

液相色谱-质谱联用法鉴定 9 种皮质激素药物

郭继芬, 钟大放*, 陈笑艳

(沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 沈阳 110015)

摘要 目的:建立皮质激素的液相色谱-质谱分析方法,为限制药物滥用提供检测手段。方法:采用 RP-HPLC-UV-MS 联用法,同时对 9 种皮质激素进行色谱分离及质谱鉴定,利用质谱解析软件研究了该类化合物的质谱裂解规律,并应用本法鉴定了药物制剂、送检物及尿样中的皮质激素。结果:在正离子检测方式下,9 种皮质激素的质谱断裂方式存在共性,即对于含有氟的分子,二级质谱优先脱去 HF;含有醋酸酯的分子,二级质谱易产生脱 CH_3COOH 的特征碎片离子。每种化合物的检测限约为 6 ng。结论:本法可用于皮质激素的体外、体内定性分析。

关键词 液相色谱-质谱联用法;皮质激素;电喷雾离子阱质谱

皮质激素类药物广泛应用于临床,但由于滥用而导致医源性疾病时有发生。近来发现在一些中药或化妆品中非法掺有大量皮质激素,严重危及人们健康,因此有必要建立快速、灵敏、专属的方法来鉴定此类药物。

此类药物常用的分析方法有放射免疫测定法(RIA)^[1-3]、HPLC-UV 法^[4-9]、HPLC-荧光法^[10]、GC/MS 法^[11-13]等。RIA 法的灵敏度较高,但所用抗体缺乏专属性,能和其他结构类似的物质发生反应,往往使结果偏高,而且不能进行定性分析。通常的 HPLC-UV 法无法区分相互重叠的色谱峰,同时检测多种皮质激素时,色谱分离难度很大,单独依靠色谱行为不能进行可靠的定性分析。GC/MS 法虽可给出能用于定性分析的分子量及碎片离子信息,但由于该类药物分子量较大不易挥发, C_{17} 侧链热不稳定^[12],高温下可能降解,往往需先衍生化以增加其稳定性,给测定带来一些麻烦。本文建立了快速鉴定皮质激素类药物的 RP-HPLC-UV-MS 法。

实 验 部 分

1 仪器和材料

美国 Finnigan 公司 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪,配有 ESI(电喷雾离子化)源以及 LCQ 1.2 数据处理系统;美国 HP 公司 HP1100 四元泵、紫外检测器和自动进样器;斯洛伐克 Highchem 公司 Mass

Frontier 1.0 质谱解析软件。

醋酸地塞米松(dexamethasone acetate)、醋酸泼尼松(prednisone acetate)、氢化泼尼松(prednisolone)、氢化可的松(hydrocortisone)、醋酸可的松(cortisone acetate)、醋酸氢化可的松(hydrocortisone acetate)、 17α -羟基醋酸去氧皮质酮(17α -hydroxydeoxycorticosterone acetate)、醋酸氟轻松(fluciclonide acetate)、醋酸曲安奈德(triamcinolone acetonide acetate)对照品由中国药品生物制品检定所提供,结构式见图 1。

醋酸地塞米松片、醋酸泼尼松片、醋酸可的松滴眼液、醋酸氟轻松软膏、皮康霜软膏(含有醋酸曲安奈德)、氢化可的松注射液均为市售品。甲醇为色谱纯,其他化学试剂均为分析纯。

2 对照品溶液的配制及待测药物的前处理

2.1 对照品溶液配制 精密称取各对照品用甲醇配制成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备溶液,再依次稀释为 $2, 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $300 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液;取各对照品的储备溶液 1 mL,用色谱流动相配制成含各药物 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液。

2.2 药物制剂的处理 醋酸地塞米松片用丙酮提取后,过滤,取续滤液于 40°C 下氮气吹干,残余物用甲醇溶解后进行 HPLC/MSⁿ 分析;醋酸泼尼松片、醋酸可的松滴眼液用二氯甲烷提取后,过滤,其余操作同上;醋酸氟轻松软膏、皮康霜软膏用甲醇破乳提取后,过滤,其余操作同上;氢化可的松注射液用甲醇稀释后直接进行 HPLC/MSⁿ 分析。

2.3 送检物的处理 取送检物 0.5 mL(某治疗支气管哮喘的“纯中药制剂”氯仿提取液)置 37°C 下氮气吹干,残余物用甲醇 1 mL 溶解,用于 HPLC/MSⁿ

收稿日期:1999-04-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39625025)

*联系人 Tel:(024) 23843711 - 3445, Fax:(024) 23911119, E-mail:zhongdf@ihw.com.cn

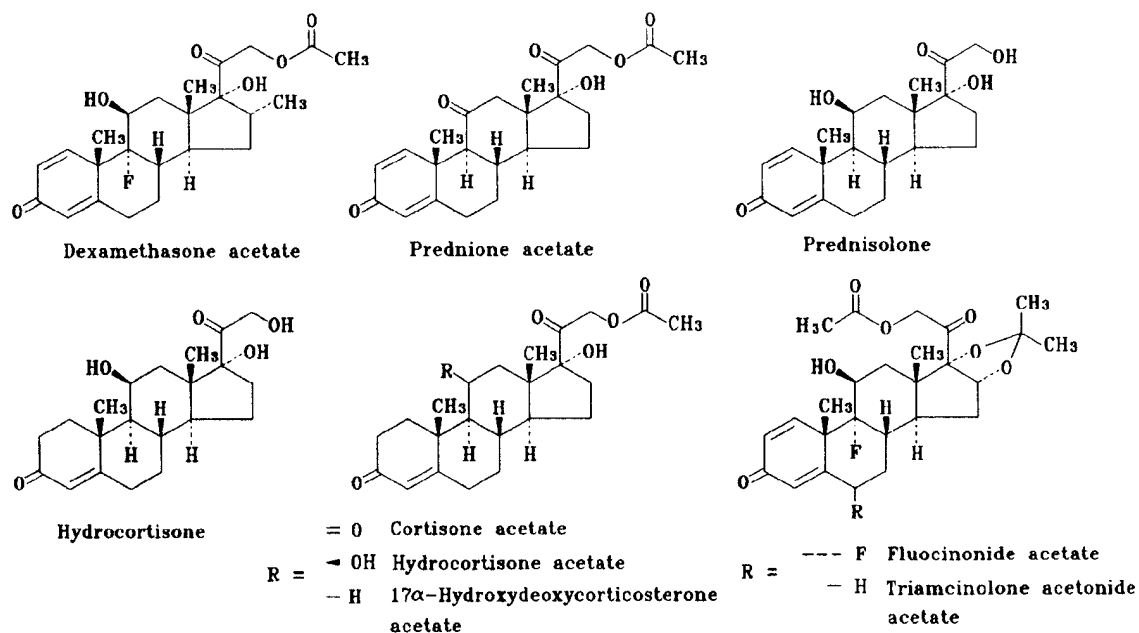


Fig 1 Structures of corticosteroids .

分析。

2.4 尿样的处理 取 Bond Elute C₁₈ 固相萃取柱, 依次用水、甲醇、水各 3 mL 洗涤, 取尿样(健康受试者口服 10 mg 醋酸泼尼松片后 2~17 h 尿样) 2 mL 以 30 滴/min 的速度通过上述已活化的固相萃取柱。用水 3 mL 洗涤后, 再用甲醇 2 mL 洗脱, 甲醇洗脱液用于 HPLC/MSⁿ 分析。

3 HPLC-UV-MSⁿ 分析条件

3.1 高效液相色谱条件 色谱柱: Alltima C₁₈ 不锈钢柱(5 μ m 粒径, 200 mm \times 4.6 mm ID, 天津凯德公司); 流动相 A: 5 mmol \cdot L⁻¹ 醋酸铵(pH 3.5), 流动相 B: 90% 乙腈, 在进样 9 min 内, 流动相 B 由 43% 线性提高到 47%, 流速由 0.5 mL \cdot min⁻¹ 提高到 0.8 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 紫外检测波长: 240 nm; 进样量: 50 μ L。

3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 正离子检测; 鞘气(N₂) 流速: 50 au(arbitrary units); 辅助气(N₂) 流速: 10 au; 源电压: 4.25 kV; 毛细管温度: 180 $^{\circ}$ C; 毛细管电压: 33.50 V; 管透镜补偿电压: 13.00 V; 相对碰撞能: 20%。采用全扫描一级质谱选择离子监测(SIM)及二级全扫描质谱(full scan MS²) 3 种方式同时测定。

结果与讨论

1 9 种皮质激素对照品的 HPLC-UV-MSⁿ 色谱-质谱行为

将各对照品的混合溶液注入 HPLC 系统, 串联

进行紫外及质谱检测, 在所选用的色谱条件下可分离 9 种皮质激素, 紫外色谱图见图 2; 相应的二级全扫描质谱图见图 3。曾尝试用甲醇-水系统分离 9 种皮质激素, 未能获得满意结果。改用乙腈-水系统, 经梯度洗脱, 色谱分离了性质相差较多的 9 种皮质激素。用紫外-质谱串联检测法, 通过紫外监测各组分的分离情况, 用质谱的选择性检测功能获得各组分的质荷比及碎片离子信息, 能为定性分析提供更充分的依据。

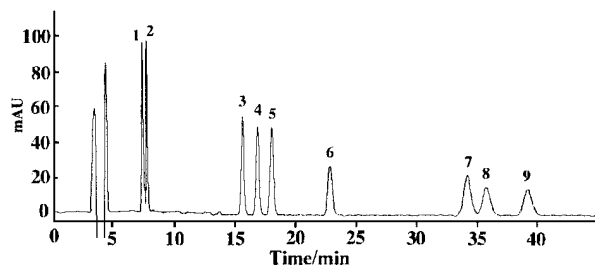


Fig 2 UV chromatogram of standard solution containing nine corticosteroids. 1. Prednisolone; 2. Hydrocortisone; 3. Hydrocortisone acetate; 4. Prednisone acetate; 5. Cortisone acetate; 6. Dexamethasone acetate; 7. 17 α -Hydroxydeoxycorticosterone acetate; 8. Triamcinolone acetonide acetate; 9. Fluocinonide acetate.

ESI 属于软电离技术, 其一级质谱一般只能获得准分子离子峰, 而无碎片离子。进行多级质谱检测, 便可大大提高质谱检测的专属性。借助质谱解析软件提供的裂解图, 归属各碎片离子, 表 1 为各物质准分子离子及对准分子离子进行二级全扫描分析所得碎片离子。

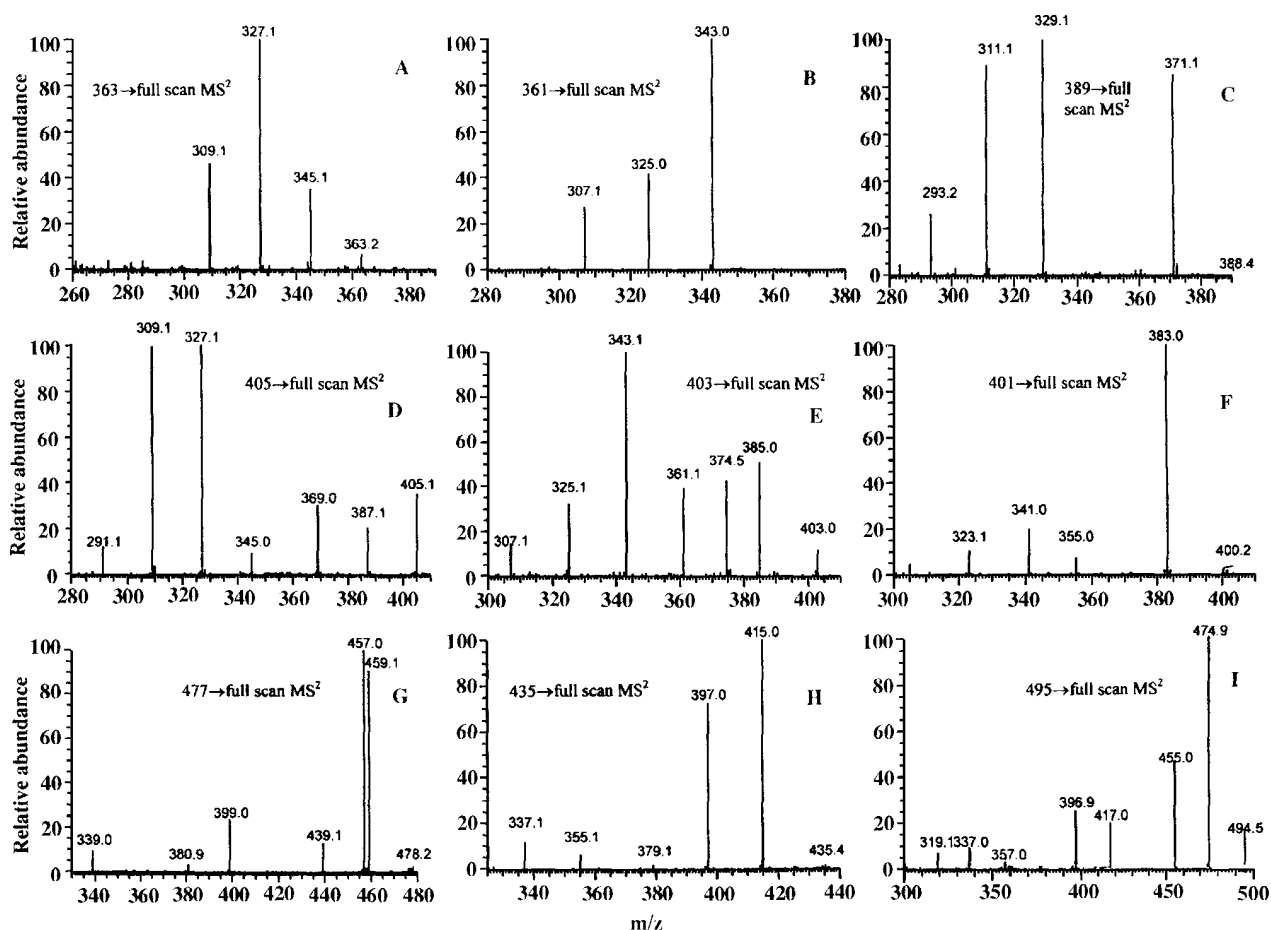


Fig 3 Full scan MS² spectra of nine corticosteroids. A. Hydrocortisone; B. Prednisolone; C. 17 α -Hydroxydeoxycorticosterone acetate; D. Hydrocortisone acetate; E. Cortisone acetate; F. Prednisone acetate; G. Triamcinolone acetonide acetate; H. Dexamethasone acetate; I. Fluciclonide acetate.

Tab 1 Pseudomolecular ions [M + H]⁺ and their product ions at full scan MS² for 9 corticosteroids

Name	[M + H] ⁺	Fragment ions from full scan MS/ MS
Hydrocortisone	m/z 363	m/z 345(- H ₂ O), 327(- 2 H ₂ O), 309(- 3 H ₂ O)
Prednisolone	m/z 361	m/z 343(- H ₂ O), 325(- 2 H ₂ O), 307(- 3 H ₂ O)
17 α -Hydroxydeoxycorticosterone acetate	m/z 389	m/z 371(- H ₂ O), 329(- CH ₃ COOH), 311(- CH ₃ COOH, - H ₂ O), 293(- CH ₃ COOH, - 2 H ₂ O)
Hydrocortisone acetate	m/z 405	m/z 387(- H ₂ O), 369(- 2 H ₂ O), 345(- CH ₃ COOH), 327(- CH ₃ COOH, - H ₂ O), 309(- CH ₃ COOH, - 2 H ₂ O), 291(- CH ₃ COOH, - 3 H ₂ O)
Cortisone acetate	m/z 403	m/z 385(- H ₂ O), 375(- CO), 361(- CH ₂ =C=O), 343(- CH ₃ COOH), 325(- CH ₃ COOH, - H ₂ O), 307(- CH ₃ COOH, - 2 H ₂ O)
Triamcinolone acetonide acetate	m/z 477	m/z 459(- H ₂ O), 457(- HF), 439(- HF, - H ₂ O), 399(- CH ₃ COOH, - H ₂ O), 381(- CH ₃ COOH, - 2 H ₂ O), 339(- CH ₃ COOH, - CH ₃ COCH ₃ , - HF)
Dexamethasone acetate	m/z 435	m/z 415(- HF), 397(- HF, - H ₂ O), 379(- HF, - 2 H ₂ O), 355(- CH ₃ COOH, - HF), 337(- HF, - CH ₃ COOH, - H ₂ O)
Fluciclonide acetate	m/z 495	m/z 475(- HF), 455(- 2 HF), 417(- CH ₃ COOH, - H ₂ O), 397(- CH ₃ COOH, - HF, - H ₂ O), 357(- CH ₃ COOH, - CH ₃ COCH ₃ , - HF), 337(- CH ₃ COOH, - 2 HF, - CH ₃ COCH ₃)
Prednisone acetate	m/z 401	m/z 383(- H ₂ O), 355(- CO, - H ₂ O), 341(- CH ₃ COOH), 323(- CH ₃ COOH, - H ₂ O), 305(- CH ₃ COOH, - 2 H ₂ O)

质谱分析结果表明在(+)-ESI检测方式下,9种皮质激素的质谱断裂方式存在共性,即对于含有氟的分子,在进行二级质谱分析时,优先脱去HF;对于含有醋酸酯的分子,在其二级质谱碎片中,易产生脱 CH_3COOH 的特征碎片离子。由于此类甾体激素结构中含有羟基,在进行二级质谱分析时,均能产生脱水的碎片离子。可以利用这些特征碎片离子对体内或体外样品中此类甾体激素进行定性分析。此外,从质谱上所获得的结果与质谱解析软件提供的裂解图相结合,为鉴定待测物提供了更多的信息。

2 最小检出量考察

在实验过程中发现,该类药物在甲醇-水系统中的电喷雾离子化程度明显优于乙腈-水系统,因此在本项考察中选用甲醇-水(80:20, v/v)系统作为流动相以增加其灵敏度,流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。当每种待测物进样量为6 ng时,二级质谱色谱峰的信噪比(S/N)在4~21之间。

3 方法的应用

根据各对照品的色谱保留时间及二级质谱特征,对含有该类药物的不同样品进行了定性分析。

3.1 鉴定6种皮质激素制剂中的主成分 取提取后各药物制剂的甲醇溶液分别注入HPLC系统,进行全扫描一级质谱,选择离子监测及二级全扫描质谱分析。与各对照品的色谱-质谱行为相对照,对各制剂的主成分进行鉴定,结果表明,其中的赋形剂不影响鉴定。

3.2 送检物的鉴定 众所周知,使用皮质激素治疗哮喘能缓解症状,但治标不治本,长期应用更是弊大于利。某患者长期服用某抗哮喘“纯中药制剂”,最后出现“满月脸”、“水牛背”等激素滥用的症状。怀疑所服“中药”含有激素,将剩余“中药”的氯仿提取液送检。送检物经预处理后,进行HPLC/MSⁿ分析,在一级全扫描质谱图中检测到准分子离子峰为m/z 401的物质,怀疑送检物中含有醋酸泼尼松。采用选择离子监测及二级全扫描质谱分析,发现其与醋酸泼尼松对照品的色谱及质谱行为相一致,进一步证明此“中药”含有大量醋酸泼尼松。

3.3 尿样中皮质激素的鉴定 文献报道醋酸泼尼松在体内代谢为泼尼松及氢化泼尼松。取受试者尿样经固相萃取后,进行HPLC/MSⁿ分析,分别以醋酸泼尼松、泼尼松和氢化泼尼松的[M+H]⁺峰为母离子进行选择离子监测及二级全扫描质谱分析,尿样中只检测到泼尼松。

以上实例说明,本法可鉴定药物制剂、中药及体

液中的多种皮质激素,且不受基质及赋形剂等的干扰。离子阱质谱的多级扫描功能确保了定性分析结果的专属性,即使在色谱分离不够完全情况下,也能选择性地鉴定结构相近的化合物。

References

- Lantto O. Radioimmunoassay and liquid-chromatographic analysis for free cortisol in urine compared with isotope dilution-mass spectrometry. *Clin Chem*, 1982, **28**: 1129
- Ueshiba H, Segawa M, Hayashi T, et al. Serum profiles of steroid hormones in patients with Cushing's syndrome determined by a new HPLC/RIA method. *Clin Chem*, 1991, **37**: 1329
- Stanley SMR, Wilhelmi BS, Rodgers JP. Comparison of immunoaffinity chromatography combined with gas chromatography-negative ion chemical ionisation mass spectrometry and radioimmunoassay for screening dexamethasone in equine urine. *J Chromatogr*, 1993, **620**: 250
- Gardner RS, Walker M, Hollingsbee DA. A sensitive high-performance liquid chromatographic method for the assessment of percutaneous absorption of topical corticosteroids. *J Pharm Biomed Anal*, 1990, **8**: 1083
- Oka K, Hirano T, Shimodaira H, et al. Suppression of endogenous cortisol for evaluating pharmacodynamics of prednisolone in early allograft rejection in renal transplantation. *Clin Chem*, 1990, **36**: 481
- Shalaby A, Shahjahan M. Improved high performance liquid chromatographic method for the determination of some corticosteroids. *J Liq Chromatogr*, 1991, **14**: 1267
- Volin P. High-performance liquid chromatographic analysis of corticosteroids. *J Chromatogr B*, 1995, **671**: 319
- Garg V, Jusko WJ. Simultaneous analysis of prednisone, prednisolone and their major hydroxylated metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1991, **567**: 39
- Chen SH, Wu SM, Wu HL. Stereochemical analysis of beta-methasone and dexamethasone by derivatization and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1992, **595**: 203
- Hay M, Mormede P. Improved determination of urinary cortisol and cortisone, or corticosterone and 11-dehydrocorticosterone by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B*, 1997, **702**: 33
- Mason SR, Ward LC, Reilly PEB. Fluorimetric detection of serum corticosterone using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1992, **581**: 267
- Yap BY, Johnston GAR, Kazlauskas R. Routine screening and quantitation of urinary corticosteroids using bench-top gas chromatography-mass selective detection. *J*

Chromatogr, 1992, **573**: 183

- 13 Stanley SMR, Wilhelmi BS, Rodgers JP. Immunoaffinity chromatography combined with gas chromatography-negative ion chemical ionisation mass spectrometry for the confirmation of flumethasone abuse in the equine. *J*

Chromatogr, 1993, **614**: 77

- 14 Shibasaki H, Furuta J, Kasuya Y. Stable isotope dilution mass spectrometry for the simultaneous determination of cortisol, cortisone, prednisolone and prednisone in plasma. *J Chromatogr*, 1992, **579**: 193

IDENTIFICATION OF NINE CORTICOSTEROIDS WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY

Guo Jifen (Guo JF), Zhong Dafang (Zhong DF)^{*} and Chen Xiaoyan (Chen XY)

(*Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*,
Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015)

ABSTRACT AIM: To develop a specific, sensitive and rapid LC/MSⁿ assay for corticosteroids, and provide a detection method for restricting abuse of these drugs. **METHODS:** Reversed-phase high performance liquid chromatography/UV/electrospray ion trap mass spectrometry was used to separate and identify nine corticosteroids, including dexamethasone acetate, prednisone acetate, prednisolone, hydrocortisone, cortisone acetate, hydrocortisone acetate, 17 α -hydroxydeoxycorticosterone acetate, fluciclonide acetate and triamcinolone acetonide acetate, which were selected as model compounds because of their clinical interest. The UV detection wavelength was fixed at 240 nm. The mobile phase composed of acetonitrile and ammonium acetate buffer (pH 3.5) and was carried out in gradient mode. The mass spectrometer (Finnigan LCQ) was operated in the positive mode and in three scan modes including full scan MS, selected ion monitoring and full scan MS². The obtained mass spectra were analyzed with assistance of the software Mass Frontier 1.0 for their fragmentation pathways. **RESULTS:** Nine corticosteroids were identified simultaneously by LC/MSⁿ and the identification was not affected by excipients and matrix. The full scan MS² spectra of the compounds containing fluorine atom or acetate group gave characteristic fragment ions of losing hydrogen fluoride [M+H-20]⁺ and acetic acid [M+H-60]⁺, respectively. This method was successfully applied to identify corticosteroids contained in drug formulations, urine and specimen doubted illegally mixing corticosteroids, with a detection limit of 6 ng for each corticosteroid. **CONCLUSION:** These chromatographic and mass spectrometric characteristics can be used for qualitative analysis of corticosteroids *in vivo* or *in vitro*, and provide potential application to study the metabolism and pharmacokinetics of corticosteroids.

KEY WORDS HPLC/MSⁿ; corticosteroids; electrospray ion trap mass spectrometry