LC-MS/MS 法测定大鼠呼吸道中的硫酸沙丁胺醇及其肺组织分布

左亚茹[1,2,3]，杨 娴[1,2,3,4]*，侯海婷[1,2,3]，赵方红[1,2,3]，马晓阳[1,2,3]，孙立杰[1,2,3,4]

（1. 石家庄四药有限公司研发中心，河北石家庄 050035；2. 化学药品无菌制剂产业技术研究院，河北石家庄 050035；3. 河北省大容量注射剂工程技术研究中心，河北石家庄 050035；4. 石家庄四药有限公司博士后科研工作站，河北石家庄 050035）

摘要：建立了 LC-MS/MS 法测定大鼠气管支气管、肺组织中的硫酸沙丁胺醇。结果显示，硫酸沙丁胺醇在大鼠气管支气管、肺中的线性范围分别为 10.41 ～ 10 410、5.205 ～ 5 205 ng/g。不同组织样品的日内与日间 RSD 均小于 15%。大鼠吸入给药后，硫酸沙丁胺醇在大鼠气管支气管及肺内呈现相似的动态变化过程，给药后即可达最大浓度，然后快速消除。吸入用硫酸沙丁胺醇溶液在靶部位气管支气管中的分布较多，为后续临床合理用药提供了参考依据。

关键词：硫酸沙丁胺醇；雾化吸入；LC-MS/MS；气管支气管；肺组织

中图分类号：R917；R974+.3 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)08-1107-07

引用：左亚茹 , 杨 娴 , 侯海婷 , 等．LC-MS/MS 法测定大鼠呼吸道中的硫酸沙丁胺醇及其肺组织分布［J］．中国医药工业杂志 , 2024, 55(8): 1107-1113．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.08.011

Determination of Salbutamol Sulfate in Rat Respiratory Tract by LC-MS/MS and Its Lung Tissue Distribution

ZUO Yaru[1,2,3], YANG Xian[1,2,3,4]*, HOU Haiting[1,2,3], ZHAO Fanghong[1,2,3], MA Xiaoyang[1,2,3], SUN Lijie[1,2,3,4]

(*1. Pharmaceutical Research Institute of Shijiazhuang No.4 Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035; 2. Industrial Technology Research Institute of Chemical Sterile Preparations, Shijiazhuang 050035; 3. Hebei Large Capacity Injection Engineering Technology Research Center, Shijiazhuang 050035; 4. Postdoctoral Research Workstation of Shijiazhuang No.4 Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035*)

ABSTRACT: The LC-MS/MS method was established to determine salbutamol sulfate in rat tracheobronchial and lung tissues. The results showed that the linear ranges in tracheobronchial and lung tissues were 10.41 – 10 410 and 5.205 – 5 205 ng/g, respectively. The intra- and inter-day RSDs of the samples from different tissues were less than 15% .After inhalation administration, salbutamol sulfate showed similar dynamic changes in the tracheobronchial and lung tissues of rats, and reached maximum concentration immediately after administration, followed by rapid elimination. The inhalation of salbutamol sulfate solution was widely distributed in the tracheal and bronchus of the target site, which provided a reference basis for the clinical use.

Key Words: salbutamol sulfate; atomization inhalation; LC-MS/MS; tracheal and bronchus; lung tissue

硫酸沙丁胺醇（salbutamol sulfate，**1**）是选择性短效 β_2 受体激动药，通过作用在气管平滑肌上的 β_2 受体而使呼吸道平滑肌舒张，同时能有效抑制组胺等致过敏性物质的释放，防止支气管痉挛，适用于治疗支气管哮喘、COPD、喘息性支气管炎和肺气肿患者的支气管痉挛等疾病[1—2]。

1 以吸入方式给药时，在缓解哮喘方面有良好的疗效[3—5]。吸入给药途径能选择性地将药物递送至呼吸道靶器官[6]。然而，由于呼吸系统的复杂性以及呼吸器官中药物含量检测技术的局限性，目前

收稿日期：2023-10-09

基金项目：河北省创新能力提升计划项目（225A2704D）、河北省高层次人才资助项目（B2022003038）

作者简介：左亚茹（1993—），女，初级工程师，从事新药非临床部分的研究。

通信作者：杨 娴（1987—），女，高级工程师，从事新药非临床部分的研究。

E-mail：xianyang323@163.com

很难确定药物（吸入或口服给药后）对呼吸道组织的靶向性。在大多数临床环境中，药代动力学数据仅限于全身血药浓度[7—8]。目前，常用于检测血浆中 **1** 的方法有 HPLC 法和超高效液相色谱 - 质谱联用法[9—10]，尚未见组织中 **1** 的测定方法。

本试验建立了高效液相串联质谱（LC-MS/MS）法测定大鼠吸入给药后不同时间点气管支气管及肺组织中 **1** 的浓度，以评估气管支气管、肺靶点部位 **1** 浓度的变化，以期为 **1** 在靶器官中的动态变化过程研究提供更多数据，并为吸入用 **1** 溶液的临床合理用药提供参考。

1　仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；UFLC-API4000+ 型液质联用仪（日本 Shimadzu 公司）；NE-C28 型压缩式吸入器（日本 Omron 公司）。

吸入用 **1** 溶液 A（自制，规格 2.5 mL ∶ 5 mg，批号 16083001）；吸入用 **1** 溶液 B（GlaxoSmithKline Australia Pty Ltd.，规格 2.5 mL ∶ 5 mg，批号 FW0342）；**1** 对照品（中国食品药品检定研究院，含量 99.3%，批号 100328-200703）；沙丁胺醇 -d_9 同位素（内标，加拿大 Toronto Research Chemicals 公司，含量 98.2%，批号 10-MMH-144-2）；戊巴比妥钠（国药集团化学试剂上海有限公司，批号 WS20050411）；乙腈、氨水、乙酸乙酯、乙酸铵、异丙醇、甲酸均为色谱纯，水为纯化水。

SD 大鼠［雄性，6～7 周龄，SPF 级，体质量 180～220 g，北京维通利华试验动物技术有限公司（动物质量合格证编号 11400700222399）］。本研究中的动物试验符合试验动物伦理委员会的伦理学标准，审批号为 SN16168-PK-1。

2　方法与结果

2.1　色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 Thermo Hypersil 柱（2.1 mm×50 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液，B 为乙腈溶液，梯度洗脱（0—3.5 min，B 8%—98%；3.5—4.5 min，B 98%；4.5—4.51 min，B 98%—8%；4.51—5.5 min，B 8%）；流速 0.2 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 5 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源（ESI），正离子模式，多反应监测（MRM）模式；气帘气 137.9 kPa；喷雾电压 3 500 V；雾化温度 650 ℃；雾化气 413.7 kPa；辅助气 413.7 kPa；碰撞气 82.7 kPa；监测离子对 *m*/*z* 239.8→*m*/*z* 148.1（**1**），*m*/*z* 249.4→*m*/*z* 149.2（内标）。

2.2　溶液配制

对照品溶液：精密称取 **1** 对照品适量，用 80% 乙腈溶解并制成质量浓度为 1.041 mg/mL 的对照品贮备液；再用 80% 乙腈稀释，得质量浓度分别为 1 041、520.5、104.1、20.82、5.205、2.082、1.041 ng/mL 的对照品溶液。

内标工作液：精密称取沙丁胺醇 -d_9 同位素适量，用 80% 乙腈配制成质量浓度为 1.031 mg/mL 的内标贮备液；取上述内标贮备液 20 μL，加乙腈定容至 1 000 μL，得 20.62 μg/mL 的内标 A 液；取内标 A 液 0.5 mL，加乙腈定容至 50 mL，即得质量浓度为 206.2 ng/mL 的内标工作液。

质控样品溶液：按对照品溶液配制方法，配成质量浓度为 1.004 mg/mL 的 **1** 贮备液；用 80% 乙腈稀释，得到质量浓度分别为 803.2、20.08、2.008、1.004 ng/mL 的质控溶液。

2.3　动物试验给药方案

将 40 只雄性大鼠随机分为 2 组，每组 20 只。A 组给予吸入用 **1** 溶液 A；B 组给予吸入用 **1** 溶液 B，给药剂量均为 30 mg/kg，给药体积均为 15 mL/kg，均给药 1 次。每组分别于给药结束后 0、0.5、1、4 h 时取 5 只大鼠，腹腔注射 2.0% 的戊巴比妥钠溶液实施麻醉（50 mg/kg），腹主动脉放血处死后取气管支气管、肺组织，用 0.9% 氯化钠注射液清洗，再用滤纸吸干，所得组织样品于 －70 ℃条件保存备用。

2.4　组织样本处理

取 SD 大鼠的气管支气管样品［*m*（气管支气管）∶ *V*（生理盐水）=1 ∶ 10］和肺组织样品［*m*（肺）∶ *V*（生理盐水）=1 ∶ 5］各 50 μL，分别置离心管中，加入 80% 乙腈溶液和“**2.2**”项下的内标工作液各 50 μL，再分别加入缓冲液（含 2.5 mmol/L 乙酸铵和 50% 氨水）20 μL 和乙酸乙酯 800 μL，涡旋 5 min，于 4 ℃离心（17 968×*g*）10 min 后，取上

清液 600 μL。剩余部分分别加入乙酸乙酯 600 μL，涡旋 5 min，于 4 ℃离心（17 968×*g*）10 min，再分别取上清液 600 μL。合并 2 次上清液，用氮气吹干，加入复溶液［*V*（乙腈）∶*V*（0.1 %甲酸水溶液）=8 ∶ 92］100 μL，涡旋 5 min，超声 30 s，于 4 ℃离心（17 968×*g*）5 min，取上清液 80 μL，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析。

2.5 方法学验证用样品

2.5.1 气管支气管组织方法学验证用样品的制备

空白气管支气管线性样品：取 SD 大鼠空白气管支气管匀浆液（即未给药大鼠的气管支气管匀浆液）50 μL，分别加入不同浓度的 **1** 对照品工作液 50 μL，其余操作同“**2.4**”项，制备 **1** 质量分数相当于 10 410、5 205、1 041、208.2、52.05、20.82、10.41 和 0 ng/g 的标准曲线样品。

质控（QC）及定量限（LLOQ）样品：取 4 个不同质量浓度（803.2、20.08、2.008、1.004 ng/mL）的 **1** 对照品工作液各 50 μL，加入 SD 大鼠空白气管支气管匀浆液 50 μL，其余操作同“**2.4**”项，制备质量分数为 8 032、200.8、20.08 ng/g 的 QC 样品和 10.04 ng/g 的 LLOQ 样品。

基质效应考察用样品：取超纯水 50 μL，置离心管中，分别加入 2.008、20.08、803.2 ng/mL 的 **1** 质控样品溶液 50 μL，其余操作同“**2.4**”项，即得溶液样品（Sol）；按“**2.4**”项下方法操作，处理气管支气管基质后再加入与溶液样品相同浓度的 **1** 质控样品溶液，即得气管支气管匀浆基质样品（SAE）。

2.5.2 肺组织方法学验证用样品的制备

空白肺线性样品：取 SD 大鼠空白肺匀浆液（未给药大鼠的肺匀浆液）50 μL，分别加入不同浓度的 **1** 对照品工作液 50 μL，其余操作同“**2.4**”项，制备质量分数相当于 5 205、2 602、520.5、104.1、26.02、10.41、5.205 和 0 ng/g 的标准曲线样品。

质控（QC）及定量限（LLOQ）样品：取 4 个不同质量浓度（803.2、20.08、2.008、1.004 ng/mL）的 **1** 对照品工作液 50 μL，加入 SD 大鼠空白肺匀浆液 50 μL，其余操作同“**2.4**”项，制备质量分数为 4 016、100.4、10.04 ng/g 的 QC 样品和 5.020 ng/g 的 LLOQ 样品。

基质效应考察用样品：取超纯水 50 μL，置离心管中，分别加入的 2.008、20.08、803.2 ng/mL 的 **1** 质控样品溶液 50 μL，其余操作同“**2.4**”项，即得溶液样品（Sol）；按“**2.4**”项下方法操作，处理肺基质后再加入与溶液样品相同质量浓度的 **1** 质控样品溶液，即得肺匀浆基质样品（SAE）。

2.6 数据处理与分析

所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 17 软件进行单因素方差分析（ANOVA），用最小显著差异法（least significant difference，LSD）进行组间比较，若 $P<0.05$ 则表示数据具有统计学显著性差异。

2.7 方法学验证

2.7.1 专属性试验

分别取 SD 大鼠空白气管支气管组织、“**2.5.1**”项下含 **1** 10 410 ng/g 的空白气管支气管组织线性样品和 SD 大鼠雾化吸入 **1** 后 0 h 的气管支气管样品，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，结果如图 1 所示。

另取 SD 大鼠空白肺组织、“**2.5.2**”项下含 **1** 5 205 ng/g 的空白肺组织线性样品和 SD 大鼠雾化吸入 **1** 后 0 h 的肺组织样品，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，结果如图 2 所示。

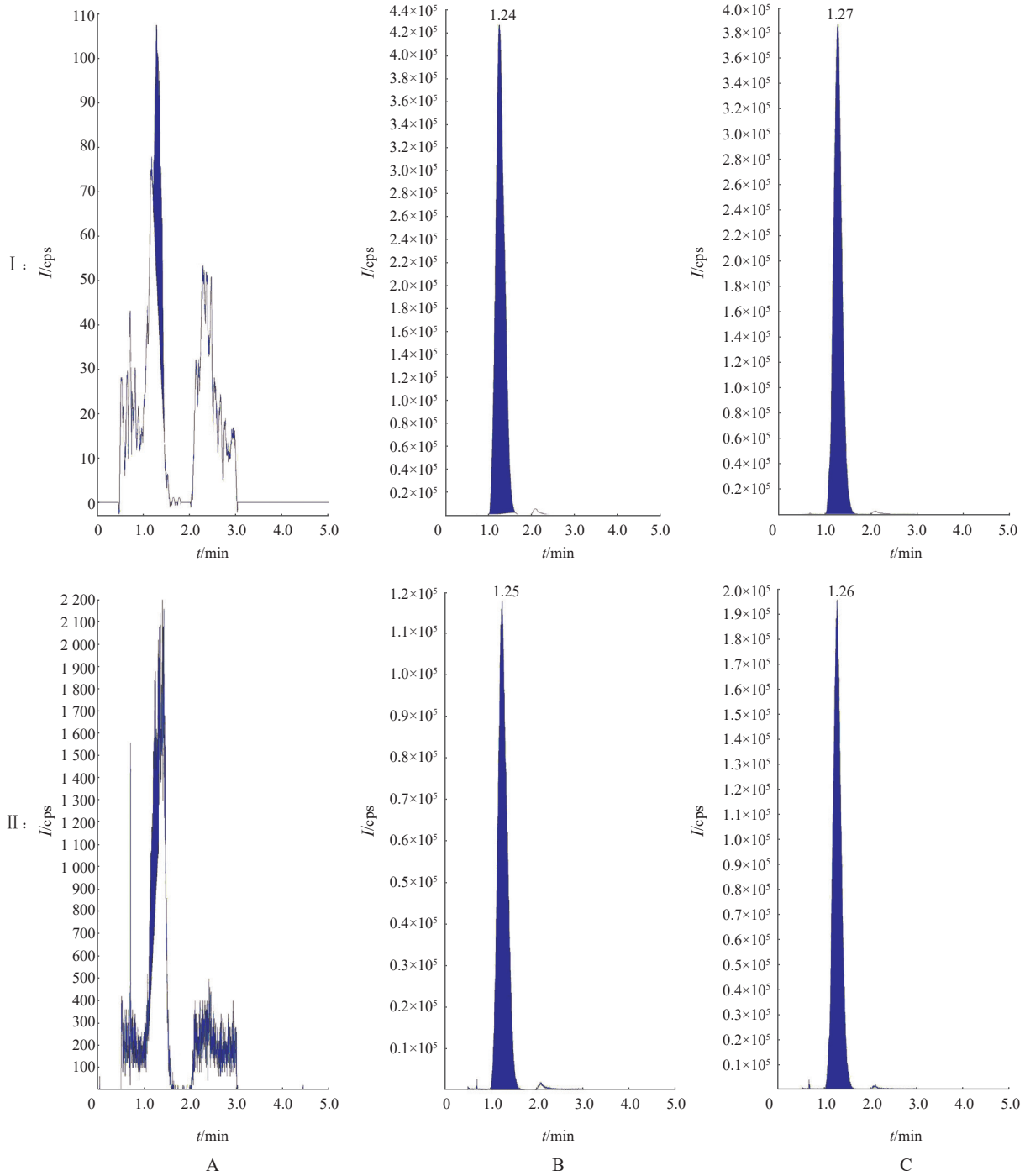
结果显示，在建立的 LC-MS/MS 条件下，**1** 和内标在气管支气管组织及肺组织中的特异性良好，无明显干扰峰，**1** 和内标的保留时间均约为 1.2 min。

2.7.2 线性试验与定量限

照“**2.5.1**”和“**2.5.2**”项下方法制备气管支气管、肺线性样品，以待测物质量分数（*c*）为横坐标、待测物与内标物的峰面积比值（*R*）为纵坐标，用加权最小二乘法进行线性回归得标准曲线和相关系数，气管支气管样品以 10.04 ng/g 为 LLOQ，肺组织样品以 5.020 ng/g 为 LLOQ。结果显示，**1** 在气管支气管组织样品中的线性方程为 R=0.000 348c+0.001 03（r=0.999 6），在肺组织样品中的线性方程为 R=0.000 762c+0.001 86（r=0.999 7），线性范围分别为 10.41 ～ 10 410 和 5.205 ～ 5 205 ng/g。

2.7.3 精密度与准确度试验

取“**2.5.1**”和“**2.5.2**”项下制备的LLOQ，以及低、中、高浓度的QC样品，每个浓度平行制备6个样本，代入“**2.7.2**”项下的线性方程



A列—SD大鼠空白气管支气管组织样品；B列—含**1** 10 410 ng/g的空白气管支气管组织线性样品；

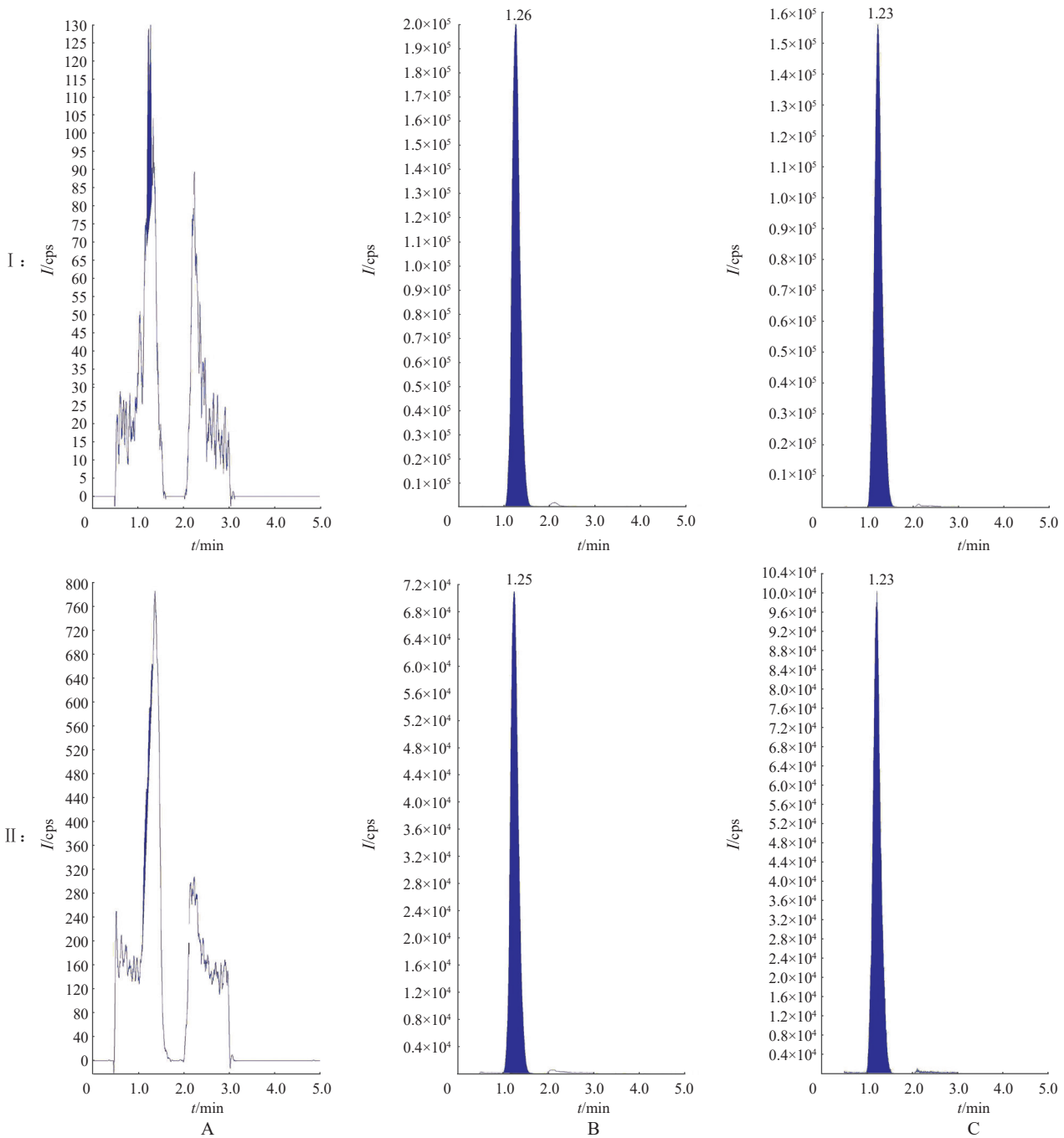
C列—SD大鼠雾化吸入**1**后0 h的气管支气管样品。

Ⅰ行—**1**；Ⅱ行—内标。

图1　气管支气管组织样品的典型质谱图

Fig.1　Typical Mass Spectra of Tracheobronchial Samples

计算气管支气管和肺组织中的实测浓度。结果显示，4 个浓度的 **1** 在大鼠气管支气管组织和肺组织中的日内 RSD（n=6）为 0.51 %～14.38 %，准确度为 101 %～114 %；日间 RSD（n=6）为 4.33 %～11.83 %，准确度为 92 %～109 %，满足生物样品定量分析要求。



A 列—SD 大鼠空白肺组织样品；B 列—含 **1** 5 205 ng/g 的空白肺组织线性样品；C 列—SD 大鼠雾化吸入 **1** 后 0 h 的肺样品。Ⅰ行—**1**；Ⅱ行—内标。

图 2 肺组织样品的典型质谱图

Fig.2 Typical Mass Spectra of Lung Tissue Samples

2.7.4 基质效应

基质效应的定量检测可用基质因子来表示[11]。取“**2.5.1**”和“**2.5.2**”项下低、中、高质量浓度的样品，各 6 份，进样分析。将相同浓度的 SAE 样品色谱峰面积（A_{SAE}）与 Sol 样品色谱峰面积（A_{Sol}）相比，得到基质因子。结果显示，低、中、高浓度的气管支气管组织样品的基质效应为 88.73%～97.35%，RSD（n=6）为 0.69%～5.09%；低、中、高浓度的肺组织样品的基质效应为 88.15%～105.80%，RSD（n=6）为 0.61%～1.66%，均可接受。

2.7.5 稳定性试验

取“**2.5.1**”和“**2.5.2**”项下气管支气管及肺组织的低、中、高浓度 QC 样品，每种样品平行配制 3 份，于室温放置 24 h 后进样测定。结果如表 1 所示，气管支气管组织及肺组织中的分析物在液相色谱仪的自动进样器中放置，24 h 内稳定。

表 1　气管支气管和肺组织中 1 的稳定性数据（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1　Stability Data for **1** in Tracheobronchial and Lung Tissues（$\bar{x}\pm s$, n=3）

组织	质量分数 /（ng·g^{-1}）	准确度 /%	
		0 h	24 h
气管支气管	20.08	113.91±0.51	111.15±2.64
	200.8	111.27±2.83	110.47±1.38
	8 032	112.33±2.24	106.13±0.28
肺	10.04	103.69±1.97	115.09±1.64
	100.4	94.45±0.87	90.13±9.15
	4 016	86.13±0.89	98.56±1.46

2.7.6 提取回收率

将 QC 样本、SAE 样品（每个浓度至少平行试验 5 次）进样分析，将相同浓度的 QC 样品色谱峰面积（A_{BL}）与 SAE 样品色谱峰面积（A_{SAE}）均值相比，得到提取回收率（ER）。结果如表 2 所示，可见提取回收率为 61.7%～104.1%，可接受。

2.8 气管支气管和肺组织分布

取 40 只雄性大鼠，按“**2.3**”项下方案给药，并按“**2.4**”项下组织样本处理方法操作，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析。结果如图 3 所示，硫酸沙丁胺醇吸入后 0～1 h，气管支气管中的 **1** 含量高于肺（P<0.05）；与已上市药物相比，气管支气管和肺组织样品浓度在各时间点接近，无统计学差异（P>0.05）。

表 2　SD 大鼠气管支气管、肺组织中 1 的提取回收率（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.2　Extraction Recovery Rates of **1** in the Tracheobronchial and Lung Tissues of SD Rats（$\bar{x}\pm s$, n=6）

组织	质量分数 /（ng·g^{-1}）	QC		SAE		ER/%
		峰面积均值	RSD/%	峰面积均值	RSD/%	
气管支气管	20.08	1.21×10^4	1.40	1.49×10^4	1.12	81.3
	200.8	1.08×10^5	1.50	1.28×10^5	2.19	84.2
	8 032	4.51×10^6	1.09	5.03×10^6	1.22	89.5
肺	10.04	1.06×10^4	2.40	1.07×10^4	2.81	98.4
	100.4	9.01×10^4	1.70	8.66×10^4	2.09	104.1
	4 016	2.38×10^6	2.87	3.68×10^6	1.47	61.7

3　讨论

1 已被证明具有强大的支气管扩张作用[2]。沙丁胺醇治疗效果取决于所使用的配方和给药途径[12]。为了减少全身不良反应，提高气管支气管及肺的药物浓度，雾化吸入是 **1** 最常用的给药方式[13]。

本研究建立了 LC-MS/MS 法分析 **1** 在气管支气管以及肺中的含量，在流动相中加入 0.1% 甲酸以促进样品的电离。方法学验证结果表明，在 10.41～10 410 ng/g，本法测定大鼠气管支气管匀浆液中 **1** 的准确度、方法专属性、稳定性均满足方法学确证的相关要求；在 5.205～5 205 ng/g 本法测定大鼠肺匀浆液中 **1** 的准确度、方法专属性、稳定性均满足方法学确证的相关要求。

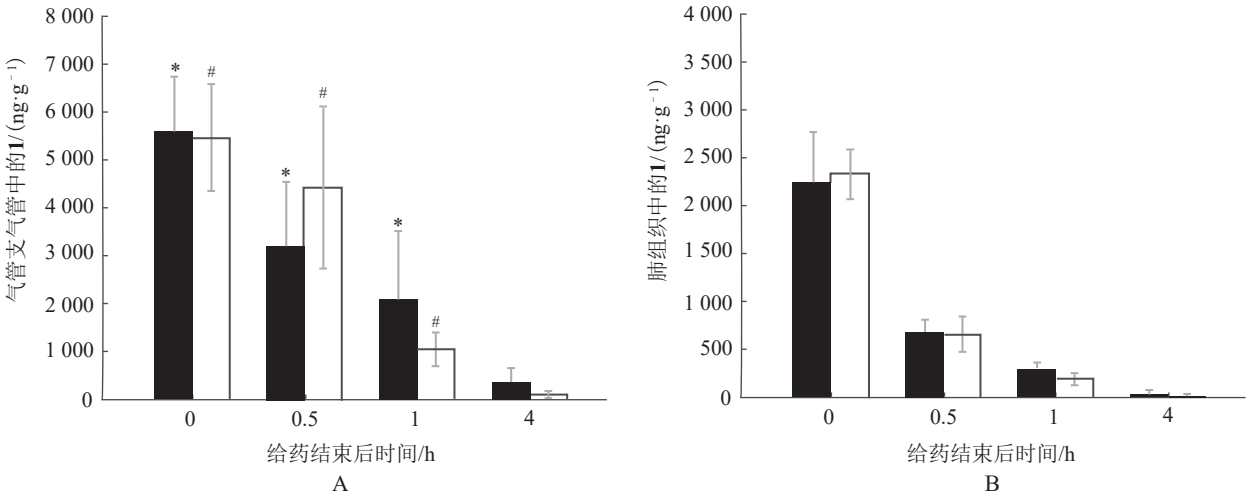
将本研究建立的 LC-MS/MS 方法应用于分析大鼠雾化吸入 **1** 后气管支气管及肺组织中药物分布的研究，可见 **1** 在气管支气管组织的含量高于肺（P>0.05）。该结果可作为临床合理用药的参考依据。

参考文献：

[1] 刘义伟，何　正，陈　婧，等. 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂药动学等效性评价技术与流程研究 [J]. 中国医院药学杂志，2021, **41**(8): 777-782.

[2] 白春平，伊　策，邢　刚，等. β_2 受体激动剂硫酸沙丁胺醇的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报，2022, **39**(10): 1287-1294.

[3] 何素云. 氧气驱动硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂联合异丙托溴铵气雾剂雾化吸入治疗小儿哮喘疗效及安全性 [J]. 中国处方药，2017, **15**(6): 91-92.



A—气管支气管组织；B—肺组织。

■—自制吸入用 **1**；□—市售吸入用 **1**。

注：A 组大鼠气管支气管组织与肺组织样品中的 **1** 含量比较，*P<0.05；B 组大鼠气管支气管组织与肺组织样品中的 **1** 含量比较，#P<0.05。

图 3 雾化吸入后气管支气管组织和肺组织中 1 的分布（n=4）

Fig.3 Distribution of **1** in Tracheobronchial and Lung Tissues after Aerosol Inhalation (n=4)

[4] 张 宇. 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂联合茶碱缓释片治疗老年急性哮喘的临床效果 [J]. 中国实用医药 , 2022, **17**(5): 145-147.

[5] 刘 鹏. 硫酸沙丁胺醇联合布地奈德混悬液雾化吸入治疗小儿哮喘急性发作效果分析 [J]. 中国处方药 , 2020, **18**(1): 90-91.

[6] BORGHARDT J M, CHARLOTTE K, ASHISH S. Inhaled therapy in respiratory disease: the complex interplay of pulmonary kinetic processes [J]. *Can Respir J*, 2018, **19**: 2732017.

[7] SADIQ M W, HOLZ O, ELLINGHUSEN B D, *et al*. Lung pharmacokinetics of inhaled and systemic drugs: a clinical evaluation [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, **178**(22): 4440-4451.

[8] TORCHILIN V P. Drug targeting [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, **11**(2): S81-S91.

[9] 刘义伟 , 何 正 , 陈 婧 , 等. 硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂药动学等效性评价技术与流程研究 [J]. 中国医院药学杂志 , 2021, **41**(18): 777-782.

[10] 刘沁洁 , 崔 艳. 高效液相色谱法测定复方异丙托溴铵雾化吸入溶液中杂质的含量 [J]. 理化检验：化学分册 , 2024, **60**(2): 180-186.

[11] CHEN B Y, HUI L L, SHI L L, *et al*. A sensitive quantification approach for detection of HETE-CP adduct after benzyl chloroformate derivatization using ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, **411**(15): 3405-3415.

[12] TAHA E I, ZAGHLOUL A A, SAMY A M, *et al*. Bioavailability assessment of salbutamol sulfate suppositories in human volunteers [J]. *Int J Pharm*, 2004, **279**(1/2): 3-7.

[13] JACOBSON G A, RAIDAL S, HOSTRUP M, *et al*. Long-acting β_2-agonists in asthma: enantioselective safety studies are needed [J]. *Drug Safe*, 2018, **41**(5): 441-449.