

液相色谱-电喷雾串联质谱法 测定血浆中克仑特罗

陈笑艳, 韩莹, 张勇, 谢智勇, 钟大放*

(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: 建立快速、灵敏的液相色谱-串联质谱法测定人血浆中克仑特罗。0.5 mL 血浆样品经液-液萃取后, 以 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) : V(\text{甲酸}) = 80 : 20 : 1$ 为流动相, 采用 Zorbax XDB C8 柱分离, 通过电喷雾离子化四极杆串联质谱, 以选择离子反应监测(SRM) 方式进行检测。该法测定克仑特罗的线性范围为 $10.0 \sim 2000.0 \text{ ng/L}$, 每个样品测试时间仅为 3.2 min, 应用此法每天可以测试 120 多个样品。该法已成功用于克仑特罗药物动力学研究, 测定了 20 名受试者单剂量口服 $80 \mu\text{g}$ 盐酸克仑特罗后的血浆药物浓度。

关键词: 质谱学; 液相色谱-串联质谱法(LCMS/MS) 测定克仑特罗; 血浆样品; 药物动力学

中图分类号: O 657.63; R 974.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2002)04-0206-04

克仑特罗是一种 β 受体激动剂, 临床上主要用于治疗哮喘^[1]。此药还能起到蛋白同化激素的作用, 促进肌肉生长, 降低脂肪量, 因此被作为饲料添加剂用于提高家畜瘦肉含量^[2]。为防止被滥用, 国际奥委会从 1992 年开始明确规定禁止运动员使用此药^[3]。

克仑特罗的药理作用选择性特别强, 口服日剂量仅为 $60 \sim 120 \mu\text{g}$, 因此需要高灵敏度的方法分析其血药浓度。有文献报道采用酶免疫法^[4]和 GC/MS 法^[5]测定人血浆中克仑特罗, 样品的预处理复杂, 测试周期长。近年有报道采用液相色谱-串联质谱法(LCMS/MS) 测定动物血清和肝组织中的克仑特罗, 所需的样品量较大($> 2 \text{ mL}$)^[6, 7]。最近, Guan 等^[8]报道采用液相色谱-四极杆飞行时间质谱(LC/Q TOF/MS) 法测定马血浆中克仑特罗, 定量下限为 13 ng/L 。本工作旨在建立快速、高灵敏 LCMS/MS 法测定人血浆中的克仑特罗, 以研究该药在受试者体内的药物动力学特点。

1 实验部分

1.1 主要药品与试剂

盐酸克仑特罗: 北京韩美药品有限公司提供; 盐酸苯海拉明(内标): 中国药品生物制品检定所提供; 甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

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

1.3 实验条件

(1) 色谱条件

色谱柱为 Zorbax XDB C8 柱, $\Phi 50 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ 粒径, 美国安捷伦公司产品; 流动相为 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) : V(\text{甲酸}) = 80 : 20 : 1$; 流速 0.5 mL/min , 柱温 20°C 。

(2) 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_2) 流速: 0.55 MPa ; 辅助

收稿日期: 2002-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(39930180); 辽宁博士启动基金资助项目(001029)

作者简介: 陈笑艳(1971~), 女(汉族), 黑龙江绥棱人, 副教授, 药物代谢与药物动力学专业

* 通信作者: 钟大放, 教授, E-mail: zhongdf@china.com



气(N₂)流速 3 L/m in; 碰撞气(Ar)压力 1.9 Pa; 正离子方式检测; 扫描方式为选择反应监测(SRM), 用于监测的离子为 m/z 277 m/z 203

(克仑特罗)和 m/z 256 m/z 167(内标), 相应的二级全扫描质谱图示于图 1。

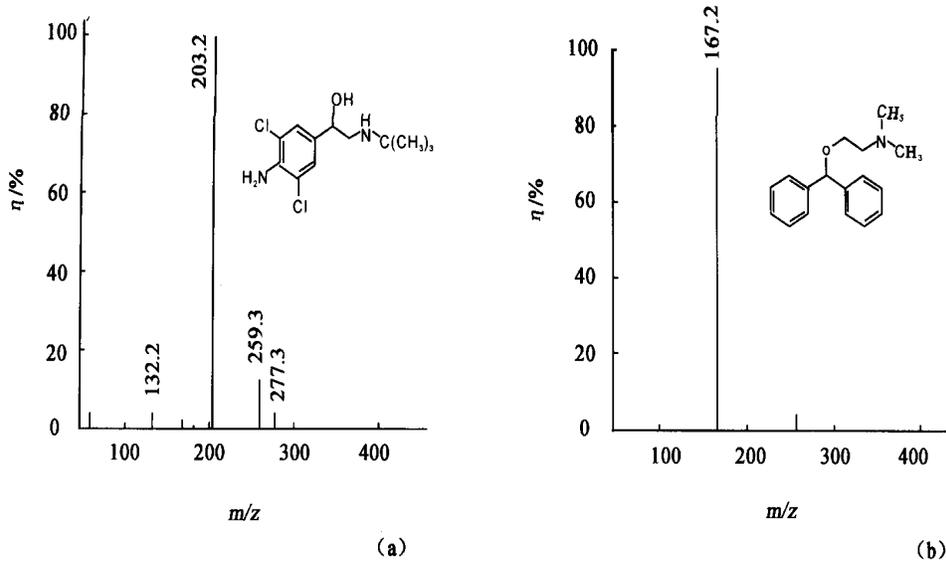


图 1 克仑特罗及苯海拉明产物离子扫描质谱图

Fig 1 Product ion spectra of $[M+H]^+$ of clenbuterol (a) and diphenhydramine (b)

1.4 血浆样品处理

取 0.5 mL 血浆样品, 依次加入流动相 50 μ L、内标溶液(苯海拉明/流动相 200 μ g/L) 50 μ L, 10 mmol 磷酸盐缓冲液(pH=14) 0.5 mL; 加入有机提取溶剂(V(正己烷) : V(二氯甲烷) : V(异丙醇) = 20 : 10 : 1) 4 mL; 涡流混合 1 min, 往复振荡 20 min, 离心 5 min, 分取有机相于 40 μ g 氮气流下吹干。残留物于 100 μ L 流动相中溶解, 取 20 μ L 进样。

2 结果与讨论

2.1 方法的专属性

分别取 6 名受试者的空白血浆 0.5 mL, 按“血浆样品处理”依法操作, 进样 20 μ L, 得色谱图, 示于图 2a。将一定浓度的克仑特罗溶液加入空白血浆, 依同法操作, 得色谱图, 示于图 2b, 待测物的保留时间为 2.5 min, 内标物的保留时间为 2.7 min; 取健康受试者给药后收集的血浆样品, 依同法操作, 得色谱图, 示于图 2c。结果表明, 空白血浆中内源性物质及代谢产物不干扰克仑特罗及内标物的测定。在本工作选用的色谱条件下, 克仑特罗每一样品的分析周期仅为 3.2 min(示于图 2), 每天可完成 120 多个血浆样品分析。

2.2 标准曲线和线性范围

取空白血浆 0.5 mL, 加克仑特罗标准系列溶液 50 μ L, 配制成相当于血浆浓度为 10.0, 25.0, 80.0, 200.0, 500.0, 1000.0 和 2000.0 ng/L 的血浆样品, 除不加入 50 μ L 流动相外, 按“血浆样品处理”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/C²)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 $y = 6.606 \times 10^{-6} + 4.954 \times 10^{-4}x$, $r = 0.9970$ 。根据标准曲线, 本法的线性范围为 10.0 ~ 2000.0 ng/L, 定量下限为 10.0 ng/L。

2.3 精密度与准确度

取空白血浆 0.5 mL, 按“标准曲线”项下方法制备克仑特罗低、中、高三个浓度(25.0, 200.0, 1600.0 ng/L)的质量控制(QC)样品, 每一浓度进行 6 个样品分析, 连续测定三天求算法的准确度与精密度, 结果表明, 克仑特罗的日内和日间变异系数 CV 均小于 9%, 日间相对偏差 s_r 在 $\pm 2.5\%$ 之内。结果列于表 1。

2.4 提取回收率及样品稳定性考察

分别取克仑特罗低、中、高三个浓度(25.0, 200.0, 1600.0 ng/L)的质量控制(QC)样品, 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,考察样品的提取回收率。每一浓度进行 6 样本分析。三种浓度下提取回收率分别为 82.6%、84.9% 和 82.5%;内标的提取回收率为 80.2%。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。

本工作考察了克仑特罗在不同保存条件下的稳定性。结果表明,待测物在三个冷冻-解冻循环中稳定, $\sigma < 12.1\%$ 。待测物的血浆溶液室温放置 4 h 及 -20°C 冷冻保存 1 个月稳定, $\sigma < 8.3\%$ 。提取后的样品溶液室温放置 24 h, $\sigma < 10.6\%$ 。

表 1 LC/MS/MS 法测定人血浆中克仑特罗的
精密度与准确度 ($n = 3$ d, 每个浓度 6 个样品)

Table 1 Precision and accuracy results for
clenbuterol in human plasma
($n = 3$ days, 6 replicates per day)

$\rho(\text{Clenbuterol})/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$		$s_r/\%$		
加入量 (add)	回收量 (found)	日内 (Intra-run)	日间 (Inter-run)	$\sigma/\%$
25.0	25.4	5.3	8.7	1.8
200.0	198.1	7.2	4.7	0.9
1600	1633	7.5	8.2	2.1

3 结论

实验中考察了不同有机溶剂对克仑特罗提取回收率的影响。文献中有报道采用 V (乙酸乙酯) V (丁醇) = 70:30 和 V (乙酸乙酯) V (异丙醇) = 60:40 进行提取,回收率仅为 15%。本工作对文献中所述的方法加以改进,考察了乙醚和混合溶剂 V (正己烷) V (二氯甲烷) V (异丙醇) = 20:10:1 对克仑特罗提取回收率的影响,后者的回收率较前者稳定,且背景噪音低,平均提取回收率可达 83.3%。实验中还考察了流动相组成对待测物质谱响应的影响,发现含有甲醇的流动相可提高待测物响应,且较高浓度的甲醇可降低背景噪音。

上述结果表明,该法在灵敏度、选择性及测试速度等方面均超过文献报道的方法。该法已成功用于克仑特罗药物动力学研究,测定了 20 名中国健康受试者单剂量口服 80 μg 盐酸克仑特罗后的血浆药物浓度。

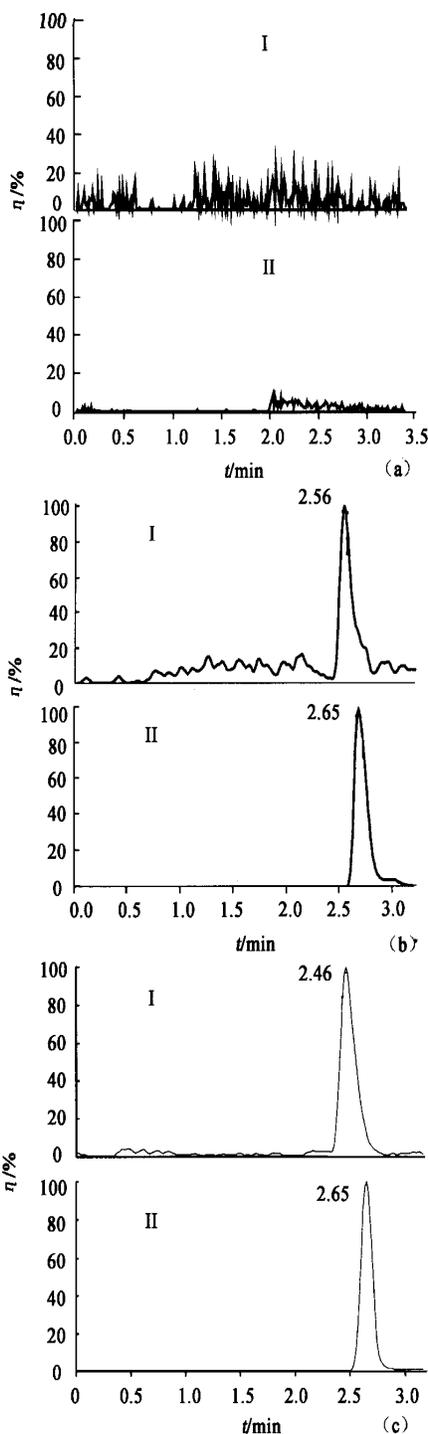


图 2 测定血浆中克仑特罗及内标苯海拉明的
典型 SRM 色谱图

a——空白血浆; b——空白血浆中加入克仑特罗(峰 I)至 10 ng/L 和内标盐酸苯海拉明(峰 II) 20 $\mu\text{g/L}$; c——受试者服药后 24 h 血浆样品

Fig 2 Chromatograms of clenbuterol and diphenhydramine (internal standard, IS) by SRM scan mode

a——blank plasma sample; b——plasma spiked with 10 ng/L clenbuterol and IS; c——plasma sample from a volunteer 24 h after administration of 80 μg clenbuterol hydrochloride; peak I——clenbuterol; peak II——IS

参考文献:

- [1] Ionescu AA, Bistriceanu G, Bogdan M, et al. The Clenbuterol Treatment of Patients With the Chronic Obstructive Syndrome [J]. *Pneumoftiziologia*, 1995, 44: 45~ 47.
- [2] Dawson J. β Agonists Put Meat in the Light Again [J]. *Br Med J*, 1990, 301: 1 238~ 1 239.
- [3] Spann C, Winter ME. Effect of Clenbuterol on Athletic Performance [J]. *Ann Pharmacother*, 1995, 29: 75~ 77.
- [4] Meyer H, Rinke L, Duersch L. Residue Screening for the β agonists Clenbuterol, Salbutamol and Cimatrol in Urine Using Enzyme Immunoassay and High-Performance Liquid Chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1991, 564: 551~ 556.
- [5] Keskin S, Oezer D, Temizer A. Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis of Clenbuterol from Urine [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 18: 639~ 644.
- [6] Lehner AF, Harkins JD, Karpiesiuk W, et al. Clenbuterol in the Horse: Confirmation and Quantitation of Serum Clenbuterol by LC-MS-MS After Oral and Intratracheal Administration [J]. *J Anal Toxicol*, 2001, 25: 280~ 287.
- [7] DeWasch K, DeBabander H, Courtheyn D. LC-MS-MS to Detect and Identify Four β agonists and Quantify Clenbuterol in Liver [J]. *Analyst*, 1998, 123: 2 701~ 2 705.
- [8] Guan F, Uboh CE, Soma LR, et al. Quantification of Clenbuterol in Equine Plasma, Urine and Tissue by Liquid Chromatography Coupled on-line With Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16: 1 642~ 1 651.

Determination of Clenbuterol in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CHEN Xiao-yan, HAN Ying, XIE Zhi-yong, ZHANG Yong, ZHONG Da-fang
(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University,
Shenyang 110016, China)

Abstract A rapid, sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method is developed and validated for determination of clenbuterol in human plasma. The analyte is extracted from plasma samples by liquid-liquid extraction, separated through a Zorbax XDB C8 column and detected by tandem mass spectrometry with an electrospray ionization interface. Diphenhydramine is used as the internal standard. The method has a lower limit of quantitation (LOQ) of 10.0 ng/L for clenbuterol. The intra- and inter-run precision is measured to be below 7.2%. The inter-run accuracy is within $\pm 2.5\%$ for the analyte. The chromatographic run time is approximately 3.2 min. More than 120 samples can be assayed daily with this method, including sample preparation, data acquisition and processing. The method is applied for the evaluation of the pharmacokinetics of clenbuterol in 20 volunteers after an oral dose of 80 μ g clenbuterol hydrochloride.

Key words mass spectrometry; determination of clenbuterol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry; human plasma; pharmacokinetics