

Università degli Studi di Bologna

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dipartimento di Chimica "G. Ciamician"

Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche

XIX Ciclo

Coordinatore: Chiar.mo Prof. V. Balzani

Metodologie analitiche combinate di spettrometria di massa per lo studio di impurezze in farmaci e di metaboliti di biomolecole

**Tesi di Dottorato di:
Marcello Locatelli**

**Relatore:
Chiar.mo Prof. Pierluigi Reschiglian**

**Responsabile Scientifico:
Chiar.mo Prof. Aldo Roda**

Parole chiave: HPLC-ES-MS/MS, BIOANALITICA, VALIDAZIONE METODI

Anno accademico 2006/2007

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: CHIM/01

INDICE

| | |
|--|---------|
| Indice | pag. 2 |
| Prefazione | pag. 5 |
| CAPITOLO I: Sviluppo e messa a punto di un metodo HPLC-MS/MS con impatto elettrospray per la determinazione di acidi biliari in plasma | pag. 8 |
| 1. Introduzione | pag. 9 |
| 1.1 Origine degli acidi biliari | pag. 9 |
| 1.2 Struttura degli acidi biliari | pag. 10 |
| 1.3 Ruolo fisiologico degli acidi biliari | pag. 11 |
| 1.4 Circolazione enteroepatica | pag. 14 |
| 1.5 La biosintesi epatica degli acidi biliari | pag. 15 |
| 1.6 Alterazioni del metabolismo degli acidi biliari nelle principali patologie epatobiliari | pag. 18 |
| 2. Scopo | pag. 21 |
| 3. Materiali e metodi | pag. 23 |
| 3.1 Materiali e reagenti | pag. 23 |
| 3.2 Calibrazione degli standard e controllo di qualità dei campioni | pag. 23 |
| 3.3 Preparazione dei campioni in siero | pag. 23 |
| 3.4 Analisi HPLC-ESI-MS/MS | pag. 24 |
| 3.5 Analisi quantitativa | pag. 29 |
| 4. Risultati | pag. 30 |
| 4.1 Spettri di massa degli acidi biliari liberi, tauro e glico-coniugati e analisi HPLC | pag. 31 |
| 4.2 Curve di calibrazione | pag. 31 |
| 4.3 Precisione, accuratezza e limite di quantificazione | pag. 32 |
| 5. Discussione | pag. 34 |
| 6. Conclusioni | pag. 35 |
| 7. Bibliografia | pag. 36 |
| CAPITOLO II: Sviluppo e messa a punto di un metodo HPLC-MS/MS con impatto elettrospray per la determinazione di impurezze e metaboliti <i>in vivo</i> di un nuovo farmaco: l'acido 6α etil-3α,7α diidrossi-5β colanico | pag. 39 |
| 1. Introduzione | pag. 40 |
| 1.1 Acido 6 α etil-3 α ,7 α -diidrossi-5 β colanico (6ECDCA) | pag. 41 |
| 2. Scopo | pag. 44 |
| 3. Materiali e metodi | pag. 45 |

| | | |
|-------|--|---------|
| 3.1 | Materiali e reagenti | pag. 45 |
| 3.2 | Calibrazione degli standard e controllo di qualità dei campioni | pag. 45 |
| 3.3 | Preparazione del campione | pag. 46 |
| 3.3.1 | Siero | pag. 46 |
| 3.3.2 | Tessuto epatico, tessuto intestinale e del colon, tessuto renale | pag. 46 |
| 3.3.3 | Contenuto del colon e dell'intestino | pag. 47 |
| 3.3.4 | Feci | pag. 47 |
| 3.3.5 | Urine | pag. 48 |
| 3.4 | Analisi HPLC-ESI-MS/MS | pag. 48 |
| 3.5 | Analisi quantitativa | pag. 51 |
| 3.6 | Farmacocinetica e metabolismo del 6ECDCA nel ratto | pag. 52 |
| 4. | Risultati | pag. 53 |
| 4.1 | Spettri di massa del 6ECDCA e dei suoi metaboliti e analisi HPLC | pag. 53 |
| 4.2 | Curve di calibrazione | pag. 54 |
| 4.3 | Precisione, accuratezza e limite di quantificazione | pag. 56 |
| 4.4 | Farmacocinetica e metabolismo del 6ECDCA | pag. 56 |
| 5. | Discussione | pag. 60 |
| 6. | Conclusioni | pag. 62 |
| 7. | Bibliografia | pag. 63 |

CAPITOLO III: Sviluppo e validazione di un metodo HPLC-ESI-MS/MS per la determinazione di glucosamina in plasma e liquido sinoviale umano

| | | |
|-----|---|---------|
| | | pag. 68 |
| 1. | Introduzione | pag. 69 |
| 1.1 | Glucosamina | pag. 69 |
| 1.2 | Struttura della cartilagine e ruolo fisiologico della GLcN endogena | pag. 69 |
| 1.3 | Meccanismo d'azione della GLcN come agente "condroprotettivo" | pag. 72 |
| 1.4 | Tossicità | pag. 74 |
| 2. | Scopo | pag. 77 |
| 3. | Materiali e metodi | pag. 79 |
| 3.1 | Materiali e reagenti | pag. 79 |
| 3.2 | Calibrazione degli standard e controllo di qualità dei campioni | pag. 79 |
| 3.3 | Preparazione del campione | pag. 80 |
| 3.4 | Analisi HPLC-ESI-MS/MS | pag. 80 |
| 3.5 | Analisi quantitativa | pag. 82 |
| 4. | Risultati | pag. 83 |

| | |
|---|----------|
| 4.1 Spettri di massa della Glucosamina e della ¹³ C-Glucosamina e analisi HPLC | pag. 83 |
| 4.2 Curve di calibrazione | pag. 88 |
| 4.3 Precisione, accuratezza e limite di quantificazione | pag. 89 |
| 4.4 Efficienza del metodo | pag. 91 |
| 4.5 Stabilità del plasma, del liquido sinoviale e dei campioni trattati | pag. 93 |
| 5. Applicazione del metodo | pag. 94 |
| 5.1 Determinazione della biodisponibilità e della farmacocinetica di GLcN solfato in plasma umano dopo somministrazione singola e ripetuta di farmaco | pag. 94 |
| 5.2 Determinazione dei livelli di GLcN in plasma e liquido sinoviale umano dopo somministrazione giornaliera di GLcN solfato | pag. 95 |
| 7. Conclusioni | pag. 100 |
| 8. Bibliografia | pag. 101 |
| Articoli Pubblicati | pag. 105 |
| Ringraziamenti | pag. 106 |

PREFAZIONE

L'analisi di impurezze presenti in farmaci rappresenta un problema che ne limita sia gli aspetti regolativi che la sicurezza per l'uomo.

In accordo con le ICH (International Conference on Harmonisation) tutte le impurezze presenti tra lo 0.2% e l'1% (a seconda della dose giornaliera di farmaco) richiedono una accurata identificazione e quantificazione.

Tali impurezze possono derivare sia dalla fase di sintesi del farmaco che a seguito della limitata stabilità della formulazione finale.

In accordo con le linee guida ICH, che definiscono le procedure e criteri d'accettazione per la qualità dei prodotti farmaceutici e i metodi atti alla determinazione delle impurezze (ICH Q2A e Q3B) il produttore in fase di registrazione deve procedere secondo norme estremamente restrittive [D.L. 26/04/2002 (G.U. del 07/05/2002), D.L. 24/09/2004 (G.U. del 28/10/2004), Direttiva 2003/63/CE della Commissione del 25 giugno 2003].

I farmaci devono quindi essere altamente purificati e caratterizzati utilizzando una serie di procedure analitiche (ICH Q2A e Q2B) standardizzate o sviluppate "ad hoc" (e validate) per quella particolare molecola.

E' infatti noto che l'insuccesso nello sviluppo di un nuovo farmaco deriva nel 90% dei casi da problematiche riguardanti il suo Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione (ADME). Successivamente a studi di drug-design, che utilizzano approcci bioinformatici e di chimica combinatoriale, è fondamentale eseguire uno studio pilota mediante somministrazione di una singola dose all'animale da laboratorio, con successiva valutazione del bilancio di massa che consiste nella valutazione della concentrazione del farmaco nei vari organi e fluidi biologici a tempi diversi, per ottenere informazioni sulla sua farmacocinetica e metabolismo.

Lo sviluppo e l'ottimizzazione delle procedure per l'identificazione e la caratterizzazione delle impurezze deve essere incentrato sulla

necessità di separare e quantificare tutte le possibili impurezze presenti nel prodotto con una selettività e sensibilità elevate.

Il problema analitico è quindi complesso, poiché un'impurezza può avere proprietà chimico-fisiche notevolmente diverse dal farmaco e non essere rilevabile con i convenzionali metodi standard dalla farmacopea, basati sull'utilizzo di rivelatori UV-Vis.

Un'impurezza "trasparente" nell'UV-Vis potrebbe quindi essere sottostimata con notevoli rischi per la salute dell'uomo.

Solo con l'utilizzo di tecniche HPLC combinate con la spettrometria di massa è possibile affrontare tale problema, anche se rimangono problemi legati alla possibilità di coeluire molecole strutturalmente simili.

In tale contesto lo studio di metaboliti e biomolecole presenti nell'organismo è un'altra notevole problematica analitica, poiché tali molecole sono in genere presenti in fluidi biologici complessi, a concentrazioni sub-molari e presenti come classi costituite anche da 10-20 molecole a volte strutturalmente simili (epimeri, isomeri di posizione, ecc.), ma con proprietà chimico-fisiche estremamente variabili.

Per la loro analisi è pertanto necessario mettere a punto sistemi cromatografici ad alta risoluzione che permettano la loro separazione e successiva identificazione in tempi ragionevoli e con elevata selettività e sensibilità.

Il progetto del lavoro di dottorato può essere quindi suddiviso in tre parti fondamentali:

1. Sviluppo di metodiche analitiche combinate HPLC-ES-MS/MS per molecole endogene presenti in composizione complessa in fluidi biologici quali siero come gli acidi biliari, la cui composizione qualitativa e quantitativa varia da specie a specie animale e la cui rivelazione con tecniche HPLC-UV/Vis non è percorribile [**CAPITOLO I**].

2. Sviluppo di metodiche analitiche combinate HPLC-ES-MS/MS per molecole esogene che vengono somministrate a cavie animali come potenziali farmaci per la terapia di patologie che colpiscono l'uomo e che richiedono studi di farmacocinetica e di tossicità relativi anche ai loro metaboliti [**CAPITOLO II**].
3. Sviluppo di metodiche analitiche combinate HPLC-ES-MS/MS per molecole ad elevata idrofilia e difficilmente separabili e rilevabili con tecniche convenzionali come HPLC-UV/Vis. A questa categoria appartiene ad esempio un amminozucchero come la glucosammina (e suoi metaboliti), che è sia una sostanza endogena che farmaco [**CAPITOLO III**].

A tale scopo è stato pertanto necessario sviluppare nuove metodologie combinate basate sull'accoppiamento HPLC-ES-MS/MS, in grado di rispondere alle problematiche analitiche esposte in precedenza.

CAPITOLO I

SVILUPPO E MESSA A PUNTO DI UN METODO HPLC-MS/MS CON IMPATTO ELETTROSPRAY PER LA DETERMINAZIONE DI ACIDI BILIARI IN PLASMA

1. INTRODUZIONE

1.1 Origine degli acidi biliari

Gli acidi biliari sono i prodotti finali del metabolismo del colesterolo e rappresentano una via per la sua eliminazione.

Sono sintetizzati attraverso una sequenza di steps nei quali la reazione di 7α -idrossilazione della molecola di colesterolo è considerata come essenziale e come elemento limitante della velocità di tutto il processo.

Principalmente si suddividono in:

- acidi biliari primari
- acidi biliari secondari

Nell'uomo esistono due tipi di acidi biliari primari: l'acido colico e l'acido chenodesossicolico.

Gli acidi biliari primari sono sintetizzati nel fegato, mentre i secondari sono prodotti a seguito di reazioni di biotrasformazione, per opera di batteri, degli acidi biliari primari [1].

Gli acidi biliari primari vengono poi coniugati con glicina o taurina dopo la loro sintesi nel fegato ad opera di un enzima microsomiale: il cholil-CoA glicina:taurina aminotransferase.

È da notare che il rapporto tra acidi biliari glico-coniugati e tauro-coniugati dipende dalla concentrazione di taurina negli epatociti, la quale è determinata dall'apporto di taurina nella dieta [2, 3].

Nella seguente tabella sono riportati i principali acidi biliari.

Tabella 1: nome IUPAC, nome comune e abbreviazione dei principali acidi biliari.

| Nome | Nome Comune | Abbrev. |
|---|--------------------------------|---------|
| Acido 3 α ,7 β diidrossi-5 β colanico | acido ursodesossicolico | UDCA |
| Acido 3 α ,7 α diidrossi-5 β colanico | acido chenodesossicolico | CDCA |
| Acido 3 α ,12 α diidrossi-5 β colanico | acido desossicolico | DCA |
| Acido 3 α ,7 α ,12 α triidrossi-5 β colanico | acido colico | CA |
| Acido 3 α idrossi-5 β colanico | acido litocolico | LCA |
| Acido tauro 3 α ,7 β diidrossi-5 β colanico | acido tauro-ursodesossicolico | TUDCA |
| Acido tauro 3 α ,7 α diidrossi-5 β colanico | acido tauro-chenodesossicolico | TCDCA |
| Acido tauro 3 α ,12 α diidrossi-5 β colanico | acido tauro-desossicolico | TDCA |
| Acido tauro 3 α ,7 α ,12 α triidrossi-5 β colanico | acido tauro-colico | TCA |
| Acido tauro 3 α idrossi-5 β colanico | acido tauro-litocolico | TLCA |
| Acido glico 3 α ,7 β diidrossi-5 β colanico | acido glico-ursodesossicolico | GUDCA |
| Acido glico 3 α ,7 α diidrossi-5 β colanico | acido glico-chenodesossicolico | GCDCA |
| Acido glico 3 α ,12 α diidrossi-5 β colanico | acido glico-desossicolico | GDCA |
| Acido glico 3 α ,7 α ,12 α triidrossi-5 β colanico | acido glico-colico | GCA |
| Acido glico 3 α idrossi-5 β colanico | acido glico-litocolico | GLCA |

Molti animali, come ad esempio il ratto, possono sintetizzare taurina e coniugare molti dei loro acidi biliari con tale molecola.

1.2 Struttura degli acidi biliari

Le molecole di acidi biliari sono caratterizzate da un nucleo di tipo steroideo e da una catena laterale presente in posizione C₁₇.

Gli acidi biliari si distinguono però dagli altri steroidi naturali per la presenza di una giunzione *cis* tra gli anelli A e B, che porta come conseguenza principale alla configurazione β dell'idrogeno presente in posizione 5.

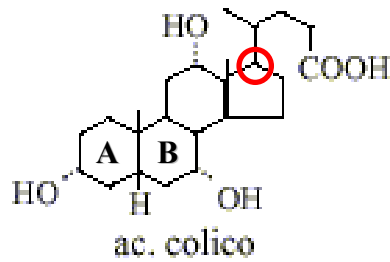


Fig 1: viene mostrato, a titolo di esempio, l'acido colico con evidenziata la posizione C₁₇ nella quale si ha la presenza della catena laterale e i due anelli A e B in giunzione di tipo cis.

Presentano inoltre altri elementi distintivi:

- gruppi metilici in posizione C₁₀ e C₁₃ oltre a quelli presenti in posizione C₁₈ e C₁₉;
- catena laterale che presenta un gruppo carbossilico terminale;
- presenza di uno o più gruppi ossidrilici in posizione C₃, C₆, C₇, C₁₂ che ne modulano le proprietà in soluzione acquosa (solubilità, effetto del pH sulla loro solubilità, la ionizzazione, la concentrazione micellare critica (CMC) e la lipofilia).

Particolare importanza va data agli acidi biliari in quanto la differenza principale e fondamentale dagli altri steroidi è che il colesterolo, molecola estremamente insolubile in acqua, produce queste molecole che sono i suoi detergenti e trasportatori naturali.

1.3 Ruolo Fisiologico degli acidi biliari

Tra le funzioni fisiologiche svolte dagli acidi biliari quella fondamentale è sicuramente legata al trasporto dei lipidi in fase micellare [4], con il risultato finale di favorire l'assorbimento

intestinale dei prodotti della digestione dei grassi e di altri importanti sostanze quali le vitamine liposolubili [5].

Un'altra funzione è legata alla stimolazione del flusso biliare mediante meccanismo osmotico.

Gli acidi biliari svolgono inoltre proprietà regolatrici nel controllo, mediante un meccanismo di feedback negativo, della loro stessa sintesi epatica e di quella del colesterolo ed hanno la proprietà di complessare cationi quali Fe^{2+} e Ca^{2+} , favorendone l'assorbimento intestinale.

La funzione di regolazione negativa della propria biosintesi da parte degli acidi biliari si attua attraverso la repressione del gene codificante la colesterolo-7 α -idrossilasi che è l'enzima limitante della via biosintetica classica e appartenente alla superfamiglia dei citocromi P450.

Esperimenti *in vivo* hanno provato che il promotore del gene endogeno della colesterolo-7 α -idrossilasi contiene le sequenze che mediano il feedback degli acidi biliari sulla loro stessa sintesi [6].

Nella seguente figura è riportato lo schema del metabolismo degli acidi biliari sia attraverso la via classica (neutra) che attraverso la via alternativa (acida).

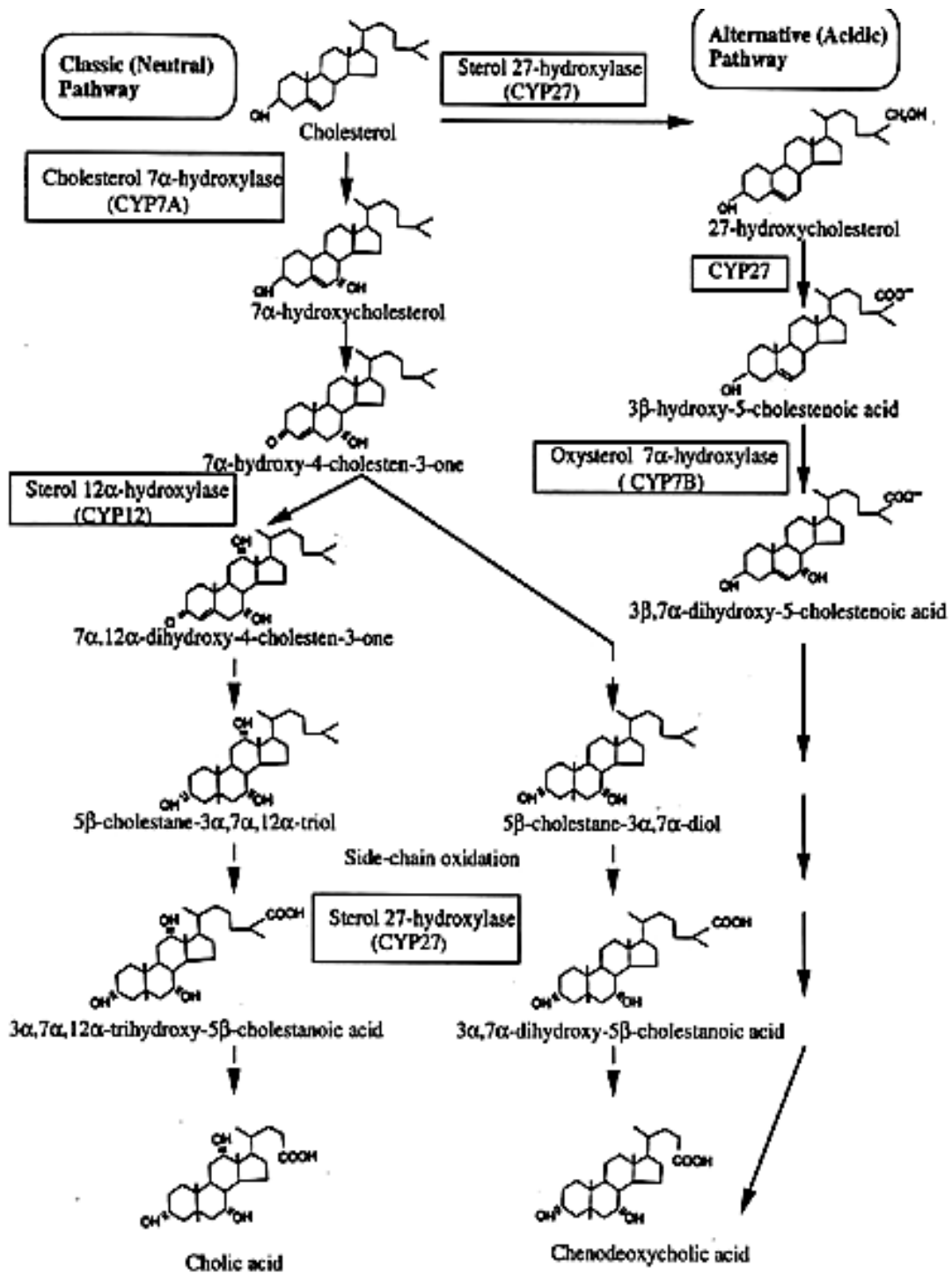


Fig 2: viene mostrato il processo metabolico (classico e alternativo) che dal colesterolo porta alla formazione degli acidi biliari primari (acido colico e chenodeossicolico).

1.4 Circolazione Enteroepatica

La distribuzione degli acidi biliari nell'organismo è sostanzialmente limitata al fegato, alle vie biliari, all'intestino e al sistema circolatorio [7].

Il circolo enteroepatico degli acidi biliari è un'entità dinamica in cui il "pool" degli acidi biliari (da intendersi come la loro massa) ricircola costantemente, realizzando le sue funzioni fisiologiche e subendo i processi di sintesi come pure le trasformazioni [8, 9]; una sua rappresentazione schematica è riportata nella figura 3.

Una delle principali funzioni di tale circolazione (CEE) è il mantenimento dell'omeostasi del pool degli acidi biliari in condizioni fisiologiche: la piccola quota di acidi biliari che viene eliminata per via fecale viene rimpiazzata da una equivalente proveniente dalla neosintesi epatocitaria a partire dal colesterolo.

Il pool totale degli acidi biliari in condizioni fisiologiche è di 4-6 grammi; tale massa ricircola nella CEE almeno 5-9 volte al giorno, in funzione della contrazione colecistica e della mobilità intestinale.

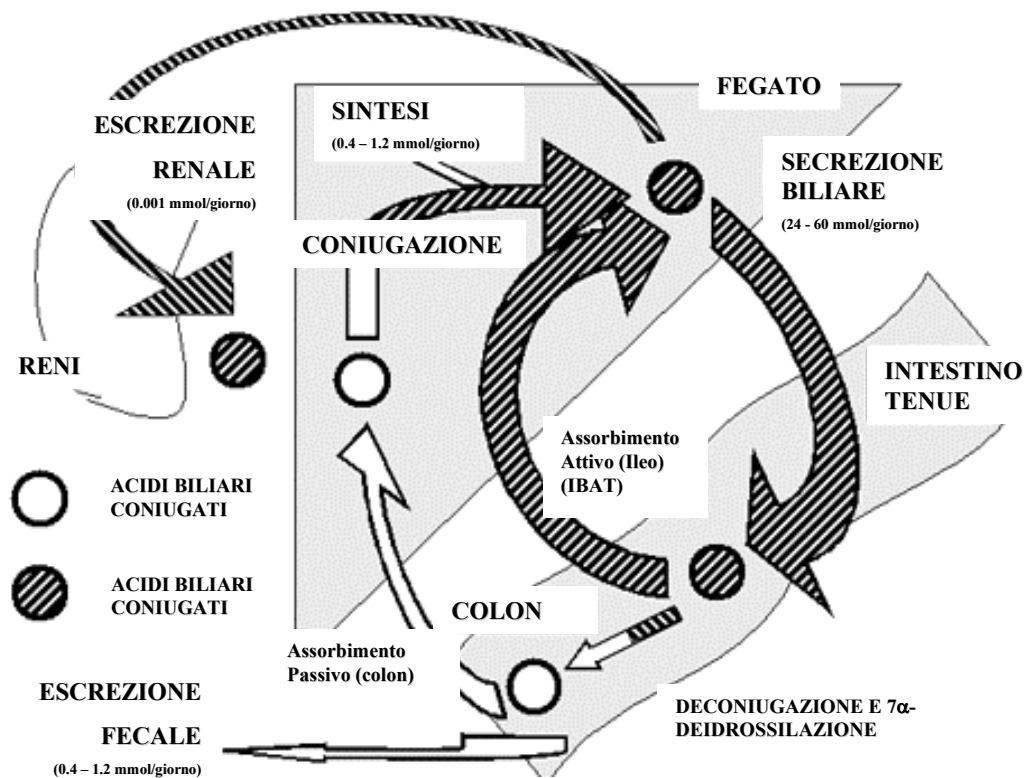


Fig 3: descrizione schematica della circolazione enteroepatica degli acidi biliari nell'organismo con indicate le quote di sintesi e catabolismo del pool di acidi biliari.

La CEE degli acidi biliari viene resa possibile dall'esistenza negli epatociti e negli enterociti di meccanismi di assorbimento e trasporto sia di tipo passivo che di tipo attivo (cioè mediante specifici sistemi proteici trasportatori che coinvolgono gli ioni sodio).

1.5 La biosintesi epatica degli acidi biliari

Il meccanismo della biosintesi degli acidi biliari [10] è quello di sintesi *ex novo* dal colesterolo da cui si originano gli acidi biliari primari, i principali dei quali sono, nell'uomo, l'acido colico (CA) e l'acido chenodeossicolico (CDCA).

Un secondo meccanismo di biosintesi, che permette la formazione degli acidi biliari detti secondari a partire dagli acidi biliari primari,

consiste nella rimozione ad opera degli enzimi della flora batterica intestinale di un ossidrile in posizione 7 con formazione rispettivamente dell'acido deossicolico (DCA) dal CA e dell'acido litocolico (LCA) a partire dal CDCA.

Questa classificazione in acidi biliari primari e secondari e coniugati viene riportata nella seguente figura, dove sono evidenziati anche gli atomi di carbonio (in posizione 3, 6, 7, 12, dove sono presenti o meno gli ossidrili nelle configurazioni α o β).

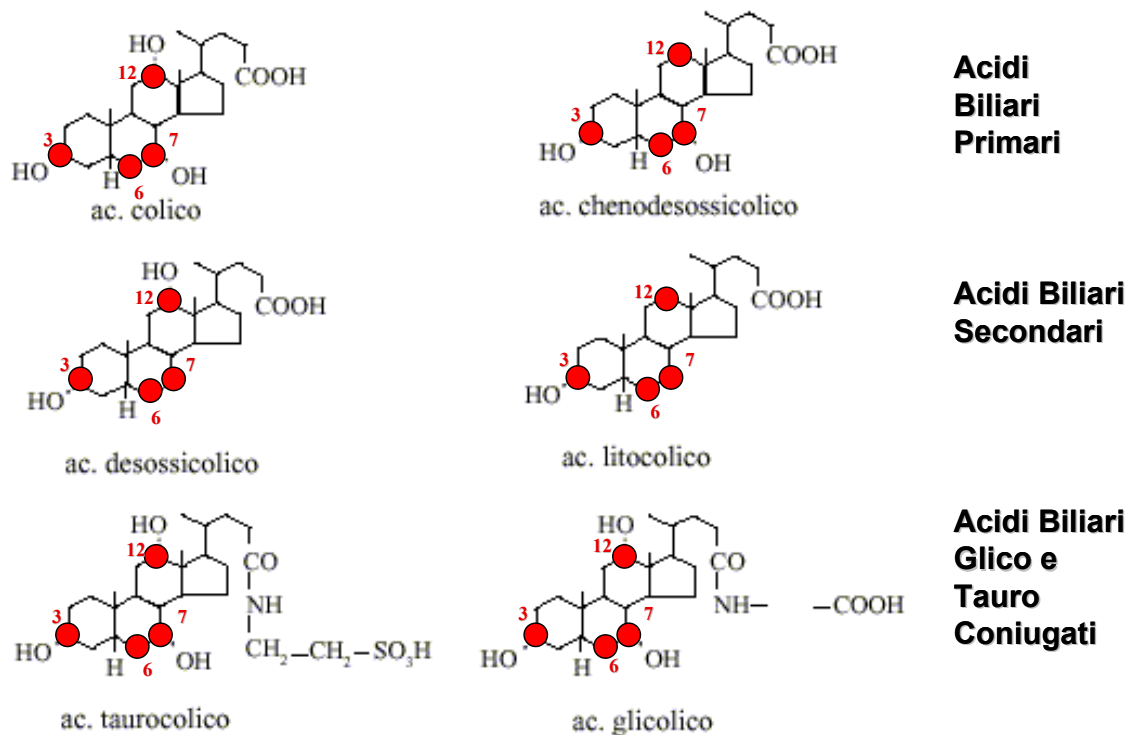


Fig 4: descrizione schematica degli acidi biliari primari, secondari e coniugati.

Nella sintesi *ex novo* dal colesterolo esistono due possibili vie metaboliche associate all'azione indipendente di due differenti enzimi: colesterolo-7 α -idrossilasi (via classica) e sterolo-27-idrossilasi (via alternativa).

Il primo enzima catalizza la sintesi degli acidi biliari a livello epatico dal colesterolo (substrato specifico); la sterolo-27-idrossilasi è un enzima ubiquitario che catalizza la 27-idrossilazione degli steroli.

Per quanto riguarda la loro regolazione, è la via classica quella più sensibile e dipendente dal flusso di acidi biliari attraverso il fegato, mentre la conversione del 27-idrossicolesterolo ad acidi biliari attraverso la via alternativa, confermata da studi *in vivo* [11] e *in vitro* [12], è regolata soprattutto dai livelli di colesterolo ed è una via extraepatica.

Nella via classica la conversione del colesterolo a 7α -idrossicolesterolo, catalizzata dalla colesterolo- 7α -idrossilasi, è stata identificata come la reazione limitante del principale meccanismo di biosintesi degli acidi biliari.

Studi condotti sugli animali indicano che l'enzima colesterolo- 7α -idrossilasi è sotto il controllo di vari fattori che includono ormoni, dieta, colesterolo neosintetizzato e acidi biliari lipofili.

Nonostante la sua importanza clinica, esistono solo pochi e incompleti dati sulla regolazione dell'attività della colesterolo- 7α -idrossilasi nell'uomo, spiegabile con la difficoltà di applicazione e il carattere invasivo dei metodi che studiano l'attività dell'enzima [13].

È inoltre noto che tale enzima subisce regolazioni molto diverse nelle diverse specie che impediscono un possibile trasferimento dei dati ottenuti nelle sperimentazioni animali (con il ratto o il topo) all'uomo.

Tradizionalmente infatti, la stima della sintesi degli acidi biliari era valutata eseguendo una biopsia per la determinazione dell'attività della colesterolo- 7α -idrossilasi, direttamente nel tessuto epatico [14].

Il passaggio successivo alla formazione del 7α -idrossicolesterolo, è rappresentata dalla sua rapida deidrogenazione/isomerizzazione, con formazione dell'intermedio 7α -idrossi-4-colesten-3-one (α HC).

Recentemente la concentrazione plasmatica dei due precursori degli acidi biliari, il 7α -idrossicolesterolo e l' α HC sono stati proposti come indici dell'attività della colesterolo- 7α -idrossilasi nell'uomo.

Come è stato confermato dal metodo del bilancio fecale e dalla valutazione dell'escrezione fecale di acidi biliari in pazienti con fistola biliare, c'è una stretta correlazione tra i livelli di 7 α -idrossicolesterolo plasmatici e la sintesi di acidi biliari [15].

Altri metodi hanno reso possibile invece la conferma della stretta relazione tra livelli plasmatici di α HC e l'attività della colesterolo-7 α -idrossilasi nel tessuto epatico umano [15, 16].

1.6 Alterazioni del metabolismo degli acidi biliari nelle principali patologie epatobiliari

Tutte le condizioni patologiche caratterizzate da alterazioni del metabolismo degli acidi biliari riconducibili a lesioni anatomofunzionali di una o più strutture del circolo enteroepatico sono note con il termine di "colanopatie" e si traducono in un'alterata dinamica del circolo enteroepatico stesso.

Una semplice classificazione schematica, utile ai fini clinici, si può ottenere correlando l'alterazione con la stazione del circolo enteroepatico coinvolta e con la malattia, come riportato nella seguente tabella:

| Segmento anatomico | Funzione | Patologia |
|--------------------|---|--|
| Epatocita | Captazione Trasporto | Epatopatia M. Litiastica Sindromi colestatiche ereditarie |
| Albero Biliare | Deposito Motilità | M. Litiastica Sindrome Postcolecistectomia Colestasi Extraepatica |
| Intestino | Trasformazione Batterica Trasporto Assorbimento | Sindrome da Contaminazione del Tenue Patologia da Resezione Ileale Litiasi Renale Ossalica |
| Colon | Assorbimento Secrezione | Sindrome da Malassorbimento degli acidi biliari |

Tab. 2: classificazione delle colanopatie

Nell'ambito di tali patologie, quelle che rivestono un ruolo preminente, sia per la frequenza con cui si presentano che per l'importanza clinica, sono la malattia litiasica, le sindromi da malassorbimento degli acidi biliari e la cirrosi epatica.

La litiasi biliare è una patologia caratterizzata dalla secrezione di bile contenente un eccesso di colesterolo rispetto ad acidi biliari e fosfolipidi in cui è favorita la cristallizzazione del colesterolo con conseguente formazione di calcoli.

Inoltre la bile sovrassatura di colesterolo, stazionando nel tessuto colecistico ne danneggia la funzione muscolare determinando un difetto della contrazione che conduce a stasi biliare.

Col termine colestasi extraepatica si descrive invece un quadro patologico caratterizzato dalla diminuzione del flusso biliare nell'intestino dovuta a varie cause ostruttive delle vie biliari.

Questo porta all'accumulo dei costituenti della bile nel fegato e nell'albero biliare.

In entrambi i casi l'aumento delle concentrazioni di acidi biliari a livello epatico determina una diminuzione della biosintesi ex novo degli acidi biliari stessi (per attivazione del meccanismo di regolazione a feedback negativo) che si riflette in una diminuzione dei livelli ematici di α HC.

Analogamente, nella cirrosi epatica si riscontra un rallentamento della biosintesi degli acidi biliari dovuto, in questo caso, al danno diretto subito dagli epatociti ed alla colestasi intraepatica.

Nell'ambito delle "sindromi da malassorbimento degli acidi biliari" un esempio classico è il quadro che si realizza nelle resezioni ileali, in cui il malassorbimento può causare una diarrea acquosa dovuta all'effetto eccito-secretore degli acidi biliari diidrossilati quando vengono a contatto con la mucosa del colon [17].

Questo comporta la riduzione della quota di acidi biliari che torna al fegato con la CEE e quindi un aumento della sintesi epatica di acidi biliari.

In caso di grave malassorbimento, il fegato non è più in grado di risintetizzare queste molecole in quantità sufficiente per assicurare una normale solubilizzazione dei lipidi biliari ed alimentari.

Si verifica in questo caso una sindrome da malassorbimento lipidico caratterizzata da steatorrea (diarrea ricca di grassi) **[18]**.

2. SCOPO

Lo studio di metaboliti e biomolecole presenti nell'organismo è una notevole sfida, poiché tali molecole sono in genere presenti in fluidi biologici complessi, a concentrazioni sub-molari e presenti come classi costituite da 10-20 molecole a volte strutturalmente simili (epimeri, isomeri di posizione, ecc.), ma con proprietà chimico-fisiche estremamente variabili.

Per la loro analisi è pertanto necessario mettere a punto sistemi cromatografici ad alta risoluzione che permettano la loro separazione e successiva identificazione in tempi ragionevoli e con elevata selettività e sensibilità.

Come per le impurezze nei farmaci, là dove le normative impongono la necessità di monitorare oltre allo ione pseudomolecolare anche ioni frammento, la spettrometria di massa è indispensabile per identificare metaboliti in fluidi biologici.

In questa ottica è stata messa a punto una metodica analitica per l'analisi degli acidi biliari in matrici biologiche quali plasma.

Le metodiche precedentemente sviluppate prevedevano la derivatizzazione dell'acido biliare dopo estrazione ed idrolisi e l'analisi mediante tecniche di spettrometria di massa GC-MS con sorgente ionica tipo Fast Atom Bombardment (FAB), Electron Impact (EI), che rendevano l'analisi lunga e con recuperi variabili.

Gli acidi biliari che sono stati presi in considerazione, poiché costituiscono i principali acidi biliari presenti nell'organismo umano, sono riportati nella tabella 1.

I metodi HPLC-Electrospray-MS precedentemente sviluppati inoltre non prevedevano una completa risoluzione di tutti gli acidi biliari e non affrontavano il problema di determinare oltre allo ione molecolare, anche gli ioni frammento.

Vista la complessità della matrice è stato necessario sviluppare e ottimizzare una procedura d'estrazione e di clean-up del campione.

La metodica HPLC è stata sviluppata partendo da un metodo già in uso in questo laboratorio [19] ma che prevedeva la rivelazione mediante singolo quadrupolo senza avere la possibilità di fare analisi MS-MS.

Nella metodica sviluppata, per poter soddisfare le normative vigenti per la validazione di metodi in spettrometria di massa [20], è stata eseguita anche la frammentazione dello ione molecolare, ottenendo una serie di ioni frammento caratteristici per gli acidi biliari analizzati. È da notare che molti di questi ioni frammento sono gli stessi e che per questo senza una tecnica separativa potente a monte, non è possibile ottenere una soddisfacente analisi quantitativa.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali e reagenti

Gli standard dei vari acidi biliari sono stati ottenuti dalla Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

L'acido Tauro-Ursodeossicolico è stato ottenuto dalla P.C.A Spa (Basaluzzo, Italy), l'acido Litocolico dalla Calbiochem-Novabiochem International Inc (La Jolla, CA), l'acido Glico-ursodeossicolico dalla Erregierre (San Paolo D'Argon (BG), Italy).

Acetonitrile, metanolo, alcol isopropilico (HPLC grade, LiChrosolv®) essendo di grado analitico sono stati utilizzati senza altri passaggi di purificazione.

Le colonnine per SPE Isolute C18 sono state ottenute dalla International Sorbent Technology LTD. (Hengoed, UK).

3.2 Calibrazione degli standard e controllo di qualità dei campioni

Le soluzioni madre degli acidi biliari (2.5 mg/mL) sono state preparate in metanolo e conservate ad una temperatura di -20°C fino al loro utilizzo.

Le diluizioni di ogni analita sono state preparate attraverso diluizione delle rispettive soluzioni madre con metanolo.

Sia per la preparazione degli standard per la curva di calibrazione che per la preparazione dei quality control (QC) è stato utilizzato del serum free (libero da acidi biliari).

3.3 Preparazione dei campione in siero

I campioni di siero sono stati diluiti e posti per 30' con NaOH 0.1N (in rapporto 1:6, v:v) in bagno ad acqua termostata a 64°C. Al termine il tutto è stato fatto passare attraverso una colonna per SPE

C18 precedentemente condizionata con 5 mL di metanolo e 5 mL di acqua bi-distillata (MilliQ).

Il campione è stato fatto fluire e successivamente lavato con 10 mL di acqua MilliQ.

Dopo lo step di lavaggio, si sono eluiti gli analiti mediante 5 mL di metanolo.

Tale eluato è stato poi portato a secco e ripreso con una uguale quantità del campione iniziale di fase mobile (70:30, v/v, tampone ammonio acetato, 15 mM, pH 5/acetoneitrile) e iniettato per l'analisi HPLC-ESI-MS/MS.

3.4 Analisi HPLC–ESI–MS/MS

La separazione cromatografia viene effettuata mediante un sistema HPLC Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) dotato di autocampionatore e di sistema per la termostatazione della colonna cromatografia.

La colonna cromatografica Phenomenex Sinergy Hydro-RP, C18, 150 x 2.1 mm, 4 µm viene protetta con una pre-colonna di guardia C18 (ODS, 4 mm L x 2.0 mm ID) ed il tutto è termostatato a 45°C.

Il volume di iniezione di ogni campione è di 3 µL e la separazione cromatografia viene effettuata mediante una analisi in gradiente con 2 solventi: tampone ammonio acetato 15 mM pH 5 (solvente A) e acetoneitrile (solvente B) e con una velocità di flusso di 0.15 mL/minuto.

L'analisi prevede il seguente gradiente: 0 minuti, 70% A; 0-12 minuti, decremento lineare da 70 a 36% di A; 12-20 minuti, decremento lineare da 36 a 30% di A; 20-30 minuti, decremento lineare da 30 a 0% di A; 30-31 minuti, isocratica allo 0% di A; 31-50 minuti, ripristino delle condizioni iniziali di analisi (70% di A).

Il sistema HPLC è interfacciato direttamente con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo mediante sorgente ESI.

L'analisi è effettuata con ionizzazione negativa e con un settaggio dei parametri strumentali ottenuto mediante infusione diretta di soluzioni standard in metanolo.

I parametri strumentali possono essere così riassunti:

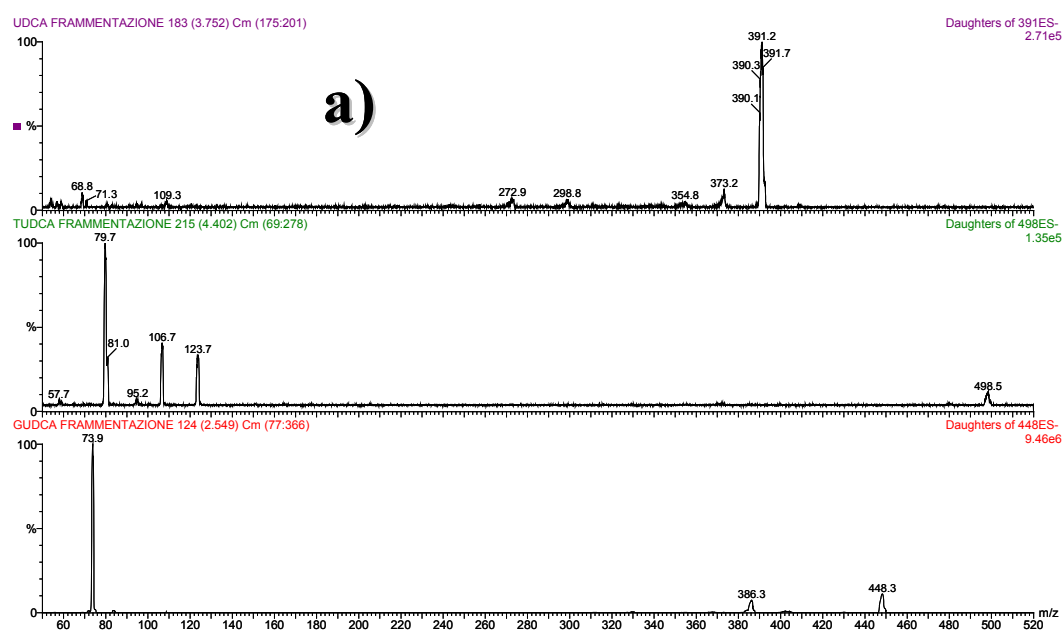
- velocità di flusso del gas di nebulizzazione: 119 l/h
- velocità di flusso del gas di desolvatazione: 926 l/h
- temperatura di desolvatazione: 180°C
- temperatura della sorgente: 80 °C
- voltaggio del capillare: 3.0 kV
- voltaggio del cono: 70V
- gas di collisione: argon;

L'analisi quantitativa viene effettuata mediante analisi in modalità MRM monitorando lo ione genitore e gli ioni frammento indicati nella seguente tabella.

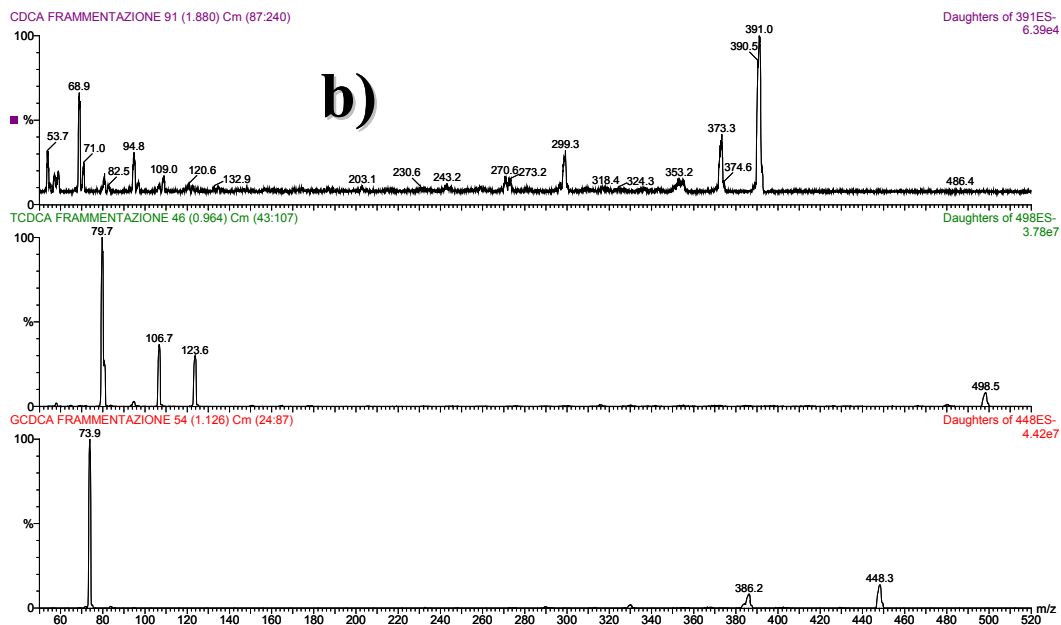
Tabella 3: nome, transizioni “parent ion -> daughter ion” utilizzate per l’analisi HPLC-ESI-MS/MS e relativo valore di energia di collisione usato per ottenere i frammenti.

| | Parent Ion (m/z) | Daughter ion (m/z) | Collision energy (eV) |
|-------|------------------|--------------------|-----------------------|
| TUDCA | 498.3 | 123.7 | 50 |
| TCDCa | 498.3 | 123.7 | 50 |
| TDCA | 498.3 | 123.7 | 50 |
| TCA | 514.3 | 123.7 | 50 |
| TLCA | 482.3 | 106.5 | 60 |
| GUDCA | 448.3 | 73.8 | 50 |
| GCDCA | 448.3 | 73.8 | 50 |
| GDCA | 448.3 | 73.8 | 50 |
| GCA | 464.3 | 73.8 | 50 |
| GLCA | 432.3 | 73.8 | 40 |
| UDCA | 391.3 | 391.3 | 40 |
| CDCA | 391.3 | 391.3 | 40 |
| DCA | 391.3 | 345.0 | 40 |
| CA | 407.3 | 343.0 | 40 |
| LCA | 375.3 | 375.3 | 10 |

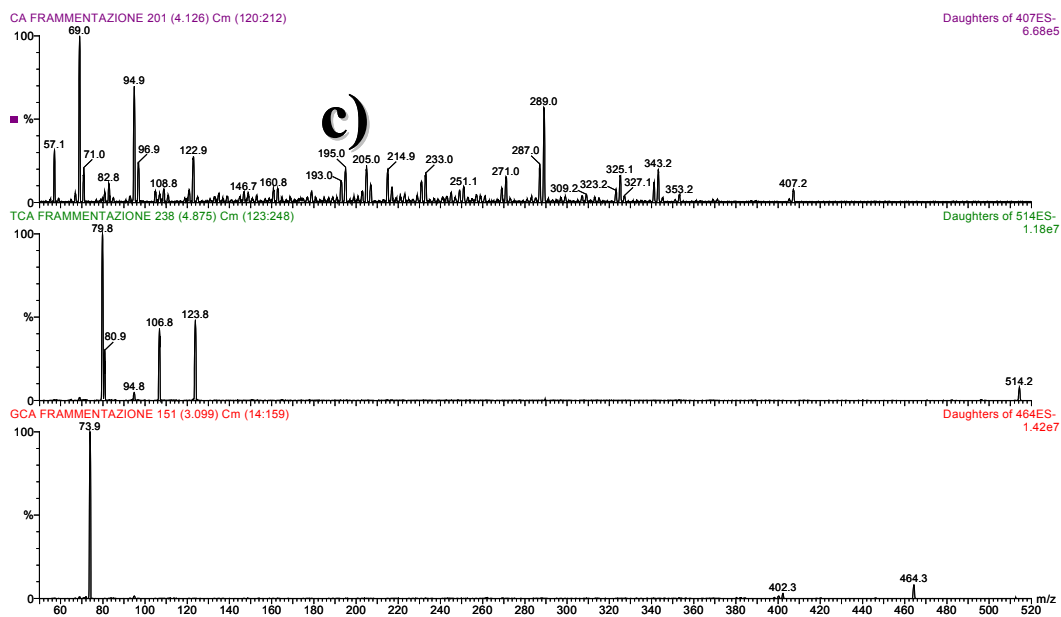
Tali ioni genitore e ioni frammento sono stati ottenuti mediante preventiva analisi per infusione diretta degli standard, che hanno permesso di ottenere i seguenti spettri MS/MS.



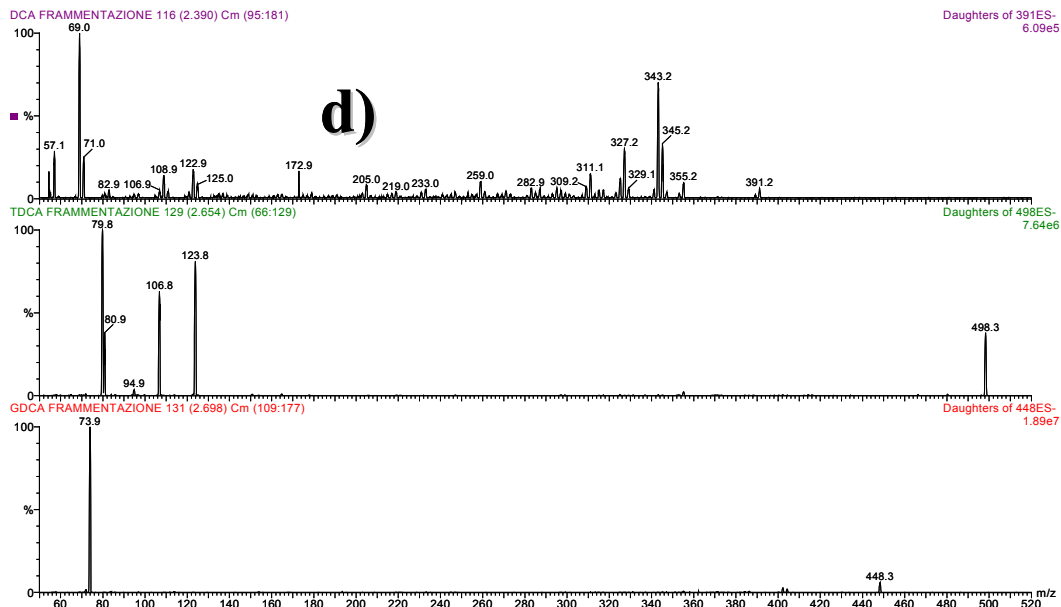
a) serie dell’acido ursodeossicolico e suoi tauro e glico coniugati;



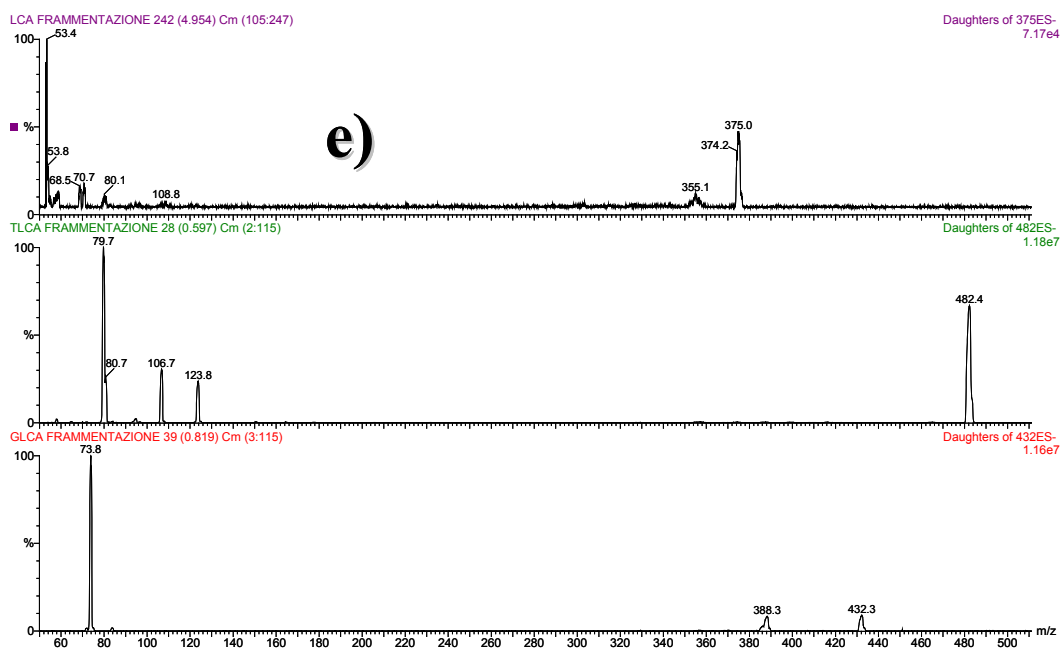
b) serie dell'acido chenodeossicolico e suoi tauro e glico coniugati;



c) serie dell'acido colico e suoi tauro e glico coniugati;



d) serie dell'acido deossicolico e suoi tauro e glico coniugati



e) serie dell'acido litocolico e suoi tauro e glico coniugati

Figura 5: Spettro di MS/MS (ESI-MS/MS) degli analiti, registrati nelle condizioni riportate in precedenza, usando il parent ion come ione precursore.

3.5 Analisi quantitativa

Le curve di calibrazione per ogni sono state ottenute analizzando serum free (libero da acidi biliari) fortificato con le soluzioni di lavoro (Working solution) degli standard.

Si sono ottenute curve di calibrazione lineari graficando l'area dell'analita Vs la concentrazione nominale dello stesso.

Si sono utilizzate rette di regressione lineare ai minimi quadrati.

La concentrazione dei campioni è stata ottenuta per interpolazione su tali curve.

4. RISULTATI

Il metodo HPLC-ESI-MS/MS messo a punto è in grado di separare e quantificare, in una singola analisi di 30 minuti, 15 acidi biliari di interesse.

4.1 Spettri di massa degli acidi biliari liberi, tauro e glicconiugati e analisi HPLC

Gli spettri di massa ottenuti mediante analisi MS/MS con infusione diretta degli standard riportati in precedenza hanno permesso di utilizzare lo ione molecolare deprotonato come “ione precursore” e a seguito della frammentazione è stato possibile monitorare anche uno ione frammento specifico per ogni analita considerato.

A seguito dell'analisi HPLC-ESI-MS/MS, si ottengono dei cromatogrammi come quello riportato in figura 6.

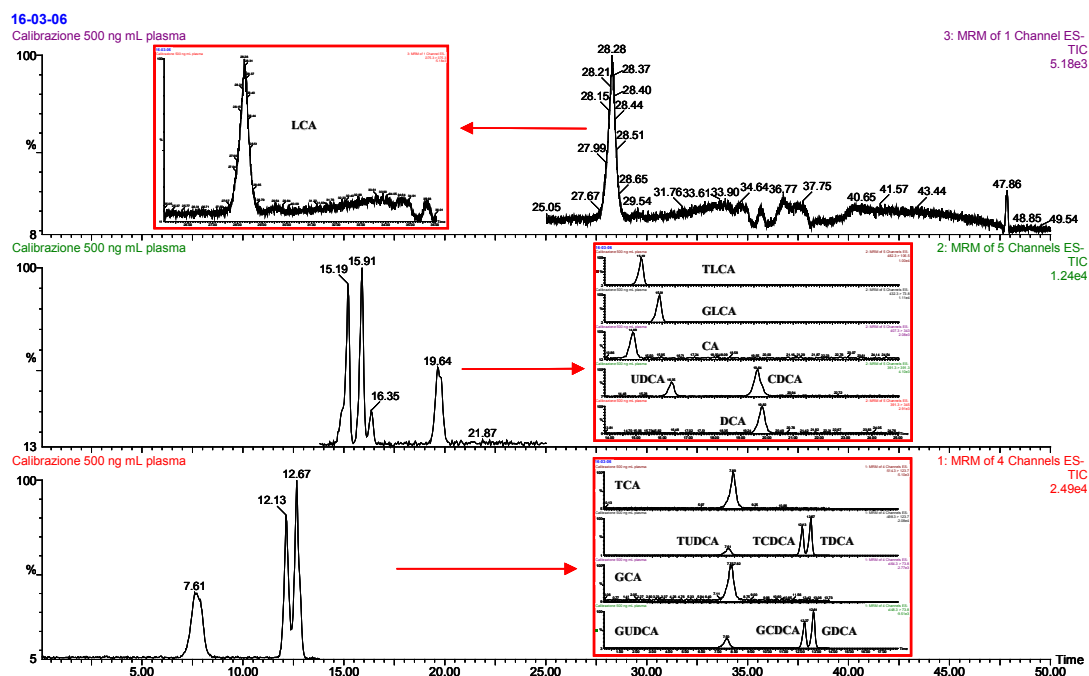


Figura 6: esempio di cromatogramma con indicati i tempi di ritenzione per i 15 analiti di interesse (analisi di una soluzione

standard in plasma a concentrazione 500 ng/mL); nei riquadri rossi sono riportati i singoli tracciati MRM usati per la quantificazione.

Non sono presenti altri segnali significanti, il che suggerisce che la modalità di acquisizione MRM può essere utilizzata con successo nella determinazione selettiva del pool di acidi biliari considerato.

Dalla separazione cromatografia si può inoltre risalire alle caratteristiche della molecola.

Questo risulta molto importante in quanto a seguito della sola analisi in MS/MS non sarebbe stato possibile distinguere i vari isomeri, visto che possiedono lo stesso peso molecolare e danno origine allo stesso pattern di frammentazione.

4.2 Curve di calibrazione

Le curve dose-risposta ottenute nello sviluppo di questo metodo sono lineari (coefficiente di determinazione pari a 0.993 o migliore) nel range di concentrazione investigato (0.01 – 20 µg/mL).

Nella seguente tabella sono riportati i valori di pendenza, intercetta e coefficiente di determinazione per le curve di calibrazione degli analiti considerati nel plasma.

Tabella 4: valori di pendenza, intercetta e coefficiente di correlazione lineare per i 15 analiti considerati (la concentrazione su asse ascisse è espressa in nM, in ordinata è l'area assoluta; N = 30).

| | pendenza | intercetta | coefficiente determinazione |
|--------------|-----------------|-------------------|--|
| TUDCA | 616 | -5.95 | 0.998 |
| TCDCA | 877 | 21.4 | 0.995 |
| TDCA | 1240 | 17.3 | 0.994 |
| GUDCA | 602 | 0.240 | 0.998 |
| GCDCA | 693 | -40.4 | 0.998 |
| GDCA | 937 | -53.2 | 0.998 |
| TCA | 715 | -45.7 | 0.998 |
| GCA | 641 | -11.7 | 0.999 |
| LCA | 1180 | -219 | 0.996 |
| CA | 150 | -11.4 | 0.999 |
| UDCA | 210 | -4.25 | 0.996 |
| CDCA | 213 | -36.7 | 0.998 |
| DCA | 207 | -21.5 | 0.996 |
| TLCA | 756 | -36.6 | 0.993 |
| GLCA | 1030 | -158 | 0.995 |

4.3 Precisione, accuratezza e Limite di Quantificazione

Si è determinata la precisione intra-batch analizzando campioni di controllo nell'arco di una giornata su 1 livello di concentrazione (1 µg/mL).

Si è inoltre determinata l'accuratezza del metodo attraverso il confronto dei valori misurati di concentrazione di acidi biliari con il valore nominale.

Il valore di C.V.(%) vicino al LOQ è di 1-2%, mentre al livello di concentrazione (1 µg/mL) è sotto al 5%.

Il recupero medio degli analiti è dell'80-96%.

Il limite di rivelazione (LOD) viene definito come il segnale del bianco sommato a 3 volte la sua deviazione standard, mentre per limite di quantificazione (LOQ) si intende il segnale del bianco sommato a 10 volte la sua deviazione standard.

In accordo con tali definizioni, i valori di LOD e LOQ sono stati calcolati e riportati nella tabella seguente.

Tabella 5: valori di LOD e LOQ per i 15 analiti

| | LOD nM | LOQ nM |
|--------------|-------------------|-------------------|
| TUDCA | 10 | 20 |
| TCDCA | 9 | 19 |
| TDCA | 8 | 15 |
| TCA | 12 | 22 |
| TLCA | 5 | 13 |
| | LOD nM | LOQ nM |
| GUDCA | 10 | 23 |
| GCDCA | 14 | 30 |
| GDCA | 22 | 32 |
| GCA | 10 | 22 |
| GLCA | 4 | 11 |
| | LOD nM | LOQ nM |
| UDCA | 20 | 38 |
| CDCA | 14 | 25 |
| DCA | 20 | 38 |
| CA | 22 | 51 |
| LCA | 4 | 11 |

5. DISCUSSIONE

Il metodo messo a punto risulta in grado di determinare la concentrazione di tutti gli analiti presi in considerazione in plasma.

In particolare l'effetto matrice viene minimizzato e compensato dalle curve di calibrazione esterne fatte in matrici bianche ("external matrix-matched standard calibration") e che porta a dati quantitativi corretti.

Per ogni analita visto, sono stati monitorati e utilizzati ai fini dell'analisi quantitativa non solo il tempo di ritenzione e lo ione molecolare, ma anche almeno uno ione frammento specifico.

Questo ha permesso di ottenere un rapporto segnale/rumore migliore e soprattutto ha permesso di avere la determinazione dei composti in accordo con le linee guida della Comunità Europea in fatto di sviluppo e validazione di metodi analitici in spettrometria di massa **[21 riguardante le performance di un metodo analitico e l'interpretazione dei risultati]** basati sull'uso dei punti identificativi (IPs).

In accordo con tale regolamentazione infatti, sono stati ottenuti almeno 3 punti identificativi per ogni analita per una identificazione positiva ed una corretta quantificazione del composto.

Utilizzando la spettrometria di massa a bassa risoluzione i punti identificativi possono essere ottenuti considerando 1 IP per lo ione precursore, 1.5 IP per ogni ione frammento, 1 IP per il tempo di ritenzione dell'analita.

Il metodo sviluppato risulta essere stabile e la precisione ed accuratezza al LOQ sono risultati essere inferiori al 2%.

6. CONCLUSIONI

L'identificazione degli analiti è stata ottenuta in accordo con la regolamentazione europea per la validazione di metodi.

L'approccio utilizzato permette di compensare e minimizzare l'effetto matrice grazie all'utilizzo della calibrazione esterna in matrice ("external matrix-matched standard calibration").

I valori di LOQ ottenuti permettono di ottenere dati quantitativi sul pool di acidi biliari, che come esposto all'inizio serve ad identificare le varie patologie dell'apparato gastrointestinale e soprattutto possono essere utilizzati per valutare l'effettiva efficacia di un trattamento terapeutico.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Lillienau J, Hagey LR, Borgstrom B.: Hepatic and ileal transport and effect on biliary secretion of norursocholic acid and its conjugates in rats. *Am J Physiol.* 1991;261

[2] Sturman JA, Gaull GE.: Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. *J Neurochem.* 1975; 25(6): 831-5.

[3] Hardison WG.: Hepatic taurine concentration and dietary taurine as regulators of bile acid conjugation with taurine. *Gastroenterology.* 1978; 75(1): 71-5.

[4] Hofmann A.F., Roda A.: Physicochemical properties of bile acid and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J Lipid Res.*, 1984, 25, 1477.

[5] Haslewood G.A.D.: The biological utility of bile salts. North Holland Publishing Co., Amsterdam. 1978

[6] Crestani M., De Fagiani E., Galli G.: Controllo molecolare della sintesi degli acidi biliari. Roda A. Roda E., Hofmann A. (eds.). In: *Acidi Biliari 2000: aggiornamento per il futuro.* 1999, Sanofi-Synthelabo, Milano.

[7] Hofman A.F.: The secretion of bile: an overview. In: *Handbook of Physiology, Section on the Gastrointestinal System*, Schultz S.G. e Forte J.G. (eds.), the American Physiological Society, 1988.

[8] Hofman A.F.: Enterohepatic circulation of bile acids. In: *Handbook of Physiology, Section on the Gastrointestinal System*, Schultz S.G. e Forte J.G. (eds.), the American Physiological Society, 1988, 567.

- [9] Vlahchevich Z.R., Heumann D.M., Hileman P.B. Physiology and pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. In *Hepatology*, Zakim D.Z., Boyer J.L., (eds.), Saunders WB, Philadelphia, 1990, 341.
- [10] Russell D.W., Setchell K.D.R.: bile acids biosynthesis. *Biochemistry*, 1992, 31, 4737.
- [11] Anderson K.E., Kok E., Javitt N.B.: bile acids synthesis in man: metabolism of 7α -hydroxycholesterol- ^{14}C and 26 -hydroxycholesterol- ^3H . *J. Clin. Invest.* 1972, 51, 112.
- [12] Sauter G., Fischer S., Pahernik S., Koebe H.G., Paumgartner G.: formation of cholic acid and chenodeoxycholic acid from 7α -hydroxycholesterol and 27 -hydroxycholesterol by primary cultures of human hepatocytes. *Biochim Biophys. Acta.* 1996, 1300, 25.
- [13] Sauter G., Berr F., Beuers U., Fischer S., Paumgartner G.: Serum concentration of 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one reflect bile acid synthesis in humans. *Hepatology*, 1996, 24 (1), 123.
- [14] Petterson L., Eriksson C.G.: reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum. *J. Chromatogr. B*, 1994, 657, 31.
- [15] Axelson M., Björkhem I., Reinher E., Einarsson K.: the plasma level of 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one reflects the activity of hepatic cholesterol hydroxylase in man. *Febs Lett.*, 1991, 284, 216.
- [16] Yoshida T., Honda A., Tanaka N., Matsuzaki Y., Shoda J., He B., Osuga T., Miyazaki H.: determination of 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one level in plasma using isotope-dilution mass spectrometry and

monitoring its circadian rhythm in human as an index of bile acid biosynthesis. *J. Chromatogr. B*, 1994, 655, 179.

[17] Hofmann A.F., Poley J.R.: role of bile acids malabsorption in pathogenesis of diarrhea and steatorrhea in patients with ileal resection. *Gastroenterology*. 62, 918, 1972.

[18] Aldini R., Roda A., Festi D., Gazzella G., Morselli A.M., Sama C., Roda E., Scopinaro N., Barbara L.: diagnostic value of serum primary bile acids in detecting bile acid malabsorption. *Gut*., 1982, 23, 829.

[19] Roda A., Gioacchini A.M., Cerre C., Baraldini M., High Performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of bile acids in biological fluids. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1995; 665(2), 281.

[20] D.L. n. 120 del 27.1.1992 G.U. n.40, 18-2-1992; ISSN 0021-2571 33(1), 1-175; Boyd R.K et al. Mass Spectrometry and Good Laboratory Practice. *J. Am. Mass Spectrom.* 7:211-218 (1996)

[21] Official Journal of the European Communities, 12.08.2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August, implementing Council Directive 96/23/EC

CAPITOLO II

**SVILUPPO E MESSA A PUNTO DI UN
METODO HPLC-MS/MS CON IMPATTO
ELETTROSPRAY PER LA DETERMINAZIONE
DI IMPUREZZE E METABOLITI *IN VIVO* DI
UN NUOVO FARMACO: L'ACIDO
 6α ETIL- $3\alpha,7\alpha$ DIIDROSSI- 5β COLANICO**

1. INTRODUZIONE

Gli acidi biliari sono i prodotti finali del metabolismo del colesterolo e giocano un ruolo importante nel controllo omeostatico di tale molecola.

Questa funzione viene svolta attraverso una precisa regolazione dell'apporto di colesterolo attraverso la dieta, la biosintesi a livello endogeno e l'eliminazione del colesterolo attraverso la produzione di acidi biliari [1].

Questa via metabolica risulta essere regolata da recettori nucleari, in particolare dal recettore FXR [3].

All'interno di questo processo regolatorio svolge un'importante funzione un acido biliare naturale, l'acido chenodeossicolico [5, 10, 11, 12 a, 12 b, 12 c].

L'FXR rappresenta un regolatore a feed-back della sintesi epatica degli acidi biliari dal colesterolo e questo processo passa attraverso la repressione dell'attività del gene CYP450 [4] che decodifica la colesterolo 7 α -idrossilasi e che rappresenta lo step limitante di tutta la biosintesi, coniugazione e trasporto degli acidi biliari [5-9].

Il recettore FXR regola l'espressione di diversi geni presenti nel processo metabolico delle lipoproteine ed è inoltre un modulatore positivo dei geni delle PLTP (PhosphoLipids Transfer Protein) [17-18] e regolatore negativo per il gene apoA-I [19].

Tale recettore risulta essere presente nel fegato, reni, colon, intestino e nella corteccia surrenale [2, 13].

Recentemente si è osservato che gli acidi biliari rappresentano una classe di ligandi per l'FXR e che soprattutto l'acido chenodeossicolico (CDCA) rappresenta un potente attivatore di tale recettore [12 a-12 c, 9].

Recentemente si è trovato che l'analogo 6 α -alchil- sostituito dell'acido chenodeossicolico, l'acido 6 α -etil-chenodeossicolico, rappresenta un potente steroide agonista per l'FXR e produce

importanti effetti protettivi in caso di colestasi e fibrosi del fegato [14-16].

1.1 Acido 6 α etil-3 α , 7 α -diidrossi, 5 β colanico (6ECDCA)

La molecola oggetto dello studio è un nuovo analogo sintetico dell'acido 3 α ,7 α -diidrossi,5 β colanico (acido chenodesossicolico CDCA), l'acido 6 α etil-3 α ,7 α -diidrossi,5 β colanico (6ECDCA) che studi preliminari di binding con il recettore FXR hanno dimostrato possedere attività antagonista nei confronti del CDCA. Tale molecola è in grado di legarsi selettivamente a tale recettore e modulare processi di regolazione del metabolismo del colesterolo [15].

Non è tuttavia ancora nota la sua attività nelle diverse patologie epatobiliari (quali la colestasi), la sua farmacocinetica e le principali biotrasformazioni cui va incontro dopo somministrazione all'animale da esperimento.

Il 6ECDCA è stato ottenuto per sintesi dal Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco di Perugia e potrebbe contenere i seguenti intermedi o impurezze:

- Acido chenodesossicolico o altri acidi biliari quali il 3 α ,7 β -diidrossi,5 β colanico (UDCA)
- Acido 6 α etil-ursodeossicolico (7 β epimero dell'acido 6-etil-chenodeossicolico) o altri epimeri quali:
 - 6 β etil-3 α ,7 β -diidrossi,5 β colanico (6 β etil UDCA)
 - 6 β etil-3 α ,7 α -diidrossi,5 β colanico (6 β etil CDCA)
- Intermedi parzialmente ossidati quali acido 7keto-3 α -idrossi,5 β colanico; acido 6 etil-7keto-3 α -idrossi,5 β colanico

- Eventuale materiale derivante dalle fasi di purificazione e sali inorganici

Per quanto riguarda il metabolismo esso potrebbe andare incontro ai seguenti processi:

- ossidazione del gruppo -OH presente sul carbonio in posizione 7
- rimozione dell'ossidrilico in posizione 7
- riarrangiamenti per processi ossido-riduttivi con formazione di epimeri: quali 6 α etil-3 α ,7 β -diidrossi, 5 β colanico (6 α etil UDCA), 6 β etil-3 α ,7 β -diidrossi, 5 β colanico (6 β etil UDCA) e 6 β etil -3 α ,7 α -diidrossi, 5 β colanico (6 β etil CDCA).

Tali epimeri hanno lo stesso peso molecolare ma presentano una diversa lipofilia, che ne può permettere la separazione su colonna cromatografica C18 a fase inversa e la loro ionizzazione e frammentazione nello spettrometro di massa. Anche nel caso di analisi in frammentazione, è tuttavia necessaria una potente tecnica separativa a monte, perché acidi biliari a stesso peso molecolare (epimeri) tendono a formare gli stessi ioni frammento.

Un secondo metabolismo riguarda la catena laterale con formazione di tauro e glico coniugati o derivati di processi di β -ossidazione.

Le molecole di interesse sono riportate nella figura 1.

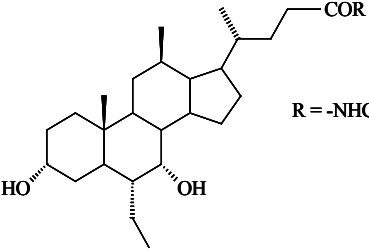
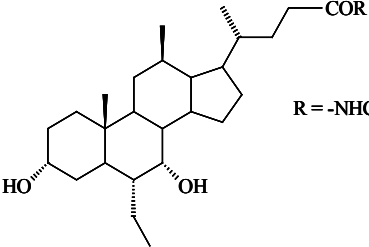
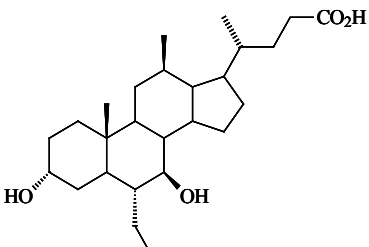
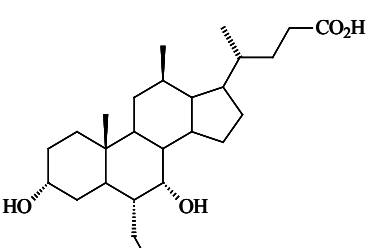
| STRUTTURA | ABBREV. |
|--|----------|
|  <p data-bbox="619 383 911 412">R = $-\text{NHC}_2\text{H}_4\text{SO}_3^-$ tauro-conjugate</p> | 6-ETCDCA |
|  <p data-bbox="619 685 911 714">R = $-\text{NHCH}_2\text{CO}_2^-$ glyco-conjugate</p> | 6-EGCDCA |
|  | 6-EUDCA |
|  | 6-ECDCA |

Figura 1: rappresentazione della struttura del 6ECDCA e dei suoi principali metaboliti.

2. SCOPO

Vista l'elevata importanza che giocano gli acidi biliari nelle varie patologie dell'apparato gastro-intestinale e soprattutto visto il sempre crescente interesse nei confronti di molecole in grado di agire sul metabolismo del colesterolo, si è studiata una "nuova entità chimica" (NCE) che agisce sul recettore FXR modulandone l'attività.

La molecola oggetto dello studio è un nuovo analogo sintetico dell'acido $3\alpha,7\alpha$ -diidrossi, 5β colanico (acido chenodesossicolico CDCA), l'acido 6α etil- $3\alpha,7\alpha$ -diidrossi, 5β colanico (6ECDCA) che studi preliminari di binding con il recettore FXR hanno dimostrato possedere attività antagonista nei confronti del [15].

Tale legame implica una inibizione sul gene che codifica per l'enzima Cyp7a1, che rappresenta il primo step della via classica del metabolismo del colesterolo.

Tale reazione rappresenta inoltre il "rate limiting step" di tutto il processo metabolico che avviene secondo la via classica (o neutra) e che porta alla formazione finale di acidi biliari primari come l'acido colico e l'acido chenodeossicolico.

Non è tuttavia ancora nota la sua attività nelle diverse patologie epatobiliari, la sua farmacocinetica e le principali biotrasformazioni cui va incontro dopo somministrazione.

Lo scopo del lavoro è stato quindi rivolto allo studio di questa molecola di sintesi, sia per la valutazione della sua purezza che per l'identificazione dei potenziali metaboliti.

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiali e reagenti

L'acido 6 α etil-3 α ,7 α -diidrossi,5 β colanico (6ECDCA) e l'acido 6 α etil-3 α ,7 β -diidrossi,5 β colanico (6EUDCA) e i rispettivi tauro e glicconiugati sono stati sintetizzati nel laboratorio del Prof. Roberto Pellicciari, dell'Università di Perugia.

Lo standard interno utilizzato, l'acido chenodeossicolico marcato con carbonio 13 in posizione 24 è stato ottenuto dalla CIL (Andover, MA, USA).

Acetonitrile, metanolo, alcol isopropilico (HPLC grade, LiChrosolv®) essendo di grado analitico sono stati utilizzati senza altri passaggi di purificazione.

La β -glucuronidasi da *Helix Pomata* (tipo HP-2, in soluzione acquosa) con attività specifica di 10⁵ unità/mL è stata ottenuta da Sigma (Milano).

Le colonnine per SPE Isolute C18 sono state ottenute dalla International Sorbent Technology LTD. (Hengoed, UK).

3.2 Calibrazione degli standard e controllo di qualità dei campioni

Le soluzioni madre degli acidi biliari (2.5 mg/mL) e dello standard interno (400 μ g/mL) sono state preparate in metanolo e conservate ad una temperatura di -20°C fino al loro utilizzo.

Le diluizioni di ogni analita, come anche dello standard interno (fino a una concentrazione finale di 200 ng/mL) sono state preparate attraverso diluizione delle rispettive soluzioni madre con metanolo.

Sia per la preparazione degli standard per la curva di calibrazione che per la preparazione dei quality control (QC, relativi ad ogni matrice analizzata) sono stati utilizzati campioni provenienti dal gruppo di controllo (bianco).

3.3 Preparazione dei campione

3.3.1 Siero

I campioni di siero sono stati diluiti e posti per 30' con NaOH 0.1N (in rapporto 1:6, v:v) in bagno ad acqua termostata a 64°C. Al termine il tutto è stato fatto passare attraverso una colonna per SPE C18 precedentemente condizionata con 5 mL di metanolo e 5 mL di acqua bi-distillata (MilliQ).

Il campione è stato fatto fluire e successivamente lavato con 10 mL di acqua MilliQ.

Dopo lo step di lavaggio, si sono eluiti gli analiti e lo standard interno mediante 5 mL di metanolo.

Tale eluato è stato poi portato a secco e ripreso con una uguale quantità del campione iniziale di fase mobile (70:30, v/v, tampone ammonio acetato, 15 mM, pH 5/acetonitrile) e iniettato per l'analisi HPLC-ESI-MS/MS.

3.3.2 Tessuto epatico, tessuto intestinale e del colon, tessuto renale

Ogni campione di tessuto viene omogenato con un mixer. Da tale preparato viene prelevato 1 mg totale da differenti punti e miscelato con 2 mL di tampone fosfato (0.005 M, pH 7.2).

La miscela viene ulteriormente omogenata e il recipiente lavato con 3 mL di metanolo.

Il tutto viene poi sonicato e vortexato per 5 minuti, scaldato a 37°C per 20 minuti e centrifugato a 4000 rpm per 15 minuti.

1 mL del surnatante (su 5 mL totali) viene prelevato, portato a secco e successivamente vi si aggiungono 2 mL di NaOH 0.1N.

La soluzione viene sonicata per 10 minuti, scaldata per 30 minuti a 64°C e sottoposta ad estrazione su cartuccia SPE come descritto anche per i campioni di siero.

Una volta portato a secco l'eluato, lo si riprende con 200 μ L di una miscela metanolo/tampone ammonio acetato 1:1 (v/v) e iniettato per l'analisi HPLC-ESI-MS/MS.

3.3.3 Contenuto del colon e dell'intestino

Ogni campione di contenuto viene omogenato con un mixer. Da tale preparato viene prelevato 1 mg totale da differenti punti e miscelato con 2 mL di tampone fosfato (0.005 M, pH 7.2).

La miscela viene ulteriormente omogenata e il recipiente lavato con 3 mL di metanolo.

Il tutto viene poi sonicato e vortexato per 5 minuti, scaldato a 37°C per 20 minuti e centrifugato a 4000 rpm per 15 minuti.

1 mL del surnatante (su 5 mL totali) viene prelevato, portato a secco e successivamente vi si aggiungono 2 mL di NaOH 0.1N.

La soluzione viene sonicata per 10 minuti, scaldata per 30 minuti a 64°C e sottoposta ad estrazione su cartuccia SPE come descritto anche per i campioni di siero.

Una volta portato a secco l'eluato, lo si riprende con 200 μ L di una miscela metanolo/tampone ammonio acetato 1:1 (v/v) e iniettato per l'analisi HPLC-ESI-MS/MS.

3.3.4 Feci

Ogni campione viene omogenato e di questo se ne prelevano complessivamente 2 grammi (da punti diversi).

Ad ogni aliquota vengono aggiunti 6 mL di alcol isopropilico e la miscela viene vortexata e centrifugata a 4000 rpm per 10 minuti.

Il surnatante (10 μ L di estratto) viene diluito 1:100 (v/v) con una miscela acetonitrile/tampone ammonio acetato 30:70 (v/v) per la determinazione del 6ECDCA e 1:10 per la determinazione del 6ETCDCA, 6EGCDCA e del 6EUDCA e iniettato per l'analisi HPLC-ESI-MS/MS.

3.3.5 Urine

A 500 µL di campione vengono addizionati 4.5 mL di tampone ammonio acetato (0.02 M, pH 5) e 20 µL di una soluzione di β-glucuronidasi (attività enzimatica > 10⁵) ottenuta per diluizione 1:10 (v/v) del prodotto commerciale con una soluzione di NaCl allo 0.2%.

Dopo 16 ore di incubazione a 37°C, a 2 mL del campione vengono aggiunti 3 mL di NaOH 0.1N e il tutto viene sottoposto ad estrazione su SPE C18 come riportato in precedenza.

Una volta portato a secco l'eluato, lo si riprende con 200 µL di una miscela metanolo/tampone ammonio acetato 1:1 (v/v) e iniettato per l'analisi HPLC-ESI-MS/MS.

Alcuni campioni di urina sono stati analizzati senza aver fatto la reazione di idrolisi enzimatica.

Questi sono stati diluiti 1:6 (v/v) con NaOH 0.1N, scaldati a 64°C per 30 minuti, estratti con colonne per SPE e analizzati (come descritto in precedenza).

3.4 Analisi HPLC–ESI–MS/MS

La separazione cromatografia viene effettuata mediante un sistema HPLC Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) dotato di autocampionatore e di sistema per la termostatazione della colonna cromatografia.

La colonna cromatografica Phenomenex Sinergy Hydro-RP, C18, 150 x 2.1 mm, 4 µm viene protetta con una pre-colonna di guardia C18 (ODS, 4 mm L x 2.0 mm ID) ed il tutto è termostatato a 45°C.

Il volume di iniezione di ogni campione è di 3 µL e la separazione cromatografia viene effettuata mediante una analisi in gradiente con 2 solventi: tampone ammonio acetato 15 mM pH 5 (solvente A) e acetonitrile (solvente B) e con una velocità di flusso di 0.15 mL/minuto.

L'analisi prevede il seguente gradiente: 0 minuti, 70% A; 0-12 minuti, decremento lineare da 70 a 36% di A; 12-20 minuti, decremento lineare da 36 a 30% di A; 20-30 minuti, decremento lineare da 30 a 0% di A; 30-31 minuti, isocratica allo 0% di A; 31-50 minuti, ripristino delle condizioni iniziali di analisi (70% di A).

Il sistema HPLC è interfacciato direttamente con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo mediante sorgente ESI.

L'analisi è effettuata con ionizzazione negativa e con un settaggio dei parametri strumentali ottenuto mediante infusione diretta di soluzioni standard in metanolo.

I parametri strumentali possono essere così riassunti:

- velocità di flusso del gas di nebulizzazione: 119 l/h
- velocità di flusso del gas di desolvatazione: 926 l/h
- temperatura di desolvatazione: 180°C
- temperatura della sorgente: 80 °C
- voltaggio del capillare: 3.0 kV
- voltaggio del cono: 70V
- gas di collisione: argon;

L'analisi quantitativa viene effettuata mediante analisi in modalità MRM monitorando lo ione genitore e gli ioni frammento indicati nella figura 2.

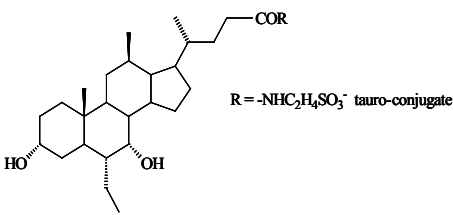
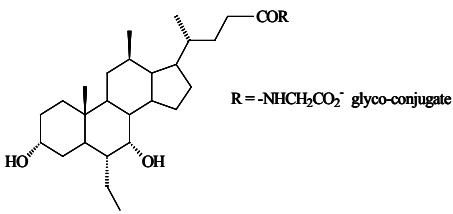
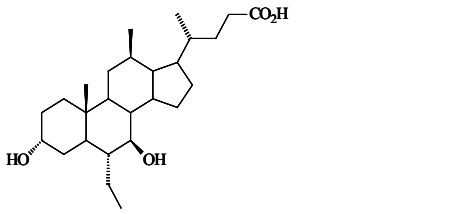
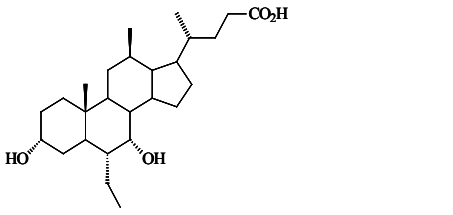
| STRUTTURA | ABBREVIAZIONE | TRANSIZIONE |
|--|---------------|-------------------------|
|  <p>R = -NHC₂H₄SO₃⁻ tauro-conjugate</p> | 6-ETCDCA | 526 > 123 and 526 > 106 |
|  <p>R = -NHCH₂CO₂⁻ glyco-conjugate</p> | 6-EGCDCA | 476 > 73 |
|  | 6-EUDCA | 419 > 419 |
|  | 6-ECDCA | 419 > 419 and 419 > 401 |

Figura 2: struttura molecolare, abbreviazione e transizioni “parent ion -> daughter ion” utilizzate per l’analisi HPLC-ESI-MS/MS

Tali ioni genitore e ioni frammento sono stati ottenuti mediante preventiva analisi per infusione diretta degli standard, che hanno permesso di ottenere i seguenti spettri MS/MS.

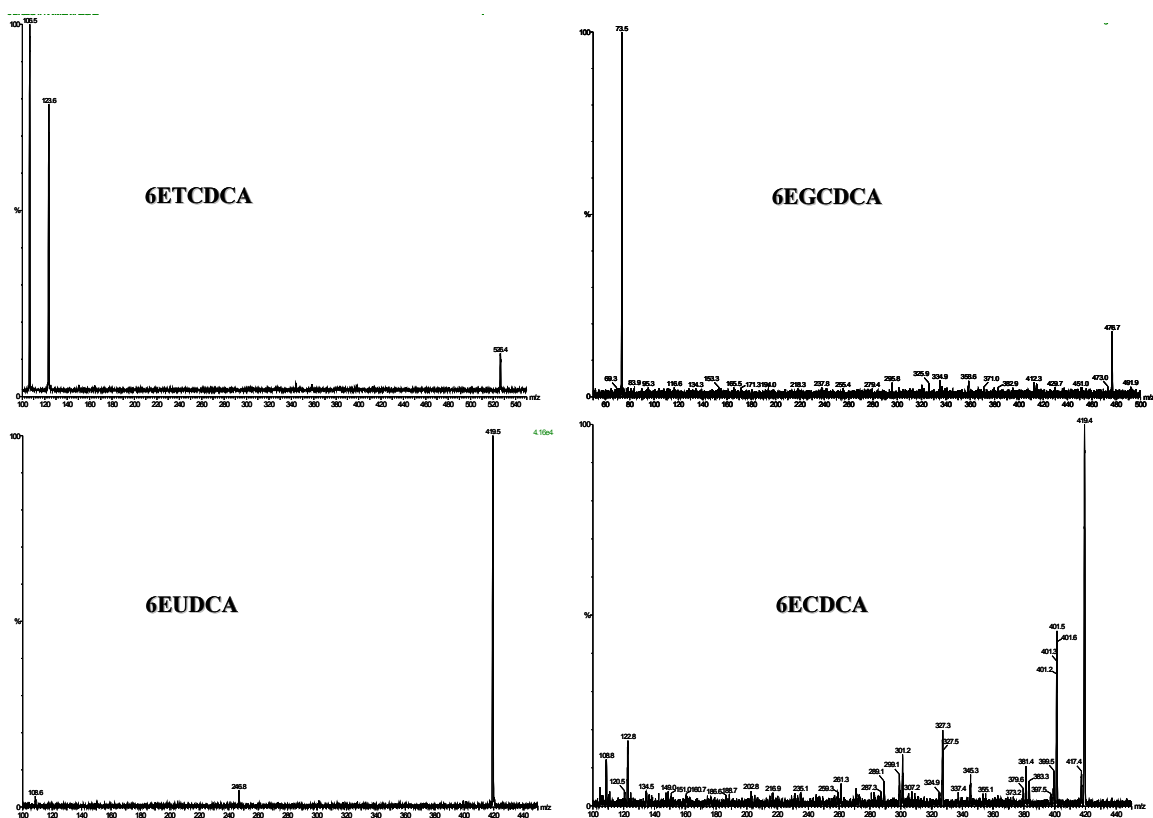


Figure 3: Spettro di MS/MS (ESI-MS/MS) degli analiti, registrati nelle condizioni riportate in precedenza, usando il parent ion come ione precursore

3.5 Analisi quantitativa

Le curve di calibrazione per ogni analita in ciascuna matrice analizzata sono state ottenute analizzando campioni di controllo fortificati.

Si sono ottenute curve di calibrazione lineari graficando il rapporto area analita/area standard interno Vs la concentrazione nominale di analita.

Si sono utilizzate rette di regressione lineare ai minimi quadrati.

La concentrazione dei campioni incogniti è stata ottenuta per interpolazione su tali curve.

3.6 Farmacocinetica e metabolismo del 6ECDCA nel ratto

Lo studio di farmacocinetica include anche la valutazione della biodistribuzione del 6ECDCA, del suo epimero 6EUDCA e dei rispettivi glico e tauro coniugati nelle varie matrici analizzate.

Il protocollo prevede l'utilizzo di 32 ratti Sprague Dawley (età 8 settimane e dal peso di 245-255 grammi) ai quali viene somministrata un'unica dose di 6ECDCA pari a 30 mg/Kg dissolti in carbossimetilcellulosa all'1% in acqua.

Questi ratti vengono posti in quarantena 2 settimane prima della somministrazione del farmaco in ambiente con temperatura controllata tra 18 e 20°C, umidità $55 \pm 4\%$ e cicli buio/luce di 12h/12h.

Ogni ratto, dopo somministrazione del farmaco, è stato randomizzato.

Dopo sacrificio dell'animale, i vari campioni di tessuto sono stati conservati a -80°C, mentre i campioni di siero, urine e feci sono stati conservati a -20°C fino all'analisi HPLC-ESI-MS/MS.

4. RISULTATI

Il metodo HPLC-ESI-MS/MS messo a punto è in grado di separare e quantificare, in una singola analisi di 30 minuti, il 6ECDCA e i suoi principali metaboliti ed epimeri nelle varie matrici prese in considerazione.

4.1 Spettri di massa del 6ECDCA e dei suoi metaboliti e analisi HPLC

Gli spettri di massa ottenuti mediante analisi MS/MS con infusione diretta degli standard riportati in precedenza hanno permesso di utilizzare lo ione molecolare deprotonato come “ione precursore” e a seguito della frammentazione è stato possibile monitorare anche uno ione frammento specifico per ogni analita preso in considerazione.

A seguito dell'analisi HPLC-ESI-MS/MS, si ottengono dei cromatogrammi come quello riportato in figura 4.

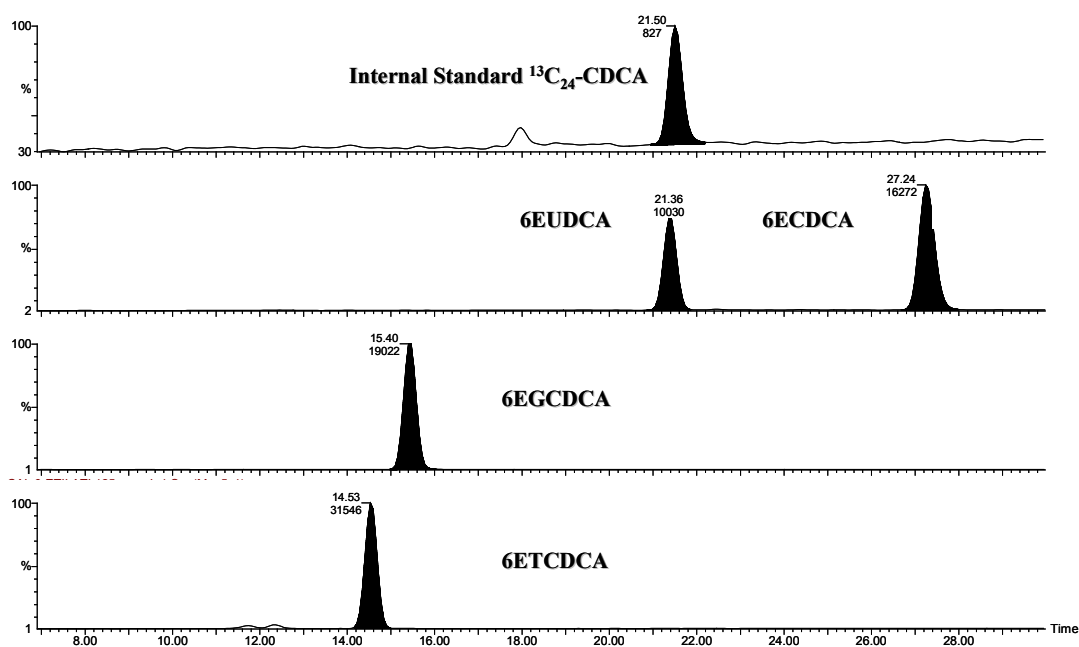


Figura 4: esempio di cromatogramma con indicati i tempi di ritenzione per i 4 analiti di interesse (analisi di una soluzione standard a concentrazione 125 ng/mL).

Non sono presenti altri segnali significanti, il che suggerisce che la modalità di acquisizione MRM può essere utilizzata con successo nella determinazione selettiva del 6ECDCA, dei suoi metaboliti tauro e glico coniugati e del suo epimero (6EUDCA) in tutti i campioni considerati.

Dalla separazione cromatografia si può inoltre risalire alle caratteristiche della molecola.

La lipofilicità e la differente forza dell'interazione tra analita e fase stazionaria hanno portato ad avere per il 6ECDCA un tempo di ritenzione pari a 27.27 minuti, mentre per il 6EUDCA (epimero) di 21.36 minuti.

Questo risulta molto importante in quanto a seguito della sola analisi in MS/MS non sarebbe stato possibile distinguere i due isomeri, visto che possiedono lo stesso peso molecolare e danno origine allo stesso pattern di frammentazione.

In aggiunta, nonostante lo standard interno abbia lo stesso tempo di ritenzione del 6EUDCA, è possibile quantificarlo separatamente in quanto prevede una diversa transizione ione genitore -> ione frammento, senza quindi avere alcun genere di interferenza.

4.2 Curve di calibrazione

Le curve dose-risposta ottenute nello sviluppo di questo metodo sono lineari (coefficiente di correlazione lineare pari a 0.9888 o migliore) nel range di concentrazione investigato (0.02 – 100 µg/mL).

Nella seguente tabella sono riportati i valori di pendenza, intercetta e coefficiente di correlazione lineare per le curve di calibrazione degli analiti presi in considerazione e per tutte le matrici analizzate, oltre ai valori di LOQ (in ng/mL) dei singoli analiti.

Tabella 1: pendenza (a), intercetta (b), coefficiente di determinazione, valore di LOQ (ng/mL) e numero di punti sperimentali (N) per gli analiti nelle varie matrici prese in esame.

| | 6-ETCDCA | | | LOQ | 6-EGCDCA | | | LOQ | N |
|--------------------------------|----------|--------|-------------|-------|----------|--------|-------------|-------|----|
| | a | b | Coeff. Det. | ng/mL | a | b | Coeff. Det. | ng/mL | |
| Plasma | 0.0015 | -0.26 | 0.999 | 45 | 0.0020 | -0.24 | 0.999 | 41 | 16 |
| Liver | 0.0014 | 0.44 | 0.992 | 63 | 0.0019 | 0.75 | 0.992 | 35 | 16 |
| Feces | 0.0013 | 0.19 | 0.989 | 120 | 0.0017 | -0.17 | 0.994 | 55 | 21 |
| small intestine content | 0.0015 | -0.06 | 0.996 | 70 | 0.0019 | -0.19 | 0.999 | 7 | 18 |
| colon content | 0.0012 | 0.15 | 0.9999 | 46 | 0.0018 | 0.077 | 0.996 | 14 | 18 |
| Urine | 0.0021 | -0.24 | 0.991 | 1 | 0.0028 | 0.37 | 0.999 | 0.1 | 18 |
| Kidney | 0.0013 | 0.48 | 0.995 | 53 | 0.0016 | 0.083 | 0.993 | 86 | 6 |
| small intestine tissue | 0.0015 | -0.06 | 0.996 | 70 | 0.0019 | -0.19 | 0.999 | 7 | 18 |
| colon tissue | 0.0012 | 0.15 | 0.9999 | 46 | 0.0018 | 0.077 | 0.996 | 14 | 18 |
| | 6-EUDCA | | | LOQ | 6-ECDCA | | | LOQ | N |
| | a | b | Coeff. Det. | ng/mL | a | b | Coeff. Det. | ng/mL | |
| Plasma | 0.0011 | -0.066 | 0.998 | 31 | 0.0012 | -0.32 | 0.998 | 18 | 16 |
| Liver | 0.0010 | -0.26 | 0.996 | 39 | 0.0011 | 0.17 | 0.994 | 40 | 16 |
| Feces | 0.0012 | 0.026 | 0.991 | 71 | 0.0013 | -0.026 | 0.991 | 110 | 21 |
| small intestine content | 0.0013 | -0.019 | 0.997 | 2 | 0.0014 | -0.044 | 0.997 | 6 | 18 |
| colon content | 0.0010 | 0.034 | 0.998 | 6 | 0.0012 | 0.047 | 0.999 | 57 | 18 |
| Urine | 0.0019 | 0.38 | 0.998 | 1 | 0.0018 | 0.11 | 0.998 | 0.1 | 18 |
| Kidney | 0.0012 | 0.066 | 0.997 | 16 | 0.0013 | 0.084 | 0.997 | 32 | 6 |
| small intestine tissue | 0.0013 | -0.019 | 0.997 | 2 | 0.0014 | -0.044 | 0.997 | 6 | 18 |
| colon tissue | 0.0010 | 0.034 | 0.998 | 6 | 0.0012 | 0.047 | 0.999 | 57 | 18 |

Nelle varie matrici studiate sono stati rilevati diversi valori di pendenza, che riflettono la presenza di un effetto matrice che sopprime sia il segnale dell'analita che dello standard interno.

Questo fenomeno deriva dalla competizione tra elementi presenti nella matrice e gli ioni di analita formati durante il processo di ionizzazione [24-28].

In questi casi, generalmente, si tende ad utilizzare il metodo delle aggiunte standard per ottenere una quantificazione precisa ed accurata e che elimina gli effetti matrice.

In realtà quando il numero di campioni risulta essere elevato, una alternativa valida e percorribile per ottenere una quantificazione

corretta risulta essere il metodo della calibrazione esterna in matrice (“external matrix-matched standard calibration”) [24].

Con questo metodo è possibile compensare tale effetto [24, 25].

4.3 Precisione, accuratezza e Limite di Quantificazione

Si è determinata la precisione intra-batch analizzando 6 campioni di controllo nell’arco di una giornata su 3 livelli di concentrazione (0.05, 0.5, 1 µg/mL).

Si è inoltre determinata l’accuratezza del metodo attraverso il confronto dei valori misurati di concentrazione di acidi biliari con il valore nominale.

Il valore di C.V.(%) vicino al LOQ è di 11%, mentre ai 3 livelli di concentrazione (0.05, 0.5, 1 µg/mL) è sotto all’8.4%.

Il recupero medio degli analiti è dell’80-96%.

Il limite di rivelazione (LOD) viene definito come il segnale del bianco sommato a 3 volte la sua deviazione standard, mentre per limite di quantificazione (LOQ) si intende il segnale del bianco sommato a 10 volte la sua deviazione standard.

In accordo con tali definizioni, i valori di LOQ sono stati calcolati e riportati nella tabella precedente (tab. 1).

4.4 Farmacocinetica e metabolismo del 6ECDCA

I risultati ottenuti mostrano che il 6ECDCA viene assorbito e ben conservato dall’organismo nella circolazione enteroepatica.

Il metabolita principale, come aspettato, risulta essere il tauro-coniugato e in minor quantità il glico-coniugato.

La coniugazione è necessaria per la secrezione di questi composti nella bile e conseguentemente il 6ECDCA è presente nel fegato nella forma coniugata.

Il gruppo etile presente in posizione 6 riduce la cinetica della reazione di 7-deidrossilazione e riduce la formazione di acidi biliari altamente lipofili e tossici come l'acido litocolico (o acido 6 etil litocolico).

Tali metaboliti sono presenti e sono stati rilevati, ma sono in quantità molto bassa e rappresentano una via metabolica che non viene seguita dal 6ECDCA.

Questi risultati suggeriscono che il gruppo etile in posizione 6 è stabile e non viene degradato o rimosso dai batteri intestinali.

Come conseguenza una percentuale di 6ECDCA è presente nella forma originaria nel contenuto del colon e nelle escrezioni fecali.

Il ridotto metabolismo e le proprietà chimico-fisiche in termini di solubilità e lipoficità portano ad una buona conservazione e biodisponibilità del 6ECDCA.

Alle 24 ore dopo la somministrazione del farmaco è stato inoltre possibile recuperare circa il 96% della dose totale somministrata, attraverso l'analisi delle varie matrici, come riportato nella seguente tabella.

Tabella 2: sommario dei risultati ottenuti (in nmoli rilevate) a seguito dell'analisi delle varie matrici; dato che gli standard per 6EGUDCA e 6ETUDCA non erano disponibili, i valori di concentrazione alle 24 ore sono stati calcolati sulle curve del 6EGCDCA e del 6ETCDCA rispettivamente.

| | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
|----------|------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| PLASMA | | | | | | | |
| 6-ETCDCA | 2.09 | 24.2 | 38.6 | 17.2 | 24.0 | 54.8 | 8.15 |
| 6-EGCDCA | 0.53 | 16.2 | 26.9 | 10.7 | 13.7 | 9.71 | 2.18 |
| 6-EUDCA | 3.52 | 17.1 | 26.9 | 9.25 | 8.27 | 8.71 | 1.30 |
| 6-ECDCA | 58.5 | 61.0 | 93.9 | 97.5 | 71.6 | 21.2 | 6.53 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 1.62 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 0.43 |
| FEGATO | | | | | | | |
| 6-ETCDCA | 353 | 496 | 881 | 755 | 557 | 261 | 157 |
| 6-EGCDCA | 125 | 102 | 197 | 122 | 83.4 | 15.4 | 19.9 |
| 6-EUDCA | 6.89 | 13.3 | 9.42 | 9.26 | 4.45 | 3.93 | 2.11 |
| 6-ECDCA | 36.3 | 35.5 | 78.1 | 48.3 | 47.2 | 5.10 | 3.73 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 88.9 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 11.3 |

| | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| FECI | | | | | | | |
| 6-ETCDCA | | | | | | | 9.31 |
| 6-EGCDCA | | | | | | | 4.55 |
| 6-EUDCA | | | | | | | 39.8 |
| 6-ECDCA | | | | | | | 1870 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 0.20 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 0.10 |
| CONTENUTO DELL'INTESTINO | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
| 6-ETCDCA | 0.45 | 6.02 | 26.9 | 518 | 2187 | 4570 | 6740 |
| 6-EGCDCA | 0.41 | 2.79 | 5.76 | 22.1 | 114 | 14.7 | 163 |
| 6-EUDCA | 0.19 | 4.70 | 3.62 | 9.76 | 24.9 | 15.7 | 98.6 |
| 6-ECDCA | 0.25 | 2.60 | 36.3 | 303 | 1370 | 1100 | 270 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 2460 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 59.4 |
| CONTENUTO DEL COLON | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
| 6-ETCDCA | 2.79 | 8.04 | 10.5 | 13.5 | 10.8 | 36.3 | 167 |
| 6-EGCDCA | 1.70 | 1.82 | 1.88 | 9.52 | 1.69 | 2.06 | 8.52 |
| 6-EUDCA | 1.28 | 3.92 | 3.27 | 7.41 | 5.03 | 37.8 | 127 |
| 6-ECDCA | 2.14 | 8.42 | 4.06 | 6.63 | 1.74 | 1100 | 4850 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 4.39 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 0.22 |
| URINE | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
| 6-ETCDCA | | | | | | | 13.4 |
| 6-EGCDCA | | | | | | | 7.71 |
| 6-EUDCA | | | | | | | 5.32 |
| 6-ECDCA | | | | | | | 5.86 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 12.2 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 7.00 |
| RENI | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
| 6-ETCDCA | | | | | | | 3.39 |
| 6-EGCDCA | | | | | | | 1.36 |
| 6-EUDCA | | | | | | | 0.32 |
| 6-ECDCA | | | | | | | 1.03 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 1.06 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 0.43 |
| TESSUTO INTESTINO | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
| 6-ETCDCA | 5.09 | 3.02 | 32.4 | 2270 | 5040 | 1930 | 6.26 |
| 6-EGCDCA | 1.62 | 1.00 | 2.61 | 5.57 | 3.79 | 4.11 | 0.77 |
| 6-EUDCA | 10.6 | 9.16 | 2.08 | 4.80 | 1.77 | 5.96 | 1.59 |
| 6-ECDCA | 23.5 | 18.3 | 154 | 373 | 261 | 74.6 | 2.03 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 4.90 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 0.61 |
| TESSUTO COLON | gruppo 1 (t=0.25 h) | gruppo 2 (t=0.5 h) | gruppo 3 (t=1 h) | gruppo 4 (t=2 h) | gruppo 5 (t=4 h) | gruppo 6 (t=8 h) | gruppo 7 (t=24 h) |
| 6-ETCDCA | 0.82 | 1.19 | 2.00 | 0.65 | 0.96 | 5.20 | 0.56 |
| 6-EGCDCA | 0.10 | 0.04 | 0.09 | 0.05 | 0.13 | 0.36 | 0.08 |
| 6-EUDCA | 0.54 | 0.48 | 0.32 | 0.16 | 1.17 | 3.65 | 0.34 |
| 6-ECDCA | 3.25 | 3.31 | 1.54 | 2.02 | 12.7 | 17.9 | 1.08 |
| 6-ETUDCA | | | | | | | 0.18 |
| 6-EGUDCA | | | | | | | 0.03 |

La seguente figura esprime le percentuali di ogni singolo acido biliare 6 etilato preso in considerazione e rilevato alle 24 ore.

Della dose totale somministrata all'animale è stato recuperato il 96.54%, come mostrato di seguito.

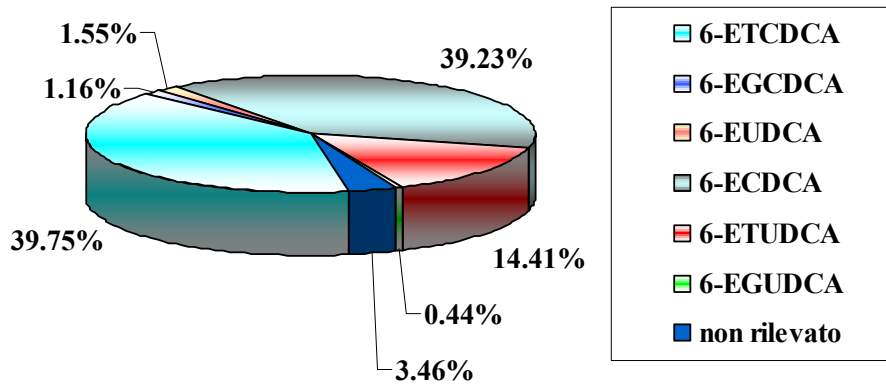


Figura 5: rappresentazione schematica delle percentuali dei vari acidi biliari rilevate alle 24 ore dopo la somministrazione di una dose di 30 mg/kg a ratti Sprague Dawley; da notare il 3.46% che rappresenta la percentuale non rilevata.

In aggiunta, data la dose somministrata di 30 mg/kg non sono stati ritrovati altri metaboliti come ad esempio acidi biliari solfati o glucuronidi nei reni o nelle urine.

L'analisi delle urine con e senza idrolisi enzimatica ha inoltre mostrato inoltre lo stesso profilo cromatografico.

5. DISCUSSIONE

Il metodo messo a punto risulta in grado di determinare la concentrazione di tutti gli analiti presi in considerazione nelle varie matrici studiate.

In particolare l'effetto matrice viene minimizzato e compensato dalle curve di calibrazione esterne fatte in matrici bianche ("external matrix-matched standard calibration") e che porta a dati quantitativi corretti.

Per ogni analita visto, sono stati monitorati e utilizzati ai fini dell'analisi quantitativa non solo il tempo di ritenzione e lo ione molecolare, ma anche almeno uno ione frammento specifico.

Questo ha permesso di ottenere un rapporto segnale/rumore migliore e soprattutto ha permesso di avere la determinazione dei composti in accordo con le linee guida della Comunità Europea in fatto di sviluppo e validazione di metodi analitici in spettrometria di massa [30] basati sull'uso dei punti identificativi (IPs).

In accordo con tale regolamentazione infatti, sono stati ottenuti almeno 3 punti identificativi per ogni analita per una identificazione positiva ed una corretta quantificazione del composto.

Utilizzando la spettrometria di massa a bassa risoluzione i punti identificativi possono essere ottenuti considerando 1 IP per lo ione precursore, 1.5 IP per ogni ione frammento, 1 IP per il tempo di ritenzione dell'analita.

Il metodo sviluppato risulta essere stabile e la precisione ed accuratezza al LOQ sono risultati essere inferiori all'11%.

Dai dati ottenuti dall'applicazione di questo metodo HPLC-ESI-MS/MS è stato trovato che il 6ECDCA viene inizialmente metabolizzato nel fegato per formare il tauro coniugato (6ETCDCA).

In presenza poi di batteri intestinali il 6ETCDCA viene deamidato per riformare il 6ECDCA che viene di nuovo parzialmente riassorbito e parzialmente escreto nelle feci.

Il 6ECDCA subisce anche la reazione di 7-deidrossilazione ad opera della flora intestinale per formare l'acido 6 etil-litocolico attraverso una via metabolica ossidativa, come confermato dalla presenza nelle feci dell'intermedio acido 6 etil-7 keto-litocolico.

Entrambi questi metaboliti, rilevati nelle feci, sono stati osservati solo negli animali sottoposti a trattamento, ma non negli animali di controllo.

Il 6ECDCA non forma altri metaboliti e meno dell'1% subisce la reazione di glucuronazione/solfatazione.

Dalle analisi relative alla purezza della formulazione del farmaco si è osservato che una piccola percentuale (0.7%) era costituita dal 7 β -epimero del 6ECDCA, il 6EUDCA.

Tale epimero subisce lo stesso metabolismo del 6ECDCA, venendo coniugato con taurina nel fegato e deconiugato dai batteri intestinali.

I dati ricavati da questo studio sono simili a quelli precedentemente osservati in altre analisi.

6. CONCLUSIONI

L'identificazione degli analiti è stata ottenuta in accordo con la regolamentazione europea per la validazione di metodi, unica eccezione sono il 6EGCDCA e il 6EUDCA, per i quali si utilizza una sola transizione MRM e il tempo di ritenzione per la loro identificazione e quantificazione.

L'approccio utilizzato permette di compensare e minimizzare l'effetto matrice grazie all'utilizzo della calibrazione esterna in matrice ("external matrix-matched standard calibration").

I valori di LOQ ottenuti permettono di ottenere dati di farmacocinetica per tutti i composti esaminati.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Laudet, V. J. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Mol. Endocrinol.* 1997, 19, 207.

[2] Forman, B.M.; Goode, E.; Chen, J.; Oro, A.E.; Bradley, D.J.; Perlmann, T.; Noonan, D.J.; Burka, L.T.; McMorris, T.; Lamph, W.W.; et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by Farnesol metabolites. *Cell* 1995, 81, 687.

[3] Sinal, C.J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J.M.; Lambert, G.; Gonzalez, F.J. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bileacid and lipid homeostasis. *Cell* 2000, 102, 731.

[4] Shuetz, E.G.; Strom, S.; Yasuda, K.; Lecureur, V.; Assem, M.; Brimer, C.; et al. Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among Nuclear Receptor, Transporters, and Cytochrome P450. *J Biol Chem*, 2001, 276, 39411.

[5] Plass, J.R.; Mol, O.; Heegsma, J.; Geuken, M.; Faber, K.N.; Jansen, P.L.; et al. Farnesoid X Receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology*, 2002, 35, 589.

[6] Ananthanarayanan, M.; Balasubramanian, N.; Makishima, M.; Mangelsdorf, D.J.; Suchy, F.J. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor. *J Biol Chem*, 2001, 276, 28857.

[7] Chiang, J.K.; Kimmel, R.; Weinberger, C.; Stroup, D. Farnesoid X Receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -

hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Biol Chem*, 2000, 275, 10918.

[8] Lu, T.T.; Makishima, M.; Repa, J.J.; Schoonjans, K.; Kerr, T.A.; Auwerx, J.; et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*, 2000, 6, 507.

[9] Chiang, J.Y. Bile acid regulation of gene expression: role of nuclear hormone receptors. *Endocrinol Rev*, 2002, 23, 443.

[10] Ellis, E.; Axelson, M.; Abrahamsson, A. ; Eggersten, G.; Thorne, A.; Novak, G.; et al. Feedback regulation of bile acid synthesis in primary human hepatocytes: evidence that CDCA is the strongest inhibitor. *Hepatology*, 2003, 38,930.

[11] Lew, J.L.; Zhao, A.; Yu, J.; Huang, L.; De, P.N.; Pelaez, F.; et al. The Farnesoid X Receptor controls gene expression in a ligand and promoter selective fashion. *J Biol Chem*, 2004, 279, 8856.

[12] (a) Makishima, M.; Okamoto, A. Y.; Repa, J. J.; Tu, H.; Learned, R. M.; Luk, A.; Hull, M. V.; Lustig, K.D.; Mangelsdorf, D. J.; Shan, B. Identification of a Nuclear Receptor for bile acids. *Science* 1999, 284, 1362. (b) Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R.K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D.D.; Lehmann, J. M. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999, 284,1365. (c) Wang, H.; Chen, J.; Hollister, K.; Sowers, L. C.; Forman, B. M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 1999, 3, 543.

[13] Campana, G.; Pasini, P.; Roda, A.; Spanpinato, S. Regulation of ileal bile acid-binding expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic

acid: role of the farnesoid X receptor. *Biochemical Pharmacology* 2005, 69, 1755.

[14] Fiorucci S.; Clerici C.; Antonelli E.; Orlandi S.; Goodwin B.; Sadeghpour B.M.; Sabatino G.; Russo G.; Castellani D.; Wilson T.M.; Pruzanski M.; Pellicciari R.; Morelli A. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a Farnesoid X Receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313 (2005): 604.

[15] Fiorucci S.; Rizzo, G.; Antonelli E.; Renga, B.; Mencarelli, A.; Riccardi, L.; Orlandi S.; Pruzanski, M.; Morelli A.; Pellicciari R. A Farnesoid X Receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloprotease inhibitor-1 and matrix metalloprotease expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314 (2005): 584.

[16] Costantino G.; Macchiarulo A.; Entrena-Guadix A.; Camaioni E.; Pellicciari R. Binding mode of 6ECDCA, a potent bile acid agonist of the Farnesoid X Receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003):1865.

[17] Kast H.R.; Nguyen C.M.; Sinal C.J.; Jones S.A.; La fitte B.A.; Reue K.; Gonzales F.J.; Wilson T.M.; Edwards P.A. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol. Endocrinol.* 15 (2001): 1720.

[18] Urizar N.L. Dowhan D.H.; Moore D.D. The Farnesoid X-activated Receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J. Biol. Chem.* 275 (2000): 39313.

- [19] Claudel T.; Sturm E.; Duez H. Torra I.P.; Sirvent A.; Kosykh V.; Fruchart J.C.; Dallongeville J.; Hum D.W.; Kuipers F.; Staels B.J. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J. Clin. Invest.* 109 (2002):961
- [20] Roda A.; Gioacchini AM.; Cerre C.; Baraldini M. High performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of bile acids in biological fluids. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 2 (1995): 281.
- [21] Tessier E.; Neirinck L.; Zhu Z. High performance liquid chromatographic mass spectrometric method for the determination of ursodeoxycholic acid and its glycine and taurine conjugate in human plasma. *J. Chromatogr B* 798 (2003): 295.
- [22] Perwaiz S.; Tuchweber B.; Diane M.; Gilat T. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 42 (2001): 114.
- [23] Griffiths W.J. Tandem Mass Spectrometry in the study of fatty acids, bile acids and steroids. *Mass Spectrometry Reviews* 22 (2003): 81.
- [24] Zrostlikova J.; Hajslova J.; Poustka J.; Begany P. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of pesticides residues in plant materials. *J. Chromatogr A* 973 (2002): 13.
- [25] Stuber M.; Reemtsma T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004): 910.

[26] Choi B.K.; Hercules D.M.; Gusev A.I. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. *J. Chromatogr A* 907 (2001): 337.

[27] Matuszewski B.K.; Constanzer M.L.; Chavez-Eng C.M. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analysis of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentration. *Anal. Chem.* 70 (1998): 882.

[28] Matuszewski B.K.; Constanzer M.L.; Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75 (2003): 3019.

[29] Little J.M., Chari M.V., Lester R. Excretion of colate glucuronide. *Journal of Lipid Research* 26 (1985): 583.

[30] Official Journal of the European Communities, 12.08.2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of the result.

CAPITOLO III

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO HPLC-ESI-MS/MS PER LA DETERMINAZIONE DI GLUCOSAMINA IN PLASMA E LIQUIDO SINOVIALE UMANO

1. INTRODUZIONE

1.1 Glucosamina

Le Osteoartriti (OA) sono la più comune forma di disturbo articolare che colpisce la popolazione mondiale, modificandone pesantemente la qualità della vita.

Al momento sono conosciute due tipologie di OA indicate con primarie e secondarie. L'OA primaria (localizzata o generalizzata) è la forma più frequente ma apparentemente senza cause scatenanti con l'avanzare dell'età la quale comunque costituisce un fattore di rischio. Invece vanno sotto il nome di OA secondarie quelle che derivano da infortuni, traumi alle articolazioni, malattie congenite o altre infermità [1, 2].

Per comprenderne l'eziologia e di conseguenza il ruolo terapeutico della glucosamina (GLcN) come agente condroprotettivo, risulta utile conoscere la fisiologia delle articolazioni.

1.2 Struttura della cartilagine e ruolo fisiologico della GLcN endogena

In un individuo sano, la superficie articolare delle ossa è coperta dalla cartilagine ed immersa nel fluido sinoviale il quale fornisce un'adeguata lubrificazione.

La cartilagine, in condizioni normali, è caratterizzata dalla seguente composizione:

- 2% di cellule specializzate denominate condrociti
- 20–40% di matrice extracellulare che corrisponde al tessuto connettivale
- 60–80% di acqua.

I condrociti producono e mantengono la matrice, che a sua volta rappresenta un ambiente favorevole per lo sviluppo di queste stesse cellule.

La matrice extracellulare è composta al 60% da collagene (prevalentemente di tipo II) e al 40% di proteoglicani, che forniscono l'intelaiatura per il componente precedente e contribuiscono alla realizzazione di legami tra acqua e cationi, responsabili a loro volta della formazione dello strato viscoso ed elastico che lubrifica e protegge la cartilagine.

Dal punto di vista chimico, il collagene è una proteina insolubile e fibrosa, mentre i proteoglicani sono macromolecole con un nucleo centrale proteico cui sono legate delle catene di polisaccaridi e glicosaminoglicani (GAG). Questi ultimi, noti anche come mucopolisaccaridi, sono amminozuccheri, ovvero unità ripetute di disaccaridi contenenti GLcN solfato e altri analoghi strutturali. Nel tessuto connettivale umano cheratina solfato, eparina solfato, condroitin solfato, keratan solfato e dermatan solfato sono i GAG più rappresentativi [3].

Nella matrice i proteoglicani sono legati a molecole di acido ialuronico in modo da ottenere particolari aggregati estremamente idrofilici, caratteristica questa che spiega l'elevata quantità d'acqua presente nella matrice (fig 1).

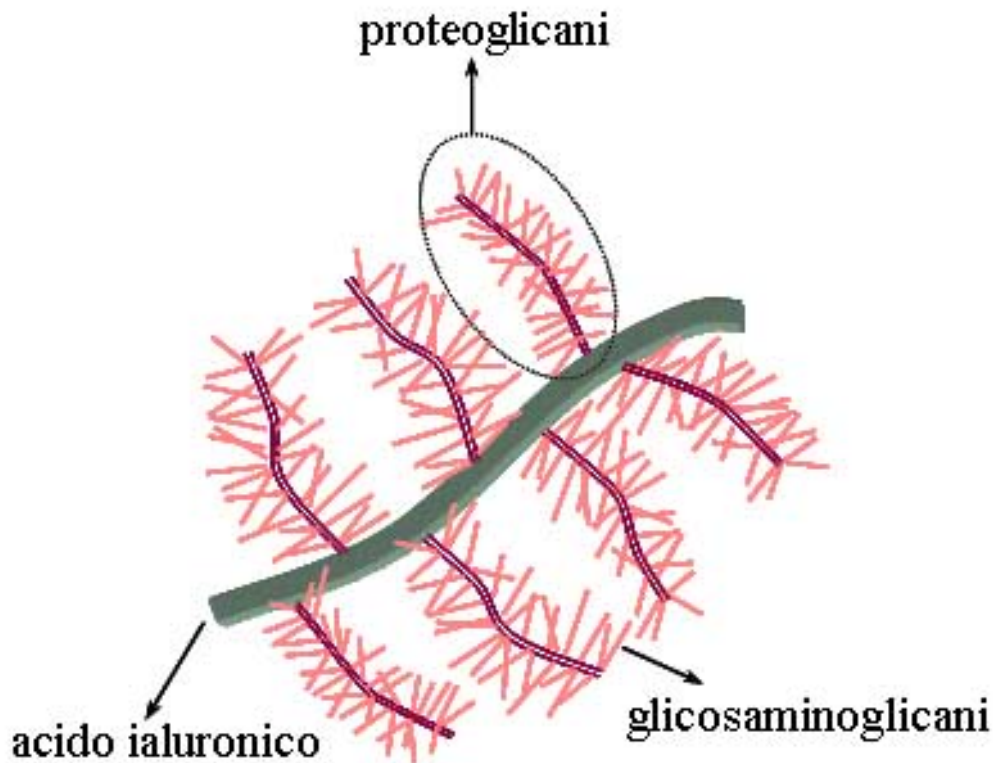


Figura 1: struttura della cartilagine.

Contemporaneamente l'eccessivo richiamo d'acqua, che cambierebbe radicalmente le proprietà fisiche della cartilagine, viene evitato dalle connessioni che si stabiliscono tra i proteoglicani stessi con le fibrille di collagene.

Come tutti gli altri tessuti connettivi dell'organismo, anche la cartilagine articolare è un materiale vivo e dinamico per cui è costantemente soggetta a cicli perfettamente equilibrati di sintesi e degradazione [4].

Se avviene uno sbilanciamento tra i due processi per un aumento della cinetica di degradazione, si assiste al catabolismo progressivo dei proteoglicani della cartilagine e allo sviluppo dell'osteoartrite.

In particolare, si verifica una minor produzione di glicosaminoglicani, che porta a sua volta ad una diminuzione dei legami tra proteoglicani e collagene. Il risultato è un maggior richiamo di acqua all'interno della matrice, che rende la cartilagine maggiormente suscettibile agli effetti

della compressione, tensione e taglio che di norma hanno luogo durante il normale movimento delle articolazioni [3].

1.3 Meccanismo d'azione della GLcN come agente “condroprotettivo”

Le terapie convenzionali sono solite agire attraverso interventi chirurgici, consigliati però solo nei casi più gravi, o cambiamenti nello stile di vita (perdita di peso, alimentazione sana, lieve attività fisica), ma risultano difficilmente applicabili all'odierno stile di vita.

Per tali ragioni, negli ultimi anni ha subito un notevole impulso la ricerca di principi attivi che rallentino il progredire dell'OA e stimolino la riparazione delle cartilagini danneggiate: i cosiddetti agenti “condroprotettivi” [5].

I composti che hanno mostrato di avere tali caratteristiche sono quelli naturalmente presenti nella cartilagine, tra cui i più rappresentativi sono acido ialuronico, glucosamina (GLcN) e condroitin solfato [6-9]. La GLcN, 2-amino-2-deossi- α -D-glucosio rappresentato in fig 2, è un aminozucchero sintetizzato dai condrociti a partire dal glucosio (fig 3) che assume un ruolo fondamentale nelle reazioni di sintesi dei glicosaminoglicani e dei proteoglicani. Funge, infatti, da substrato e promotore nella biosintesi del condroitin solfato, dell'acido ialuronico e di altre macromolecole della matrice coinvolte nella struttura e nel funzionamento delle articolazioni [8].

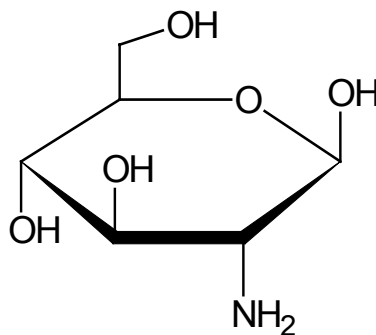


Figura 2: struttura della glucosamina.

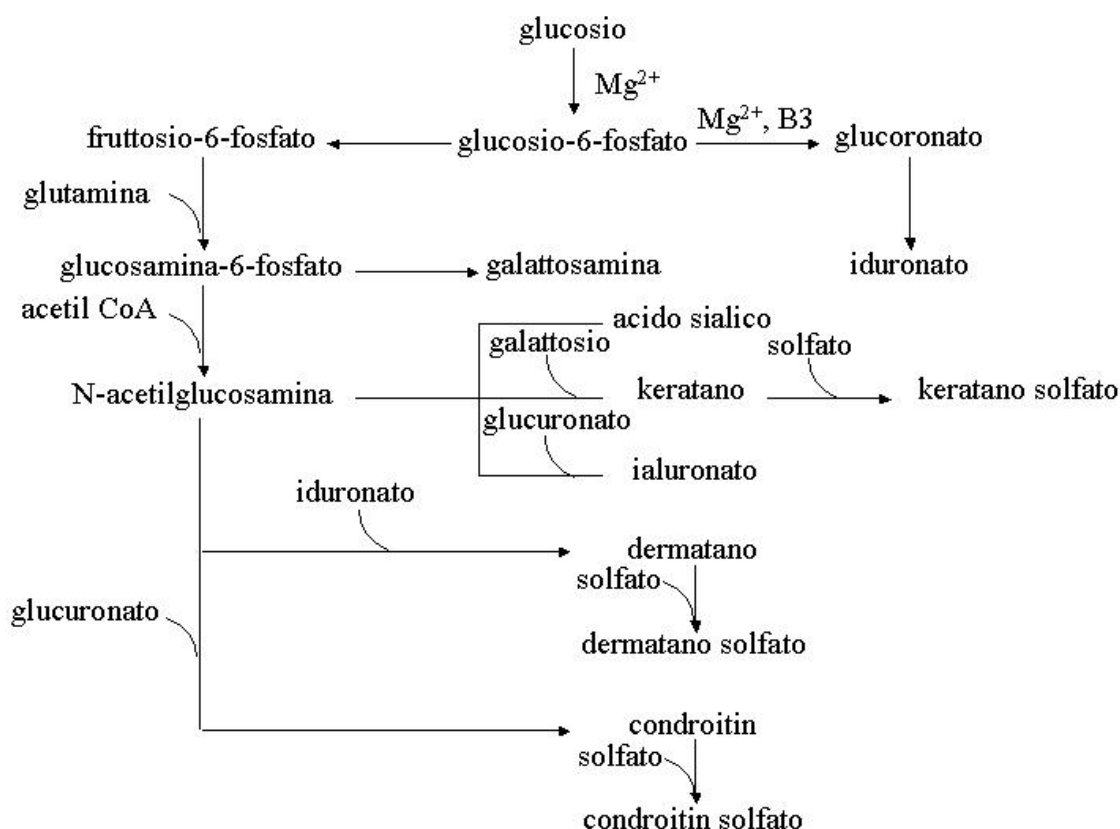
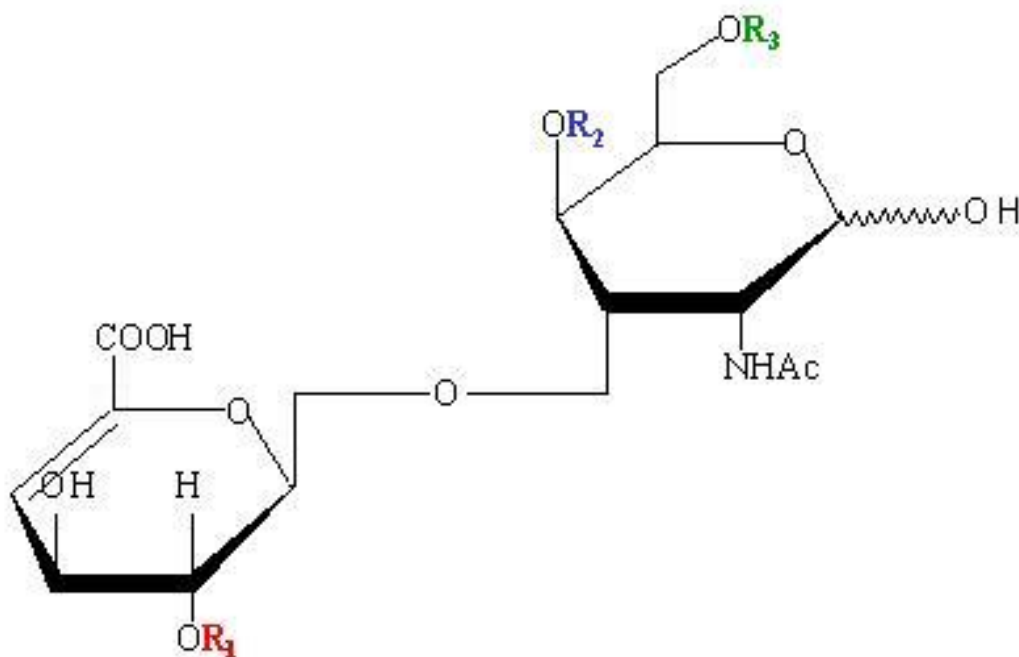


Figura 3: processo di sintesi della GLcN a partire dal glucosio.

In accordo a quanto appena detto, l'assunzione di sali di glucosamina solfato o condroitin solfato, come formulazione farmaceutica o supplemento dietetico [10-12], dovrebbe apportare un miglioramento dello squilibrio tra processi anabolici e catabolici responsabili della patologia e condurre inoltre un'azione preventiva nei confronti delle articolazioni già compromesse.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che tutti i vantaggi di un condroprotettore sono raggiunti se la GLcN è assunta in associazione con il condroitin solfato, polimero di acido glucuronico e N-acetil-galattosamina solfato (fig 4) la cui funzione fondamentale è incrementare la concentrazione di glicosaminoglicani nella cartilagine e limitarne l'eccessiva degradazione [6, 13].



| disaccaridi | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-------------|----------------|-----------------|-----------------|
| UA-GalNAc | H | H | H |
| UA-GalNAc4S | H | SO ₃ | H |
| UA-GalNAc6S | H | H | SO ₃ |

Figura 4: struttura del condroitin solfato.

Dal momento che la glucosamina stimola la produzione di nuova cartilagine e il condroitin solfato ne impedisce la degradazione, la somministrazione combinata determinerà il rallentamento nella progressione dell'OA.

1.4 Tossicità

Gli studi di tossicità non hanno portato ad alcun valore di DL₅₀, dal momento che anche a dosaggi molto elevati (5000 mg/kg per os, 3000 mg/kg IM e 1500 mg/kg IV) non si registra la morte di nessun animale da esperimento [3].

Inoltre ne è stata dimostrata l'elevata tollerabilità (Tab 1), ulteriore motivo dell'interesse crescente verso gli agenti condroprotettori, a scapito dei comuni corticosteroidi e farmaci anti-infiammatori non

steroidi (FANS), quali aspirina e ibuprofene [14]. Queste ultime due classi di farmaci agiscono sugli stati infiammatori responsabili del dolore ma non sull'etiologia dell'OA e per di più sono spesso responsabili di effetti collaterali come ulcere gastriche, necrosi renali, riduzione dell'attività immunitaria che ne impediscono la somministrazione a lungo termine, come invece richiesto dalla pratica clinica.

| SINTOMI | % DEI CASI DICHIARATI |
|---------------------------|------------------------------|
| dolore epigastrico | 3,48 |
| pirosi | 2,73 |
| diarrea | 2,48 |
| nausea | 1,16 |
| dispepsia | 0,99 |
| vomito | 0,83 |
| spossatezza | 0,83 |
| costipazione | 0,66 |
| reazioni cutanee | 0,33 |
| mal di testa | 0,33 |
| anoressia | 0,25 |
| dolori addominali | 0,25 |
| meteorismo | 0,17 |
| sonnolenza | 0,17 |
| insonnia | 0,08 |
| edema | 0,08 |
| tachicardia | 0,08 |

Tabella 1: tossicità della glucosamina.

Data la problematica, si comprende la necessità di sviluppare delle metodiche analitiche sensibili e specifiche in grado di effettuare il dosaggio della glucosamina su due livelli ben distinti ovvero nelle preparazioni farmaceutiche e nei liquidi biologici (plasma e/o liquido sinoviale). Una tecnica rapida, semplice e validata per la quantificazione del principio attivo in diversi preparati, quali tavolette e capsule, consiste nella cromatografia su strato sottile ad elevata prestazione (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) in cui il campione contenente l'analita viene depositato automaticamente su una lastra di gel di silice, fatto reagire con una soluzione di ninidrina che ne permette la successiva rivelazione e dosaggio per via densitometrica [15]. Tale approccio non consente però di effettuare degli studi in vivo.

Per definire un profilo farmacocinetico a partire da fluidi biologici, risultano idonee tecniche cromatografiche, in particolare la cromatografia liquida ad elevata prestazione (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), combinata con tecniche di rivelazione UV. La molecola deve essere necessariamente derivatizzata [16-18] in quanto, per la sua struttura chimica, non assorbe alle lunghezze d'onda del visibile: un cromoforo, come la ninidrina, facilita l'assorbimento nel visibile ma reagisce, non essendo specifico, con le altre ammine endogene presenti nel plasma. Tale approccio analitico dunque mostra scarsa specificità, selettività e tempi lunghi nella preparazione del campione.

Un notevole miglioramento nella definizione del profilo farmacocinetico della GLcN assunta per via orale (*os*) si raggiunge mediante la combinazione di due diverse metodiche e in particolare cromatografia liquida e spettrometria di massa (LC-MS). Si sfrutta così la capacità della cromatografia di isolare da una miscela gli analiti di interesse, introdotti poi nello spettrometro di massa che ne permette l'esatta identificazione e determinazione quantitativa in base al loro specifico rapporto massa/carica (m/z).

2. SCOPO

L'osteoartrite (OA) è un disordine articolare altamente invalidante la cui incidenza è in progressivo aumento nella popolazione occidentale.

L'attuale pratica clinica utilizza l'aminozucchero endogeno glucosamina (GLcN), unità costitutiva naturale e molecola essenziale nella biosintesi dei glicosaminoglicani (GAG) e delle glicoproteine presenti nel tessuto connettivale, come agente condroprotettivo.

L'importanza dunque di effettuarne l'analisi nei fluidi biologici, quale plasma e liquido sinoviale, è legata alla possibilità di comprenderne da una parte il ruolo fisiologico della molecola endogena, dall'altra il suo meccanismo d'azione come agente terapeutico.

In questo lavoro ci si è posto come obiettivo lo sviluppo e la validazione di un metodo combinato HPLC-ESI-MS/MS per la determinazione quantitativa rapida e sensibile della glucosamina nel plasma e nel liquido sinoviale umano che non richieda la derivatizzazione dell'analita prima dell'analisi.

Le procedure analitiche attualmente utilizzate e riportate in letteratura impiegano, infatti, come modalità di rivelazione la fluorescenza e l'assorbimento UV-vis, tecniche poco specifiche e sensibili che necessitano di una fase di derivatizzazione dell'analita per permetterne la rivelazione.

D'altra parte la determinazione quantitativa effettuata su campioni di queste due matrici biologiche complesse contenenti numerosi altri zuccheri ed amminozuccheri (glucosio, galattosio e galattosamina) che potrebbero interferire nell'analisi, rende indispensabile l'utilizzo di una tecnica di separazione cromatografica. A causa delle particolari caratteristiche chimico-fisiche di questi composti anche in questo caso viene spesso utilizzata una procedura di derivatizzazione allo scopo di migliorare la separazione cromatografica dell'analita di interesse dagli interferenti.

Un approccio analitico che accoppia la capacità separativa della cromatografia liquida mediante colonne specifiche per l'analisi degli

zuccheri con l'elevata sensibilità della spettrometria di massa potrebbe invece permettere l'analisi diretta della GlcN in campioni biologici, evitando l'uso di processi di derivatizzazione del campione, responsabili di potenziali errori e di un aumento dei tempi di analisi. Si è cercato inoltre di apportare miglioramenti nel limite di quantificazione (LOQ), sensibilità, precisione e accuratezza, parametri regolatori riportati dalla Guidance for Industry [19] indispensabili per la validazione di qualsiasi metodo analitico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali e reagenti

La D-glucosamina cloridrato (purezza > 99.8%) è stata fornita dal Laboratorio della Rotta Research (Monza, Italia), mentre lo standard marcato D-[1-¹³C] glucosamina cloridrato (¹³C-GLcN, purezza isotopica 99%), utilizzato come standard interno, è stato procurato dalla Omicron (South Bend, IN, USA).

Le fasi mobili impiegate sono acetonitrile (LiChrosolv®, per HPLC, Carlo Erba) e acqua deionizzata MilliQ (Millipore, Molsheim, Francia).

3.2 Calibrazione degli standard e controllo di qualità dei campioni

Per effettuare la curva di taratura, necessaria per conoscere l'ambito di linearità del farmaco in esame, si preparano soluzioni madre (stock solution) di GLcN e ¹³C-GLcN (100 µg/ml) in tampone ammonio acetato 10 mM, pH 7.5, da conservare a -20 °C fino al momento dell'uso.

Per successiva diluizione delle precedenti si ottengono le soluzioni di lavoro (working solution) di GLcN e ¹³C-GLcN a una concentrazione pari a 12.5 µg/ml.

Per la preparazione degli standard di calibrazione e dei controlli di qualità dei campioni viene recuperato un pool selezionato di campioni di tali matrici contenenti GLcN in una quota inferiore al limite di identificazione riportato dal metodo.

La curva di taratura degli standard in plasma e liquido sinoviale si effettua aggiungendo alla matrice le soluzioni di lavoro, tali che la concentrazione di GLcN sia compresa nell'intervallo tra 10 e 1000 ng/ml.

Allo stesso modo, ai campioni vengono addizionate quantità di analita in concentrazioni pari a 10, 100 e 800 ng/ml per ottenere i controlli di qualità dei campioni.

3.3 Preparazione dei campione

Vengono fortificati 490 µl di matrice (plasma o liquido sinoviale) con 10 µl di standard interno, ¹³C–GLcN, la cui concentrazione finale deve essere pari a 250 ng/ml (valore ottenuto da precedenti prove di linearità). Tale concentrazione è mantenuta in tutti i campioni per l'intera conduzione dell'analisi.

Il campione così preparato viene poi agitato con vortex in modo da garantire uniformità nella risposta.

Successivamente, si addizionano 250µl di Acido Tricloroacetico (TCA) a concentrazione pari a 200 g/l, che precipita le proteine presenti in matrice purificando così il campione.

Dopo breve agitazione fino al raggiungimento di una soluzione omogenea, si centrifuga a 13400 rpm per 10 minuti e si trasferisce il surnatante in un vial per la successiva analisi HPLC–ESI–MS/MS.

3.4 Analisi HPLC–ESI–MS/MS

La separazione HPLC è effettuata su un sistema cromatografico Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA) dotato di un autocampionatore.

La colonna HPLC impiegata è una colonna Shodex® Asahipak NH₂P-50 2D (5 µm, 2.0 mm i.d. × 150 mm), dotata di una precolonna Shodex® Asahipak NH₂P-50G 2A (5 µm, 2.0 mm i.d. × 30 mm) (Showa Denko K.K. (Kanagawa, Giappone).

L'analisi viene condotta su un volume di campione pari a 3 µl ad una velocità di flusso di 0.3 ml/min.

I solventi utilizzati sono: solvente A (acqua Milli-Q) e solvente B (acetonitrile).

L'andamento del gradiente è il seguente: 0-7 min, 20% di A; 7-8 min dal 20% al 50% di A, 8-16 min 50% di A, 16-17 min dal 50% al 20% di A, infine 17-30 min 20% di A.

Lo spettrometro di massa utilizzato è un analizzatore a triplo quadrupolo (Quattro LC, Micromass UK Ltd., UK), che, data la struttura chimica della GLcN, viene impostato in modalità di ionizzazione positiva.

I parametri strumentali possono essere così riassunti:

- velocità di flusso del gas di nebulizzazione: 85 l/h
- velocità di flusso del gas di desolvatazione: 550 l/h
- temperatura di desolvatazione: 250°C
- temperatura della sorgente: 120 °C
- voltaggio del capillare: 3.6 kV
- voltaggio del cono: 18V
- gas di collisione: argon
- energia di collisione: 19 eV (per la frammentazione di GLcN e ¹³C-GLcN).

Per quanto concerne l'aspetto quantitativo, viene impiegata la modalità di acquisizione MRM, seguendo le transizioni m/z 180→72 per la GLcN e 181→73 per la ¹³C-GLcN, come mostrato dallo spettro di massa nella fig 5.

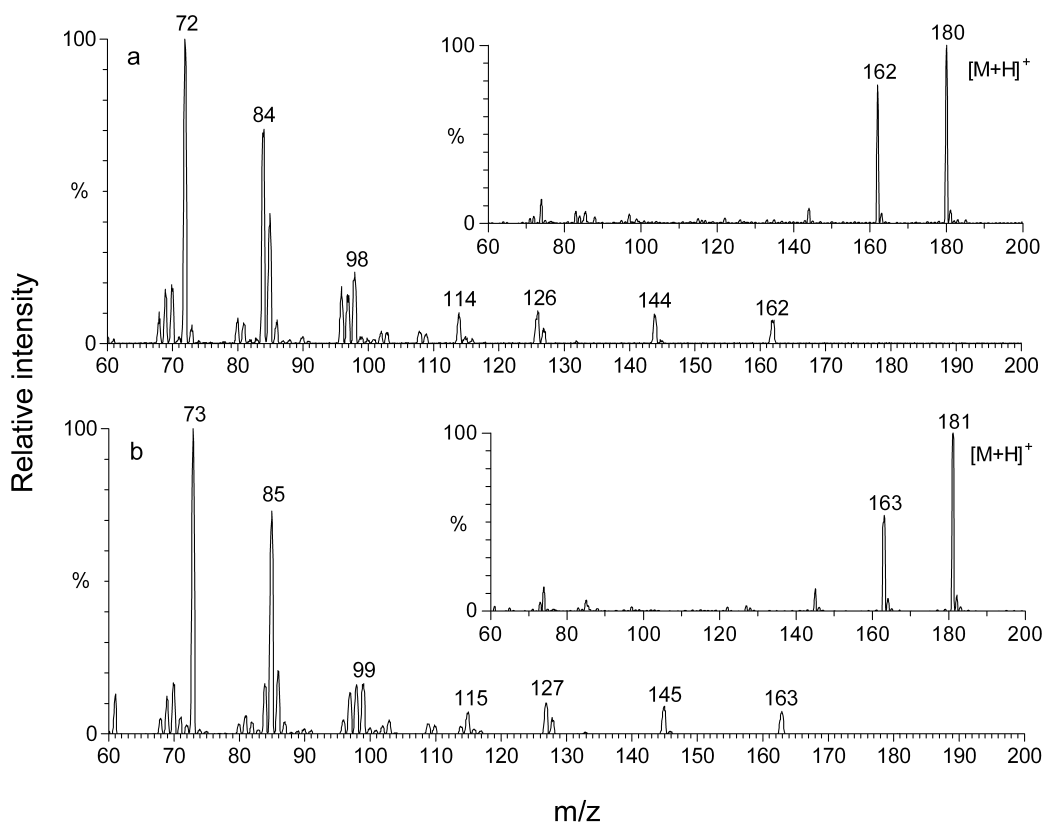


Figura 5: spettro di MS e MSMS relativo alla GLcN (a) e allo standard interno (^{13}C -GLcN) (b).

Per l'impostazione dei parametri ed il controllo dell'intera strumentazione viene utilizzato il software MassLynx nella versione 4.0 (Micromass UK Ltd.).

3.5 Analisi quantitativa

Per la determinazione quantitativa della concentrazione di analita presente in un campione incognito si rende necessaria la costruzione di una curva di taratura prima di ogni serie analisi.

Nel caso specifico della GLcN si osserva la relazione lineare che intercorre tra il rapporto delle aree $\text{GLcN}/^{13}\text{C}\text{-GLcN}$, riportato sull'asse delle ordinate, e la concentrazione nominale della molecola di interesse su quello delle ascisse, nell'intervallo di concentrazione preso in considerazione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Spettri di massa della Glucosamina e della ^{13}C -Glucosamina e analisi HPLC

La presenza di un gruppo amminico ($-\text{NH}_2$) nella struttura della GLcN ha suggerito di utilizzare la sorgente ESI in modalità di ionizzazione positiva, la quale si è dimostrata altamente efficace grazie alla produzione di intense correnti di ioni protonati.

In questo modo è stata possibile la rilevazione diretta di basse concentrazioni della molecola di interesse, a differenza dei metodi analitici finora utilizzati, che invece prevedevano procedure di derivatizzazione responsabili di un aumento dei tempi di analisi.

In particolare, dalla ionizzazione sono stati ottenuti gli ioni molecolari positivi ($[\text{M}+\text{H}]^+$) a valori di m/z pari a 180 e 181 [20], rispettivamente per la GLcN e per lo standard interno ^{13}C -GLcN, e altri picchi meno intensi a m/z di 162 e 163, probabilmente dovuti alla perdita di una molecola di acqua (fig 7).

L'utilizzo dello ^{13}C -GLcN come standard interno è innovativo in questo tipo di analisi. La maggior parte dei metodi analitici riportati in letteratura, impiegano la galattosamina (fig 6) [21-24], isomero strutturale della GLcN che presenta lo svantaggio di generare uno spettro di massa del tutto identico a quello dell'analita.

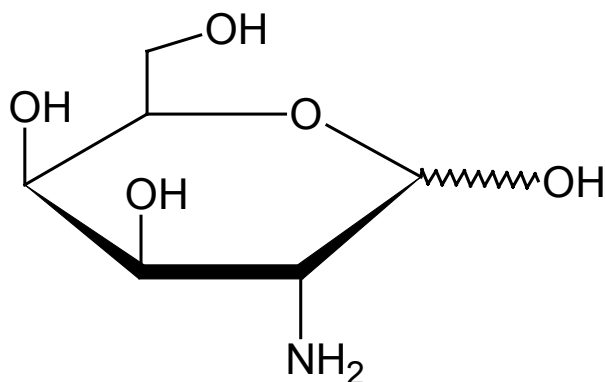


Figura 6: struttura della galattosamina.

Pertanto lo standard marcato ^{13}C -GLcN risulta più idoneo: infatti genera, rispetto alla molecola di GLcN, un segnale ad un diverso valore di m/z e ne possiede le medesime proprietà chimico-fisiche.

Quest'ultima caratteristica permette di ottimizzare le condizioni di ionizzazione ma non la separazione cromatografica, in quanto lo standard interno e l'analita vengono eluiti dalla colonna con un identico tempo di ritenzione.

Tale problema viene risolto utilizzando la modalità di acquisizione MRM che consente di valutare separatamente le transizioni del farmaco e della ^{13}C -GLcN.

Osservando gli spettri, è possibile notare che i picchi più intensi corrispondono agli ioni frammento a valori $m/z = 72$ per la GLcN (con formula molecolare $[\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}]^+$) e $m/z = 73$ per lo standard interno.

Un possibile schema di frammentazione è proposto di seguito (fig 7) [25].

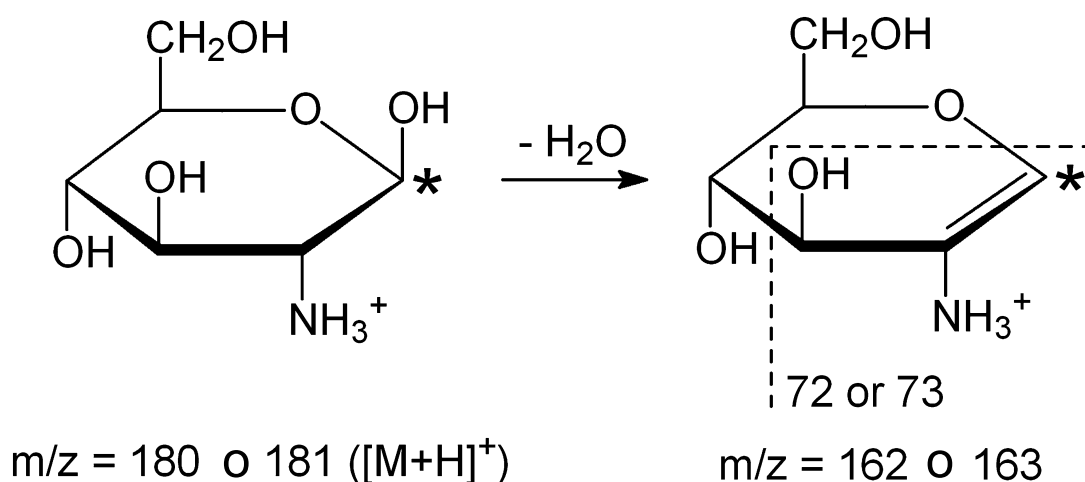


Figura 7: rappresentazione della struttura del frammento a m/z pari a 72 (73 per lo standard interno).

Le transizioni ioniche $180 \rightarrow 72$ e $181 \rightarrow 73$ sono state scelte per la determinazione quantitativa rispettivamente dell'analita e dello

standard interno in modalità MRM, a causa dell'abbondanza relativa degli ioni a m/z 72 e 73 e della loro specificità per GLcN e ^{13}C -GLcN. La specificità di queste transizioni ed il metodo cromatografico sviluppato risolvono il problema delle interferenze da parte di zuccheri ed aminozuccheri endogeni (glucosio, galattosio e galattosamina) presenti nelle matrici ad elevate concentrazioni.

A causa del carattere idrofilico e polare degli aminozuccheri e zuccheri, le comuni colonne a fase inversa possono essere utilizzate solo in seguito ad un processo di derivatizzazione degli analiti per aumentarne l'idrofobicità.

Per effettuare un'efficiente separazione cromatografica in tempi rapidi senza dover pre-trattare il campione, in questo lavoro è stata utilizzata una colonna la cui fase stazionaria è costituita da un gel di alcol polivinilico funzionalizzato con amino gruppi, che favorisce la separazione di monosaccaridi, oligosaccaridi e alcoli mediante una eluizione a gradiente di acqua e acetonitrile.

È utile notare il duplice ruolo dell'acetonitrile: nella tecnica separativa favorisce l'eluizione degli analiti, mentre nella ionizzazione elettrospray promuove il processo di desolvatazione.

Il metodo analitico sviluppato ha consentito di analizzare direttamente la GLcN nelle matrici semplificando notevolmente la preparazione del campione.

Essa, infatti, consiste nella precipitazione proteica con acido tricloroacetico, che permette la rimozione di tutti i composti endogeni potenzialmente interferenti, come è osservabile dall'assenza di segnali significativi nel tracciato cromatografico riportato in fig 8a per il plasma e in figura 8b per il liquido sinoviale.

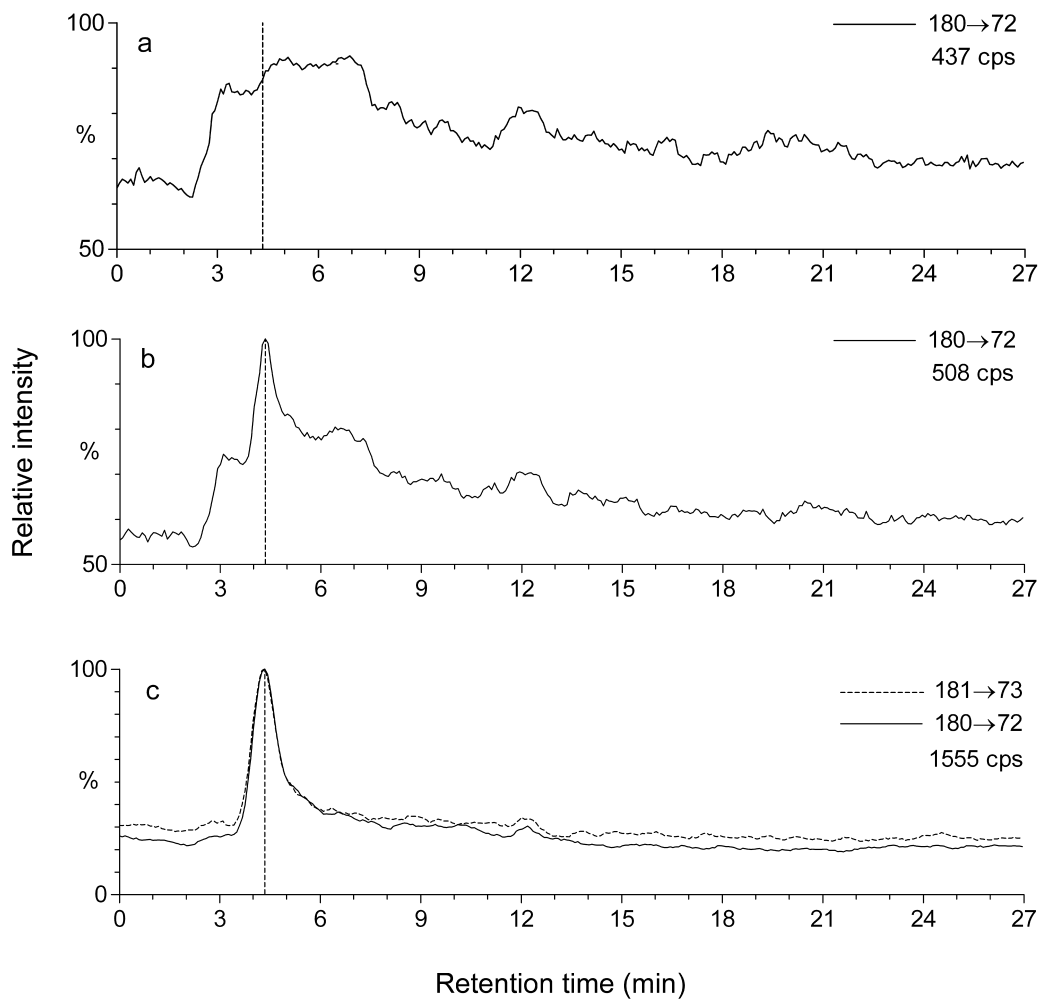


figura 8a: cromatogramma di una analisi della glucosamina in plasma umano usato per la calibrazione degli standard e dei Quality Control (QC) (a), della glucosamina a 10 ng/mL (b) e della glucosamina e dello standard interno entrambi a 250 ng/mL (c).

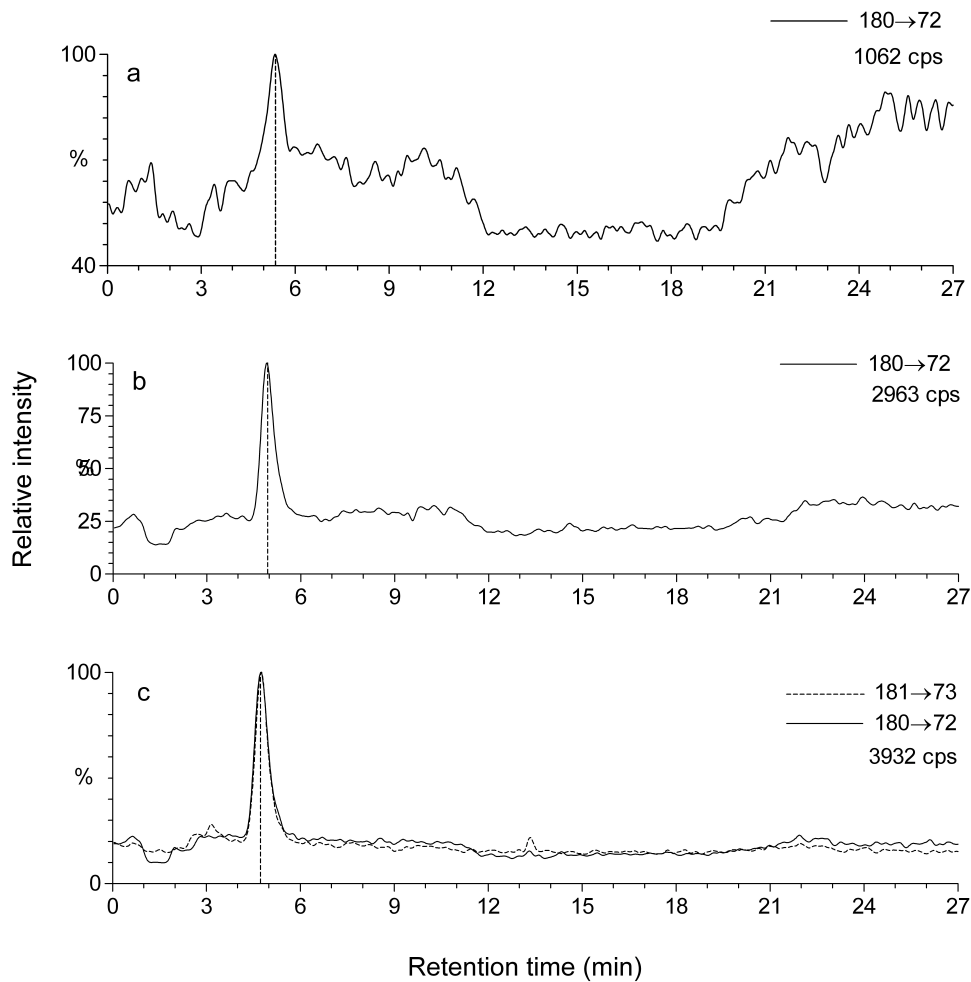


figura 8b: cromatogramma di una analisi della glucosamina in liquido sinoviale usato per la calibrazione degli standard e dei Quality Control (QC) (a), della glucosamina a 10 ng/mL (b) e della glucosamina e dello standard interno entrambi a 250 ng/mL (c).

Dall'osservazione critica dei cromatogrammi, si nota che la GLcN e il ^{13}C -GLcN, come atteso, presentano un identico tempo di ritenzione (4.6 min), diverso da quello della galattosamina (4.0 min) che perciò non causa alcuna interferenza durante l'analisi. La corsa cromatografica ha una durata di circa 30 minuti per consentire l'eluizione di tutti i composti ritenuti.

4.2 Curve di calibrazione

Per l'analisi di quantificazione sono state costruite curve di calibrazione in matrice fortificata con soluzioni standard di GLcN, con concentrazioni comprese nell'intervallo di linearità (10–1000 ng/ml).

Il valore di deviazione standard relativa (RSD) calcolato è risultato inferiore al 7.0% per tutti i valori di concentrazioni inclusi nella curva calibrazione, fatta eccezione per il valore di 10 ng/ml.

I dati sono riportati in tabella 2a per il plasma e 2b per il liquido sinoviale.

| curva | pendenza | intercetta | coefficiente di determinazione |
|----------------|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.00326 | 0.008 | 0.9943 |
| 2 | 0.00330 | 0.011 | 0.9978 |
| 3 | 0.00322 | 0.008 | 0.9889 |
| 4 | 0.00329 | 0.011 | 0.9962 |
| 5 | 0.00315 | 0.013 | 0.9990 |
| 6 | 0.00325 | 0.009 | 0.9923 |
| media | 0.00324 | 0.010 | |
| SD | 0.00005 | 0.002 | |
| RSD (%) | 1.6 | 19.7 | |

Tabella 2a: parametri della curva di calibrazione ottenuti trattando sei curve di calibrazione indipendenti con il metodo dei minimi quadrati nell'intervallo di concentrazione 10-1000 ng/mL di GLcN.

| curva | pendenza | intercetta | coefficiente di determinazione |
|----------------|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.00456 | 1.0001 | 0.9999 |
| 2 | 0.00458 | 1.0096 | 0.9994 |
| media | 0.00457 | | |
| SD | 0.00001 | | |
| RSD (%) | 0.22 | | |

Tabella 2b: parametri della curva di calibrazione ottenuti trattando due curve di calibrazione indipendenti con il metodo dei minimi quadrati nell'intervallo di concentrazione 10-1000 ng/mL di GLcN. (per la validazione parziale non era necessario trattare 6 curve di calibrazione).

4.3 Precisione, accuratezza e Limite di Quantificazione

Per valutare la ripetibilità e riproducibilità del metodo, i Quality Control (QC) sono stati fortificati con concentrazioni di GLcN pari a 10, 100 e 800 ng/ml.

Le soluzioni così ottenute (6 per ogni livello di concentrazione) sono state poi analizzate nel medesimo giorno per la valutazione della ripetibilità, e in sei giorni differenti per quella della riproducibilità.

I valori di RSD calcolati sono risultati compresi tra 3.3% e 14%.

| concentrazione teorica di GLcN (ng/ml) | concentrazione media effettiva di GLcN (ng/ml) | % RSD |
|---|---|--------------|
| intra-saggio | | |
| 10.0 | 11 | 9.6 |
| 100.0 | 97 | 4.1 |
| 800.0 | 800 | 4.6 |
| inter-saggio | | |
| 10.0 | 10 | 14 |
| 100.0 | 100 | 5.3 |
| 800.0 | 790 | 4.3 |
| valori intra-saggio per campioni diluiti 1:10 prima del saggio | | |
| 9000.0 | 8800 | 3.3 |

Tabella 3a: dati relativi alla ripetibilità, riproducibilità del metodo nel plasma (n=6 ripetute per ogni livello di concentrazione).

| concentrazione teorica di GLcN (ng/ml) | concentrazione media effettiva di GLcN (ng/ml) | % RSD |
|---|---|--------------|
| intra-saggio | | |
| 10.0 | 10 | 9.9 |
| 100.0 | 100 | 9.2 |
| 1000.0 | 990 | 9.4 |
| inter-saggio | | |
| 10.0 | 10 | 12 |
| 100.0 | 100 | 13 |
| 1000.0 | 1000 | 8.3 |
| valori intra-saggio per campioni diluiti 1:10 prima del saggio | | |
| 10000.0 | 9400 | 5.7 |

Tabella 3b: dati relativi alla ripetibilità, riproducibilità del metodo nel liquido sinoviale (n=6 ripetute per ogni livello di concentrazione).

Nel caso si disponga di matrici con concentrazioni di GLcN al di fuori della linearità, la riproducibilità viene determinata solo su campione biologico precedentemente diluito 1:10; anche in questa situazione, la precisione e l'accuratezza sono risultate paragonabili a quelle ottenute per le concentrazioni di GLcN all'interno dell'intervallo di calibrazione .

È stato ricavato il LOQ secondo i criteri riportati nella guidance for industry [19], utilizzando la relazione matematica $10 \sigma/S$, dove σ è la deviazione standard e S la pendenza della curva di calibrazione.

Il valore ottenuto è 10 ng/ml per entrambe le matrici, con una RSD di 14% per il plasma e di 12% per il liquido sinoviale.

È stato poi ricavato un altro parametro necessario ai fini della caratterizzazione completa del metodo, ovvero il LOD, che nel nostro caso equivale a circa 5 ng/ml di GLcN.

4.4 Efficienza del metodo

L'efficienza del metodo è stata misurata mediante la valutazione del recupero calcolato come il rapporto fra aree dei picchi ottenuti per i QC con quelli delle soluzioni standard di GLcN in tampone ai medesimi valori di concentrazione.

I risultati, riassunti in tabella 4a per il plasma e 4b per il liquido sinoviale, indicano una buona efficienza dell'intero processo.

| concentrazione GLcN (ng/ml) | Rapporto medio dell'area in estratti di plasma (% RSD) | rapporto medio dell'area in soluzione (% RSD) | % recupero |
|------------------------------------|---|--|-------------------|
| 10.0 | 0.0449 (8.4) | 0.0418 (9.1) | 108 |
| 100.0 | 0.321 (4.4) | 0.334 (5.1) | 96 |
| 800.0 | 2.64 (4.2) | 2.61 (3.1) | 101 |

Tabella 4a: risultati relativi all'efficienza del processo analitico derivati da sei esperimenti indipendenti e calcolati dai QC di campioni ottenuti fortificando soluzioni standard di GLcN in plasma con concentrazioni inferiori al LOD del metodo (n=6 ripetute per ogni livello di concentrazione).

| concentrazione GLcN (ng/ml) | rapporto medio dell'area in estratti di liquido sinoviale (% RSD) | rapporto medio dell'area in soluzione (% RSD) | % recupero |
|------------------------------------|--|--|-------------------|
| 10.0 | 1.05 (0.89) | 1.09 (4.99) | 97 |
| 100.0 | 1.49 (1.60) | 1.59 (3.09) | 94 |
| 800.0 | 5.34 (3.68) | 5.36 (2.12) | 100 |

Tabella 4b: risultati relativi all'efficienza del processo analitico derivati da sei esperimenti indipendenti e calcolati dai QC di campioni ottenuti fortificando soluzioni standard di GLcN in liquido sinoviale con concentrazioni inferiori al LOD del metodo (n=6 ripetute per ogni livello di concentrazione).

I recuperi della GLcN oscillano tra il 96% e il 108%, con una media del 102±6% per il plasma e tra il 94% e il 100%, con una media del

97±3% per il liquido sinoviale, valori che confermano l'efficacia dell'estrazione del plasma con il solo agente precipitante.

È stata effettuata una stima del recupero totale della ¹³C-GLcN, confrontando le aree del picco dello standard interno nella matrice biologica con le soluzioni standard di ¹³C-GLcN nella fase mobile alla concentrazione impiegata per fortificare i campioni, ovvero 250 ng/ml.

È stato trovato che il recupero assoluto dello IS equivale a 97%±5%, che dimostra l'assenza di un effetto matrice significativo a livello della ionizzazione in sorgente.

4.5 Stabilità del plasma, del liquido sinoviale e dei campioni trattati

Ai fini dell'affidabilità dello studio, è stata valutata la stabilità della matrice biologica e dei campioni trattati in seguito a conservazione a -20°C e all'interno dell'autocampionatore.

Per le soluzioni madre (stock solution) di GLcN, i campioni di plasma e liquido sinoviale fortificati con il farmaco e gli estratti mantenuti a temperatura ambiente per periodi superiori alle 24 ore sono state valutate eventuali diminuzioni della concentrazione misurata di analita e degradazione dell'analita con conseguente cambiamento nella separazione cromatografica.

La conservazione dei campioni trattati di plasma umano a -20°C ha assicurato stabilità per un periodo di almeno quattro mesi e per non più di tre cicli di congelamento-scongelo.

5. APPLICAZIONE DEL METODO

5.1 Determinazione della biodisponibilità e della farmacocinetica di GLcN solfato in plasma umano dopo somministrazione singola e ripetuta di farmaco [26].

Il metodo HPLC–ESI–MS/MS sviluppato è stato utilizzato per la valutazione della concentrazione della GLcN nel plasma ottenuto da 12 volontari (5 donne e 7 uomini dall'età media di 25.9 ± 4.3) reclutati per gli studi di biodisponibilità di tale farmaco assunto per *os*.

I soggetti, per potere prendere parte allo studio, sono stati preventivamente sottoposti ad accertamenti medici volti a garantirne lo stato di buona salute e l'idoneità; ed una volta venuti a conoscenza del protocollo sperimentale approvato dal Comitato Etico dell'Università G. D'Annunzio di Chieti, hanno sottoscritto la loro adesione secondo la formula del Consenso Informato.

Il protocollo sperimentale per la valutazione del profilo farmacocinetico ha previsto la somministrazione giornaliera ai volontari reclutati di una dose singola o tre consecutive (dose ripetuta) di 1880 mg di GLcN solfato cristallina, equivalente a 1500 mg di principio attivo presente sotto forma di polvere solubile (fig 9).

In seguito alla somministrazione del farmaco sono stati raccolti campioni di plasma dopo 48 h dall'assunzione [26].

Per poter determinare la concentrazione di GLcN nel plasma, è stato necessario considerare il contributo endogeno dell'amminozucchero, sottraendo la concentrazione basale di GLcN, misurata prima della sua somministrazione, da quelle misurate nei campioni ottenuti dai volontari dopo trattamento.

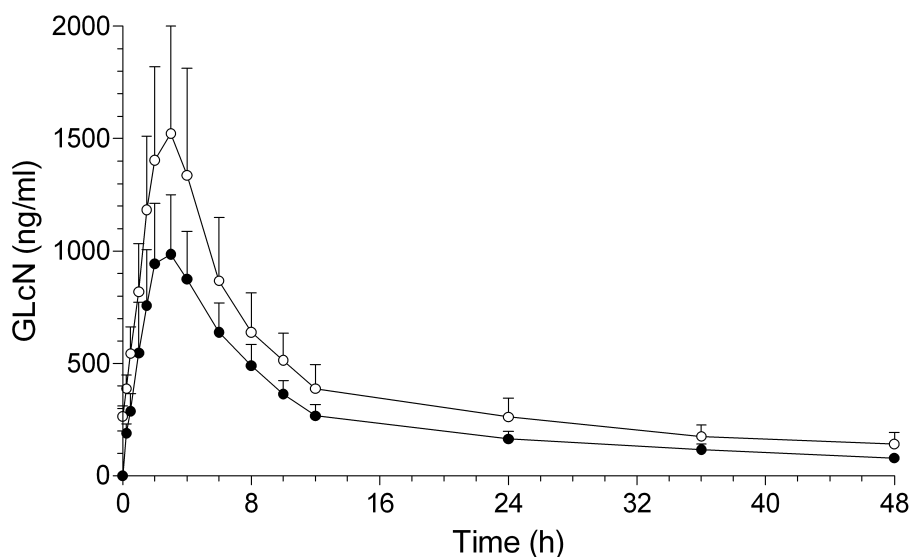


Figura 9: profilo farmacocinetico della concentrazione della glucosamina in plasma misurata in dodici volontari sani dopo somministrazione per via orale di dose singola (●) e ripetuta (○) di 1500 mg di glucosamina solfato.

5.2 Determinazione dei livelli di GLcN in plasma e liquido sinoviale umano dopo somministrazione giornaliera di GLcN solfato [27].

Il metodo HPLC–ESI–MS/MS sviluppato è stato utilizzato per la valutazione della concentrazione della GLcN nel liquido sinoviale ottenuto da 12 volontari con osteoartrosi (6 maschi e 6 femmine) reclutati per gli studi di biodisponibilità di tale farmaco assunto per *os*. I soggetti, per potere prendere parte allo studio, sono stati preventivamente sottoposti ad accertamenti medici volti a garantirne lo stato della patologia; ed una volta venuti a conoscenza del protocollo sperimentale approvato dal Comitato Etico, hanno sottoscritto la loro adesione secondo la formula del Consenso Informato.

Il protocollo sperimentale per la valutazione della concentrazione della GLcN in plasma e liquido sinoviale ha previsto la

somministrazione giornaliera ai volontari reclutati di una dose giornaliera di 1880 mg di GLcN solfato cristallina, equivalente a 1500 mg di principio attivo presente sotto forma di polvere solubile (tab 5) per un periodo di 14 giorni (dose terapeutica).

In seguito alla somministrazione del farmaco sono stati raccolti campioni di liquido sinoviale e plasma dopo 3 ore dall'ultima assunzione.

Per poter determinare la concentrazione di GLcN nel liquido sinoviale e nel plasma, è stato necessario considerare il contributo endogeno dell'amminozucchero, sottraendo la concentrazione basale di GLcN, misurata prima della sua somministrazione, da quelle misurate nei campioni ottenuti dai volontari dopo trattamento.

| Randomizzazione nro | Età (anni) | Altezza (cm) | Peso (kg) | BMI (kg/m²) |
|----------------------------|-------------------|---------------------|------------------|-------------------------------|
| Femmine | | | | |
| 2 | 57 | 155 | 54 | 22.5 |
| 3 | 64 | 168 | 67 | 23.8 |
| 7 | 47 | 163 | 75 | 28.2 |
| 8 | 49 | 160 | 95 | 37.1 |
| 10 | 49 | 163 | 64 | 24.1 |
| 12 | 81 | 150 | 60 | 26.7 |
| Media | 53 | 161.5 | 65.5 | 25.4 |
| Range | 47-81 | 150-168 | 54-95 | 22.5-37.1 |
| Maschi | | | | |
| 1 | 48 | 180 | 85 | 26.2 |
| 4 | 61 | 172 | 76 | 26.0 |
| 5 | 65 | 178 | 105 | 33.1 |
| 6 | 56 | 174 | 92 | 30.4 |
| 9 | 25 | 178 | 78 | 24.7 |
| 11 | 61 | 168 | 91 | 32.2 |
| Media | 58.5 | 176 | 88 | 28.3 |
| Range | 25-65 | 168-180 | 76-105 | 22.5-33.1 |
| Media complessiva | 56.5 | 168 | 77 | 26.5 |
| Range complessivo | 25-81 | 150-180 | 54-105 | 22.5-37.1 |

Tabella 5: raggruppamento e randomizzazione dei 12 volontari dello studio.

Dopo somministrazione del farmaco per un periodo di 15 giorni, agli stessi soggetti è stata prelevata nuovamente una aliquota di liquido sinoviale e una di plasma, ottenendo i livelli di GLcN post trattamento.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 6 (concentrazioni basali) e in tabella 7 (concentrazioni post trattamento).

| Random. nro | PLASMA | | FLUIDO SINOVALE | | Rapporto Concentrazione Sinoviale/plasma x 100 |
|--------------------------|--------|-----------|-----------------|------------|--|
| | ng/mL | µM | ng/mL | µM | |
| Femmine | | | | | |
| 2 | 50 | 0.28 | <10 | <0.06 | >5 |
| 3 | 45 | 0.25 | 20 | 0.11 | 44 |
| 7 | 47 | 0.26 | 33 | 0.20 | 70 |
| 8 | 41 | 0.23 | 22 | 0.18 | 54 |
| 10 | 121 | 0.68 | 67 | 0.37 | 55 |
| 12 | 86 | 0.47 | 38 | 0.21 | 44 |
| Media | 48.5 | 0.27 | 27.5 | 0.19 | 49 |
| Range | 41-121 | 0.23-0.68 | <10-67 | <0.06-0.37 | >5-70 |
| Maschi | | | | | |
| 1 | 47 | 0.26 | <10 | <0.06 | >4.7 |
| 4 | 112 | 0.63 | 53 | 0.30 | 47 |
| 5 | 99 | 0.55 | 52 | 0.29 | 53 |
| 6 | 47 | 0.26 | 35 | 0.20 | 74 |
| 9 | 56 | 0.31 | 44 | 0.25 | 79 |
| 11 | 54 | 0.30 | 57 | 0.32 | 106 |
| Media | 55 | 0.31 | 48 | 0.27 | 64 |
| Range | 47-112 | 0.26-0.63 | <10-57 | <0.06-0.32 | >4.7-106 |
| Media complessiva | 52 | 0.29 | 36.5 | 0.21 | 54.5 |
| Range complessivo | 41-121 | 0.23-0.68 | <10-67 | <0.06-0.37 | >4.7-106 |

Tabella 6: livelli di GLcN basali determinati nel liquido sinoviale e nel plasma nei pazienti prima della somministrazione del farmaco

| Random. nro | PLASMA | | FLUIDO SINOVIALE | | Rapporto Concentrazione Sinov./plasma x 100 |
|--------------------------|---------------------|-----------|-------------------------|-----------|---|
| | ng/mL | μM | ng/mL | μM | |
| Femmine | | | | | |
| 2 | 600 (12) | 3.35 | 577 (>57.7) | 3.22 | 96 |
| 3 | 4061 (90) | 22.7 | 3248 (162) | 18.1 | 80 |
| 7 | 1401 (30) | 7.83 | 1093 (33) | 6.11 | 78 |
| 8 | 1309 (32) | 7.31 | 999 (45) | 5.58 | 76 |
| 10 | 1319 (11) | 7.37 | 672 (10) | 3.75 | 51 |
| 12 | 1025 (12) | 5.73 | 758 (20) | 4.23 | 74 |
| Media | 1314 (21) | 7.34 | 878.5 (39) | 4.91 | 77 |
| Range | 600-4061 (11-90) | 3.35-22.7 | 577-3248 (10-162) | 3.22-18.1 | 51-96 |
| Maschi | | | | | |
| 1 | 1896 (40) | 10.5 | 1978 (>197.8) | 11.1 | 104 |
| 4 | 914 (8) | 5.11 | 633 (12) | 3.54 | 69 |
| 5 | 993 (10) | 5.55 | 796 (15) | 4.45 | 80 |
| 6 | 1297 (28) | 7.25 | 808 (23) | 4.51 | 62 |
| 9 | 1267 (23) | 7.08 | 638 (15) | 3.56 | 50 |
| 11 | 968 (18) | 5.41 | 746 (13) | 4.17 | 77 |
| Media | 1130 (20.5) | 6.32 | 771 (15) | 4.31 | 73 |
| Range | 914-1896 (8-40) | 5.11-10.5 | 633-1978 (12->197.8) | 3.54-11.1 | 50-104 |
| Media complessiva | 1282 (20.5) | 7.17 | 777 (21.5) | 4.34 | 76.5 |
| Range complessivo | 600-4061 (8-90) | 3.35-22.7 | 577-3248 (10->197.8) | 3.22-18.1 | 50-104 |

Tabella 7: livelli di GLcN basali determinati nel liquido sinoviale e nel plasma nei pazienti dopo somministrazione del farmaco alla dose terapeutica (in parentesi viene riportato di quanto aumenta la concentrazione di GLcN).

Come risulta dalle precedenti tabelle 6 e 7, i livelli di GLcN subiscono un aumento a seguito della somministrazione, tanto nel plasma (raggiungendo gli stessi valori di T_{max} e di C_{max} osservati in studi precedenti, **26**) quanto nel liquido sinoviale.

Nella seguente figura viene riportato un grafico in cui si può notare come le concentrazioni di GLcN nel plasma e nel liquido sinoviale post trattamento siano correlate da una relazione lineare e descritte dall'equazione $y = 0.84 x - 115.6$ ($r = 0.96$).

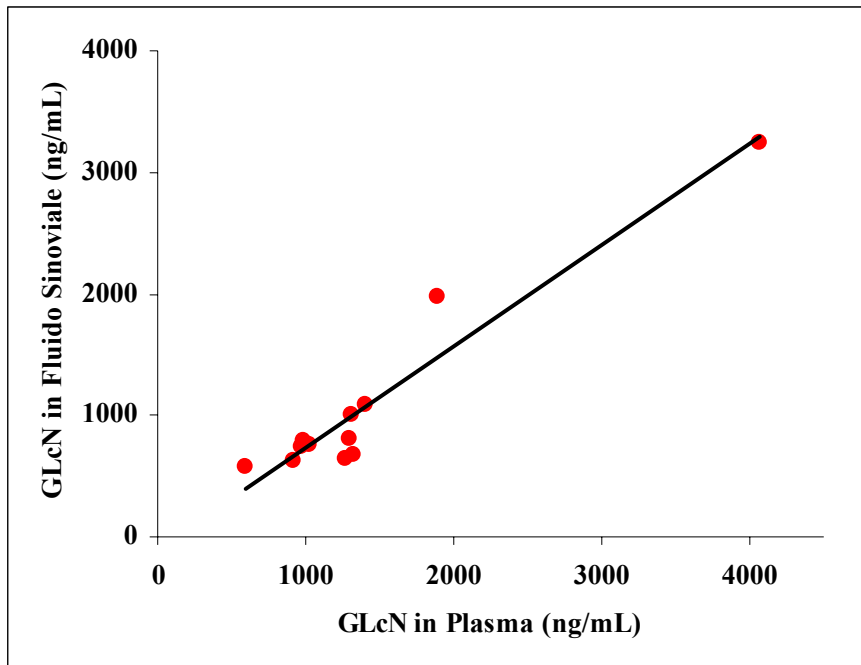


Figura 10: correlazione tra la concentrazione di GLcN in plasma e in fluido sinoviale alla fine del trattamento. La correlazione è lineare ed è descritta dalla relazione $y = (0.84 \pm 0.08) x + (-115.6 \pm 130)$ ($r = 0.96$).

Come si può osservare dalla precedente figura e dalla tabella 6 e 7, la concentrazione di GLcN nelle due matrici è confrontabile e dello stesso ordine di grandezza e ben rappresentata da una regressione lineare (intercetta non significativamente diversa da 0 e pendenza significativamente diversa da 1).

In studi precedenti [28], fatti su cavalli, era stato osservato che i livelli di GLcN nel liquido sinoviale erano fino al 90% più bassi rispetto a quelli plasmatici, nel nostro caso invece è stato osservato che non differiscono più del 25%, come viene dimostrato anche dalla pendenza della retta.

Il perché esista questa differenza tra le due matrici purtroppo però non è ancora noto.

6. CONCLUSIONI

Il metodo HPLC-ESI-MS/MS sviluppato per la determinazione quantitativa di GLcN in plasma e liquido sinoviale umano soddisfa pienamente tutti i requisiti analitici richiesti a livello regolatorio.

L'ottimizzazione della procedura di separazione cromatografica e dei parametri della rivelazione mediante spettrometria di massa ha permesso il raggiungimento di un valore di LOQ migliore rispetto a quelli precedentemente riportati in letteratura ed ottenuti con altri metodi analitici.

Ulteriori vantaggi di questo metodo consistono nei tempi ridotti di analisi, resi possibili dall'assenza di procedure di derivatizzazione preanalitiche, e dall'assenza di interferenze dovute a composti endogeni grazie all'elevata specificità della rivelazione mediante spettrometria di massa.

Il metodo è stato applicato con successo alla determinazione dei livelli basali di GLcN nel plasma umano ed alla valutazione dei profili farmacocinetici di GLcN a seguito della sua somministrazione per via orale come farmaco condroprotettivo in entrambe le matrici esaminate.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] Manek NJ. Medical management of osteoarthritis. Mayo Clinic Proceedings, 76 (2001) 533-539.

[2] Cramer P. Osteoarthritis pain and its treatment. Current opinion in Rheumatology, 12 (2000) 450-455.

[3] Gregory S. Kelly. The Role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative disease. Alt Med Rev, 3 (1998) 27-39.

[4] Sack KE. Osteoarthritis: a continuous challenge. West J Med 163 (1995) 579-86.

[5] Setnikar I. Antireactive properties of “chondroprotective” drugs. Int J Tissue React 14 (1992) 253-261.

[6] McAlidon TE, La Valley MP, Gulin JP, Felson DT. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and metanalysis. JAMA 283 (2000) 1469-75.

[7] Towheed TE, Maxwell L, Anastassiades TP, Shea B, Houpt J, Robinson V, Hochberg MC, Wells C. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. The Cochrane Database of Systematic Reviews 2005, Issue 2. Art. No.: CD002946. pub2. DOI: 10. 1002/14651858. CD002946.

[8] Setnikar I, Giacchetti C, Zanolio G. Pharmacokinetics of glucosamine in the dog and in the man. Arzneimittel forschr 36 (1986) 729-735.

- [9] Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 320 (1989) 1322-1330.
- [10] Dietary supplement. Health and education act of 1994, Pub L no 103-407 103rd congress 1994 Oct 25.
- [11] Russell RS, Aghazadeh-Habashi A, Jamali F. Active ingredient consistency of commercially available glucosamine sulfate products. *J Rheumatol* 29 (2002) 2407-2409
- [12] Deal CL, Moskovits RW. Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis: the role of glucosamine, chondroitin sulfates and collagen hydrolysate. *Rheum Dis Clin North Am* 25 (1999) 379-395.
- [13] McAlidon TE, La Valley MP, Gulin JP, Felson DT. Efficacy of glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis. *JAMA* 284 (2000) 1241.
- [14]. Qiu Xing G, Gao Neng S, Giacobelli G, Rovati L, Setnikar I. Efficacy and safety of glucosamine sulfate versus ibuprofen in patients with knee osteoarthritis. *Drug Research* 48 (1998) 469-474.
- [15] Sullivan C, Sherma J. Development and validation of an HPTLC-densitometry method for assay of glucosamine of different forms in dietary supplement tablets and capsules. *Acta Chromatographica* 15 (2005) 119-130.
- [16] Diaz J., Libera JL, Comellas L, Broto-Puig F. Amino acid and amino sugars determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by HPLC and fluorescence detection. *J. Chromatogr A* 719 (1996) 171-179.

- [17] Altman F. Determination of amino sugars and aminoacids in glycoconjugates using pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 204 (1992) 215-219.
- [18] Osswald WF, Jehle J, Firl J. Quantification of fungal infection in plant tissues by determining the glucosamine phenyl isothiocyanate derivative using HPLC techniques. *J. Plant Physiol* 145 (1995) 393-397.
- [19] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.
- [20] Kerwin JL, Whitney DL, Shekh A. Mass spectrometric profiling of glucosamina, glucosamina polymers and their catecholamine adducts-Model reactions and cuticular hydrolysates of *Toxothynchitesamboinensis* (Culicidae) pupae. *Insect Biochem Mol Biol*, 29 (1999) 599-607
- [21] Aghazadeh-Habashi A, Sattari S, Pasutto F, Jamali F. HPLC determination of glucosamine in rat plasma. *J Pharm Pharmaceut Sci* 5 (2002) 176-180
- [22] Zhang, X, Amelung W. Gas chromatographic determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine, and galactosorganics and microbes. *Soil Biol. Biochem*, 28 (1996)1201–1206.
- [23] Yu Y, Cai L, Zuo M, Duan G. Precolumn derivatization liquid chromatography with mass spectrometry assay for the determination of glucosamine in small volume human plasma. *Ann. Chim.* 95 (2005) 709-713.

[24] Huang TM, Cai L, Yang B, Man-Xiang Z, Yun-Fei S, Geng-Li D. Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the assay of glucosamine sulfate in human plasma: validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 251-256

[25] Aldo Roda, Laura Sabatini, Anna Barbieri, Massimo Guardigli, Marcello Locatelli, Francesco Saverio Violante, Lucio C. Rovati, Stefano Persiani. Development and validation of a sensitive HPLC–ESI-MS/MS method for the direct determination of glucosamine in human plasma, *J Chromatogr B* 844 (2006), 119-126.

[26] Persiani S, Roda E, Rovati LC, Locatelli M, Giacovelli G, Roda A. glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *OsteoArthritis and cartilage* 13 (2005) 1040-1049.

[27] Persiani S., R. Rotini, G. Trisolino, L. C. Rovati, M. Locatelli, D. Paganini and A. Roda, Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose, *Osteoarthritis Cartilage* (2007), doi:10.1016/j.joca.2007.01.019 (article in press).

[28] Laverty S, Sandy JD, Celeste C, Vachon P, Marier JF, Plaas AHK. Synovial fluid levels and serum pharmacokinetics in a large animal model following treatment with oral glucosamine at clinically relevant doses. *Arthritis Rheum* 2005;52(1):181e91.

ARTICOLI PUBBLICATI

Il capitolo III deriva dalla pubblicazione di 3 articoli su riviste con referee:

[1] Aldo Roda, Laura Sabatini, Anna Barbieri, Massimo Guardigli, Marcello Locatelli, Francesco Saverio Violante, Lucio C. Rovati, Stefano Persiani. Development and validation of a sensitive HPLC–ESI-MS/MS method for the direct determination of glucosamine in human plasma, *J Chromatogr B* 844 (2006), 119-126.

[2] Persiani S, Roda E, Rovati LC, Locatelli M, Giacobelli G, Roda A. glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *OsteoArthritis and cartilage* 13 (2005) 1040-1049.

[3] Persiani S., R. Rotini, G. Trisolino, L. C. Rovati, M. Locatelli, D. Paganini and A. Roda, Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose, *Osteoarthritis Cartilage* (2007), doi:10.1016/j.joca.2007.01.019 (article in press).

RINGRAZIAMENTI

Volevo ringraziare tutto il gruppo di ricerca del Prof. Aldo Roda e del Prof. Pierluigi Reschiglian per l'aiuto, il supporto e la pazienza che hanno dimostrato.

Un ringraziamento particolare va a tutte quelle persone che mi hanno sopportato e aiutato nel corso di questi tre anni, Prof. Guardigli, Dott.ssa Simoni, Andrea, Elisabetta, Daniela, Paolo, Elisa, Mara, Luisa Stella, Manuela e tutti i ragazzi che sono parte fondamentale di questo gruppo di ricerca estremamente valido.

Un ringraziamento particolare ai miei genitori e a mio fratello, che mi sono sempre stati vicini e che mi hanno permesso di raggiungere traguardi importanti.