

液相色谱-串联质谱法测定犬血浆中布地奈德

邓 泮^{1,2}, 段小涛^{1,2}, 陈笑艳¹, 李三鸣², 钟大放^{1*}

(1. 中国科学院 上海药物研究所, 上海 201203; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 建立液相色谱-串联质谱法测定犬血浆中布地奈德。血浆样品碱化后, 经乙酸乙酯液-液萃取, 以乙腈-5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵 (60:40, v/v) 为流动相, Capcell Pak C₁₈ MG 柱分离; 采用电喷雾电离源, 以多反应监测 (MRM) 方式进行负离子检测, 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 489→ m/z 357 (布地奈德) 和 m/z 493→ m/z 413 (内标, 曲安奈德)。测定血浆中布地奈德方法的线性范围为 25.0~2 000 pg·mL⁻¹, 定量下限为 25.0 pg·mL⁻¹, 日内、日间精密度的 (RSD) 均小于 15%, 准确度 (RE) 在 -8.1%~ -1.7%。应用本法研究 6 只比格犬单次和多次给予布地奈德缓释胶囊 9 mg 后的药代动力学结果显示: 单次给药后 T_{max} 为 (3.5±3.3) h, C_{max} 为 (786±498) pg·mL⁻¹; 多次给药后 C_{max} 为 (2 142±1 515) pg·mL⁻¹。该法选择性强、灵敏度高、操作简便, 适用于布地奈德缓释制剂的药代动力学研究。

关键词: 布地奈德; 缓释制剂; 液相色谱-串联质谱法; 药代动力学

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2008)01-0076-05

LC-MS/MS determination of budesonide in dog plasma

DENG Pan^{1,2}, DUAN Xiao-tao^{1,2}, CHEN Xiao-yan¹, LI San-ming², ZHONG Da-fang^{1*}

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method was developed for the determination of budesonide in dog plasma. Budesonide and the internal standard triamcinolone acetonide were separated from plasma by alkalized liquid-liquid extraction with ethyl acetate. Chromatographic separation was performed on a Capcell Pak C₁₈ MG column with the mobile phase consisted of acetonitrile - 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (60:40, v/v) at a flow-rate of 0.50 mL·min⁻¹. A tandem mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and operated in the negative ion mode. Quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the transitions m/z 489 → m/z 357 and m/z 493 → m/z 413 for budesonide and the internal standard, respectively. The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 25.0 - 2 000 pg·mL⁻¹. The lower limit of quantification was 25.0 pg·mL⁻¹. The intra- and inter-day relative standard deviation over the entire concentration range was less than 15%. The accuracy was in the range of -8.1% to -1.7% in terms of relative error. The method was applied to a pharmacokinetic study of budesonide controlled-release capsules in Beagle dogs. Maximal budesonide plasma level was observed after (3.5±3.3) h and the C_{max} was (786±498) pg·mL⁻¹ after a single oral administration of 9 mg budesonide capsules, C_{max} was increased to (2 142±1 515) pg·mL⁻¹ after multiple oral administration (9 mg × 5 d) of budesonide capsules. This method was selective and rapid, and the sensitivity was sufficient for the purpose of the pharmacokinetic study of budesonide controlled-release formulation.

Key words: budesonide; controlled-release formulation; LC-MS/MS; pharmacokinetics

收稿日期: 2007-07-18.

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50800738, E-mail: dfzhong@mail.shnc.ac.cn

布地奈德(budesonide)是一种具有高效局部抗炎作用的糖皮质激素^[1]。由于其对糖皮质激素受体的高度亲和力及显著的首过效应^[2],布地奈德全身性不良反应较小,多用于哮喘治疗中的呼吸道给药以及溃疡性结肠炎的肠道靶向给药^[3]。在对溃疡性结肠炎的治疗中,开发了多种新型布地奈德肠道靶向制剂^[4-6],进一步提高疗效,降低不良反应。文献^[7]报道,比格犬口服布地奈德 $9.89 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后吸收迅速,血药浓度在1 h之内达峰,且 C_{max} 低于 $430 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,因此对布地奈德新剂型的药代动力学研究要求分析方法具有较高的灵敏度。

测定生物样品中布地奈德的方法有HPLC-UV法^[7]以及放射免疫法^[8],这些分析方法易受到内源性皮质激素及布地奈德代谢物干扰,选择性欠佳。目前已有文献^[9-12]报道采用液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)测定生物样品中布地奈德的浓度。其中Qu等^[9]建立了毛细管色谱串联质谱法测定血浆中布地奈德,定量下限为 $5 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;Kronkvist等^[10]建立的LC-MS/MS法定量下限为 $6.45 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这两种方法均采用梯度色谱分离;其他LC-MS/MS方法的定量下限均高于 $100 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[11,12]。本实验旨在建立一种灵敏、操作简便的LC-MS/MS法,测定布地奈德血浆浓度,并用于布地奈德缓释制剂的药代动力学研究。

材料与amp;方法

仪器 美国Agilent 1100液相色谱系统(包括G1311A型四元输液泵,G1367A型自动进样器,G1316A型柱温箱和G1379A型脱气机);API 4000型液相色谱-串联质谱联用仪,配有电喷雾电离源(ESI)以及Analyst 1.4.1数据处理系统,美国Applied Biosystems公司;TurboVap蒸发器,美国Zymark公司;Milli-Q Gradient超纯水系统,法国Millipore公司。

药品与试剂 布地奈德对照品(纯度99.6%)及曲安奈德对照品(纯度99.7%)由复旦大学药学院提供;布地奈德缓释胶囊(Entocort EC,3 mg,批号MT0036),AstraZeneca公司;空白犬血浆由上海药物研究所实验动物中心提供。

色谱条件 色谱柱为Capcell Pak C₁₈ MG柱(100 mm × 4.6 mm ID, 5 μm,日本资生堂公司);预柱为C₁₈柱(4 mm × 3.0 mm ID, 5 μm,美国Phenomenex公司);流动相为乙腈-5 mmol · L⁻¹醋酸铵(60:40, v/v);流速为 $0.50 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样

量为 $20 \mu\text{L}$;柱温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

质谱条件 电喷雾电离源(ESI源);源喷射电压为 -3.8kV ,温度为 $450 \text{ }^\circ\text{C}$,离子源气体1(N₂)压力为 414kPa ,离子源气体2(N₂)压力为 414kPa ,气帘气体(N₂)压力 69kPa ;碰撞气压力为 20.7kPa ;负离子方式检测;去簇电压(DP)为 -40V ;扫描方式为多反应监测(MRM),用于定量分析的离子反应分别为 $m/z 489 \rightarrow m/z 357$ (布地奈德)和 $m/z 493 \rightarrow m/z 413$ (内标,曲安奈德);扫描时间为 0.2s 。碰撞能量分别为 -19eV (布地奈德)和 -28eV (内标,曲安奈德)。

血浆样品处理 在血浆 $500 \mu\text{L}$ 中分别加入内标溶液($400 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 曲安奈德甲醇溶液) $100 \mu\text{L}$ 和 $1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂CO₃溶液 $200 \mu\text{L}$,混匀,加乙酸乙酯 4mL ,涡流混合 1min ,往复振荡 15min (240次/分),离心 5min ($3500 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)。取上层有机相于另一试管中,于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 空气流下吹干,残留物加入流动相 $150 \mu\text{L}$ 溶解,涡流混合,取 $20 \mu\text{L}$ 进行LC-MS/MS分析。

药代动力学实验方法 成年雄性比格犬6只,体重为 $10 \sim 12 \text{kg}$ (苏州动物实验研究中心)。6只比格犬连续给药5天,每天1次,晨7时口服布地奈德缓释胶囊剂Entocort EC(3粒),于给药第1天及给药后第5天按以下时间点采血:服药前和服药后 $0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10、14$ 和 24h (多次给药采血至 48h)由后腿静脉采血 2mL 。于第3天和第4天给药前各采血 2mL 。血样取出后立即移入涂有肝素的试管内,离心($3500 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10min ,移取上层血浆,冷冻保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中至测定。

结果

1 质谱分析

在选定的色谱条件中,布地奈德和内标曲安奈德在ESI负离子电离方式下,主要生成 $[\text{M} + \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}]^-$ 的溶剂加合离子峰,分别为 m/z : 489和493。选择性对 $[\text{M} + \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}]^-$ 峰进行产物离子全扫描质谱分析(图1),布地奈德和内标曲安奈德生成的主要碎片离子分别为 m/z : 357和413,将其作为多反应监测(MRM)扫描时监测的产物离子。

2 方法的专属性

分别取6只犬的空白血浆 $500 \mu\text{L}$,除不加内标溶液外,按“血浆样品处理”项下操作,取 $20 \mu\text{L}$ 进

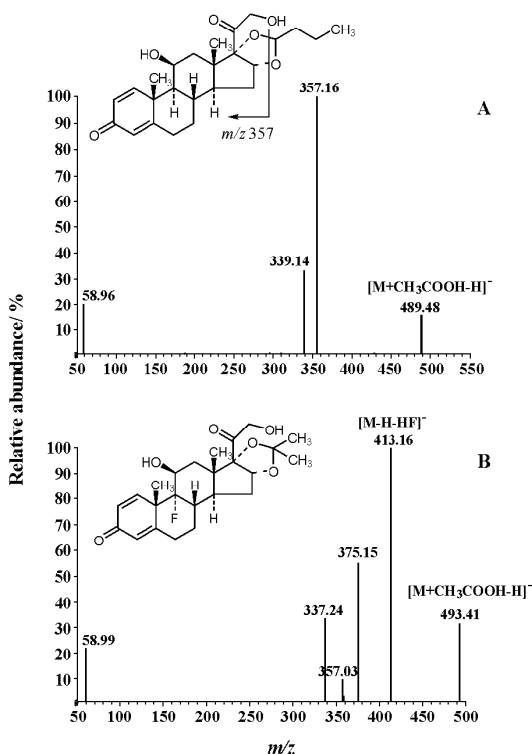


Figure 1 Full scan product ion spectra of $[M + \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}]^-$ of budesonide (A) and triamcinolone acetonide (B)

样分析,得典型色谱图 2A;将一定浓度的对照溶液吹干后加入内标溶液和空白血浆,依同法操作,得色谱图 2B。布地奈德和内标曲安奈德的保留时间分别为 4.1 和 3.1 min。取犬口服给药后的血浆样品,依同法操作,得色谱图 2C。结果表明,空白血浆中的内源性物质不干扰布地奈德和内标曲安奈德的测定。

3 线性范围和定量下限

系列对照溶液 50 μL 在空气流下吹干后加入空白血浆 500 μL , 配制成相当于布地奈德血浆质量浓度分别为 25.0、50.0、100、250、500、1 000 和 2 000 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,按“血浆样品处理”项下操作,建立布地奈德的标准曲线。以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权 ($w = 1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程即为标准曲线。布地奈德的典型回归方程为 $y = 1.49 \times 10^{-5} + 2.37 \times 10^{-4}x$, $r = 0.9957$ 。

布地奈德血浆质量浓度为 25.0 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品在方法确证第 1 天进行 6 样本分析,并根据当日标准曲线求得每一样本测定浓度,求得该浓度下的

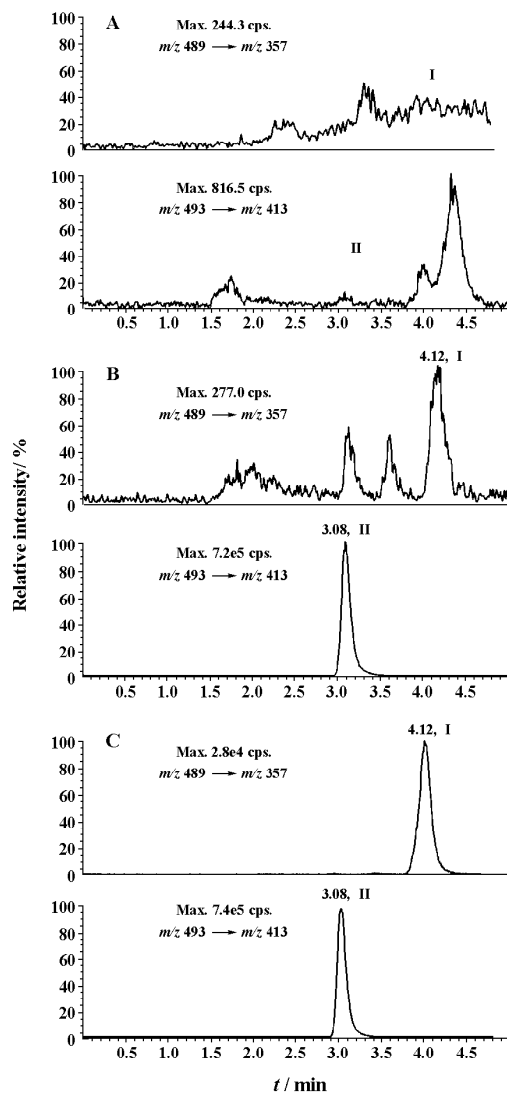


Figure 2 Typical chromatograms of budesonide and triamcinolone acetonide (IS) in dog plasma by multiple reaction monitoring (MRM) scan mode. A; Blank plasma sample; B; Blank plasma spiked with budesonide at 25.0 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and triamcinolone acetonide (IS) at 80.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; C; Plasma sample obtained at 6.0 h after a single oral administration of 9 mg budesonide to a Beagle dog. Peaks I and II refer to budesonide and triamcinolone acetonide, respectively

布地奈德日内精密度 (RSD) 为 10.2%, 准确度 (RE) 为 6.1%, 该结果表明此方法下布地奈德的定量下限可达到 25.0 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4 精密度与准确度

取空白血浆 500 μL , 按“标准曲线和定量下限”项下的方法配制低、中、高等 3 个质量浓度 (布地奈

德质量浓度分别为 50.0、400 和 1 800 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质量控制(QC)样品,每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 天,根据当日的标准曲线,计算 QC 样品的测得浓度。将 QC 样品的结果进行方差分析,计算方法的准确度与精密度,结果见表 1。在 3 种浓度下,布地奈德 QC 样品的日内精密度(RSD)均小于 9.3%,日间精密度(RSD)均小于 14.5%,准确度(RE)在 -8.1% ~ -1.7% 之间。

Table 1 Precision and accuracy for the analysis of budesonide in dog plasma

Concentration/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$		RSD/%		RE/%
Added	Found	Intra-day	Inter-day	
50.0	49.2	7.9	14.1	-1.7
400	393	8.2	14.5	-1.7
1 800	1 654	9.3	8.9	-8.1

考察稀释 QC 样品的精密度和准确度。配制质量浓度为 18.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,以犬空白血浆稀释 10 倍至血浆浓度为 1 800 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,得到稀释 QC 样品,进行 3 样本分析,并根据当日标准曲线计算稀释 QC 样品的测定浓度,求得布地奈德稀释 QC 样品的日内精密度(RSD)为 10.4%,准确度(RE)为 2.0%。

5 回收率、基质效应和稳定性考察

考察了布地奈德低、中、高 3 个浓度(布地奈德血浆质量浓度分别为 50.0、400 和 1 800 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)下的提取回收率($n=6$),以各待测物血浆样品液-液萃取后的色谱峰面积,与空白血浆经液-液萃取后加入相应浓度的布地奈德和内标溶液获得的色谱峰面积之比,计算回收率。布地奈德低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 81.8%、78.0% 和 80.2%,内标的提取回收率为 81.3%。

分别取 6 只犬的空白血浆 500 μL ,经液-液萃取处理后,以布地奈德和内标曲安奈德混合溶液溶解,布地奈德溶液质量浓度为 50.0、400 和 1 800 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,内标溶液质量浓度为 80.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,进行 LC-MS/MS 分析获得峰面积,与混合溶液直接进样获得峰面积之比评价基质效应,比值均在 90% ~ 110%,表明本文的 LC-MS/MS 条件可有效避免犬血浆基质效应。

考察了布地奈德低、高两个浓度的血浆样品(布地奈德血浆质量浓度分别为 50.0 和 1 800 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)在不同保存条件下的稳定性($n=3$)。结果表明,布地奈德血浆样品室温放置 2 h 稳定(RE

在 4.0% ~ -4.8%),预处理后的血浆样品室温放置 12 h 稳定(RE 在 -6.9% ~ 5.6%),血浆样品经历 3 次冷冻解冻循环稳定(RE 在 -6.1% ~ -1.1%),血浆样品 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 周稳定(RE 在 5.4% ~ 0.3%)。

6 犬血浆样品测试

未知血浆样品测定按“血浆样品处理”项下操作,每天建立 1 条标准曲线,同时分析低、中、高(双样本或三样本)的 QC 样品,根据当日标准曲线求算未知样品浓度和 QC 样品浓度,至少 67% QC 样品的相对偏差在 $\pm 15\%$ 之内,且 33% 的不是同一浓度的 QC 样品相对偏差可以超出 $\pm 15\%$,当日数据方可接受。浓度超过定量上限的血浆样品,将样品以空白血浆稀释后重新测定。

7 分析方法在药代动力学研究中的应用

在临床前药代动力学研究中,6 只比格犬单次和多次口服布地奈德缓释胶囊剂 Entocort EC(含布地奈德 9 mg)后,平均血药浓度时间曲线见图 3。文献^[7]报道,比格犬口服布地奈德溶液胶囊剂后 T_{\max} 约为 1.0 h,本实验测得比格犬单次口服布地奈德缓释胶囊后 T_{\max} 为 (3.5 ± 3.3) h,表明该制剂具有一定的缓释性。与单次给药 [C_{\max} 为 (786 ± 498) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$]相比,比格犬多次口服奈德缓释胶囊剂后, AUC 及 C_{\max} ($2 142 \pm 1 515$) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 均明显增加。

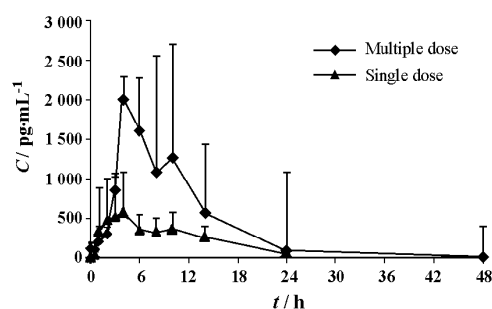


Figure 3 Mean plasma concentration (C)-time (t) curves of budesonide after single or multiple oral administration of controlled-release capsules containing 9 mg budesonide to 6 Beagle dogs

讨论

目前已有文献报道 LC-MS/MS 法测定血浆中布地奈德,其中 Qu 等^[9]使用 ESI 电离源,在正离子检测方式下选择脱水离子(m/z 431 \rightarrow m/z 413)作为定量分析时监测的产物离子;Wang 等^[11]采用 ESI 电离源,在负离子检测方式下,监测 m/z 489.4 \rightarrow m/z

357.3 的离子反应; Kronkvist 等^[10] 则采用 APCI 电离源, 监测 m/z 489.6 \rightarrow m/z 357.2 的离子反应。

本实验曾尝试布地奈德在不同离子源下的质谱响应, 结果表明在 ESI 源下的响应较 APCI 源更佳。在 ESI 源正离子检测方式下, 布地奈德的基峰离子为 $[M + H]^+$, 但同时也生成峰强度较高的金属加合离子, 选择性地对 $[M + H]^+$ 进行产物离子全扫描质谱分析, 主要生成脱水碎片离子 m/z 413, 该离子背景噪音较高; 选择性地对 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 进行产物离子全扫描质谱分析时, 该金属加合离子不易获得碎片离子。在负离子检测模式下, 布地奈德和内标曲安奈德主要生成溶剂加合离子 $[M + CH_3COOH - H]^-$, 选择性地对此加合离子进行产物离子全扫描质谱分析, 布地奈德的主要碎片离子为脱去乙缩醛侧链生成的 m/z 357 的离子, 曲安奈德的主要碎片离子为脱去 HF 生成 m/z 413 的离子。在含有醋酸铵缓冲液的流动相体系中, 此加合离子响应较强且稳定, 因此最终采用 ESI 负离子模式, 选择背景噪音低的 m/z 489 \rightarrow m/z 357 作为布地奈德定量分析的离子反应, 定量下限可达到 $25.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

在优化色谱条件时, 使用 C_{18} 色谱柱, 尝试甲醇-水(90:10, v/v)和乙腈-水(90:10, v/v)为流动相, 在流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下, 布地奈德的保留时间分别为 8.53 和 2.79 min。为获得适宜的色谱保留时间, 最终选用乙腈-5 mmol \cdot L⁻¹ 醋酸铵(60:40, v/v)为流动相, 布地奈德和内标曲安奈德的保留时间分别为 4.12 和 3.08 min。

文献报道的布地奈德血浆样品预处理方法包括固相萃取法^[9-11]和液-液萃取法^[12]。本实验在文献^[12]的基础上建立了以乙酸乙酯为提取溶剂的液-液萃取法, 血浆用量为 500 μL , 待测物和内标的提取回收率高且稳定, 分别为 80.0% 和 81.3%。

结论

本研究建立的 LC-MS/MS 法灵敏度高, 选择性强, 操作简便, 血浆用量小, 适用于布地奈德缓释制剂的药代动力学研究, 也为其他糖皮质激素类药物的生物样品分析提供了参考。

致谢: 复旦大学药学院裴元英教授惠赠布地奈德、曲安奈德对照品以及布地奈德缓释胶囊制剂。

References

[1] Seibold F, Wagner AC, Goke B, et al. Drug treatment of

chronic inflammatory bowel diseases: current status and prospects [J]. Schweiz Med Wochenschr, 2000, 130: 222 - 223.

- [2] Edsbacker S, Andersson P, Lindberg C, et al. Liver metabolism of budesonide in rat, mouse, and man. Comparative aspects [J]. Drug Metab Dispos, 1987, 15: 403 - 411.
- [3] Greenberg GR. Budesonide for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. Can J Gastroenterol, 1994, 8: 369 - 372.
- [4] Krishnamachari Y, Madan P, Lin SS. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon [J]. Int J Pharm, 2007, 338: 238 - 247.
- [5] Liu Y, Zhang JS, Hu LS. Study on the preparation and drug release of controlled-release micropellets for budesonide colon specific deliver [J]. J Chin Pharm Univ (中国药科大学学报), 2003, 34: 419 - 422.
- [6] Cui JH, Yan YD, Guo JP, et al. Studies on the preparation and release *in vitro* of budesonide pulsatile controlled-release tablet for colon-specific deliver [J]. Pharm J Chin PLA (解放军药学报), 2004, 20: 418 - 419.
- [7] Ryrfeldt A, Tonnesson M, Nilsson E, et al. Pharmacokinetic studies of a potent glucocorticoid (budesonide) in dogs by high-performance liquid chromatography [J]. J Steroid Biochem, 1979, 10: 317 - 324.
- [8] Hochhaus G, Fröhlich P, Hochhaus R, et al. A selective HPLC/RIA for the determination of budesonide [J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 17: 1235 - 1242.
- [9] Qu J, Qu Y, Straubinger RM. Ultra-sensitive quantification of corticosteroids in plasma samples using selective solid-phase extraction and reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2007, 79: 3786 - 3793.
- [10] Kronkvist K, Gustavsson M, Wendel AK, et al. Automated sample preparation for the determination of budesonide in plasma samples by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 1998, 823: 401 - 409.
- [11] Wang YN, Tang YF, Moellmann H, et al. Simultaneous quantification of budesonide and its two metabolites, 6 β -hydrobudesonide and 16 α -hydroxyprednisolone in human plasma by liquid chromatography negative electrospray ionization tandem mass spectrometry? [J]. Biomed Chromatogr, 2003, 17: 158 - 164.
- [12] Deventer K, Mikulčíková P, Van Hoecke H, et al. Detection of budesonide in human urine after inhalation by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 42: 474 - 479.