

## 气相色谱-氮磷检测方法同时检测尿样中的 刺激剂、麻醉剂和抗雌激素类五种兴奋剂

邱丽君<sup>1</sup>, 郑小严<sup>2</sup>, 游飞明<sup>2</sup>, 刘 薇<sup>1</sup>, 张金章<sup>1</sup>, 张 兰<sup>1\*</sup>

(1. 食品安全分析与检测教育部重点实验室(福州大学), 福建 福州 350002;

2. 福建省中心检验所, 福建 福州 350002)

**摘要**:建立了一种简单、灵敏、快速地同时测定人体尿液中3类(刺激剂、麻醉剂和抗雌激素)5种兴奋剂的气相色谱-氮磷检测(GC-NPD)方法。尿样采用非衍生法液-液萃取预处理技术,选用叔丁基甲醚作为萃取溶剂,二苯胺作为内标进行定量检测。即在一定量标准品及内标的混合溶液中加入5.0 mL空白尿样混合均匀后,加入0.5 mL 5 mol/L氢氧化钠溶液、3.0 g氯化钠和5.0 mL叔丁基甲醚提取液,涡旋、离心,萃取液经氮气吹干、丙酮溶解后用GC-NPD测定。该方法在0.022~20 mg/L之间呈现良好的线性关系,相关系数为0.9945~0.9998,最小检出质量浓度为0.007~0.015 mg/L。5种兴奋剂的尿样加标回收率为75.8%~118.2%,相对标准偏差小于17.2%。

**关键词**:气相色谱-氮磷检测;刺激剂;麻醉剂;抗雌激素;兴奋剂;尿

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)03-0364-04 栏目类别:技术与应用

## Simultaneous determination of stimulant, narcotics and antiestrogen in urine by gas chromatography-nitrogen phosphorous detection

QIU Lijun<sup>1</sup>, ZHENG Xiaoyan<sup>2</sup>, YOU Feiming<sup>2</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, ZHANG Jinzhang<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Analysis and Detection for Food Safety, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;

2. Fujian Provincial Central Inspection Institute, Fuzhou 350002, China)

**Abstract**: An easy, sensitive and quick method was established for simultaneously separating and determining stimulant, narcotics and antiestrogen in spiked human urine using gas chromatography-nitrogen phosphorous detection (GC-NPD). The urine sample was preprocessed by liquid-liquid extraction. Tert-butyl methyl ether and *N*-phenylamine were chosen as extraction solvent and internal standard for quantitation, respectively. That is, a standard stock mixture containing methylephedrine, meperidine, methadone, tamoxifen, fentanyl and *N*-phenylaniline was added into 5.0 mL urine samples and mixed uniformly, then 0.5 mL 5.0 mol/L NaOH, 3.0 g NaCl and 5.0 mL tert-butyl methyl ether were added and finally centrifuged. The extraction solution was dried under N<sub>2</sub>, redissolved by acetone and then determined by GC-NPD. The method showed the satisfactory linearity was between 0.022 - 20 mg/L, with the coefficient correlation from 0.9945 to 0.9998. The detection limits were in the range of 0.007 - 0.015 mg/L, and the average recoveries in spiked urine were between 75.8% - 118.2% and the relative standard deviations were lower than 17.2%.

**Key words**: gas chromatography-nitrogen phosphorous detection; stimulant; narcotics; antiestrogen; doping; urine

刺激剂、麻醉剂、抗雌激素是体育竞赛中较常用的兴奋剂。刺激剂可增强自信心和进取心,增强耐

力和力量,还可增加心律、血压和肌肉血流量,扩张呼吸道、增加肺通气量。麻醉剂的服用会使运动员

\* 通讯联系人:张 兰,教授,博士生导师. E-mail: zlan@fzu.edu.cn.

基金项目:福建省体育局重大专项项目(HX2005-74)、福建省科技计划重点项目(2007I0020, 2007Y0060)和福建省新世纪优秀人才支持计划项目(HX2006-101).

收稿日期:2008-10-08

产生快感和心理亢奋,降低疼痛感,在比赛中会造成更严重的伤害。此外,该类药物多有成瘾性。而抗雌激素在临床上被用作治疗乳腺癌、不孕不育症等与激素相关的疾病。近年来,这类药物被兴奋剂滥用者引入到体育竞赛中,用来提高体内睾酮水平,并用于对抗服用外源性类固醇所引起的副作用。目前,兴奋剂检测的主要方法有气相色谱(GC)<sup>[1]</sup>、高效液相色谱<sup>[2]</sup>、气相色谱-质谱联用<sup>[3-6]</sup>、高效毛细管电泳<sup>[7,8]</sup>、毛细管电泳-离子阱质谱<sup>[9]</sup>、高效液相色谱-质谱联用<sup>[10,11]</sup>、流动注射电化学发光<sup>[12]</sup>等方法。由于在实际样品检测中,上述几类目标分析物的含量较低,因此分析前常需要对实际样品中的目标分析物进行分离和富集。液-液萃取<sup>[13]</sup>、固相萃取<sup>[14]</sup>已被成功地应用于实际样品的前处理过程。

气相色谱具有极强的分离能力,而氮磷检测器(NPD)对含N、P元素样品的检测具有灵敏度高、特异性强的优点,因此GC-NPD非常适用于兴奋剂的分离与鉴定。尿样的前处理中,采用液-液非衍生化萃取法,既简便易行,又能保证回收率。本实验试图探讨建立不经衍生化直接进样实现尿样中甲基麻黄碱(刺激剂)、哌替啶(麻醉剂)、美沙酮(麻醉剂)、他莫昔芬(抗雌激素)、芬太尼(麻醉剂)3类5种兴奋剂的同时分离及测定的方法,为实际工作中同时快速检测尿样中的上述兴奋剂提供参考依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

仪器:美国Agilent 6890N气相色谱仪配氮磷检测器(美国Agilent公司),QI-861型旋涡混合器Vortex Shaker(海门市麒麟医用仪器厂),TDZ4-WS型自动平衡离心机(湖南赛特湘仪离心机有限公司),HGC-24A型氮吹仪(厦门精艺兴业科技有限公司)。

试剂:二苯胺(*N*-phenylaniline)购自国药集团化学试剂有限公司;叔丁基甲醚(色谱纯)购自Fisher ChemAlert Guide;丙酮、正己烷均为色谱纯,购自天津福晨化学试剂厂。其他常用试剂均为分析纯。实验用水为去离子水。

标准品:甲基麻黄碱(methylephedrine)、哌替啶(meperidine)、美沙酮(methadone)、他莫昔芬(tamoxifen)、芬太尼(fentanyl)均从中国药品生物制品检定所购得。

### 1.2 气相色谱条件

色谱柱为HP-5石英毛细管柱(30.0 m × 0.32 mm × 0.25 μm);载气为高纯氮(纯度 > 99.999%),流速为1.3 mL/min,进样方式为不分流进样,进样体积为1.0 μL,进样口温度为280 °C;检

测器温度为340 °C;柱温升温程序:初始温度为85 °C,保持1 min,以5 °C/min速率升至130 °C,保持10 min,再以20 °C/min速率升至280 °C,保持5 min;尾吹气为N<sub>2</sub>,流速为30 mL/min;H<sub>2</sub>流速为3.0 mL/min,空气流速为60 mL/min。

### 1.3 标准工作曲线的绘制

分别准确移取一定量的待测兴奋剂标准品混合溶液,以丙酮稀释,并加入内标物(二苯胺)使其最终浓度为5.0 mg/L,得到一系列不同浓度的混合溶液。在最优化条件下进行气相色谱分析,以浓度为横坐标、以待测物与内标物的峰面积比为纵坐标,绘制标准工作曲线。

### 1.4 样品处理

取5.0 mL空白尿样,加入1.0 mL含1.0 mg/L标准品及5.0 mg/L内标的混合溶液,混匀后加入0.5 mL 5.0 mol/L NaOH溶液、3.0 g的NaCl和5.0 mL前处理有机溶剂(叔丁基甲醚提取液),之后先涡旋3 min,再以4 000 r/min离心10 min,取上清液于试管中,在氮气流下缓慢吹干,加入1.0 mL丙酮溶解,待GC-NPD检测。

## 2 结果和讨论

### 2.1 GC-NPD检测条件的选择

#### 2.1.1 加热电流和基流

基流和被测组分信号均随钨珠加热电流的增加而增大,实际工作中,常用基流为标记来调节加热电流的大小。其原则是,灵敏度允许的前提下,宁小勿大。对于不同型号的商品仪器有不同的最佳基流设定值。本文所使用的仪器其NPD基流设定缺省值为50 pA。

#### 2.1.2 载气、尾吹气和氢气流速

通常进入NPD的气体有载气、尾吹气、氢气和空气,这些气体及其流速决定了电离源周围气体层的成分,从而强烈影响NPD的灵敏度和专一性。选择氮气作为载气和尾吹气,其流速从柱分离角度考虑分别为1.3 mL/min及30 mL/min。虽然氢气和空气流速对电离源周围气体成分影响较大,但当NPD中氢气流速控制在2.5~4.5 mL/min时,流速对分离的影响并不显著。本文选择最佳的氢气流速为3.0 mL/min,空气流速为60 mL/min。

#### 2.1.3 检测器温度

检测器温度高有助于提高NPD的灵敏度和稳定性。通常检测器温度至少为150 °C,如无不良影响,应尽量高些,以减小基线干扰,减小因载气或尾吹气流速改变而引起的灵敏度变化。因此将检测器温度保持在340 °C。

## 2.2 加标尿样的前处理条件考察

### 2.2.1 有机溶剂的优化

选用 4 种溶剂(乙醚、乙酸乙酯、叔丁基甲醚、氯仿-正己烷-异丙醇(体积比为 4:5:1)),按“1.4”节的样品处理方法分别对加标尿样进行预处理,分别用每种溶剂处理一份空白尿样和两份加标尿样。各种溶剂的前处理所得的平均回收率如图 1。由图 1 可见,采用叔丁基甲醚作为前处理溶剂时,各种化合物的回收率(80%~120%)令人满意,因此选用叔丁基甲醚作为前处理溶剂结果较理想。

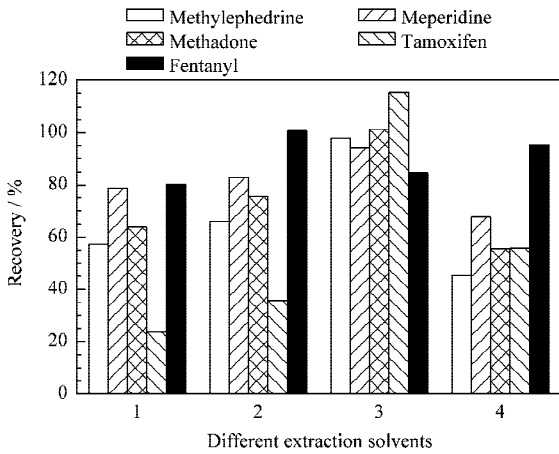


图 1 不同萃取溶剂对回收率的影响

Fig. 1 Influence of different extraction solvents on recovery

1. ether; 2. acetic ether; 3. tert-butyl methyl ether; 4. mixed solvents (chloroform-*n*-hexane-isopropanol (4:5:1, v/v/v)).

分别用 3.0~7.0 mL 的叔丁基甲醚按上述方法对加标尿样进行前处理,计算出用不同体积的叔丁基甲醚进行前处理所得的回收率,结果如图 2 所示。综合考虑,采用 5.0 mL 的叔丁基甲醚进行前处理时,各物质加标回收率较理想。

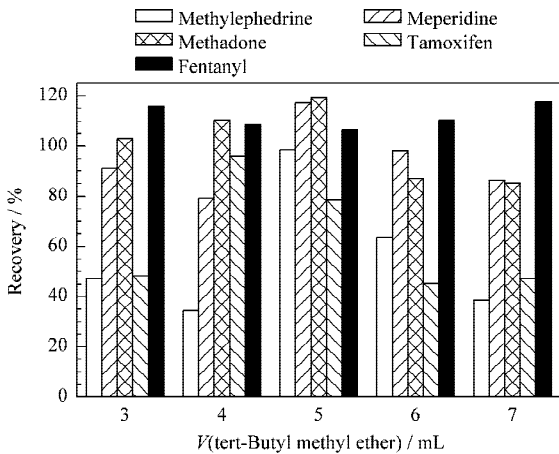


图 2 叔丁基甲醚萃取体积对回收率的影响

Fig. 2 Influence of different extraction volumes of tert-butyl methyl ether on recovery

### 2.2.2 前处理的重现性

为了考察加标尿样前处理方法的可靠性,对加标尿样平行进行 5 次前处理,计算出各种兴奋剂回收率的相对标准偏差(RSD):甲基麻黄碱 5.5%,哌替啶 2.9%,美沙酮 17.2%,他莫昔芬 11.0%,芬太尼 8.3%。所以采用叔丁基甲醚作为萃取溶剂,各种药物的 RSD 为 2.9%~17.2%。部分药物的回收率的 RSD 偏大,其中美沙酮可能是由于其为叔胺结构,碱性较弱,适宜在弱碱性条件下萃取<sup>[1]</sup>,而本实验在碱性较强的条件下萃取,使得其提取回收率的 RSD 较大。

综合以上因素可以得到“1.4”节的最佳的前处理条件。

图 3 为 1.0 mL 浓度为 1.0 mg/L 的标准品混合溶液(含 5.0 mg/L 内标)加入到 5.0 mL 的尿样中,在最佳前处理条件下所得的色谱图。从图 3 可以看到,混合标准品中各组分不受干扰物质峰的影响,尿样中基体成分与混合标准品中的各组分得到较好的分离,无干扰情况产生。因此,此方法适合于尿样中刺激剂、麻醉剂和抗雌激素类兴奋剂的同时检测。

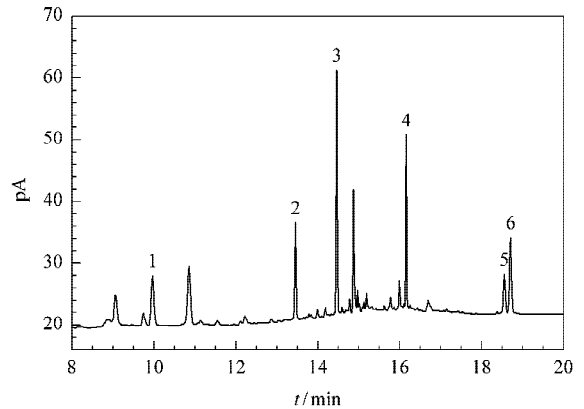


图 3 加标尿样在最佳的前处理条件下所得的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a urine spiked with standards under the optimal pretreatment method

1. methylephedrine; 2. *N*-phenylaniline (I. S.); 3. meperidine; 4. methadone; 5. tamoxifen; 6. fentanyl.

## 2.3 线性范围和检出限

配制一系列标准溶液,按选定的色谱条件,分别以待测物与内标物的峰面积比( $y$ )对各种兴奋剂的浓度( $x$ )进行线性拟合,得到各物质的标准工作曲线、回归方程和相关系数,并以 3 倍信噪比计算最低检出限,结果如表 1 所示。由表 1 中数据可以看出,方法的相关系数在 0.9945~0.9998 之间,呈现良好的线性关系,根据 3 倍信噪比,计算得到方法的检出限在 0.007~0.015 mg/L 之间,其灵敏度高于文献[13]所报道的其他方法的灵敏度。此结果能满足国际反兴奋剂机构的要求<sup>[15]</sup>。

表1 5种兴奋剂的标准曲线、相关系数( $r^2$ )、线性范围和检出限Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients ( $r^2$ ), linear ranges and detection limits of 5 dopings

Analyte	Regression equation <sup>1)</sup>	$r^2$	Linear range/(mg/L)	Detection limit <sup>2)</sup> /(mg/L)
Methylephedrine	$y = 0.1666x - 0.0028$	0.9960	0.022 - 20	0.011
Meperidine	$y = 0.1625x - 0.0013$	0.9996	0.022 - 9.6	0.007
Methadone	$y = 0.1285x - 0.0028$	0.9998	0.022 - 12.8	0.011
Tamoxifen	$y = 0.0889x - 0.0014$	0.9994	0.022 - 9.6	0.007
Fentanyl	$y = 0.1034x + 0.0005$	0.9994	0.045 - 2.9	0.015

1)  $y$ : peak area ratio of the analytes with I.S;  $x$ : mass concentration, mg/L. 2)  $S/N = 3$ .

## 2.4 回收率和精密度

为了考察加标尿样前处理方法的可靠性,对加标尿样平行进行5次前处理,计算各种兴奋剂回收率的RSD,结果见表2。

表2 5种兴奋剂的回收率( $n = 5$ )Table 2 Recoveries of 5 dopings ( $n = 5$ ) %

Analyte	Recoveries (RSD)		
	0.5 mg/L	1.0 mg/L	5.0 mg/L
Methylephedrine	103.7 (7.9)	98.3 (5.5)	96.7 (5.0)
Meperidine	118.1 (4.6)	116.2 (2.9)	109.1 (3.0)
Methadone	113.3 (15.6)	118.2 (17.2)	107.4 (14.3)
Tamoxifen	85.1 (13.1)	78.4 (11.0)	75.8 (8.2)
Fentanyl	109.2 (9.2)	106.5 (8.3)	103.4 (6.7)

## 3 结论

本实验利用气相色谱-氮磷检测器对3类5种兴奋剂的分离及检测方法进行了研究。所建立的液-液萃取前处理方法可同时提取5种兴奋剂,因此该法能用于尿样中甲基麻黄碱等5种兴奋剂的同时分离和测定。方法的最小检出限在0.007~0.015 mg/L,为兴奋剂检测工作同时快速检测尿样中的3类兴奋剂提供了参考方法。

## 参考文献:

- [1] Meng P J, Yao L J, Wang J H, et al. Journal of Chinese People's Public Security University: Science and Technology (孟品佳,姚丽娟,王景翰,等.中国人民公安大学学报:自然科学版), 2004(4):7
- [2] Liu Y H, Li T P. Chinese Journal of Chromatography (刘玉华,李太平.色谱), 1995, 13(6):483
- [3] Jin Y C, Cai M Z, Huang X L, et al. Journal of Instrumental Analysis (金永春,蔡明招,黄晓兰,等.分析测试学报), 2007, 26(2):151
- [4] Wu P G, Chen H H, Wang Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (吴平谷,陈慧华,王强,等.色谱), 2008, 26(1):39
- [5] Shen M, Xiang P, Shen B H, et al. Chinese Journal of Chromatography (沈敏,向平,沈保华,等.色谱), 2008, 26(4):454
- [6] Shanguan L M, Liu W, Zheng X Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (上官良敏,刘薇,郑向阳,等.色谱), 2008, 26(4):460
- [7] Xiao H, Tong P, Feng Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (肖惠,董萍,冯强,等.色谱), 2008, 26(4):444
- [8] Wang W Y, Zhang Y L, Xing X P, et al. Chinese Journal of Chromatography (王伟宇,张玉莲,邢晓平,等.色谱), 2008, 26(2):228
- [9] Wey A B, Caslavská J, Thormann W. J Chromatogr A, 2000, 895:133
- [10] Zhu L, Chen X Y, Zhang Y F, et al. J Chromatogr B, 2005, 820:175
- [11] Qin Y, Xu Y X, Yang S M, et al. Chinese Journal of Chromatography (秦暘,徐友宣,杨树民,等.色谱), 2008, 26(4):431
- [12] Cai X L, Zhao C Z, Tao S C, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (柴晓莉,赵常志,陶晟辰,等.分析实验室), 2008, 27(6):108
- [13] Lu J H, Wang B, Deng J, et al. Chinese Journal of Sports Medicine (陆江海,王杉,邓静,等.中国运动医学杂志), 2004, 23(6):701
- [14] Baniceru M, Croitoru O, Popescu S M. J Pharmaceut Biomed, 2004, 35:593
- [15] World Anti-Doping Agency. WADA Technical Document-TD2004MRPL Version 1.0. (2005-11). <http://www.wada-ama.org> (accessed November 2005)