

气相色谱-质谱联用技术用于尿样中 β -阻断剂的初筛定量和确证

上官良敏, 刘 薇, 郑向阳, 张 兰

(食品安全分析与检测教育部重点实验室(福州大学) 福州大学运动科学研究中心, 福建 福州 350002)

摘要 :建立了一种同时测定 5 种 β -阻断剂(卡替洛尔、艾司洛尔、普萘洛尔、索他洛尔、比索洛尔)的气相色谱-质谱方法(GC-MS),并用于疑似阳性实际尿样的初筛、定量和确证。分别对游离态和结合态药物进行了提取,合并提取液后采用 *N*-甲基-*N*-三甲基硅基-三氟乙酰胺($C_6H_{12}F_3NOSi$, MSTFA)和 *N*-甲基-双三氟乙酰胺试剂($C_5H_3F_6NO_2$, MBTFA)进行混合衍生。确定了优化的 GC-MS 条件,建立了采用选择离子监测方式(SIM)初筛和全扫描方式(SCAN)确证的实验流程,建立了 SIM 模式下 5 种 β -阻断剂的尿样加标工作曲线,其 SIM 方法的检出限达 0.2 ~ 1.0 ng/mL,尿样的加标回收率为 70.5% ~ 103.4%,相对标准偏差小于 14.9%。该方法成功地用于普萘洛尔阳性尿样的检测,并绘制了普萘洛尔的尿代谢曲线。该方法对兴奋剂检测中 β -阻断剂滥用的控制有重要的意义。

关键词 :气相色谱-质谱 β -阻断剂 兴奋剂检测 尿液

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)04-0460-05 栏目类别 :兴奋剂检测方法专栏

Screening , quantification and confirmation of β -blockers in urine using gas chromatography-mass spectrometry

SHANGGUAN Liangmin , LIU Wei , ZHENG Xiangyang , ZHANG Lan

(*Key Laboratory of Analysis and Detection for Food Safety , Ministry of Education ,
Sport Science Research Center , Fuzhou University , Fuzhou 350002 , China*)

Abstract : A method was developed to perform the screening , quantification and confirmation of the five β -blockers , propranolol , carteolol , bisoprolol , esmolol , and sotalol , in human urine using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In sample preparation , conjugated and unconjugated β -blockers in urine were extracted separately , and the extracts were combined. The extracts were derivatized with *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) and *N*-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA). The optimal conditions of GC-MS were established , and the progresses of screening by selected ion monitoring (SIM) mode and confirmation by full scan (SCAN) mode were completed. At last , the quantification curves of the five β -blockers in spiked urine were established by SIM mode. The limits of detection were 0.2 ~ 1.0 ng/mL. Overall recoveries were 70.5% ~ 103.4% , and the relative standard deviations were lower than 15%. In addition , the method was successfully applied to the analysis of the positive urine of propranolol , and the urinary excretion curve was also established accordingly. It is significant to prohibit the abuse of β -blockers in doping control.

Key words : gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ; β -blockers ; doping detection ; urine

β -阻断剂是一类在临床上被广泛用于降低心脏病人的心率和血压的药物。在体育运动中,射击、射箭、摩托车等项目的运动员服用此类药物可降低焦虑情绪及赛前的激动心情,缓解外周紧张状态,以提高运动成绩^[1]。滥用此类药物可能引起头晕、失

眠、抑郁、幻觉、心跳过缓和低血压,严重者可诱发支气管哮喘;长期使用后突然停药会引发心跳过速、心肌梗死,乃至突然死亡。因此,世界反兴奋剂机构(WADA)将其定为特殊项目中的禁用物质。

目前,随着体育运动的迅速发展,兴奋剂检测的

收稿日期 2008-01-05

第一作者 :上官良敏,硕士. E-mail : shangguan789@163.com.

通讯联系人 :张 兰,教授,博士生导师. Tel : (0591) 87893207 , E-mail : zlan@fzu.edu.cn.

基金项目 :福建省体育局重大专项、福建省自然科学基金(B0510006 , 2007J0279)、福建省教育厅科技计划项目(2007F5067)、福建省科技厅国际合作重点项目(2007I0020)、福建省科技厅重点项目(2007Y0060)和福建省高校新世纪优秀人才支持计划资助。

工作量日益增大。建立一种同时筛选和测定多种 β -阻断剂的检测方法,对减少工作量,提高工作效率,节约人力和物力资源的投入意义重大。

迄今为止,应用于 β -阻断剂的检测技术有流动注射化学发光^[2]、胶束电动色谱^[3]、毛细管电泳^[4]、气相色谱(GC)^[5]、高效液相色谱^[6-9]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[10,11]、高效液相色谱-质谱联用^[12]等。按照国际奥委会规定,兴奋剂检测需要对可疑被测物进行质谱定性,因此集气相色谱的分离能力强和质谱灵敏度高、鉴别能力强于一身的GC-MS成为 β -阻断剂检测的主要手段。建立一种能同时筛选、定量和确证 β -阻断剂的GC-MS方法,可在各种大型体育比赛中及时准确地对运动员的尿样进行筛查,并对阳性尿进行确证,以维护体育运动的纯洁性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:Agilent Technologies 6890N/5973i 气相色谱-质谱联用仪。

试剂:半胱氨酸($C_3H_7NO_2S$);固体缓冲剂(分析纯级的碳酸氢钠和碳酸钾按质量比9:1的比例混匀并研磨,pH约为9.6);12 mol/L浓盐酸;12 mol/L氢氧化钠溶液;乙醚、异丙醇、甲醇和丙酮均为色谱纯级,购自国药集团化学试剂有限公司。其他常用试剂均为分析纯。实验用水为去离子水。

标准品:盐酸卡替洛尔(carbetolol hydrochloride);盐酸艾司洛尔(esmolol hydrochloride);盐酸普萘洛尔(propranolol hydrochloride);盐酸索他洛尔(sotalol hydrochloride);富马酸比索洛尔(bisoprolol fumarate)和内标酒石酸美托洛尔(metoprolol tartrate)均从中国药品生物制品检定所购得。

衍生剂:*N*-甲基-*N*-三甲基硅基-三氟乙酰胺($C_6H_{12}F_3NOSi$,简称MSTFA)和(*N*-甲基-双三氟乙酰胺($C_5H_3F_6NO_2$,简称MBTFA)购自Fluka公司。

1.2 样品制备

1.2.1 结合态药物的提取

由于 β -阻断剂在给药后经体内吸收转化代谢,部分药物会与蛋白结合成为结合态。结合态药物在提取前需进行水解,本文采用耗时较短的酸水解法。在10 mL塑料离心试管中移入5 mL尿样并加入25 μ L 20 μ g/mL美托洛尔作为内标,加入100 mg半胱氨酸及0.5 mL浓盐酸,涡旋混匀,在100 $^{\circ}$ C下加热30 min,自然冷却至室温,然后加入3 mL乙醚并涡旋3 min,离心(4 000 r/min)10 min后弃去有机

相,向水相中加入0.6 mL氢氧化钠溶液,涡旋混匀。加入2 g固体缓冲剂,混匀。再加入3 mL乙醚-异丙醇(体积比为10:1),涡旋3 min,离心(4 000 r/min)10 min。

1.2.2 游离态药物的提取

药物在人体中代谢后,部分以游离态(即原型)排入尿中。对游离态药物的提取采取直接的液-液提取方式。向10 mL塑料离心试管中移入5 mL尿样,加入2 g固体缓冲剂,涡旋混匀。加入3 mL乙醚-异丙醇(体积比为10:1),加入25 μ L 20 μ g/mL美托洛尔的甲醇溶液,涡旋3 min,离心(4 000 r/min)10 min。

1.2.3 衍生化反应

将含有结合态和游离态药物的有机相合并于另一支10 mL离心试管中,在45 $^{\circ}$ C下用氮气吹干。残渣中加入MSTFA 100 μ L,涡旋振荡后移至衍生小瓶中,旋紧瓶盖,在70 $^{\circ}$ C下反应20 min,自然冷却。再加入MBTFA 30 μ L,涡旋混匀后,旋紧瓶盖,在70 $^{\circ}$ C下反应10 min。

1.3 GC-MS条件

参照文献[6],并根据实验室条件对分析 β -阻断剂的GC-MS条件进行了适当的优化。优化后的GC-MS条件:色谱柱为HP-5MS石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m);载气为高纯氦(纯度>99.999%),恒流,流速为0.9 mL/min;进样方式为分流进样,分流比为10:1,进样量为2 μ L,进样口温度为280 $^{\circ}$ C;柱温升温程序:初始温度为180 $^{\circ}$ C,以5 $^{\circ}$ C/min速率升至220 $^{\circ}$ C,再以10 $^{\circ}$ C/min速率升至260 $^{\circ}$ C,然后以5 $^{\circ}$ C/min速率升至280 $^{\circ}$ C,保持10 min;溶剂延迟时间为2.5 min;接口温度为300 $^{\circ}$ C;扫描范围为50~650 u;电离能量为70 eV;离子源温度为200 $^{\circ}$ C;四极杆温度为150 $^{\circ}$ C。

2 结果与讨论

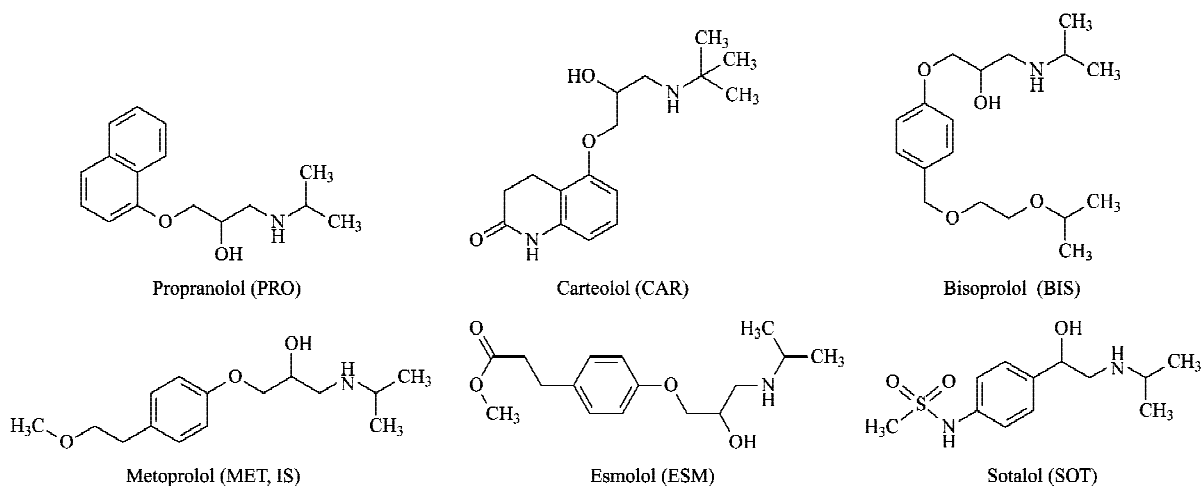
2.1 样品制备

2.1.1 提取

由于 β -阻断剂在人体代谢以后,一部分以与蛋白结合状态、另一部分以游离状态排出体外,因此本文采用分别提取游离态和结合态药物的方法进行提取以避免漏检。

2.1.2 衍生

5种 β -阻断剂和内标物的化学结构(见图1)通常由3部分组成:(1)取代芳环或杂环;(2)乙醇型或氧代丙醇,醇羟基均为仲醇结构;(3)含有较大的两个以上碳原子取代基的仲胺。 β -阻断剂的侧链手性碳原子上都含有极性的羟基,二级胺上也有一个

图 1 5 种 β -阻断剂及内标的化学结构式Fig. 1 Chemical structures of the five β -blockers and the internal standard

未取代的活泼氢,因而分子的极性较大,挥发性小,故需要衍生化后才能进行 GC-MS 分析。用 MSTFA 和 MBTFA 对 β -阻断剂进行混合衍生化,可选择性地在羟基上进行三甲基硅烷化、在氨基上进行三氟乙酰化,使衍生物的稳定性和挥发性增加,且过量的反应试剂无需去除即可直接进样。这种衍生化方法的灵敏度比较高,适合用于做定量分析。

2.2 SIM 初筛与 SCAN 确证

在优化的 GC-MS 条件下,选择一定浓度的混合标准溶液,用美托洛尔作为内标,衍生化后进行 GC-MS 的 SCAN 模式总离子流(TIC)图分析,从而得到各个物质的保留时间及定性定量离子等参数(见表 1)。

表 1 5 种 β -阻断剂及内标物的衍生产物的保留时间和特征离子
Table 1 Retention times (t_R) and characteristic ions for the derivatives of five β -blockers and the internal standard

Substance	t_R / min	Quantification ion (m/z)	Confirmation ions (m/z)
Sotalol	4.21	362	362, 440, 73
Metoprolol	6.15	284	284, 73, 129, 435
Propranolol	7.12	284	284, 73, 129, 427
Esmolol	8.16	284	284, 73, 129, 463
Carteolol	8.20	235	235, 86, 129, 421, 436
Bisoprolol	9.30	284	284, 73, 129, 493

根据各目标物的保留时间和定量离子,采用 SIM 模式在不同的时间段选择不同的特征离子进行扫描,以提高灵敏度,获得更低的检出限。

图 2 与图 3 分别是各阻断剂质量浓度为 200 ng/mL、内标美托洛尔质量浓度 100 ng/mL 的加标尿样的 SIM 及 SCAN 模式的 TIC 图。对比图 2 与图 3 可发现,同一样品在相同色谱分析条件下采用 SCAN 模式时基质的干扰十分严重,SOT 峰被大量

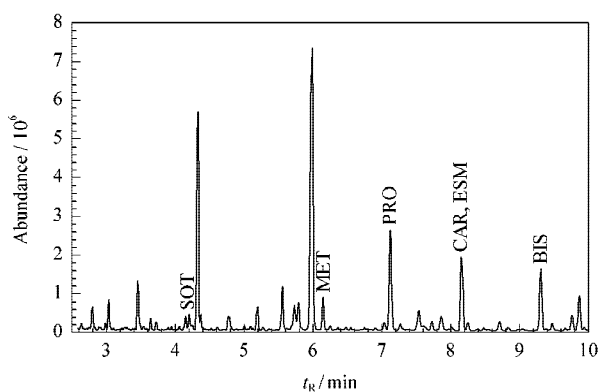


图 2 空白尿样中添加标准品溶液和内标的 SIM-TIC 图

Fig. 2 Total ion current chromatogram by SIM of the urine sample spiked with the analytes and IS

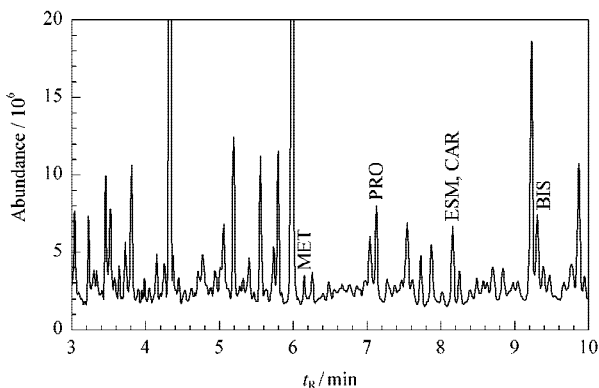


图 3 空白尿样中添加标准品溶液和内标的 SCAN-TIC 图

Fig. 3 Total ion current chromatogram by SCAN of the urine sample spiked with the analytes and IS

杂质峰掩盖而无法检测到。这是因为 SCAN 模式的扫描范围覆盖了被测物的全部碎片离子,得到的是化合物的全谱,给基质如此复杂的尿样溶液的实验数据处理和实际应用带来了很大的困难。而 SIM 模式只采集特定的离子,因此可以较好地排除基质的干扰,使灵敏度更高,得到的峰形也更好,因此

SIM 模式对各药物的检测能力均高于 SCAN 模式。但其缺点是扫描的离子数目少,不利于未知物的鉴定及物质的确证。因此本文采用 SCAN 模式得到全质谱图,以便对可疑被测物进行质谱定性,初步确定可疑样品,进而采用 SIM 模式针对疑似样品的特征离子进行快速的提取和筛选,从而提高分析效率,减小基质干扰,并有利于各物质的确证和高灵敏度的定量。此程序符合国际奥委会兴奋剂检测的先定性、后定量的要求和规定。

2.3 定量方法的建立

在 5 mL 的空白尿样中分别加入所配制的不同浓度的 β-阻断剂溶液和 25 μL 内标溶液(20 μg/mL),按所建立的方法进行处理和测定,以标准品的质量浓度 x (ng/mL)为横坐标,以不同质量浓度标准品的峰面积与内标峰面积之比 y 为纵坐标作图,得到的回归方程见表 2。从表 2 的数据可以看出,此方法的检测能力已经大大高于 WADA 对 β-阻断剂的最低执法限量(MRPL)(500 ng/mL)要求^[13]。

表 2 5 种 β-阻断剂 GC-SIM-MS 的线性范围、回归方程

Table 2 Linear ranges and regression equations of five β-blockers

Substance	Regression equation *	r^2	Linear range (ng/mL)
Sotalol	$y = 0.0004x + 0.0005$	0.9952	3 - 300
Propranolol	$y = 0.0067x + 0.0522$	0.9978	1 - 250
Esmolol	$y = 0.0028x + 0.0002$	0.9970	1 - 200
Carteolol	$y = 0.0045x + 0.0396$	0.9963	3 - 900
Bisoprolol	$y = 0.0083x + 0.0121$	0.9976	1 - 200

* x : mass concentration of analyte, ng/mL; y : peak area ratio of analyte and IS.

根据 SCAN 和 SIM 模式的色谱图中各分析物定量离子的 3 倍信噪比可估算出两种模式下 5 种 β-阻断剂的检出限,结果见表 3。

表 3 两种检测模式下 5 种 β-阻断剂的检出限

Table 3 Limits of detection (LODs) of five β-blockers by SIM and SCAN modes

Substance	Quantification ion (m/z)	LOD of SIM/(ng/mL)	LOD of SCAN/(ng/mL)
Sotalol	362	0.5	10.0
Propranolol	284	0.3	3.0
Esmolol	284	0.2	3.0
Carteolol	235	1.0	2.0
Bisoprolol	284	0.3	6.0

由表 3 可看出,SIM 模式下的检出限为 0.2 ~ 1.0 ng/mL,SCAN 模式的检出限为 2.0 ~ 10.0 ng/mL,SCAN 的检出限高于 SIM,进一步验证了用 SIM 模式进行定量及初筛,采用 SCAN 模式提供的质谱全图进行确证的可行性。

此外,分别在尿样中添加 50,200 ng/mL 的混合标准溶液各 5 份,按“1.2”节中的前处理方法处理,按“1.3”节中的 GC-MS 条件进行 SIM 模式检测,计算方法的精密度与回收率,结果见表 4。由表 4 可见,方法的回收率为 70.5% ~ 103.4%,相对标准偏差(RSD)小于 15%,结果令人满意。

表 4 定量方法的精密度和回收率($n = 5$)

Table 4 Precisions and recoveries of the method ($n = 5$)

Substance	Added/(ng/mL)	Found/(ng/mL)	Recovery/%	RSD/%
Sotalol	50	42.9	85.9	3.4
	200	172.6	86.3	1.0
Propranolol	50	39.1	78.2	14.9
	200	152.8	76.4	13.1
Esmolol	50	43.6	87.1	11.5
	200	141.0	70.5	14.8
Carteolol	50	37.3	74.6	13.1
	200	179.6	89.8	11.1
Bisoprolol	50	51.7	103.4	12.0
	200	165.2	82.6	1.7

2.4 实际样品的测定

为了验证方法的可行性,收集了男性成年人服药前及单剂量口服 1.0 mg 普萘洛尔 7.5 h 的尿样,采用所建立的方法进行测定。图 4 为普萘洛尔阳性尿样与空白尿样的 SIM 模式 TIC 对比图。从图 4 中可以看出,与空白尿样相比,阳性尿中有明显的普萘洛尔峰出现。这说明该方法能成功地应用于 β-阻断剂类药物的检测,可以应用于体育运动中该类兴奋剂药物的控制。

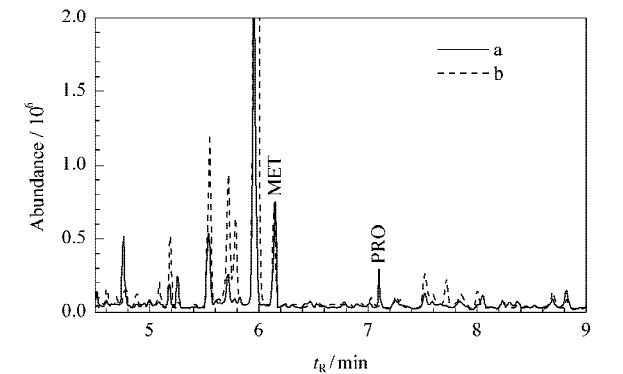


图 4 普萘洛尔(a)阳性尿样和(b)空白尿样的 SIM-TIC 图
Fig. 4 Total ion current chromatograms by SIM of propranolol of (a) positive urine and (b) blank urine

上述阳性尿样在 SCAN 模式下的 TIC 图(图略)并没有明显区别于空白尿样的特征峰出现,但是对相应的保留时间进行质谱分析,发现其质谱图与标准品的匹配率达 90% 以上(见图 5),证明了普萘洛尔的存在,可以用于该物质的定性。说明采取灵敏度更高的方法用于初筛以避免漏检的必要性。

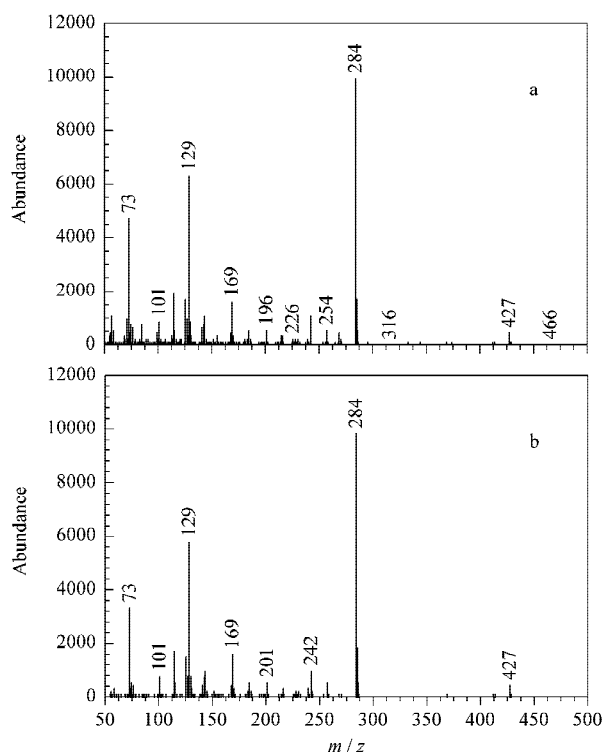


图 5 (a)普萘洛尔阳性尿样和(b)标准品的质谱图
Fig. 5 Mass spectra by SIM of propranolol of (a) positive urine and (b) the standard

对上述成年男性口服 1.0 mg 普萘洛尔后在不同时间段排泄的尿进行分析,测得尿代谢曲线图(见图 6)。从图 6 可以看出,服药者在服药后 7.5 h 时尿药浓度达到了峰值(24.0 ng/mL),随后尿药浓度逐渐降低,服药后 24 h 的尿样中普萘洛尔的质量浓度为 3.6 ng/mL,24 h 之后在 SIM 模式下还可以检出,但 SCAN 模式下得到的质谱图已十分杂乱,不能对该尿样是否为阳性给予充分的确认,说明服药后大约 24 h 已不能检出该类兴奋剂药物。该结

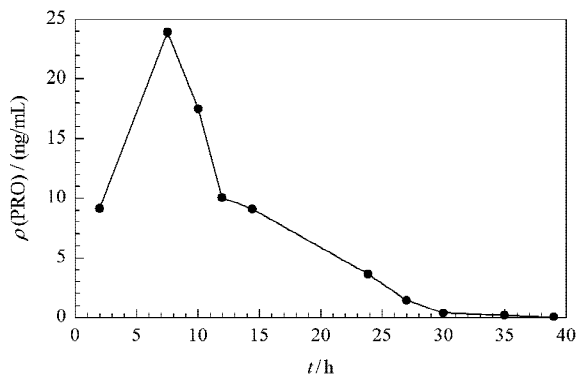


图 6 口服 1.0 mg 普萘洛尔的尿代谢曲线
Fig. 6 Urinary excretion curve of taken 1.0 mg propranolol orally

果对于 β -阻断剂类兴奋剂阳性尿样的最佳检出时间给出了指导性的判据。

3 结论

建立了同时对 β -阻断剂的 GC-MS 定性、定量及确证的分析方法。提出了切实可行的尿样中 β -阻断剂的提取和衍生方法,比较了 SIM 模式和 SCAN 模式下定量、定性特性的区别。用有更高检测灵敏度的 SIM 模式制作了 5 种 β -阻断剂的尿样加标工作曲线, SIM 方法的检出限为 0.2 ~ 1.0 ng/mL,尿样的加标回收率为 70.5% ~ 103.4%, RSD 小于 15%。所建立的方法成功地用于普萘洛尔阳性尿样的检测,并绘制了男性志愿者单剂量口服普萘洛尔后的尿代谢曲线,得出在服药 7.5 h 后尿药浓度达到峰值、24 h 后不能检出的结论。建立的方法可以用于运动兴奋剂检测中 β -阻断剂类药物滥用的控制。

参考文献:

- [1] Shen P, Jiang H J. Journal of Shenyang University (申萍, 江洪军. 沈阳大学学报), 2004, 16(4): 106
- [2] Rao Z M, Wu Q L, Xie G P, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (饶志明, 吴秋莲, 谢国平, 等. 分析化学), 2004, 32(2): 1660
- [3] Lin C E, Chen Y C, Chang C C, et al. J Chromatogr A, 1997, 775: 349
- [4] Zhou X W, Li X J, Zeng Z R. Chinese Journal of Chromatography (周兴旺, 李秀娟, 曾昭睿. 色谱), 2006, 24(1): 1
- [5] Peng J H, Tu J S, Xing J D. Journal of China Pharmaceutical University (彭建和, 涂家生, 邢久东. 中国药科大学学报), 1995, 28(6): 344
- [6] Dulger B, Basci N E, Sagdic-Yalvac I, et al. J Chromatogr B, 2002, 772: 179
- [7] Wang L Z, Qiu Z Y. Chinese Journal of Chromatography (王凌志, 邱宗荫. 色谱), 1999, 17(5): 411
- [8] Ding G S, Liu Y, Cong R Z, et al. Chinese Journal of Chromatography (丁国生, 刘莺, 丛润滋, 等. 色谱), 2004, 22(4): 386
- [9] Zhao H, Li H Z, Qiu Z Y. Chinese Journal of Chromatography (赵华, 李惠芝, 邱宗荫. 色谱), 1999, 17(4): 369
- [10] Paik M J, Lee J, Kim K R. Anal Chim Acta, 2007, 601(2): 230
- [11] Xu Y X, Fang H J, Xu Y G, et al. Chinese Journal of Chromatography (徐友宣, 方洪钜, 徐妍青, 等. 色谱), 1992, 10(1): 7
- [12] Zuppa A F, Shi H, Adamson P C. J Chromatogr B, 2003, 796: 293
- [13] WADA. WADA technical document — TD2004 MRPL version 1.0. (2005-11). <http://www.wada-ama.org>