

毛细管区带电泳用于多种类兴奋剂的同时快速分离检测

肖 惠, 童 萍, 冯 强, 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 :建立了一种同时分离检测包括利尿剂、蛋白同化剂、 β -阻断剂、麻醉剂、 β_2 -激动剂、刺激剂等 6 类 8 种兴奋剂的毛细管区带电泳-紫外检测法。优化的色谱条件为 :以 50 mmol/L 甲酸铵-氨水(pH 7.8)缓冲液为运行液 ,于 3 kPa 下进样 10 s ,分离电压为 20 kV ,检测波长为 214 nm。在此条件下 ,8 种兴奋剂在 7 min 内实现了快速的基线分离。在相应的浓度范围内 ,8 种组分的浓度与峰高呈良好的线性关系 ,检出限达为 0.2 ~ 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 。该方法快速 ,分析成本低 ,无污染 ,非常适用于多种类兴奋剂的同时快速检测。

关键词 :毛细管区带电泳 ;多种类兴奋剂 ;同时检测

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)04-0444-05 栏目类别 :兴奋剂检测方法专栏

A rapid capillary zone electrophoresis method for simultaneous determination of several kinds of doping agents

XIAO Hui , TONG Ping , FENG Qiang , 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 capillary zone electrophoresis-ultraviolet detection (CZE-UV) method was established for the simultaneous determination of eight doping agents which belong to diuretics , anabolic steroids , β -blocks , narcotics , β_2 -agonists and stimulants. Under the optimal conditions , with 50 mmol/L ammonium formate buffer (pH 7.8) as the running buffer , injection at a pressure of 3 kPa for 10 s , applied voltage of 20 kV , and detection at 214 nm , eight doping agents were separated quickly and completely within 7 min. The linearities of the eight doping agents were good in respective concentration ranges. Their detection limits were from 0.2 to 0.7 $\mu\text{g/mL}$. It is a simple and rapid method with small sample size for doping detection.

Key words : capillary zone electrophoresis (CZE) ; several kinds of doping agents ; simultaneous determination

国际奥委会所公布的禁用药物的种类繁多 ,利尿剂、 β -阻断剂、蛋白同化剂、麻醉剂、 β_2 -激动剂、刺激剂均在其列^[1]。按照官方规定的兴奋剂检测方法 ,尿样送至实验室后要先按上述分类分成数份并分交各组 ,分别用酸、碱性有机溶剂提取后进行化学衍生化(例如甲基化、硅烷化、乙酰化或者混合使用) ,然后采用气相色谱-氮磷检测器(GC-NPD)筛选及气相色谱-质谱(GC-MS)确证。整个过程繁琐、耗时长、分析成本高。专家预计 2008 年北京奥运会将会有不少于 4 500 例的样品需要检测 ,因此建立一种高通量、低成本且能同时分离多种类兴奋

剂的分析方法具有非常重要的现实意义。

单一种类的兴奋剂检测方法已有报道 ,如采用气相色谱法^[2,3]、高效液相色谱法^[4,5]、毛细管电泳法(CE)^[6-8]、薄层色谱法^[9]、免疫测定法^[10]等进行检测。CE 法因柱效高、分离速度快、试剂和样品消耗少、分析成本低的特点 ,近几年在药物分析领域中得到了广泛的应用。CE 用于兴奋剂的检测已有一些报道^[11-13] ,而同时分离测定多种类兴奋剂的方法还未见报道。本文以阿米洛利(AM)利尿剂、克伦特罗(CLT)蛋白同化剂、卡替洛尔(CTL)和索他洛尔(STL) β -阻断剂、芬太尼(FTN)和海洛因(HR)麻

收稿日期 2008-01-05

第一作者 :肖 惠 ,硕士。E-mail :nowmaggyis@126.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(HX2005-74)、福建省自然科学基金(B0510006 , 2007J0219)、福建省科技厅国际合作重点项目(200710020)和福建省高校新世纪优秀人才支持计划资助。

醉剂)、福莫特罗(FMT)(β_2 -激动剂)、匹莫林(PML)(刺激剂)(化学结构式见图1)等6类8种兴奋剂为研究对象,建立了一种快速、低分析成本、同时检测多种类兴奋剂的毛细管区带电泳(CZE)方法。

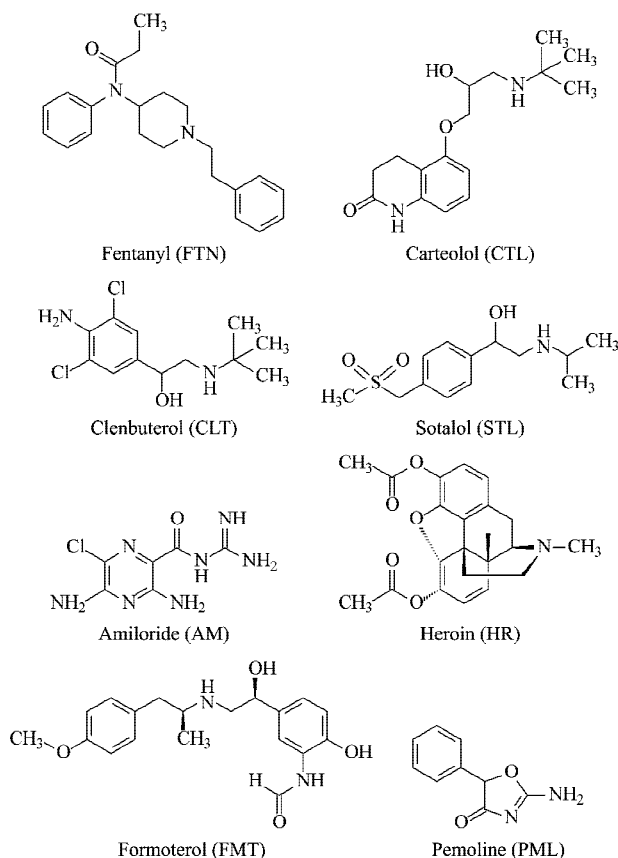


图1 8种兴奋剂的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of eight doping agents

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Lumex Capel 105 型毛细管电泳仪(俄罗斯 Lumex 公司),连续可变波长(190~400 nm)紫外检测器。

盐酸阿米洛利、克伦特罗、卡替洛尔、索他洛尔、芬太尼、海洛因、福莫特罗、匹莫林(中国生物药品检验所),水为 Milli-Q 超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 毛细管的使用方法

初次使用的毛细管需先活化。活化方法:首先,依次用甲醇、超纯水、1 mol/L NaOH、超纯水冲洗 5~10 min,然后用运行缓冲液冲洗 20 min;接着用 1 mol/L NaOH 清洗 5 min,放置 5 min 后再用超纯水冲洗 5 min;最后用运行缓冲液冲洗 20~30 min。

对于使用过程中的毛细管,每次更换缓冲液后依次用超纯水、0.1 mol/L NaOH 溶液、超纯水和运

行缓冲液分别冲洗 3 min;两个样品分析之间分别用超纯水、运行缓冲液冲洗 3 min。实验过程中所需溶液均用超纯水配制,所有溶液运行前均用 0.22 μm 聚丙烯微孔滤膜过滤,避免堵塞毛细管。

1.2.2 溶液的配制

标准溶液的配制:分别准确称取一定量的标准品,均用甲醇并经超声波振荡溶解,配制成浓度均为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。8 种标准品均放置于 5 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。实验时用运行缓冲液将储备液稀释至一定的浓度。

缓冲溶液的配制:分别准确称取或量取一定量的甲酸铵、乙酸铵、甲酸、乙酸和氨水,各自用超纯水配制浓度为 100 mmol/L 的母液。再用这些溶液配制不同 pH 值的甲酸-氨水、甲酸铵-氨水、乙酸-氨水、乙酸铵-氨水溶液,然后用超纯水稀释成需要的缓冲体系。

在 CE 实验中,所有的溶液在使用前均用 0.22 μm 聚丙烯微孔滤膜过滤,过滤后超声振荡处理(或静置)以去除溶液内的微小气泡。

1.2.3 电泳条件

未涂层熔融石英毛细管(62 cm(有效长度 54 cm) $\times$ 50 μm ,河北永年锐沣色谱器件有限公司),压力方式进样(3 kPa(30 mbar) $\times$ 10 s),紫外检测波长为 214 nm,分离温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,分离电压为 20 kV,运行缓冲液为 50 mmol/L 甲酸铵-氨水缓冲液(pH 7.8)。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的优化

2.1.1 检测波长的选择

通过对 8 种分析物进行紫外扫描,得到各分析物的最大吸收波长(波长范围为 208~240 nm),结合各物质的响应情况,最终选定 214 nm 作为检测波长。

2.1.2 缓冲体系的选择

为了得到最佳电泳条件,分别试验了甲酸-氨水、乙酸-氨水、甲酸铵-氨水、乙酸铵-氨水缓冲液,发现含有铵盐的缓冲液的分离效果较佳,且相对而言,分析物在甲酸铵-氨水缓冲液中的紫外响应比乙酸铵-氨水高,故选择甲酸铵-氨水缓冲液作为背景电解质。

2.1.3 缓冲溶液 pH 值的选择

考察了甲酸铵-氨水溶液的酸度对分离的影响。对于可解离的分析物来说,缓冲液的 pH 不仅会影响电渗流的大小,而且还影响到分析物的有效电荷数,因此通过调节缓冲液的 pH 值可以改变分析物

的迁移行为和分离效率。40 mmol/L 甲酸铵-氨水缓冲液在 pH 为 7.4 ~ 8.2 时对 8 种组分分离的影响如图 2 所示。从图 2 中可以看出,当 pH 小于 7.8 时,第 5 6 号峰不能基线分离;当 pH 大于 7.8 时,第 1 2 3 号峰相互间的分离度开始变差;在 pH 7.8 时 8 种组分能得到最佳分离效果;因而最终选择 pH 为 7.8 的甲酸铵-氨水溶液作为运行缓冲液。

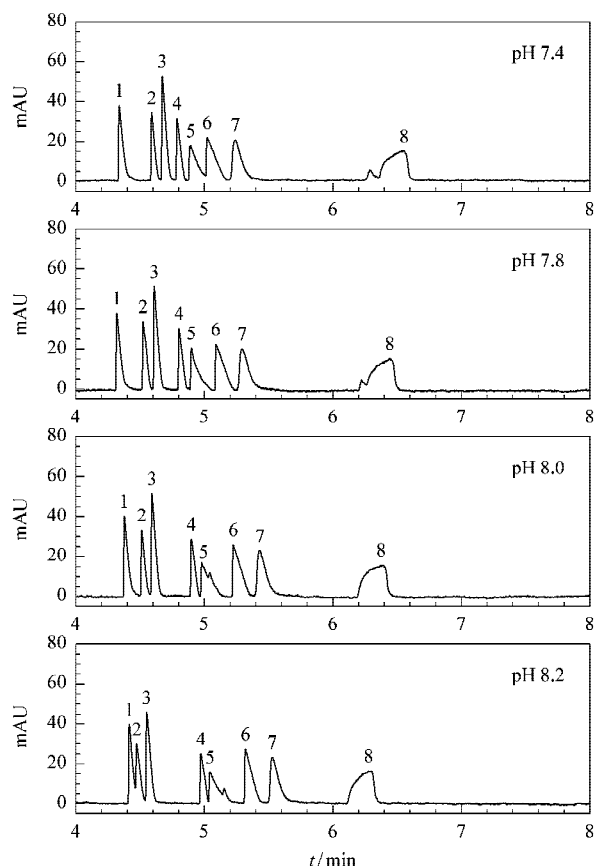


图 2 酸度对分离情况的影响

Fig. 2 Effect of pH on the separation

Capillary: 62 cm (54 cm of active length) $\times$ 50 μ m ; injection : 3 kPa (30 mbar) $\times$ 10 s ; separation voltage : 20 kV ; temperature : 25 $^{\circ}$ C ; buffer solution : 40 mmol/L NH_4COOH - NH_4OH ; detection wavelength : 214 nm.

1. AM ; 2. CLT ; 3. CTL ; 4. STL ; 5. FTN ; 6. HR ; 7. FMT ; 8. PML.

2.1.4 缓冲液浓度的选择

分别考察了甲酸铵浓度为 20 ,30 ,40 ,50 ,60 mmol/L 时甲酸铵-氨水缓冲液(pH 7.8)对迁移时间的影响,结果表明 8 种组分的迁移时间都随着缓冲液浓度的增大而延长,分离度也逐步增大。其中缓冲液的浓度对 CTL 和 CLT、FTN 和 HR 的分离度影响较大,从这两对物质的分离度和缓冲液浓度的关系图(见图 3)可以看出,当缓冲液浓度为 50 mmol/L 时,它们的 R_s 均大于 1.5,达到了基线分离。在此浓度下,其他组分的分离情况良好,因此最后选择 50 mmol/L 作为缓冲液浓度。

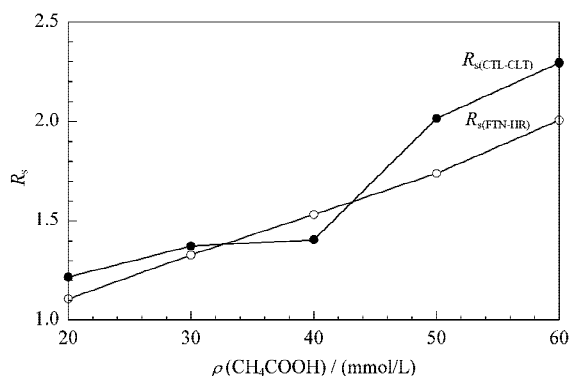


图 3 缓冲液浓度对 $R_{s(\text{CTL-CLT})}$ 和 $R_{s(\text{FTN-HR})}$ 的影响

Fig. 3 Effects of the concentration of buffer on $R_{s(\text{CTL-CLT})}$ and $R_{s(\text{FTN-HR})}$

Conditions : buffer pH , 7.8 ; other conditions are the same as in Fig. 2.

2.1.5 分离电压的选择

在长度一定的毛细管中,溶质的迁移速度与分离电压有直接的关系。在分离电压分别为 18 ,20 ,22 ,25 kV 的条件下,考察了分离电压对分离度的影响(见图 4)。由图 4 可见,随着分离电压的升高,8 种组分的迁移时间均缩短;但是当分离电压大于 20 kV 时,8 种组分无法达到基线分离;而当电压低于

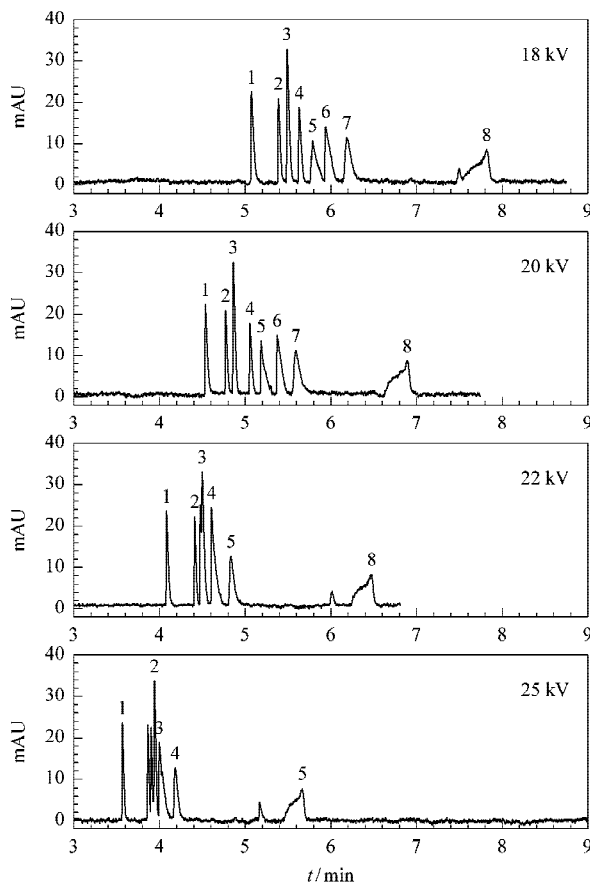


图 4 分离电压对分离的影响

Fig. 4 Effect of separation voltage on the separation

The conditions are the same as in Fig. 3. For peak identifications, see Fig. 2.

20 kV 时,8 种组分虽然可以达到分离要求,但是分离时间偏长。兼顾分离度和分离时间,最后选择分离电压为 20 kV。

2.1.6 进样时间的选择

分别考察了进样时间在 3 ~ 15 s 范围内对分析物响应的影响,结果表明峰高随着进样时间的延长而增大,但当进样时间超过 10 s 时,峰形出现明显的展宽,因此最终选择进样时间为 10 s。

图 5 为在“1.2.3”节优化条件下 8 种组分混合标准溶液的电泳谱图。

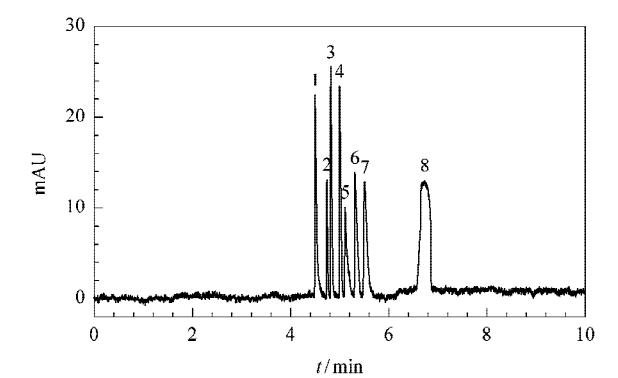


图 5 优化条件下 8 种组分混合标准样品的电泳谱图
Fig. 5 Electropherogram of eight doping agents under the optimal conditions

Capillary : 62 cm × 50 μm ; injection : 3 kPa (30 mbar) × 10 s ; temperature : 25 ℃ ; separation voltage : 20 kV ; buffer solution : 50 mmol/L NH₄COOH-NH₄OH (pH 7.8) ; detection wavelength : 214 nm.
For peak identifications , see Fig. 2.

2.2 线性范围与检测限

按照“1.2.2”方法配制一系列不同浓度的 8 种组分的混合标准溶液,在优化的条件下进样分析,以各分析物的质量浓度 x 为横坐标,相应的峰高 y 为纵坐标作图,得到各组分的线性方程、线性范围、相关系数及检测限(见表 1)。以信噪比为 3 时所对应的分析物的质量浓度为检出限,结果见表 1,检出限范围为 0.2 ~ 0.7 μg/mL。

表 1 各组分的线性方程、相关系数、线性范围及检出限
Table 1 Regression equations , correlation coefficients , linear ranges and detection limits of analytes

Compound	Regression equation ^{a)}	r^2	Linear range/ (μg/mL)	Detection limit ^{b)} / (μg/mL)
AM	$y = 1.2306x + 3.9675$	0.9935	0.8 - 40	0.3
CLT	$y = 0.6804x + 2.7421$	0.9946	0.7 - 25	0.2
CTL	$y = 0.9965x + 3.6888$	0.9948	0.8 - 50	0.3
STL	$y = 0.9645x + 3.8451$	0.9943	0.8 - 80	0.4
FTN	$y = 0.4423x - 0.4049$	0.9963	2 - 50	0.7
HR	$y = 0.4678x + 1.9173$	0.9984	1.5 - 125	0.5
FMT	$y = 1.2248x + 1.8243$	0.9951	1 - 50	0.3
PML	$y = 1.6805x + 16.862$	0.9934	1 - 160	0.4

a) y : peak height (mAU) ; x : mass concentration (μg/mL). b) $S/N = 3$.

2.3 方法的精密度

用中低浓度的混合标准溶液在同一天内连续测定 5 次,计算迁移时间和峰高的平均相对标准偏差 (RSD),结果见表 2。从表 2 中可看出,8 种组分迁移时间的 RSD 均小于(等于)1.5% ,峰高的 RSD 都小于(或等于)8.1% ,重现程度良好。

表 2 8 种组分的迁移时间和峰高测定的精密度 ($n = 5$)
Table 2 Precisions of migration times and peak heights of eight doping agents($n = 5$)

Compound	Migration time		Peak height	
	t /min	RSD/%	H /mAU	RSD/%
AM	4.40	0.8	16.55	2.2
CLT	4.77	1.2	9.72	6.5
CTL	4.81	0.7	21.04	8.1
STL	4.86	1.3	19.94	2.0
FTN	4.94	0.1	11.77	2.6
HR	5.00	0.1	5.71	3.7
FMT	5.16	0.1	8.40	3.8
PML	6.86	1.5	8.69	5.0

2.4 方法的回收率

在空白尿样中分别添加两个不同浓度水平的 8 种混合标准溶液,在优化条件下进行测定,每个加标样品平行测定 3 次,8 种组分的回收率为 95.0% ~ 105% ,RSD 为 2.3% ~ 8.4% (见表 3)。

表 3 8 种组分的加标回收率($n = 3$)
Table 3 Spiked recoveries of eight doping agents ($n = 3$)

Compound	Added/ (μg/mL)	Found/ (μg/mL)	Recovery/ %	RSD/ %
AM	4.00	3.98	99.5	3.6
	20.0	19.3	96.5	2.3
CLT	3.00	3.10	103	6.2
	15.0	15.3	102	5.0
CTL	5.00	5.13	103	8.4
	25.0	24.1	96.4	7.1
STL	6.00	5.7	95.0	7.9
	30.0	28.9	96.3	5.2
FTN	6.00	6.1	102	3.1
	30.0	30.4	101	2.5
HR	10.0	9.83	98.3	3.6
	50.0	48.7	97.4	2.9
FMT	4.00	4.21	105	5.1
	20.0	19.3	96.5	3.7
PML	8.00	7.79	97.4	5.7
	40.0	41.2	103	3.8

3 结论

建立了同时分离测定利尿剂、蛋白同化剂、β-阻断剂、麻醉剂、β₂-激动剂、刺激剂等 6 类 8 种兴奋剂的毛细管区带电泳-紫外检测方法。该方法具有快速、简单、样品用量少、重现性好等特点,用于兴奋剂检测中初筛工作的研究可大大缩短分析时间,提高分析速度。方法的建立为 2008 年奥运会现场的兴奋剂检测提供了一个很有意义的快速、简便的方法。

参考文献：

[1] World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code , 2007 Prohibited list. (2007-01). <http://www.wada-ama.org>

[2] van Thuyne W , van Eenoo P , Delbeke F T. J Chromatogr B , 2007 , 857(2) : 259

[3] 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

[4] Coopman V , Cordonnier J , Pien K , et al. Forensic Science International , 2007 , 169 : 223

[5] Qin Y , Zhu S T , Wang C , et al. Journal of Instrumental Analysis (秦旻 , 朱绍棠 , 王超 , 等. 分析测试学报) , 2003 , 22(1) : 41

[6] Roig M , Bergé R , Ventura R , et al. J Chromatogr B , 2002 , 768(2) : 315

[7] Zhang L , Tong P , He Y , et al. Chinese Journal of Chromatography (张兰 , 童萍 , 何聿 , 等. 色谱) , 2005 , 23(1) : 22

[8] Zhou X W , Li X J , Zeng Z R , et al. Chinese Journal of Chromatography (周兴旺 , 李秀娟 , 曾昭睿 , 等. 色谱) , 2006 , 24(1) : 1

[9] Godin C , Poirier D , Blomquist C H , et al. Steroids , 1999 , 64(11) : 767

[10] Collins S , O 'Keeffe M , Smyth M R. Analyst , 1994 , 119 : 2 671

[11] Maguregui M I , Jiménez R M , Alonso R M , et al. J Chromatogr A , 2002 , 949(1/2) : 91

[12] Fillet M , Bechet I , Chiap P , et al. J Chromatogr A , 1995 , 717(1/2) : 203

[13] Lu M H , Tong P , Xiao H , et al. Electrophoresis , 2007 , 28 : 1 461

书 讯

液相色谱溶剂系统的选择与优化

由沈阳药科大学孙毓庆教授与中国药科大学胡育筑教授主编、华夏英才基金(第十一批)资助的《液相色谱溶剂系统的选择与优化》已于 2008 年 1 月由化学工业出版社出版。

液相色谱法中溶剂系统(或背景电解质溶液)常是分离成败的关键。本书是国内第一本阐述液相色谱溶剂系统的权威论著 ,其中详细论述了如何根据样品性质与分析要求 ,按照分子间作用力的关系 ,正确地选择溶剂并组成溶剂系统并进行优化 ,选出最佳溶剂系统 ,以获得事半功倍的分析效果。本书共三篇 12 章。第一篇“ 各类液相色谱法的基础理论与溶剂系统 ” ,主要介绍液相色谱法分离基础 ,各类高效液相色谱法、薄层色谱法及液相色谱-质谱法(LC-MS)的溶剂系统 ,溶剂的基本性质与应用 ,以及溶剂的性质对色谱法分析结果的影响等 ;第二篇“ 溶剂系统的优化方法 ” ,介绍溶剂系统的分类、选择、优化方法及色谱方法的标准化与验证 ;第三篇“ 电动微分析法的基本原理与溶剂系统 ” ,简介毛细管电泳法(CE)及毛细管电色谱法(CEC)的溶剂系统的选择与优化方法。各章中还包括大量分析样品的色谱分析条件 ,如《 中华人民共和国药典 》与《 美国药典 》品种的法定高效液相色谱分析方法以及某些应用实例。本书涵盖了各种色谱法常用溶剂的物理性质与色谱性质、溶剂系统的组成原则及最常用的优化方法等。可供广大液相色谱及药物分析工作者学习参考。

本书 B5 开本 432 页 ;书号 978-7-122-00075-0 ,定价 59 元 ,由化学工业出版社出版(100011 北京东城区青年湖南街 13 号)。详情可登陆 www.cip.com.cn 查询。联系电话 :010-64518888 , 64518899。