/z$  408.2→271.0 (EZE),  $m/z$  412.2→271.0(EZE-d4, 内标); 帘气压力: 30 psi; 雾化气: 45 psi; 辅助气: 45 psi; 雾化气温度: 650 °C; 喷雾电压: -4 500 V。

#### 1.4 血浆样品处理

**1.4.1 对 EZE 定量的血浆样品处理** 样品在冰浴中融化后, 涡旋混匀, 吸取 40 μL 样品于 1.5 mL EP 管中, 向 1.5 mL EP 管中分别加入 10 μL 内标工作溶液(8 ng·mL<sup>-1</sup>), 混匀后, 加入 200 μL 0.05%乙酸-乙腈, 涡旋 5 min。将 1.5 mL EP 管放入离心机, 6 °C、15 700 ×g 离心 10 min, 转移 150 μL 上清溶液至 96 孔板中, 加入 150 μL 0.05%乙酸-水稀释。涡旋 5 min, 充分混匀, 6 °C 条件下进样。样品处理全程在冰浴环境中进行。

**1.4.2 对 EZE-T 定量的血浆样品处理** 样品在冰浴中融化后, 涡旋混匀, 吸取 20.0 μL 样品至 1.5 mL EP 管中, 向 1.5 mL EP 管中分别加入 10 μL 内标工作溶液(40 ng·mL<sup>-1</sup>); 加入 50 μL 醋酸-醋酸钠缓冲液, 涡旋 30 s; 加入 10 μL β-葡萄糖醛酸酶稀释液(≥20 000 units·mL<sup>-1</sup>), 涡旋 30 s 后水浴 50 °C, 60 min; 将 1.5 mL EP 管放入离心机, 1 470 ×g, 离心 30 s; 再加入 300 μL 0.05%乙酸-乙腈, 涡旋 3 min, 将 1.5 mL EP 管放入离心机, 15 700 ×g 离心 10 min; 转移 200 μL 上清溶液至 96 孔板中, 加入 200 μL 0.05%乙酸-水稀释。涡旋 5 min, 充分混匀, 6 °C 条件下进样。样品处理全程在冰浴环境中进行。

#### 1.5 方法学考察

**1.5.1 选择性** 使用 6 个单一个体来源的空白基质分别配制成 LLOQ 浓度水平的样品、只含内标的样品以及只含待测物(定量上限浓度水平)的样品, 以分别考察内源性物质对待测物和内标的干扰、内标对待测物的干扰及待测物对内标的干扰。接受标准为待测物保留时间处于干扰峰面积应低于相同个体来源空白基质配制 LLOQ 样品待测物峰面积的 20%, 而内标保留时间处于干扰峰面积应低于相同个体来源空白基质配制 LLOQ 样品内标峰面积的 5%。对于 EZE-G 回复转化为 EZE 的可能性, 平行配制 6 份仅含 EZE-G 的基质样品(浓度

设定为 150 ng·mL<sup>-1</sup>, 接近于 EZE-G 在血浆中的  $C_{max}$ ), 分别在不同的条件下放置和处理(如试验台放置、低温冻存、冻融循环、前处理后、全血中)后, 以 EZE 为对象进行测定并与新鲜配制的 EZE-G 基质样品进行比较。接受标准为放置和处理后 EZE 的面积变化值低于 EZE LLOQ 平均峰面积的 20%。

**1.5.2 标准曲线** 针对 EZE 和 EZE-T 定量, 分别配制浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 2, 4, 10, 16, 20 ng·mL<sup>-1</sup> 和 1, 2, 4, 20, 40, 100, 160, 200 ng·mL<sup>-1</sup> 的 EZE 血浆标准样品, 分别按各自血浆处理方法进行处理后进样分析, 以待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标( $Y$ ), 以待测物在生物样品中的浓度  $C$  为横坐标( $X$ ), 采用最小二乘法进行线性回归。相关系数( $r$ )应 ≥0.99; 标样测得浓度的准确度偏差应在 ±15% 以内(而 LLOQ 样品应在 ±20% 以内); 最终标准曲线应含至少 75% 及最少 6 个校正标样。

**1.5.3 准确度与精密度** 批内和批间准确度/精密度于 4 个浓度水平上(LLOQ 和低、中、高质控)进行考察, 即 0.1, 0.3, 3, 15 ng·mL<sup>-1</sup>(EZE)和 1, 3, 30, 150 ng·mL<sup>-1</sup>(EZE-T)。每批次每个浓度水平平行考察 6 份样品。每分析批(批内)或所有分析批(批间)至少总数 67% 以上标样的测得浓度的准确度偏差应在 ±15% 以内(LLOQ 样品应在 ±20% 以内), 且每一浓度至少 50% 的标样应符合以上标准; 而批内和批间精密度应在 ±15% 以内(LLOQ 样品应在 ±20% 以内)。

**1.5.4 提取回收率** 提取回收率于 3 个浓度水平上(低、中、高质控)进行考察, 以提取后样品的平均峰面积与相同浓度水平的未提取样品的平均峰面积的比值来评价, 每一浓度水平平行考察 6 份样品。各单一浓度水平上的分析物及内标峰面积的变异系数(CV)应 ≤15%; 且所有浓度水平回收率的总体 CV 应 ≤15%。

**1.5.5 基质效应** 基质效应于 2 个浓度水平上(低、高质控)进行考察, 以未经过提取过程的基质样品平均峰面积(及其与内标峰面积的比值)与相同浓度水平的纯溶液样品平均峰面积(及其与内标峰面积的比值)的比值来评价, 每一浓度水平平行考察 6 份样品, 分别以 6 个单一个体的空白血浆进行配制。基质样品与纯溶液峰面积的比值为基质因子, 而两者峰面积/内标比的比值为内标归一

化基质因子。各单一浓度水平和所有浓度水平上的基质因子/内标归一化基质因子的 CV 应  $\leq 15\%$ 。

**1.5.6 溶血与高脂基质效应** 溶血与高脂基质效应于 3 个浓度水平上(低、中、高质控)进行考察,以 2%溶血样品与 2%高脂基质效应样品的准确度和精密度进行评价,每一浓度水平平行考察 6 份。其接受标准与“1.5.3”项下的接受标准一致。

**1.5.7 稳定性** 根据中国药典《生物样品定量分析方法验证指导原则》(2015 年版第四部 9012),并参考了国内外专家观点<sup>[14-15]</sup>,本试验在低、高质控浓度水平上对基质和溶液中的 EZE 进行了全面的稳定性考察,涵盖了样品采集、储存以及分析的全过程。考察项包括溶液长、短期稳定性;基质长、短期稳定性;冻融稳定性;全血稳定性;处理后稳定性;再进样重现性等。

### 1.6 测定方法在 BE 研究中的应用

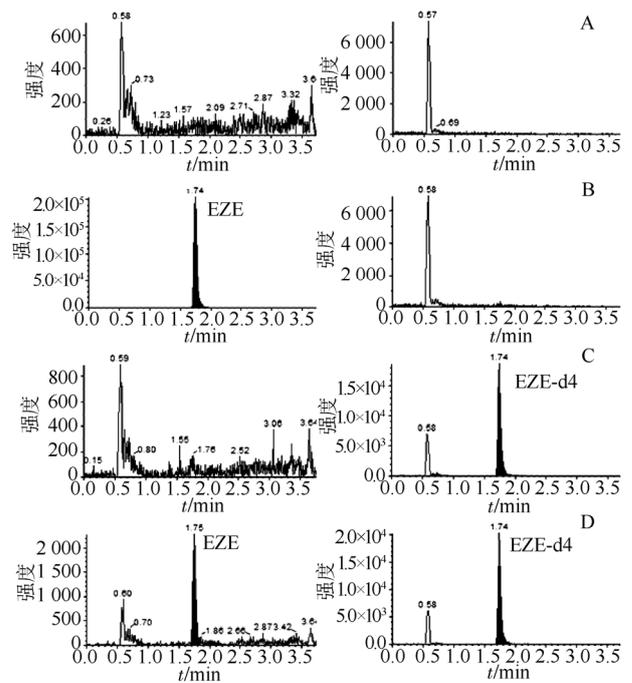
在一项两制剂、两周期、双交叉的依折麦布片 BE 研究(中国药物临床试验登记号:CTR20171001)中,入组 96 健康志愿者,其中空腹组和餐后组各 48 例。受试者每次口服 10 mg 依折麦布片,并在服药前(0 h)及服药后 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 h 采集静脉血 5 mL。血样采集后置于事先编好的 K<sub>2</sub>EDTA 抗凝负压管内并在 30 min 内离心(离心力 1 900  $\times g$ , 4  $^{\circ}C$ , 10 min)。待离心操作结束后,将样品从离心机中取出,并于 1 h 内将血浆转移至冻存管中,存于 -70  $^{\circ}C$  冰箱中直至样品测定。

针对 EZE 和 EZE-T 定量分析,分别按照“1.4.1”项下与“1.4.2”项下方法进行样品处理,记录 EZE/EZE-T 和内标的色谱峰面积,以 EZE/EZE-T 峰面积和内标峰面积之比代入当日标准曲线,即可算出 EZE 和 EZE-T 的浓度。

## 2 结果

### 2.1 方法性评价

EZE 与内标 EZE-d4 的保留时间均为 1.74 min,空白血浆中的内源性物质不对待测物与内标产生干扰,见图 2。待测物与内标不相互干扰,代谢物 EZE-G 的基质样品在不同的条件下放置和处理(如试验台上、低温冻存下、冻融、前处理)后,均不存在回转为母体待测物 EZE 的可能性,见表 1。



**图 2** 测定血浆中 EZE 和内标 EZE-d4 的典型色谱图 A-空白血浆; B-空白血浆中加入 EZE; C-空白血浆中加入内标 EZE-d4; D-空白血浆中加入 EZE 和内标 EZE-d4。

**Fig. 2** Typical chromatograph image of EZE and internal standard EZE-d4 in plasma

A-blank plasma; B-blank plasma+EZE; C-blank plasma+EZE-d4; D-blank plasma+EZE+EZE-d4.

**表 1** 代谢物 EZE-G 回转为母体待测物 EZE 的考察

**Tab. 1** Investigation of the metabolite EZE-G rotation into the parent analyte EZE

考察内容	结果
试验台放置	室温放置 4 h 及冰浴放置 18 h, 无转化
长期冻存	-20, -70 $^{\circ}C$ 放置 50 d, 无转化
冻融循环	-70 $^{\circ}C$ 下冻融 4 次, 无转化
制备后放置	6 $^{\circ}C$ 下放置 68 h, 无转化
全血中放置	室温下放置 1 h, 无转化

EZE 测定的标准曲线回归方程  $y=0.507x+0.00598(r=0.9992)$ , 在 0.1~20  $ng\cdot mL^{-1}$  浓度范围内线性关系良好, LLOQ 为 0.1  $ng\cdot mL^{-1}$ ; EZE-T 测定的标准曲线回归方程为  $y=2.2x-0.00393(r=0.9985)$ , 在 1~200  $ng\cdot mL^{-1}$  浓度范围内线性关系良好, LLOQ 为 1  $ng\cdot mL^{-1}$ 。

EZE 测定方法的提取回收率为 103.8%~108.7%, 内标的提取回收率为 102.4%; EZE-T 测定方法的提取回收率为 106.7%~109.8%, 内标的提取回收率为 108.8%。

EZE 测定方法的基质因子及其 CV 分别为 77.4%~79.8%和 1.8%~3.6%, 内标归一化基质因子及其 CV 分别为 98.5%~99.0%和 1.9%~2.4%;

EZE-T 测定方法的基质因子及其 CV 分别为 70.5%~70.6%和 1.0%~2.4%，内标归一化基质因子及其 CV 分别为 98.7%~99.4%和 3.0%~3.1%。

对 EZE 的测定，批内准确度/精密度：LLOQ 准确度偏差为 2.7%~7.7%，CV 最大值 3.3%，其余浓度准确度偏差为-1.4%~6.6%，CV 最大值 4.9%；批间准确度/精密度：LLOQ 准确度偏差为 4.5%，CV 值为 3.4%，其余浓度准确度偏差范围为-0.4%~4.2%，CV 最大值 3.8%。对 EZE-T 的测定，批内准确度/精密度：LLOQ 准确度偏差为-13.1%~17.9%，CV 最大值 6.9%，其余浓度准确度偏差范围为-6.5%~5.1%，CV 最大值 4.8%；批间准确度/精密度：LLOQ 准确度偏差为 2.9%，CV 最大值 14.5%，其余浓度准确度偏差范围为-3.8%~-1.7%，CV 最大值 6.4%。

EZE、EZE-T 的 2%溶血样品的准确度偏差分别为-0.3%~3.0%、0.5%~8.6%，CV 分别为 0.7%~2.1%、1.1%~4.1%；EZE/EZE-T 的 2%高脂样品的准确度偏差分别为 0.4%~4.7%、-5.6%~-1.1%；CV 分别为 0.9%~1.6%、1.9%~2.1%。

稳定性测试结果表明，EZE 在储备液中室温放置 46 h 及-20 °C放置 45 d、工作液中室温放置 42 h 及-20 °C放置 36 d、血浆中室温放置 72 h 及冰浴放置 15 h、血浆中-20 °C与-70 °C放置 48 d、血浆中-70 °C下冻融 4 次、血浆样品处理液中 6 °C放置 33 h、全血室温中放置 1 h 的稳定性良好，EZE 在血浆样品处理液中 6 °C放置 19 h 后再进样重复性良好。而内标 EZE-d4 在储备液中室温放置 21 h、工作液中室温放置 20 h 稳定性良好。

## 2.2 测定方法的应用

**2.2.1 BE 样品测定** 96 名健康志愿者口服 10 mg 单剂量依折麦布片后，EZE 的  $C_{max}$  均值分别约 5 ng·mL<sup>-1</sup>(空腹)或 11 ng·mL<sup>-1</sup>(餐后)，而 EZE-T 的  $C_{max}$  均值分别约 70 ng·mL<sup>-1</sup>(空腹)或 110 ng·mL<sup>-1</sup>(餐后)，与文献<sup>[9-13]</sup>报道的血药浓度结果一致。受试制剂与参比制剂的  $C_{max}$  值接近。本次试验 EZE 与 EZE-T 的定量范围是 0.1~20 ng·mL<sup>-1</sup>与 1~200 ng·mL<sup>-1</sup>可有效涵盖待测血样的浓度范围，并获取足够完整的药时曲线。

**2.2.2 药动学参数及 BE 评价** 服药后，受试者体内 EZE 的药动学参数(除  $C_{max}$  外)： $T_{max}$  约 5 h(空腹)或 1.5 h(餐后)， $t_{1/2}$  约 12 h(空腹)或 13 h(餐后)， $AUC_{0-inf}$  约 70 ng·mL<sup>-1</sup>·h(空腹)或 100 ng·mL<sup>-1</sup>·h(餐

后)；EZE-T 的药动学参数(除  $C_{max}$  外)： $T_{max}$  约 1.25 h(空腹)或 2 h(餐后)， $t_{1/2}$  约 14 h(空腹及餐后)， $AUC_{0-inf}$  约 560 ng·mL<sup>-1</sup>·h(空腹)或 650 ng·mL<sup>-1</sup>·h(餐后)。受试制剂与参比制剂的  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-t}$ 、 $AUC_{0-inf}$  的 T/R 比值均在(100±10)%以内，90%置信区间均位于 80%~125%，把握度均>80%。这些结果说明受试制剂与参比制剂是生物等效的。

## 3 讨论

本研究建立了一套可分别测定人血浆中 EZE 和 EZE-T 的 LC-MS/MS 方法系统，其中 EZE 和 EZE-T 的 LLOQ 分别达到了 0.1 和 1 ng·mL<sup>-1</sup>。本方法在前处理环节采用了较为简便的蛋白沉淀法，且血浆用量少、方法时间短。该方法经过了完整的方法学验证，各项指标均符合国内外相关指导原则的要求，并已成功用于国产依折麦布片在中国健康受试者中的 BE 研究。结果显示，采用本方法可将 EZE 和 EZE-T 的测试数据拟合出完整的药时曲线，而统计出的国产依折麦布片和原研制剂的药动参数均与文献报道一致。

EZE-G 和其原形药具有相等的药理活性，因此在 BE 研究中其存在是不可忽略的。美国 FDA 针对依折麦布片的 BE 指导原则中建议，以 EZE 和 EZE-T 作为测定对象，并以两者的药动数据同时作为 BE 评价依据。至今，亦有文献报道了在人血浆中同时测定 EZE 和 EZE-G 的 LC-MS/MS 方法，研究者们建议可以通过将 EZE 和 EZE-G 相加的方式得到 EZE-T 的血药浓度。这些方法尽管更简便，但并不是“直接”的测定方法，所以并不适合 BE 这一类需要进行严格比对的研究。本次研究参考了原研厂家在临床药动学和 BE 研究中进行 EZE-T 测定的技术路线(益适纯和葆至能)，即先用  $\beta$ -葡萄糖醛酸水解酶将 EZE-G 回转为原形药，然后对原形药进行总量的分析。

一般而言，小分子药物的葡萄糖醛酸结合产物在全血和血浆中具有回转为原形药的较大可能性，从而为原形药和葡萄糖醛酸结合物的准确定量带来风险。中国药典《生物样品定量分析方法验证指导原则》(2015 年版第四部 9012)中指出，在适当情况下应评价代谢物回转为原形药的可能性。鉴于 EZE-G 在体内的浓度远高于原形药，这项考察对于 EZE 的定量具有尤为重要的意义。迄今为止的文献中，仅见少量针对 EZE-G 在血浆中转化为原形药的研究，但未见在全血中的转化研

究。那些在血浆中进行的转化考察,均采用了“质控样品法”,即考察代谢物在基质中放置一段时间后对原形药在质控浓度水平上的准确度影响,最终以质控样品的接受标准而定。本研究全面考察了 EZE-G 在全血和血浆中转化为 EZE 的可能性。为了更灵敏地反映这种可能性对定量带来的影响,实验中采用了“特异性考察法”,即考察代谢物在基质中放置一段时间后对原形药保留时间处的干扰程度,最终以特异性的接受标准而定。

本法特异性强、灵敏、准确,重复性好,所需样本少,完全满足依折麦布片人体 BE 研究中的高通量定量分析需求。方法已成功用于依折麦布片给药后人体血浆样本检测,生物样品再分析复测结果均符合要求,且结果偏差<10%。

## REFERENCES

- [1] YU X, ZHOU Z H, YUAN H Y, et al. Simultaneous determination of two constituents in ezetimibe and simvastatin tablets by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2013, 30(9): 1008-1011.
- [2] FANG D F, WANG X Q, WANG C J, et al. Study on the effect of simvastatin combined with ezetimibe on glycolipid and level of VEGF, IL-1 $\beta$ , CRP of type 2 diabetes mellitus with atherosclerosis rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2017, 34(1): 49-52.
- [3] GUO L, WANG M M, HE M, et al. Simultaneous determination of ezetimibe and its glucuronide metabolite in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015(986/987): 108-114.
- [4] BAHRAMI G, MOHAMMADI B, KHATABI P M, et al. Application of one-step liquid chromatography-electrospray tandem MS/MS and collision-induced dissociation to quantification of ezetimibe and identification of its glucuronated metabolite in human serum: A pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(28): 2789-2795.
- [5] XIANG Y X, PENG J F, HUANG J, et al. Bioequivalence of ezetimibe tablets in healthy Chinese volunteers [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学)*, 2015, 20(8): 928-932.
- [6] FDA. Draft Guidance on Ezetimibe [EB/OL]. [https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance Compliance Regulatory Information/Guidances/ucm086170.pdf](https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance%20Compliance%20Regulatory%20Information/Guidances/ucm086170.pdf), Recommended Oct 2008.
- [7] MIGOYA E M, BERGMAN A, HRENIUK D, et al. Bioequivalence of an ezetimibe/simvastatin combination tablet and coadministration of ezetimibe and simvastatin as separate tablets in healthy subjects [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2006, 44(2): 83-92.
- [8] BALASUBRAMANIAN H, KUMAR R S, ANIREDDY J S, et al. Development of a simple, highly selective RP-LC method for the quantification of diastereomers and other related substances of ezetimibe using multivariate analysis [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(1): 71-80.
- [9] BHADORIYA A, SANYAL M, SHAH P A, et al. Simultaneous quantitation of rosuvastatin and ezetimibe in human plasma by LC-MS/MS: Pharmacokinetic study of fixed-dose formulation and separate tablets [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(10): e4291. Doi: 10.1002/bmc.4291.
- [10] KIM H, CHOI H Y, KIM Y H, et al. Pharmacokinetic interactions and tolerability of rosuvastatin and ezetimibe: An open-label, randomized, multiple-dose, crossover study in healthy male volunteers [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018(12): 815-821.
- [11] LI Z D, SHI X J, WANG B, et al. Determination of ezetimibe and total ezetimibe in human plasma and its pharmacokinetics [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2007, 42(7): 531-535.
- [12] OSWALD S, SCHEUCH E, CASCORBI I, et al. A LC-MS/MS method to quantify the novel cholesterol lowering drug ezetimibe in human serum, urine and feces in healthy subjects genotyped for SLCO1B1 [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 830(1): 143-150.
- [13] SOULELE K, KARALIS V. On the population pharmacokinetics and the enterohepatic recirculation of total ezetimibe [J]. *Xenobiotica*, 2019, 49(4): 446-456.
- [14] HU L L, TANG J L. Key points of bioanalysis in bioequivalence study [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(7): 894-899.
- [15] FREISLEBEN A, BRUDNYKLÖPPEL M, MULDER H, et al. Blood stability testing: European Bioanalysis Forum view on current challenges for regulated bioanalysis [J]. *Bioanalysis*, 2011, 3(12): 1333-1336.

收稿日期: 2019-06-24  
(本文责编: 沈倩)