

# 液相色谱-电喷雾串联质谱法测定人血浆中班布特罗： 在药代动力学研究中的应用

陈笑艳, 徐海燕, 钟大放\*, 杨汉煜, 张逸凡

(沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 目的 建立液相色谱-串联质谱法测定人血浆中班布特罗浓度, 研究中国受试者口服该药的动力学特点。方法 血浆样品经液-液萃取后, 采用液相色谱-电喷雾串联质谱法以选择离子反应监测(SRM)方式进行检测。结果 班布特罗的线性范围为 0.05 - 4.0 ng·mL<sup>-1</sup>, 最低定量浓度为 0.05 ng·mL<sup>-1</sup>, 该法的日内及日间精密度(RSD) 小于 8%, 准确度(RE) 在 ±9% 范围内。18 名中国健康受试者单剂量口服班布特罗 10 mg 后, 主要药动学参数  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{1/2}$  和  $AUC_{0-\infty}$  分别为 (2.3 ± 1.3) h, (3.95 ± 2.20) ng·mL<sup>-1</sup>, (11.4 ± 6.1) h 和 (26.85 ± 11.77) ng·h·mL<sup>-1</sup>。结论 该法灵敏度高, 操作简便、快速, 适用于临床药代动力学研究。

**关键词:** 班布特罗; 液相色谱-电喷雾串联质谱法; 血浆药物浓度; 药代动力学

中图分类号: R917.101; R972.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2001)10 - 0762 - 04

班布特罗为  $\beta_2$  受体激动剂特布他林的双二甲氨基甲酯, 是一种新型抗哮喘药, 本身无活性, 进入体内后被胆碱酯酶水解为特布他林而发挥疗效, 此时获得的特布他林的血浆浓度曲线较平稳, 克服了特布他林直接用药首过代谢强、生物利用度低的缺点, 使药效维持时间长, 每日只需服用一次<sup>[1-3]</sup>。有报道<sup>[4-7]</sup>用 GC/MS 法测定血浆浓度, 对班布特罗的药代动力学性质进行研究, 但该方法需要对分析物进行柱前衍生化处理, 以同位素标记的药物为内标, 操作复杂且所选内标有很大的局限性。本文旨在建立快速、灵敏的液相色谱-电喷雾串联质谱法测定母体药物班布特罗的血浆浓度, 并研究该药在中国健康受试者体内的药代动力学特点。

## 材料与方 法

**仪器** 美国 Finnigan 公司 TSQ 型液相色谱-质谱-质谱联用仪, 配有电喷雾离子化源(ESI) 以及 Xcalibur 1.1 数据处理系统; 日本岛津公司 LC-10AD 高效液相色谱输液泵。

**药品与试剂** 盐酸班布特罗对照品(含量 99.6%), 安徽省药物研究院提供; 瑞米芬太尼

(re mifentanil, 内标, 含量 99.7%), 香港中文大学提供; 帮备(无锡阿斯特拉制药公司, 每片含班布特罗 10 mg); 甲基硫酸新斯的明注射液, 上海信谊药厂, 规格 2 mL(1 mg/支); 乙腈、甲醇为色谱纯, 购自山东禹王试剂厂; 乙醚、二氯甲烷、甲酸和氢氧化钠为分析纯; 空白人血浆由沈阳中心血站提供。

**色谱条件** 色谱柱为 Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱, 150 mm × 2.1 mm ID, 3.5 μm 粒径(美国 HP 公司); 流动相为乙腈-甲醇 5 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵缓冲盐(pH 2, 50:70:140); 流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 20 °C。

**质谱条件** 离子源为 ESI 源; 源电压 4.5 kV; 加热毛细管温度 280 °C; 鞘气(N<sub>2</sub>) 压力 0.6 MPa; 辅助气(N<sub>2</sub>) 流速 20 au; 碰撞气(Ar) 压力 1.9 Pa。碰撞诱导解离(CID) 电压 28 V; 正离子方式检测; 扫描方式为选择反应监测(SRM), 用于定量分析监测的离子分别为 m/z 368 → m/z 293(班布特罗) 和 m/z 377 → m/z 284(re mifentanil), 二级全扫描, 扫描时间为 0.3 s。

**血浆样品采集** 选择健康男性受试者 18 名, 年龄 20 - 23 岁, 体重 54 - 75 kg, 签署知情同意书, 于试验前在医院接受全面的体格检查, 对肝、肾功能进行化验测定, 并进行心电图检查, 属正常。于试验前 14 d 内未用任何药物。于服药前禁食 12 h, 次晨空腹口服帮备一粒, 于服药前和服药后 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 36.0, 48.0 和 60.0 h, 由前臂静脉取血 5 mL, 立即移入经肝素处理并加入新斯的明注射液 200 μL(用于抑制血液中胆碱酯酶

收稿日期: 2001-02-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39930180)。

作者简介: 陈笑艳(1971-), 女, 讲师;

钟大放(1957-), 男, 教授, 博士生导师。

\* 通讯作者 Tel/Fax: (024) 23902539, E-mail: zhongdf@ihw.com.cn

的活性)的离心试管中,静置 5 min 后,离心 15 min ( $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),分离血浆,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。分别用于班布特罗和活性代谢物特布他林<sup>[9]</sup>的血浆测定。

本试验经伦理委员会批准,临床试验在辽宁省人民医院进行。

**血浆样品处理** 取血浆 1.0 mL,置于 10 mL 带塞试管中,依次加入流动相 100  $\mu\text{L}$ ,内标溶液(10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  remifentanil,流动相溶解)100  $\mu\text{L}$ ,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,涡流 30 s。加提取溶剂乙醚-二氯甲烷(100:50)3 mL,往复振荡 10 min,离心 5 min,分取有机相于  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  空气流下吹干。残留物加 100  $\mu\text{L}$  流动相溶解,取 20  $\mu\text{L}$  进样。

**数据处理** 采用梯形法计算  $\text{AUC}_{0-t}$ ,以半对数作图法,由消除相末端浓度点计算  $T_{1/2}$  和  $K_e$ ,以末端点浓度和  $K_e$  的比值计算  $\text{AUC}_{t-\infty}$ ,达峰浓度

( $C_{\text{max}}$ )和达峰时间( $T_{\text{max}}$ )为实测值。

## 结果与讨论

### 1 质谱分析

将班布特罗及内标 remifentanil 溶于流动相,按“质谱条件”项操作,相应的二级全扫描质谱图见图 1。

### 2 方法的专属性

分别取 6 名受试者的空白血浆 1.0 mL,按“血浆样品的处理”依法操作,进样 20  $\mu\text{L}$ ,得色谱图,如图 2A;将一定浓度的班布特罗溶液加入空白血浆,同法操作,得色谱图,如图 2B,待测物的保留时间为 2.47 min,内标物的保留时间为 2.49 min;取健康受试者给药后收集的血浆样品,同法操作,得色谱图,如图 2C。结果表明,空白血浆中内源性物质及代谢产物不干扰班布特罗及内标物的测定。

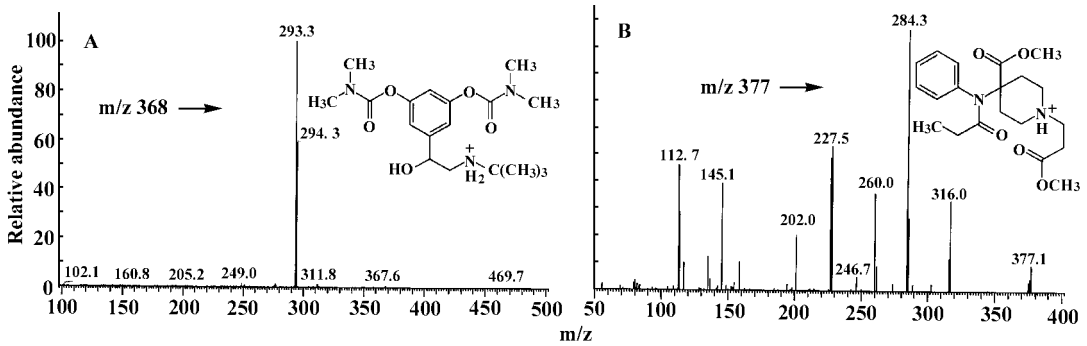


Figure 1 Full scan MS/MS spectra of bambuterol (A) and remifentanil (B) dissolved in mobile phase

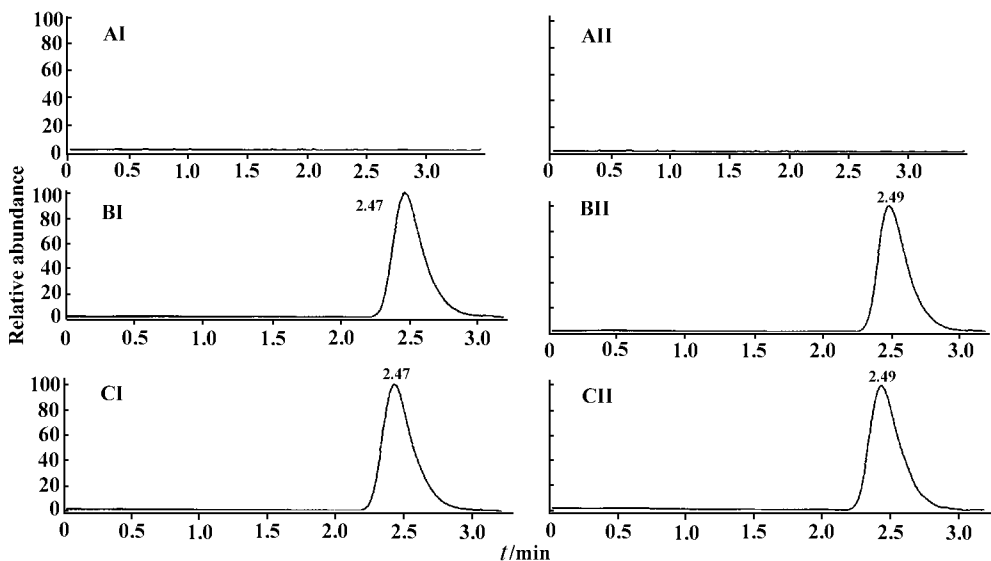


Figure 2 Chromatograms of bambuterol and remifentanil (internal standard, IS) by selected reaction monitoring (SRM) scan mode

A. Blank plasma sample; B. Plasma spiked with bambuterol  $1.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  and IS; C. Plasma sample 2.0 h after oral administration of 10 mg bambuterol to a healthy volunteer. Peak I, II refer to bambuterol and IS, respectively

### 3 标准曲线和线性范围

取空白血浆 1.0 mL, 加班布特罗标准系列溶液 100  $\mu$ L, 配制成相当于浓度为 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 4.0  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的血浆样品, 除不加入 100  $\mu$ L 流动相外, 按“血浆样品的处理”依法操作, 建立标准曲线。以血浆样品中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 ( $1/C^2$ ) 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。典型的回归方程为  $Y = 0.9984 + 5.4565C$ ,  $r = 0.996$ 。根据标准曲线, 本法的线性范围为 0.05 - 4.0  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 最低定量限为 0.05  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

用液相色谱-电喷雾离子化串联质谱法测定血浆中班布特罗时, 以 remifentanyl 作为内标。事实上其他一些碱性化合物也可作为内标, 而不必使用同位素标记内标<sup>[7]</sup>, 使得该法更易推广。实验中采用 SRM 方式检测, 提高了方法的专属性, 对色谱分离要求不高, 每一样品的色谱分离时间不足 3.3 min。该法的最低定量限为 0.05  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 比文献<sup>[7]</sup>报道的 GC/MS 法提高了 7 倍, 适用于低剂量口服班布特罗的临床药物动力学研究及生物等效性评价。

### 4 精密度与准确度

取空白血浆 1.0 mL, 按“标准曲线”项下方法制备班布特罗低、中、高 3 个浓度 (0.05, 0.4, 4.0  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的质量控制 (QC) 样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度, 将 QC 样品的结果进行方差分析<sup>[8]</sup> 求算本法的准确度与精密度, 结果见表 1。实验数据表明, 测定血浆中班布特罗的分析方法符合有关规范要求。

**Table 1 Accuracy and precision for the analysis of bambuterol in human plasma (in prestudy)**

Concentration/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		RSD/ %		Relative error/ %
Added	Found	Within run	Between run	
0.050	0.053	6.5	7.7	6.4
0.400	0.436	4.3	2.8	8.9
4.000	4.170	4.0	6.5	4.3

### 5 提取回收率及样品稳定性考察

分别取低、中、高 3 个浓度 (0.1, 0.4, 4.0  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的标准系列溶液, 按“标准曲线”项下操作, 以提取后的色谱峰面积与未经提取直接进样获得的色谱峰面积之比, 考察样品的提取率。每一浓度进行 6 样本分析。3 种浓度下样品的提取回收率分别为 82.1%, 80.3% 和 79.4%。内标溶液经同样提取

处理, 其回收率为 68.5%。该法操作简便, 血浆样品只需经过简单的液-液萃取后, 即可直接进行测定, 避免了复杂的衍生化过程。

本文初步考察了班布特罗在不同保存条件下的稳定性。班布特罗在流动相中 4  $^{\circ}\text{C}$  下, 可保存至少 1 个月, 在室温条件下 24 h 内稳定。将班布特罗加入到含胆碱酯酶抑制剂的新鲜血液中, 未检测出特布他林<sup>[9]</sup>, 证明在本文的实验条件下, 可抑制班布特罗在体外的水解。

### 6 在药代动力学研究中的应用

本文首次报道了班布特罗在中国健康受试者体内的药代动力学特点。图 3 中给出了 18 名受试者单剂量口服 1 片帮备 (10 mg 班布特罗) 后, 母体药物班布特罗的平均血浆浓度-时间曲线。从曲线可知, 班布特罗口服吸收迅速, 平均在 2.3 h 达到最大血药浓度。其主要药动学参数如下:  $C_{\text{max}}$  为  $(3.95 \pm 2.20) \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $\bar{x} \pm s$ , 下同),  $T_{1/2}$  为  $(11.4 \pm 6.1) \text{h}$ ,  $K_e$  为  $(0.081 \pm 0.043) \text{h}^{-1}$ , 用梯形法计算,  $AUC_{0-1}$  和  $AUC_{0-\infty}$  分别为  $(26.85 \pm 11.77)$  和  $(29.20 \pm 15.90) \text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

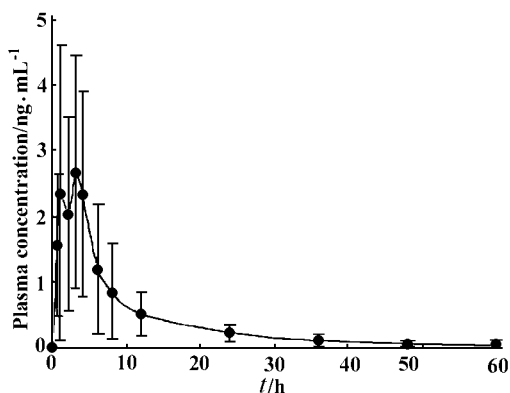


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of bambuterol after oral administration of 10 mg bambuterol to 18 healthy volunteers ( $\bar{x} \pm s$ )

据文献<sup>[1-3]</sup>报道, 班布特罗在体内主要被底物非专一性的胆碱酯酶水解代谢。该类酶主要存在于血浆中以及肠粘膜上, 可使酯类化合物迅速发生水解代谢, 对药物代谢影响非常大。本文结果表明, 班布特罗的药代动力学个体差异较大, 18 名受试者主要药代动力学参数  $T_{\text{max}}$ ,  $C_{\text{max}}$  及  $T_{1/2}$  范围分别为 0.5 - 4.0 h, 1.54 - 8.74  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 5.03 - 21.13 h。由于个体差异较大, 甚至导致了平均血药浓度曲线出现双峰, 这可能与体内的胆碱酯酶活性的个体差异有关。班布特罗既是胆碱酯酶的底物, 又是该酶的

抑制剂,其分子中的二甲氨基甲酸酯可抑制胆碱酯酶的活性<sup>[3]</sup>。本文结果还可见,班布特罗比其他酯类药物(如阿司匹林)水解缓慢得多, $T_{1/2}$ 平均可达11.4 h,生成的活性代谢物特布他林的药-时曲线较平稳,个体差异明显小于母体药物<sup>[9]</sup>,药效维持时间长。

#### REFERENCES:

- [1] Sitar DS. Clinical pharmacokinetics of bambuterol [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1996, **31**(4):246 - 256.
- [2] Sitar DS, Warren CP, Aoki FY. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bambuterol, a long-acting bronchodilator prodrug of terbutaline, in young and elderly patients with asthma [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1992, **52**(4):297 - 306.
- [3] Svensson L, Tunek A. The design and bioactivation of presystemically stable prodrug [J]. *Drug Metab Rev*, 1988, **19**(1):165 - 194.
- [4] Rosenborg J, Larsson P, Nyberg L. Pharmacokinetics of bambuterol during oral administration of plain tablets and solution to healthy adults [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2000, **49**(3):199 - 206.
- [5] Ahlstrom H, Alvero J, Alvero R, et al. Pharmacokinetics of bambuterol during oral administration to asthmatic children [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1999, **48**(3):299 - 308.
- [6] Nyberg L, Rosenborg J, Weibull AE, et al. Pharmacokinetics of bambuterol in healthy subjects [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, **45**(5):471 - 478.
- [7] Lindberg C, Joensson S, Paulson J. Determination of bambuterol, a prodrug of terbutaline, in plasma and urine by gas chromatography mass spectrometry [J]. *Bioméd Environ Mass Spectrom*, 1990, **19**(4):218 - 224.
- [8] Shah VP, Midha KK, Dighe S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies [J]. *J Pharm Sci*, 1992, **81**(3):309 - 312.
- [9] Chen XY, Yang HY, Zhong DF, et al. Rapid analysis of terbutaline by combined solid phase extraction/liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2001, **36**(9):686 - 689.

## DETERMINATION OF BAMBUTEROL IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY: APPLICATION TO PHARMACOKINETIC STUDY

CHEN Xiao-yan, XU Hai-yan, ZHONG Da-fang, YANG Hai-yu, ZHANG Yi-fan

(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To develop a sensitive, specific and accurate method for quantifying bambuterol in human plasma and to study pharmacokinetics of bambuterol in male healthy Chinese. **METHODS** Plasma samples were prepared based on a simple liquid-liquid extraction. The extracted samples were analyzed on liquid chromatography using a Zorbax SB C<sub>8</sub> column interfaced with a triple quadrupole tandem mass spectrometer and detected by use of selected reaction monitoring mode. **RESULTS** The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0.05 - 4.0 ng•mL<sup>-1</sup>. The limit of quantification was 0.05 ng•mL<sup>-1</sup>. The intra- and inter-run precision was measured to be below 7%. The inter-run accuracy was less than 8% for the analyte. After an oral administration of 10 mg bambuterol hydrochloride to 18 healthy Chinese volunteers the main pharmacokinetic parameters of bambuterol were as follows:  $T_{max}$  was (2.3 ± 1.3) h;  $C_{max}$  was (3.95 ± 2.20) ng•mL<sup>-1</sup>;  $T_{1/2}$  was (11.4 ± 6.1) h and  $AUC_{0-t}$  was (26.85 ± 11.77) ng•h•mL<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** The method is shown to be accurate, robust and convenient, and suitable for pharmacokinetic studies of bambuterol. It was found that there was marked inter-individual difference in the pharmacokinetics of bambuterol in Chinese volunteers after a single oral dose, which may be attributed to the difference of activity of cholinesterase, an enzyme catalyzing bambuterol metabolism.

**KEY WORDS:** bambuterol; liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry; plasma concentration; pharmacokinetics