

液相色谱-串联质谱法测定马饲料中的抗凝血类药物

高 照, 张亦农

(国家体育总局中国反兴奋剂中心, 北京 100029)

摘要:建立了马复合饲料中双香豆素、香豆素、醋硝香豆素、苄丙酮香豆素、苯茛二酮 5 种抗凝血类药物的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)同时快速筛查和定量测定方法,并对该类化合物在电喷雾电离条件下的主要碎裂途径进行了探讨。方法以甲醇和 0.02 mol/L NaOH 溶液作为提取溶剂,饲料样品经提取后利用混合型阳离子交换固相萃取进行净化,采用正负切换多反应监测(MRM)模式对试样中 5 种香豆素类及茛二酮类抗凝血剂进行定性与定量分析。苯茛二酮的检出限为 15 ng/g,香豆素和醋硝香豆素的检出限为 4 ng/g,华法林和双香豆素的检出限为 10 ng/g。5 种药物的定量限在 10~40 ng/g 之间,日内日间精密度分别不高于 8.63%和 10.20%。

关键词:液相色谱-串联质谱法;抗凝血类药物;马饲料;定量分析

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2011)06-0360-07

Quantification of Anticouagulants in Equine Feed Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

GAO Zhao, ZHANG Yi-nong

(China Antidoping Agency, General Administration of Sport of China, Beijing 100029, China)

Abstract: A fast screening and simultaneous determination method of four Coumarin-type and one indandione anticoagulants in equine feed was established using LC-MS/MS coupled with solid phase extraction. The fragmentation pathways were studied according to the characteristic fragment ions under electrospray ionization. Due to the weak acidity of the drugs, samples were first infiltrated and deproteinized with methanol, then enriched by solid-phase extraction (SPE) using a MCX cartridge after extracted with 0.02 mol/L NaOH. Detection was performed on a mass spectrometer by negative electrospray ionization (ESI) in multiple reaction monitoring (MRM) mode in five different time segment except for coumarin with positive mode to achieve simultaneously quantitative analysis of five anticoagulants. The limits of detection are 10 ng/g for dicoumarin and warfarin, 4 ng/g for acenocoumarin and coumarin, 15 ng/g for penidione. Limits of quantitation are as low as 10—40 ng/g and the intra-day and inter-day relative standard deviations (RSD) are less than

收稿日期:2011-04-20;修回日期:2011-09-30

作者简介:高 照(1986~),汉族,山东淄博人,硕士研究生,生化分析专业。E-mail:qiqin1990@163.com

通信作者:张亦农(1964~),山西人,研究员,从事食品药品兴奋剂检测技术研究。E-mail: zhangyinong@chinada.cn

8.63% and 10.20%, respectively.

Key words: LC-ESI-MS/MS; anticoagulants; equine dopings; quantitative analysis

抗凝血药物是国际马术联合会(International Equestrian Federation, FEI)禁用药物名录中的一类药物^[1],由于香豆素类及茛酮类抗凝血药物具有生物活性且广泛存在于天然产物中,近年来有关该类物质的临床应用和毒性引起了人们的普遍关注。欧洲食品安全局在对动物肝中毒实验的非显著性不良效应水平研究基础上,规定了人每日可承受的最大摄入量为 0.07 mg/kg^[2]。目前针对该类药物主要采用液相色谱法进行药物毒理和体内代谢方面的研究,对几种药物,尤其是双香豆素和苯茛二酮类的液相色谱-质谱(LC-MS/MS)测定方法的研究较少^[3-4]。HPLC-MS/MS 法灵敏度高、专属性和特异性好,是近年来兴奋剂检测方法主要的发展方向^[5]。本实验通过固相萃取净化等手段纯化和富集样品,运用 HPLC-MS/MS 进行快速分析和筛查,并对该类化合物的电喷雾离子化裂解途径进行归纳,建立能够同时快速筛查和定量测定饲料中该类药物的方法。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

Agilent 6410LC-MS/MS 系统(1200binary 快速液相,6410/2k-A 三重四极杆质谱仪);美国 Agilent 公司产品;高速冷冻离心机:美国 Sigma 公司产品;涡旋振荡器:Scientific Industry 公司

产品;固相萃取装置:美国 Waters 公司产品;Milli-Q 纯水系统:美国 Millipore 公司产品。

双香豆素(dicoumarin)和雌三醇(IS):购自中国药品生物制品检定所;醋硝香豆素(acenocoumarin)、苯茛二酮(phenidione)、苄丙酮香豆素(warfarin)、香豆素(coumarin):均购自上海安谱科学仪器有限公司。双香豆素使用氯仿溶解,其他标准品使用甲醇溶解,各配制 1 g/L 标准储备液,分别用甲醇稀释标准储备液制备系列标准工作液。甲醇、乙腈、乙酸乙酯(色谱纯):均购自沃凯公司;氯仿、高氯酸(分析纯):购自北京试剂公司;乙酸胺(色谱纯):购自 Baker 公司;MCX 固相萃取柱(150 mg):美国 Waters 公司产品。

1.2 仪器实验条件

1.2.1 色谱及质谱条件 色谱柱:Zorbax SB C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm×3.5 μm);柱温 30 °C;流速 2.5 mL/min;流动相 A:10 mmol/L 乙酸铵水溶液;流动相 B:乙腈溶液;干燥气温度 320 °C;干燥气流速 12 L/min;雾化器压力 2.794 ×10⁵ Pa;毛细管电压:3 500 V(+)/3 000 V(-);流动相梯度为:0~2 min、20% B,2~10 min、20~28% B,10~10.01 min、28%~90% B;10.01~15 min、90% B;Post run:6 min;进样量 10 μL。5 种药物及内标 MRM 优化的采集参数列于表 1。

表 1 MRM 检测模式下 5 种药物优化的质谱条件

Table 1 The optimized conditions of MRM detection for five anticoagulants

药物名称	母离子/ (<i>m/z</i>)	定量离子/ (<i>m/z</i>)	碰撞能量/ eV	定性离子/ (<i>m/z</i>)	碰撞能量/ eV	碎裂 电压/V	分段 采集	采集模式/ 驻留时间/ms
苯茛二酮	221.1	193.1	25	164.9	30	160	1	(-)/200
香豆素	147.1	91.0	24	102.9	15	95	3	(+)/200
双香豆素	335.1	161.1	16	117.0	40	80	5	(-)/200
卞丙酮香豆素	307.1	161.1	10	250.1	15	130	2	(-)/200
醋硝香豆素	352.0	265.1	25	295.1	15	150	2	(-)/200
雌三醇(IS)	287.0	171.0	30			140	4	(-)/200

1.2.2 样品预处理 精确称量(1.00 ± 0.02) g 经粉碎的饲料于 50 mL 具塞离心管中,加入 100 μ L 1 μ g/L 雌三醇内标,静置 1 h 后准确加入 4.0 mL 甲醇,涡旋振荡 2 min 后超声 20 min,然后以 9 000 r/min 冷冻(-4 $^{\circ}$ C 下)离心 10 min,吸取上清液于另一 50 mL 离心管中,再向残渣中加入 16 mL 0.02 mol/mL NaOH 溶液,涡旋振荡 5 min 后,相同条件下冷冻离心,合并 2 次提取溶液后加入 40 μ L 高氯酸溶液调节 pH 4,涡旋振荡 2 min 后以 4 000 r/min 离心 5 min。

上清液通过 Oasis MCX(150 mg/6 mL)萃取小柱(依次用 6 mL 甲醇、6 mL 水活化)净化,离心管底层白色胶状蛋白沉淀用 1 mL 甲醇、5 mL 水洗涤后,离心后一同过柱。5 mL 15% 甲醇水淋洗后,20 mm Hg 负压下抽干 3 min,用 5 mL V(氯仿):V(异丙醇)=5:1 的混合溶液洗脱。收集洗脱液于 50 $^{\circ}$ C 下氮气吹干,用 400 μ L V(甲醇):V(水)=1:1 的混合溶液溶解后检测。5 种物质定量下限及内标提取离子色谱图于图 1。

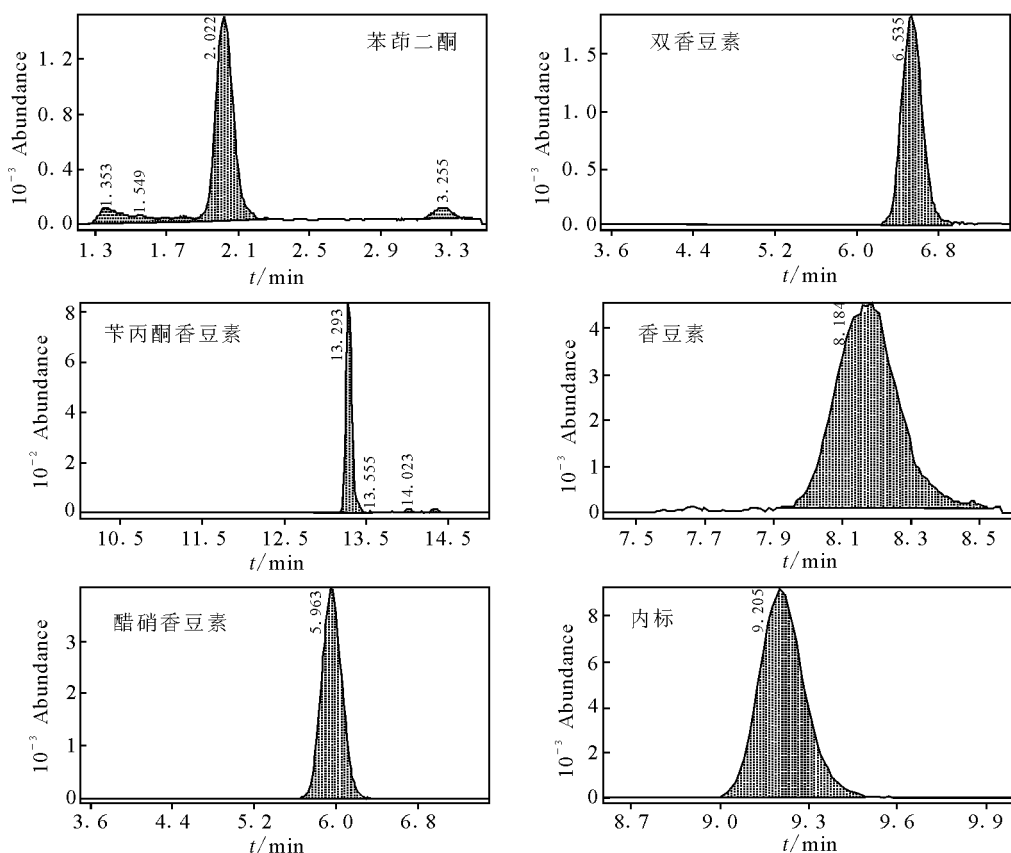


图 1 5 种物质定量下限及内标的提取离子色谱图

Fig. 1 The extracted ion chromatography of all drugs at the level of lower limit of quantification

2 结果与讨论

2.1 质谱色谱条件优化及稀释溶剂的选择

实验选用 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 3.5 μ m),5 种药物有较好的灵敏度和分离度,且相互间无明显干扰。根据香豆素类药物及茛菪二酮类药物的理化性质和结构特征,分别在正负模式下考察了 5 种药物的质谱响应,结果发现香豆素在正离子模式下一级全扫描均有较好的响应,主要为准分子离子峰 $[M+H]^+$,另外有

较弱的 $[M+Na]^+$ 峰。其余的药物均为在负离子模式下有较好的响应,主要为准分子离子峰 $[M-H]^-$ 。选择性质较为相似的雌激素雌三醇^[6]作为内标。通过对不同碰撞能量下主要碎片离子的分析,对 5 种药物的裂解途径进行解析,所选择的主要离子与其结构特征相符,保证了该类物质定性分析的准确性。每个待测物选取两对丰度较大、基质干扰小的离子对作为定量离子对和辅助定性离子对,采集分为 5 段,分别

采用正负切换的离子扫描模式,各时间段内通过优化驻留时间保证定性定量的准确度,使待测物选择离子色谱峰上采集点不少于 20 个。实验比较了甲醇,甲醇水溶液($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$),乙腈水溶液($V(\text{乙腈}):V(\text{水})=1:1$)作为复溶溶剂进样,结果表明,用甲醇水溶液($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$)定容后,上样各药物峰型较好且响应良好。

2.2 样品预处理方法的优化

目前针对几类药物的提取方法多采用加入酸性缓冲液后,用乙酸乙酯、氯仿等有机溶剂液萃取^[7-11]后浓缩进样,但赛马饲料为植物性复合饲料,基质较为复杂^[12],故选择固相萃取提取净化。有文献报道 Yu^[13-14]等用反相混合型阳离子交换固相萃取柱对沉淀蛋白后赛马血液中的违禁药物进行了提取净化,以 $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{乙酸乙酯})=4:1$ 的混合溶液洗脱中性和酸性药物,以含 2% 浓氨水的 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{二氯甲烷}):V(\text{异丙醇})=5:4:1$ 的混合溶液洗脱碱性药物,结果有较好的灵敏度和重现性。基于化合物的性质(香豆素类药物极微溶于醇和醚试剂,略溶于氯仿,而香豆素及茛二酮类在碱性溶液中易溶),实验了渗透组织能力较好的甲醇浸润和沉淀蛋白后用 0.02 mol/LNaOH 溶液提取 5 种药物后,提取上清液经阴离子交换混装柱 Oasis MAX 净化后,以 2% 甲酸乙腈溶液洗脱,结果表明,净化后双香豆素和苄丙酮香豆素的回收率均较低且波动较大,这可能是由于香豆素类物质在碱性环境下过柱时间较长发生不可逆开环,部分待测物降解造成的。在相同条件下提取上清液,用 HClO_4 调 pH 值至弱酸性后,分别通过阳离子交换混装柱 Oasis MCX 及 Oasis HLB 萃取柱净化,结果显示固相萃取柱 HLB 净化后基质干扰较多;MCX 萃取柱净化后用 $V(\text{氯仿}):V(\text{异丙醇})=5:1$ 溶液洗脱,5 种药物的回收率及重现性较好,空白提取样品中相同时间不出现与标准物质提取离子峰干扰的杂质峰,净化专属性较强,且省去了有机试剂提取液过萃取柱净化前的浓缩过程,故采用 MCX 萃取柱净化,具体见 1.2.2 样品预处理。

2.3 定量方法的建立

2.3.1 标准工作曲线及检出限 准确称量 6 份 (1.00 ± 0.02) g 空白饲料于 50 mL 具塞离心管中,加入 100 μL 1 mg/L 内标试剂雌三醇试剂

后,分别添加系列标准工作液制备醋硝香豆素,香豆素的质量浓度分别为 10、20、40、100、200、500 ng/g;苄丙酮香豆素,双香豆素的质量浓度为 20、40、80、200、500、800 ng/g;苯茛二酮的质量浓度为 40、80、200、400、800、1 000 ng/g 的基质加标样品。静置 1 h 后按 1.2.2 项进行批处理,以饲料样品中添加待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的提取定量离子色谱峰面积比值为纵坐标进行回归运算得到标准工作曲线,列于表 2。制备系列质量浓度空白加标样品经预处理后连续进样,为保证定性定量的准确性,以不低于 10 倍信噪比($S/N\geq10$)对应的基质添加浓度作为方法的检出限,以不低于 20 倍信噪比($S/N\geq20$)对应的基质添加浓度作为方法的定量限,最终确定苯茛二酮的检出限为 15 ng/g,定量限为 40 ng/g;香豆素和醋硝香豆素的检出限为 4 ng/g,定量限为 10 ng/g;华法林和双香豆素的检出限为 10 ng/g,定量限为 20 ng/g;5 种物质定量下限及内标物提取离子色谱图示于图 1。

表 2 5 种药物的工作曲线,相关系数和定量下限
Table 2 Linear range, correlation coefficient of calibration curves and LOQ of five drugs

药物名称	标准工作曲线	相关系数(r^2)	定量限/(ng/g)
苯茛二酮	$y=7.952\ 7x+0.100\ 9$	0.995 1	40
香豆素	$y=3.915\ 1x+0.002\ 2$	0.996 8	10
双香豆素	$y=0.719\ 0x+0.008\ 9$	0.998 7	20
醋硝香豆素	$y=6.543\ 0x+0.650\ 3$	0.996 4	10
苄丙酮香豆素	$y=2.509\ 8x+0.167\ 9$	0.995 7	20

2.3.2 方法的回收率,精密度及准确度 制备 5 种药物的低、中、高 3 个浓度的空白基质加标样品,每一浓度进行 5 样本分析,以当日随行标准曲线计算 QC 样品的浓度,同时另取空白饲料 (1.00 ± 0.02) g,除不加内标溶液外,按 1.2.2 项的方法制备上清液,向固相萃取柱洗脱溶剂中加入等体积的内标溶液和相应浓度的标准溶液混合后,50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气挥干,残渣用 400 μL $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:1$ 的混合溶液溶解后进样分析,获得相应峰面积(每个浓度 5 份样品测定的平均值)。以每一浓度下两份基质加标质量浓度相同的样品待测物与内标峰面积比值计算相对

回收率,结果列于表 3。连续 5 天对相同的空白饲料低、中、高 3 个浓度加标样品进行批处理,计算方法的日内日间精密度和准确度。结果表明,本方法测定马饲料中 5 类抗凝血药物的日内精密度、日间精密度和准确度良好,可以满足检测的要求,结果列于表 4。

2.4 质谱谱图解析

5 种药物的主要碎片碎裂途径的推测示于图 2~6。

双香豆素的主要碎片离子为 m/z 161.1 的负离子,将碎裂能量加大至 40 eV 得到较强的脱掉中性碎片 CO 后的 m/z 117.0 负离子。苯茛二酮的结构中有 2 个羰基,分别失掉一个 CO 分子后得到 m/z 193.1 和 m/z 164.9 的负离子,加大碎裂能量到 35 eV 时得到 m/z 145.0 的负离子,进一步加大碎裂能量到 40 eV 以上时得到 m/z 117.0 的负离子,推断分别为失掉 C_6H_4 中性分子和进一步失掉 CO 后得到的碎片离子。

表 3 5 种药物的加标提取回收率

Table 3 The relative recoveries of five drugs in feed ($n=5$)

药物名称	添加浓度/(ng/g)	回收率/%
苯茛二酮	60	60.3±9.9
	300	62.8±6.7
	900	77.1±5.0
醋硝香豆素	15	91.2±7.8
	80	74.3±5.3
	200	75.7±6.9
卞丙酮香豆素	30	62.5±12.4
	100	73.2±5.1
	500	72.3±4.4
香豆素	15	76.4±6.9
	80	78.7±5.7
	200	86.5±6.2
双香豆素	30	78.3±6.4
	100	99.2±5.7
	500	76.9±8.2

表 4 5 种药物的日内、日间精密度和准确度

Table 4 Inter-day and intra-day assay accuracy and precision data for five drugs

药物名称	添加浓度/(ng/g)	测得浓度/(ng/g)	准确度($n=5$)/%	批内精密度($n=5$)/%	批间精密度($n=5$)/%
苯茛二酮	60	64.4±2.2	7.31	2.60	3.42
	300	305.3±7.5	1.79	2.49	3.11
	900	912.9±50.1	1.33	5.56	7.85
香豆素	15	16.3±1.3	8.59	8.63	8.92
	80	82.5±6.5	3.12	8.11	8.23
	200	193.0±10.2	-3.50	5.08	6.04
双香豆素	30	27.5±1.1	-8.33	3.51	4.13
	100	107.9±2.6	7.90	2.57	8.75
	500	485.8±17.3	-4.84	3.47	4.91
醋硝香豆素	15	15.7±1.3	4.59	7.09	9.12
	80	84.6±3.1	5.75	3.93	5.33
	200	191.0±12.2	-4.50	6.12	8.92
卞丙酮香豆素	30	32.8±2.0	9.33	6.22	10.20
	100	95.1±8.4	-5.15	8.41	9.24
	500	487.1±22.8	-2.64	4.67	6.58

卞丙酮香豆素的主要碎片 m/z 250.1 为脱掉丙酮奇电子离子后的负离子,当碎裂能量达到 25 eV 时出现明显的 m/z 161.1 离子峰,当碎裂能量达到 40 eV 以上时有明显的 m/z 117.0 离

子峰。香豆素分子在正离子模式下有更好的响应,主要通过脱掉 CO 和 CO₂ 中性分子形成稳定的带有芳香性的 m/z 91.0 和 102.9 的碳正离子。

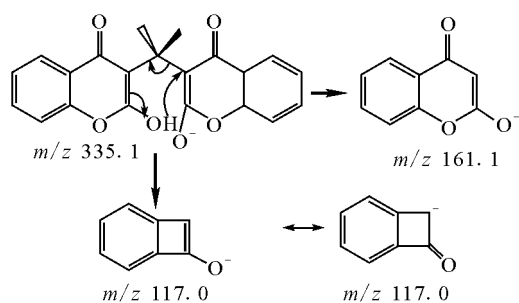


图 2 双香豆素的裂解过程

Fig. 2 Possible fragmentation pathway of dicoumarin

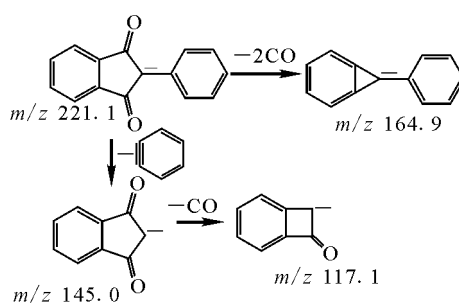


图 3 苯茆二酮的裂解过程

Fig. 3 Possible fragmentation pathway of phenidione

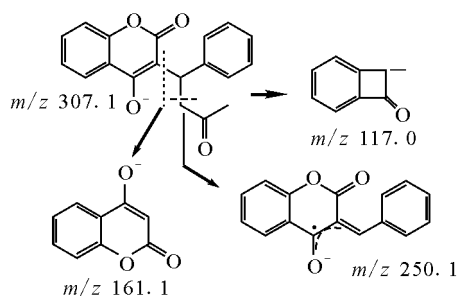


图 4 茚丙酮香豆素的裂解过程

Fig. 4 Possible fragmentation pathway of warfarin

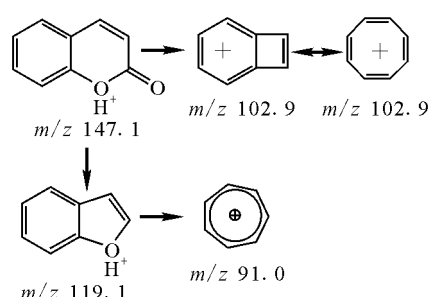


图 5 香豆素的裂解过程

Fig. 5 Possible fragmentation pathway of coumarin

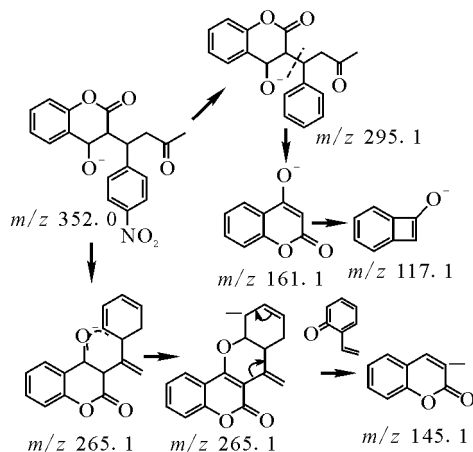


图 6 醋硝香豆素的裂解过程

Fig. 6 Possible fragmentation pathway of acenocoumarin

醋硝香豆素响应最强的碎片离子为 m/z 265.1, 推测为准分子离子失去一分子 $O=C=CH-NO_2$ 。当碎裂能量加到 40 eV 以上时有明显的 m/z 145.1 离子峰, 推测为失去一个 C_8H_8O 分子, 另外还有较强的 m/z 161.1,

117.1 的离子峰。经过中性丢失扫描 (neutral loss) 证实碰撞能量达到 20 eV, MS1 从 260 到 360 有一个明显的质量数 87 (C_2HNO_3) 的中性碎片丢失, MS1 从 100 到 260 有一个明显的质量数为 120 (C_8H_8O) 的中性碎片丢失。上述结果表明, m/z 161.1, 117.1 为 4-羟基香豆素类抗凝血药物的主要特征碎片, 可作为该类抗凝血剂衍生物的特征筛查离子。

3 结论

本实验建立了马饲料中的 4 种香豆素类抗凝血剂和 1 种茆二酮类抗凝血剂同时快速筛查和定量分析的液相色谱-质谱法, 该方法的预处理较为便捷、高效, 且有较好的专属性、重现性和灵敏度, 适用于复杂基质中该类药物的痕量分析和测定。

参考文献:

- [1] 2011 FEI Equine Prohibited Substances List. International Equestrian Federation.
- [2] AFC (2004). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materi-

- als in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to Coumarin. The EFSA Journal, 2004, 104; 1-36.
- [3] VANDENBROUCKE V, BOUSQUET-MELOU A, DE BACKER P, et al. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2008, 31(5): 437-445.
- [4] PIOTR ADAMOWICZ, MARIA KAFKA. LC-MS and LC-MS/MS determination of six anticoagulant rodenticides in blood[J]. Problems of Forensic Sciences, 2009, 77: 53-63.
- [5] 秦 旻, 徐友宣, 杨树民. 液相色谱-质谱联用在兴奋剂检测中的应用及进展[J]. 色谱, 2008, 26(4): 431-436.
- [6] MUSILIYU A, KHAN M F, COOPERWOOD J S. Synthesis and antiproliferative activity of coumarin-estrogen conjugates against breast cancer cell lines. Musa[J]. Lett Drug Des Discov, 2009, 6(2): 133-138.
- [7] VANDENBROUCKE V, DESMET N, DE BACKER P. Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 869(1/2): 101-110.
- [8] 席海为, 马 强, 王 超. 高效液相色谱法对化妆品中 17 种香豆素类化学成分的同时测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(12): 1168-1172.
- [9] SPROLL C, RUGE W, ANDLAUER C. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods [J]. Food chemistry, 2008, 109(2), 462-469.
- [10] JIN M C, REN Y P, XU X M. Determination of bromadiolone in whole blood by high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Forensic Science International, 2007, 171(1): 52-56.
- [11] JIN M C, CHEN X H. Rapid determination of three anticoagulant rodenticides in whole blood by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006; 20(18): 2741-2746.
- [12] Equine Consulting Services. Protein quality and requirements in exercising and growing horses [2011-06-19] [J/OL]. http://equineconsulting-services.com.au/admin/images_nutrition_pdf/2009_Dec0465Protein%20quality%20and%20requirements%20in%20exercising%20and%20growing%20horses3.pdf.
- [13] YU N H, HO E N M, TANG F P W, et al. Comprehensive screening of acidic and neutral drugs in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1189(1/2): 426-434.
- [14] LEUNG G N W, LEUNG D K K, W AN T S M, et al. High throughput screening of sub-ppb levels of basic drugs in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1156(1/2): 271-279.

=====

(上接第 354 页)

参考文献:

- [1] DA SILVA V M, DA CUNHA VELOSO M C, DE OLIVEIRA A S, et al. Determination of simple bromophenols in marine fishes by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [J]. Talanta, 2005, 68(2): 323-328.
- [2] WHITFIELD F B, HELIDONOTIS F, SMITH D. Role of feed ingredients in the bromophenol content of cultured prawns[J]. Food Chemistry, 2002, 79(3): 355-365.
- [3] LINCOLN D E, FIELMAN K T, MARINELLIB R L, et al. Bromophenol accumulation and sediment contamination by the marine annelids *Noto-mastus lobatus* and *Thelepus crispus*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, 33(6): 559-570.
- [4] 徐继林, 严小军, 徐年军, 等. 海产品中溴酚类海洋风味素的气相色谱-质谱联用分析[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 100-105.
- [5] 徐英江, 任传博, 田秀慧, 等. 海产品中硝基呋喃类原药的超高效液相色谱串联质谱测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(4): 327-330.
- [6] 徐英江, 宫向红, 张秀珍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定海水及沉积物中三聚氰胺[J]. 质谱学报, 2009, 30(2): 70-73.