

# 人尿中美托拉宗的液相色谱 - 质谱研究

秦, 张建丽

(国家体育总局运动医学研究所 兴奋剂检测中心, 北京 100029)

美托拉宗 (metolazone) 是一种较新的利尿剂<sup>[1]</sup>, 在 2004 年国际反兴奋剂的禁用表中明确提出禁用。利尿剂属于兴奋剂中重要的一大类, 一方面, 利尿剂可在涉及重量级别的比赛 (如举重, 拳击等) 中减轻体重, 另外还有可能作为掩蔽剂使用稀释其他兴奋剂, 因此在比赛及赛外抽查中均必须检查<sup>[2]</sup>。常规利尿剂大多采用高效液相色谱 (HPLC) 及气相色谱 - 质谱联用 (GC - MS) 的检测方法<sup>[3-4]</sup>, 近年来, 随着液相色谱 - 质谱联用 (LC - MS) 技术的发展, 越来越多实验室开始采用 LC - MS 的检测方法检测利尿剂<sup>[5-6]</sup>。本文对人尿中的美托拉宗的检测方法进行了研究, 建立了快速高效的 HPLC - MS 的检测方法, 并已成功应用于兴奋剂的检测。

## 1 实验部分

### 1.1 药品与试剂

美托拉宗 (metolazone) 由韩国兴奋剂实验室提供。乙腈为 Fisher 生产, 其它试剂皆为国产分析纯试剂。二次水由娃哈哈纯净水经 Milli-Q 纯水器处理所得。

### 1.2 仪器与条件

美国 Agilent 公司 HP1100 高效液相色谱 - 质谱仪, 配有自动进样器, 二极管阵列检测器 (DAD) 及电喷雾接口 (ESI), 分析柱为 Zorbax SB-C18 (150 mm  $\times$  2.1 mm, 填料为 C18, 粒度为 5  $\mu$ m)。

干燥气温度: 300, 干燥气流速: 7 L/min, 雾化气压力: 35 psi, 毛细管电压: 3 000 V。正离子模式; 流动相采用 pH 3.5 甲酸胺缓冲液 (A) 与乙腈 (B) 进行梯度洗脱, 淋洗梯度: 0.01 min, A 85%, B 15%; 20 min, A 25%, B 75%, 运行时间: 20 min。

### 1.3 样品处理

取尿样两份各 3 mL, 分别加入酸性固体缓冲剂 (磷酸二氢钠与磷酸氢二钠体积比 99:1, pH 5.0), 碱性固体缓冲剂 (碳酸氢钠与碳酸钾体积比 3:2, pH 9.0) 0.5 g, 然后各加入 4 mL 乙酸乙酯, 振荡提取 15 min, 离心分离出有机相, 酸性部分加入 2 mL 5% 醋酸铅溶液, 振荡离心, 取有机相, 酸碱有机相合并吹干, 溶解残渣于初始流动相中进样。

## 2 结果与讨论

### 2.1 美托拉宗的液相色谱 / 紫外光谱 - 质谱 (HPLC/UV-MS) 行为

按上述 HPLC 条件, 用 Zorbax SB-C18 分析柱进行分析, 美托拉宗可在 11.7 min 时得到检测。图 1 展示了美托拉宗的正离子模式下的质谱图及其特征的紫外光谱, 根据在色谱中的保留时间及其特征的紫外光谱、质谱, 可初步筛选并确认出尿中可疑化合物的存在。

美托拉宗的质谱在正离子及负离子模式均可检测, 用正离子模式灵敏度稍好, 约是负离子的两倍左右。图 2 为美托拉宗的结构示意图, 与其他类似化合物一样, 美托拉宗的苄基和磺酸基比较容易丢失, 正离子模式下形成  $m/z$  259,  $m/z$  179, 负离子模式下形成  $m/z$  257,  $m/z$  177。

### 2.2 美托拉宗的回收率及检出限

分别取不同量的美托拉宗标准品溶液加入空白尿中, 按上述方法酸性或碱性提取后分别进样分析, 获得酸提和碱提的回收率分别为 87% ( $n=3$ ) 和 92% ( $n=3$ )。观察各进样量下获得的色谱图, 找出其最小进样量, 以 3 倍信噪比测定检出限, 按绝对进样量计算, 该利尿剂的检出限为 0.2 ng, 完全可以满足国际奥委会对检出限的要求 (MRPL)。

作者简介: 秦 (1967 -), 女, 安徽淮南人, 副研究员, 博士, Tel: 010 - 64946933, E-mail: qy0@sohu.com

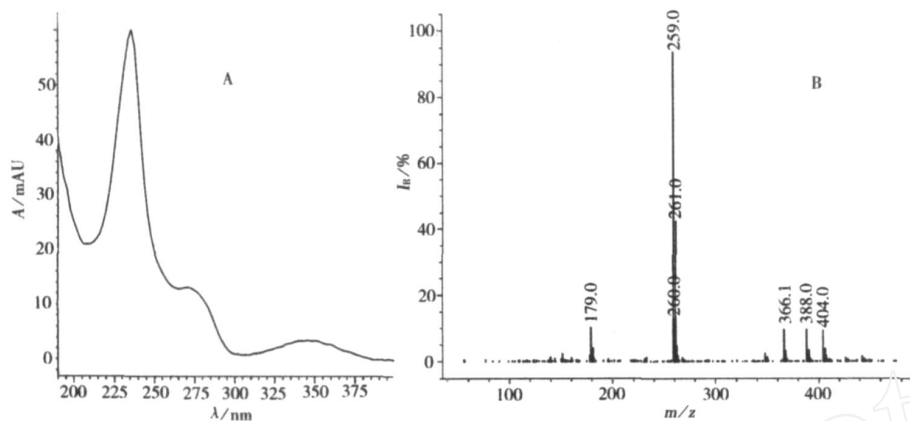


图 1 美托拉宗的紫外光谱(A)及质谱图(B)(正离子模式)

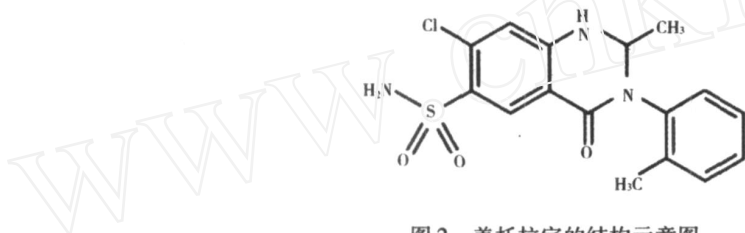


图 2 美托拉宗的结构示意图

### 2.3 尿样的检测

根据文献报道<sup>[1]</sup>, 美托拉宗在服药后主要以原型方式代谢。我们将一定量美托拉宗添加至人尿中进行提取, 然后分析检测, 观察了尿液基质对测定的影响和干扰情况, 发现正离子模式在 200 ~ 300 V 碎裂碰撞电压条件下的背景干扰较小, 可获得较满意的全谱, 满足世界反兴奋剂委员会 (WADA) 对实验室确证结果的要求。图 3 为美托拉宗模拟阳性尿的 HPLC 色谱及质谱图。在实际常规检测中, 对于可疑样品, 还可以通过其特征的紫外图谱进行对照。

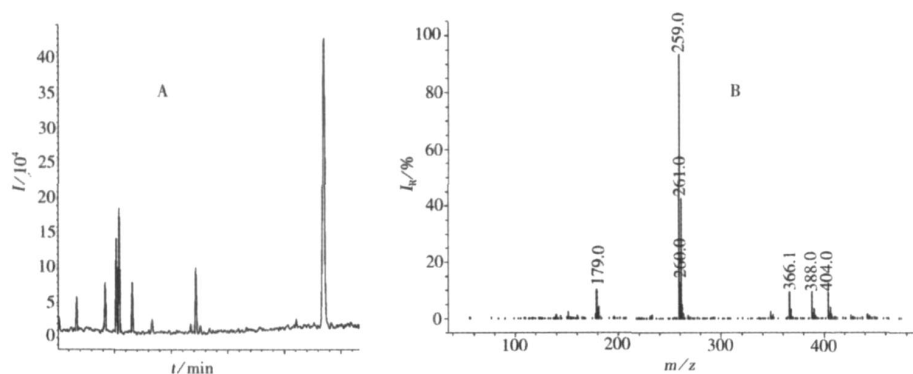


图 3 美托拉宗模拟阳性尿的 HPLC 色谱 (A) 及质谱图 (B)

#### 参考文献:

- [1] MOFFAT A C, OSSELTON M D, W DDOP B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004 [M]. The Pharmaceutical Press 2004 [2004 - 5 - 1].
- [2] WADA, The World Anti-doping Code, The 2007 Prohibited List 2007 [2006 - 9 - 16]. <http://www.wada-ama.org/en>

(下转第 74 页)

## 参考文献:

- [1] WEDNELAAR B S E The stress response in fish[J]. *Physiological Reviews*, 1997, 77: 591 - 625.
- [2] ROUITS E, BOISDRON-CELLE M, MOREL A, *et al* Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 $\beta$ -hydroxycortisol in routine practice for CYP 3A4 activity evaluation in basal conditions and after grapefruit juice intake[J]. *J Chromatogr, B*, 2003, 793: 357 - 366
- [3] 杜浩, 危起伟, 甘芳, 等. 苯唑卡因对美洲鲟运输应激的缓解作用研究 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (5): 787 - 793.
- [4] ZHANG Y, WU H L, DNG Y J, *et al* Simultaneous determination of cortisol and prednisolone in body fluids by using HPLC-DAD coupled with second-order calibration based on alternating trilinear decomposition [J]. *J Chromatogr, B*, 2006, 840: 116 - 123.

## Determination of Cortisol in Marine Fish Serum Samples by UPLC - Q-TOF-MS

**Abstract:** A sensitive analytical method on cortisol in marine fish serum was established using ultra performance liquid chromatography - quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC - Q-TOFMS). The cortisol in marine fish serum was extracted with chloroform, dried under nitrogen gas, and solved in 1:1 methanol - H<sub>2</sub>O for analysis, with dexamethasone as internal standard. The mass spectrometry was performed in reflective time-of-flight using electron spraying ionization in negative mode, with  $m/z$  407.2 for cortisol and 437.2 for dexamethasone, respectively. The results showed efficient separation of cortisol and dexamethasone are achieved on BEH C18 column. The linearity was good with the equation:  $Y = 0.0154X + 0.0451$ , from 0 to 200 ng/mL, with correlation coefficient of 0.9993 and low detection limit of 1.64 pg. The average recovery was from 93.3% to 98.1%, with SD less than 10%. Using this method, cortisol in yellow croaker and Japanese sea bass collected in Ningbo China, were determined with content ranged from 0 to 15.81 ng/mL.

**Key words:** UPLC - Q-TOFMS; Marine fish; Serum; Cortisol

(上接第 70 页)

- [3] 秦, 朱绍棠, 张长久. 兴奋剂中利尿剂的检测方法 [J]. *分析测试学报*, 2001, 20(2): 82 - 86
- [4] PARK S L, PYO H S, KM Y J, *et al* Systematic analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confirmation [J]. *J Anal Toxicol* 1990, 14(2): 84 - 90
- [5] QN Y, WANG X B, WANG C, *et al* Application of high-performance liquid chromatography-mass spectrometry to detection of diuretics in human urine [J]. *J Chromatogr, B*, 2003, 794: 193 - 203.
- [6] DEVENTER K, DELBEKE FT, ROELS K, *et al* Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2002, 16(8): 529 - 535.

## The Analysis of Metolazone Using LC - MS in Human Urine

QIN Yang, ZHANG Jian-li

(China Doping Control Center, National Research Institute of Sports Medicine, The State Sport General Administration, Beijing 100029, China)

**Abstract:** A sensitive and reliable procedure for analysis of metolazone in human urine by HPLC-MS was describes. The extraction recovery of liquid-liquid extraction (LLE) at various pH were studied. The detection limit of the compound was below 0.2ng at absolute amount. It is suitable for metolazone screening and confirmation in doping control.

**Key words:** Metolazone; HPLC; Diuretics; Analysis; Human urine