

采用三重四极杆气相质谱对尿中违禁药物进行快速全面筛查

应用简报

法医/兴奋剂检查

作者

Peter van Eenoo, Wim Van Gansbeke
Nik De Brabanter, Koen Deventer
Doping Control Laboratory (DoCoLab)
Ghent University
Technologiepark 30
B-9052, Zwijnaarde
比利时

摘要

采用 Agilent 7000 系列三重四极杆气相质谱系统，建立了一个筛查七类 150 种以上违禁药物的快速分析方法，检测水平不高于世界反兴奋剂机构（WADA）的最小要求检出限（MRPL [1]）。方法使用一根短毛细管柱，采用快速扫描模式，以氢气为载气，在 8 min 内可完成分析。



Agilent Technologies

前言

伴随着当前不断涌现的新型疗法和“专门设计的”药物，“违禁使用”（滥用药物和体育运动中服用禁药）药物已成为日益严重的全球性挑战。鉴于该问题的严重性，早在 2000 年，WADA 就建立并更新了一份违禁物质名单，并由经认证的兴奋剂检查实验室对其进行监督。WADA 为名单上物质的检测制定了 MRPL，包括：

- 五类永久禁用的物质（蛋白同化制剂、激素和相关物质、 β -受体激动剂、抗雌激素制剂、利尿剂和其它掩蔽剂）
- 体育竞赛中禁用的四类物质（兴奋剂、麻醉剂、大麻素类和糖皮质激素）

虽然人们对诸如血液（血清/血浆）、唾液和头发等样品的分析有着越来越浓厚的兴趣，但尿液仍是最常采用的样品类型。为了在不高于其 MRPL 的水平下使所有不同类型的禁用物质都获得必要的选择性，色谱联用法成为首选 [2]，GC-MS 和 LC-MS 是当前兴奋剂检查使用的互补技术。虽然已经发表了一些方法，但这些方法普遍缺乏对内源性类固醇进行定量分析与对多种外源性类固醇及其它违禁剂进行定性分析的有机结合。

本文描述了一个应用 Agilent 7000A 三重四极杆气相质谱系统开发的方法，用于检测多种内源性和外源性蛋白同化类固醇及其它违禁剂的方法，分析时间少于 8 min。

实验部分

标准品与试剂

本文所使用的标准品和试剂见参考文献 1。

仪器

方法开发采用带有分流/不分流毛细管进样口的 Agilent 7890 气相色谱和 Agilent 7000A 三重四极杆气相质谱系统，使用 Gerstel MPS2 自动进样器和 PTV 进样口。分析参数列于表 2-6。

表 1. Agilent 7000A 三重四极杆气相质谱气相色谱质谱条件

气相色谱运行条件	
分析柱	Agilent J&W HP-1 Ultra Inert 12.5 m \times 0.2 mm id, 膜厚 0.11 μ m (从 50 m 色谱柱上截取, 部件号 19091A-005)
进样量	5 μ L; 进样器条件: 100 $^{\circ}$ C (保持 0.15 min), 以 12 $^{\circ}$ C/s 的速度升至 280 $^{\circ}$ C
载气	氢气, 恒流, 1.0 mL/min
柱温程序	100 $^{\circ}$ C (保持 0.4 min), 以 90 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 185 $^{\circ}$ C; 以 9 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 230 $^{\circ}$ C; 再以 90 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 310 $^{\circ}$ C (保持 0.95 min)
传输线温度	310 $^{\circ}$ C
质谱条件	
调谐	自动调谐
EMV 增益	自动调整
采集参数	EI, 多反应监测
碰撞气流量	N_2 碰撞气: 1.5 mL/min
淬灭气流量	氦气, 2.25 mL/min
质谱温度	离子源 280 $^{\circ}$ C; 四极杆 180 $^{\circ}$ C

样品制备

将 1 mL 尿样与 β -葡萄糖醛酸酶混合，以有效分解葡萄糖醛酸缀合物，获得游离的类固醇。然后用乙醚液液萃取尿样，将蒸干后的残渣进行衍生，用于气相质谱分析。

将干燥的样品溶于 100 μ L N-甲基-N-(三甲硅烷基)三氟乙酰胺 (MSTFA) - NH_4I -乙硫醇 (100:2:3, v/w/v) 中，80 $^{\circ}$ C 加热 60 min [3]。

分析参数

采用安捷伦三重四极杆气相质谱系统分析几类违禁物质的参数见表 2-6。

结果

样品制备

兴奋剂检查实验室需要在相对小体积的复杂生物基质样品（通常为尿样）中检测非常低水平的多种违禁物质。使用这个小体积样品，实验室必须完成筛查并最终确证（采用完全独立的分析）任何违禁物质的存在。由于串联质谱的检测灵敏度高和选择性强，样品制备方法仅需要 1 mL 尿样用于筛查多种违禁剂，比它小 2-5 倍体积的样品用于采用气相质谱蛋白同化类固醇的常规筛查。

该方法也是综合性的，包括所有违禁麻醉剂、最常用的 β 2-受体激动剂、激素拮抗剂和调节剂，以及 β -受体阻断剂的一种或多种代谢物。另外，此方法也适用于检测许多兴奋剂和一些其它类型的违禁物质（见表 2-5）。只有那些不适合采用气相质谱分析的蛋白同化剂（如四氢孕三烯酮、美曲勃龙和司坦唑醇）未被包括在内。

方法中包含了一些质量保证措施，覆盖了样品制备的三个基本步骤：水解、提取和衍生。使用过量的 β -葡萄糖醛酸酶来保证在 56 °C 加热 1.5 h 后样品的有效水解。使用类似结构（d4-A-葡萄糖醛酸化和 d5-Et（游离））的葡萄糖醛酸化的和游离的类固醇，可以充分评价水解效果。多种内标混合物的使用，允许不同理化性质造成的提取效率差异。这些内标也可用于非甾代结构类似物的定量分析。最后，方法中还包括单-TMS 衍生雄酮和还原尿睾酮的离子对，有利于评价衍生效果。由于监控了所有重要的样品制备步骤，该集成方法实现了对每个样品制备效果的全面评价，而不是对每批或仅在方法认证时才进行。

本方法也对 5 α -雄甾烷-3,17-二酮和 5 β -雄甾烷-3,17-二酮的浓度水平进行了监测，这些化合物浓度的增加意味着微生物的污染，会改变内源性类固醇的存在状况。

气相色谱

本研究的目的是建立一个快速气相质谱方法，能够定量分析表 6 中的内源性类固醇，同时定性分析范围广泛的各种违禁物质。化合物间充分分离是实现满意定量分析的前提。在本方法中，较高浓度（表 6）雄酮和还原尿睾酮这对异构体的分离，以及较小浓度的其它异构体（11 β -OH-A 和 11 β -OH-Et，及 5aab 和 5bab）的分离，对色谱分离速度和进样量存在限制。本方法采用 PTV 进样口进样 5 μ L，与先前方法使用分流/不分流进样方式相比大大提高了进样量。

使用相对短的毛细管柱（12.5 m），载气氢气采用比氮气更高的流速，可以将气相色谱分析时间大大缩短到 7.98 min。当然，即使在高浓度下（4.8 μ g/mL），雄酮和还原尿睾酮也可以达到充分分离，实现满意的定量分析。（图 1）较短运行时间大大缩短了样品分析周期，这对于那些要求很短样品分析报告时间（24-48 h）的情况（如奥林匹克竞赛）非常必要。

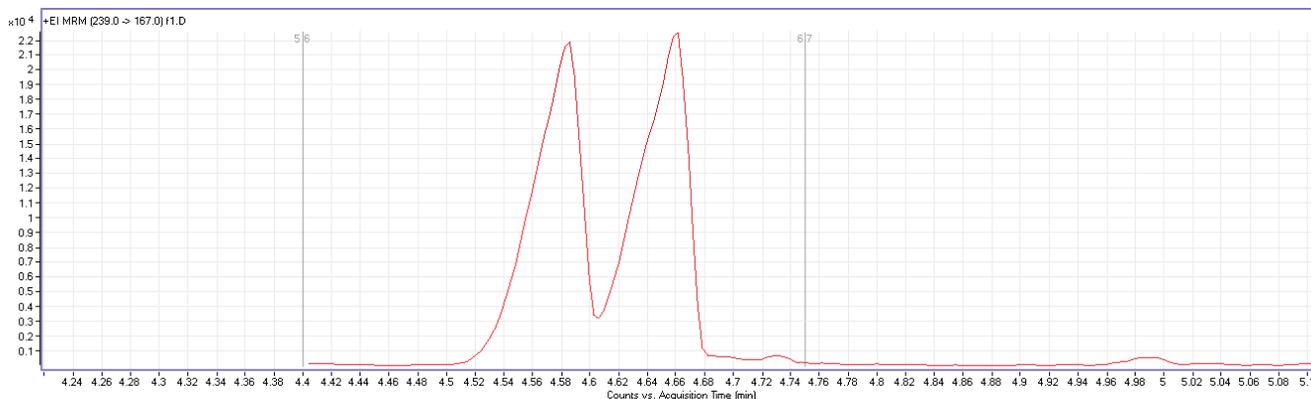


图 1. 最高校准浓度时，雄酮-bis-TMS 和还原尿睾酮-bis-TM 的萃取离子色谱图 (m/z 239 -> 167) (4.8 μ g/mL)。

质谱

采用多步程序确定和优化质谱条件。第一步，获取每一个衍生化化合物的全扫描图谱。在选择了合适的母离子后，采集不同碰撞能量（10 和 25 eV）下的子离子全扫描质谱。选择合适的子离子并确定 SRM 离子对。最终子离子（每种物质至少两个离子对）的选择和碰撞能量（5、10、15、20、30 和 35 eV）的优化采用参考标准品和加标尿样提取物进行。最佳的信噪比（S/N）用于确定每种分析物最合适的离子转换通道和碰撞能量。表 2-5 列出了方法记载的所有分析物的最终质谱仪设置。

定量分析方法验证

方法定量部分分析的物质包括那些兴奋剂检查中常见的禁用类固醇类（T、E、A、Et、DHT、DHEA、雄烯二酮、5 α b 和 5 β b）。该方法还可以监测其它不受服用天然蛋白同化激素（11 β OH-A 和 11 β -OH-Et）影响的内源性类固醇，还有微生物降解产物标志物（5 α -雄烷-二酮和 5 β -雄烷-二酮）。由于微生物降解可提高内源性类固醇的产率或者使其发生改变，这些附加参数的使用极有助于非典型类固醇物质存在状况的评价过程。该方法还可以定量分析最常用的 β 2-受体激动剂沙丁胺醇、去甲雄酮以及大麻的主要代谢物（11-正- Δ 9-四氢大麻酚-9 羧酸，THC-COOH）。

虽然被监测的化合物之间校正范围差异很大，但采用无类固醇尿液制备的 6 点校正曲线（每个点平行测定三份）的相关系数还是令人满意的。进一步分析表明，校正曲线上每一个点的剩余标准偏差低于按照 Horwitz 法（www.cipac.org/document/Guidance%20Documents/validat.pdf）计算的最大剩余标准偏差的 2/3。而且，这些点的偏差均低于 15%，也证明了本方法的准确度令人满意。因此，本方法可用于定量分析的验证，符合 Eurachem 准则[4]。

定性分析

针对无限量物质也按照 Eurachem 准则进行了方法验证。通过分析 10 个空白尿样有无基质干扰来验证方法的选择性。给这些尿样加标不同浓度水平的所有目标分析物。所有样品中在预期的保留时间处（ $\pm 1\%$ ）获得的每个监测转换离子共存信号（S/N>3）对应的最低浓度定义为检测限（LOD）。外源性物质的这些 LOD 列于表 2-6。本方法检测了 41 种蛋白同化类固醇的代谢物、4 种其它的蛋白同化剂、6 种 β 2-受体激动剂、11 个激素拮抗剂和调节剂、19 个麻醉剂和 16 个兴奋剂。

应该注意在某些情况下，观察到的代谢物 LOD 超过了 WADA 的 MRPL。对于这些物质，方法被认为未验证，虽然它们仍是方法的一部分。对于所有这样的情况，方法即会检测相同母体药物的另一个 LOD 不高于 MRPL 的代谢物。例如氟甲睾酮就是这种情况：6 β -羟基氟甲睾酮的 LOD（表 2）为 20 ng/mL，而 WADA 相应的 MRPL 规定是 10 ng/mL。而氟甲睾酮的另一个代谢物，9 α -氟-17,17-二甲基-18-正-雄烷-4,13-二烯-11-醇-3-酮，其 LOD 与 MRPL 相符。除了少数物质外，WADA 技术文件并未规定要监测哪种代谢物。因此，采用本方法检测氟甲睾酮可认为与 WADA 的要求一致。

而且，采用多种代谢物而不是单一代谢物来测定滥用的违禁药物有许多优点。首先，它可以为违禁药物滥用提供额外的支持证据，虽然在大多数情况下，“阳性”样品中的药物浓度明显高于 MRPL。其次，多种代谢物的分析有助于在违禁物质服用后不同的时间点对其进行检测。事实上，我们都知道代谢物的产生与时间和个体本身性质有关。因此，一个人服用药物一定时间后的主要代谢物，可能只是另一个人服用药物后同一时间的次要代谢物。

当前的方法也可以检测所有来自“其它蛋白同化剂”的化合物，除了那些不包括在本研究中，仍在进行临床试验的选择性雄激素受体调节剂。

除了蛋白同化剂，许多其它的激素拮抗剂和调节剂也能在不高于MRPL水平时被检测。该列表包括带有其甾体结构的物质（福美坦，6 α -OH雄烯二酮和依西美坦的代谢物：17 β -羟基-6-亚甲基雄烷-1,4-二烯-3-酮）及非甾体化合物（氨鲁米特、阿那曲唑、来曲唑代谢物、雷洛昔芬、托瑞米芬、4-OH-环芬尼、4-OH-他莫昔芬和4-OH-甲氧基他莫昔芬的异构体）。另外，雄烷-1,4,6-三烯-3,17-二酮也可代谢为勃地酮及其代谢物[3]，本方法中不包括的该类化合物是睾内酯、氯米芬和氟维司群，原因是缺少它们代谢物的参考标准品。

大多数禁用麻醉剂也经历了广义的I相和II相代谢。因此，所有WADA禁用麻醉剂和/或它们的代谢物都包括在当前方法中。除了具有较高液相质谱检测限的芬太尼，所有LOD均低于WADA MRPL，使该方法非常适合于监测麻醉剂的滥用。该方法也可以筛查可待因，因为服用可待因可按吗啡被检测。当检测出吗啡可能归于可待因的服用时，实验室不应报告这一情况[5]。

一般来说，尿样不太适合通过采集的样品确定服药时间。当然，当前的方法能通过监测代谢物确定一些物质的服用时间，因为代谢物的产生情况与时间有关。例如海洛因就是这种情况，因为方法不仅监测母体物质，而且监测吗啡和6-单乙酰吗啡（MAM）。

该方法还可同时定量分析11-正- Δ^9 -四氢大麻酚-9-羧酸（THC-COOH），它是大麻的主要代谢物，以及世界上最常被检测到的违禁剂之一。因此，该方法还可被用于法证科学、毒理学、药物滥用和工作场所检测实验室。

与麻醉剂不同的是，大多数兴奋剂并不以缀合物的形式出现，并且这些物质的检测不是本研究的重点。尽管如此，多种兴奋剂（或者它们的代谢物），包括可卡因及其代谢物苯甲酰爱康宁也包括在方法中。

方法覆盖了体育界最频繁使用的 β_2 -受体激动剂。而且，如非诺特罗这种情况，母体药物（四-O-TMS衍生物）和一个降解产物，C,N-亚甲基非诺特罗-四-TMS衍生物均可被监测[6]。虽然该降解产物在验证研究中未被检测到，但由于非诺特罗可以快速降解，它包括在方法中可以提高方法检测实际样品的能力。

虽然 β -受体阻断剂仅在某些特定运动中禁用，15种 β -受体阻断剂包含在方法中，但包括它们可以在它们需要检测时最佳化实验室效率。

虽然方法使用了最优化的衍生方法[7]，但衍生各步骤的效果还是要通过监测单-TMS衍生的雄酮和还原尿睾酮的含量来确证。其它的一些化合物（如塞利洛尔和吲哚洛尔）也可能形成多种衍生物。鉴于某个衍生物通常给出比另一个衍生物更理想的信号，所以，方法中包括第二种衍生物可看做是一种安全防范措施。由于Agilent 7000系列三重四极杆GC/MS系统可以快速转变SRM离子转换通道（500个转换通道/秒），这个离子转换通道的加入就不会降低方法的整体性能。

表 2. Agilent 7890/7000A 气相质谱分析参数, 针对内源性蛋白同化雄激素类固醇 (AAS; 禁用类别 S1a)

类别	保留时间 (min)	物质	离子对		碰撞能量 (eV)	LOD (ng/mL)	MRPL (ng/mL)
S1a	4.14	5β-雄烷-1-烯-17β-醇-3-酮	432.0 → 194.0	15	15	5	10
			432.0 → 206.0	15			
	5.32	勃地酮	430.0 → 206.0	10	30	10	10
			430.0 → 191.0	10			
	5.09	1-雄烯二醇	434.0 → 195.0	20	20	5	10
			434.0 → 127.0	20			
	5.05	1-睾酮	432.0 → 194.0	5	10	10	10
			432.0 → 206.0	10			
	5.09	17α-甲基-5α-雄烷-3α,17β-二醇	435.0 → 255.0	20	20	2	2
			435.0 → 213.0	20			
	5.12	17α-甲基-5β-雄烷-3α,17β-二醇	435.0 → 255.0	20	20	5	2
			435.0 → 213.0	20			
	6.7	羟甲睾酮甲	534.0 → 389.0	20	20	10	10
			534.0 → 444.0	20			
	4.15	雄烯二醇	358.0 → 301.0	15	15	2	2
			358.0 → 196.0	5			
	6.57	6β-羟基雄酮	517.0 → 229.0	20	15	5	10
			517.0 → 337.0	15			
	5.63	美替诺龙 PC	446.0 → 208.0	10	15	5	10
			446.0 → 195.0	15			
	4.92	1-亚甲基-5α-雄烷-3α-醇-17-酮 (美替诺龙代谢物)	446.0 → 341.0	15	5	20	10
			446.0 → 195.0	5			
	5.64	17α-乙基-5β-雌烷-3α,17β-二醇 (诺乙雄龙主要代谢物)	421.0 → 241.0	15	5	10	10
			421.0 → 331.0	5			
	5.4	17α-乙基-5α-雌烷-3α,17β-二醇 (诺乙雄龙次要代谢物)	421.0 → 241.0	15	25	5	10
			421.0 → 145.0	25			
	4.77	2α-甲基-5α-雄烷-3α-醇-17-酮 (屈他雄酮代谢物)	448.0 → 433.0	10	25	10	10
			448.0 → 253.0	25			
	6.05	勃拉睾酮 PC	460.0 → 355.0	15	15	10	10
			460.0 → 315.0	15			
	5.62	7α,17α-二甲基-5β-雄烷-3α,17β-二醇 (勃拉睾酮代谢物)	284.0 → 269.0	5	10	10	10
			284.0 → 213.0	10			
	6.13	卡普睾酮 PC	460.0 → 355.0	15	15	10	10
			460.0 → 315.0	15			
	5.45	7β,17α-二甲基-5β-雄烷-3α,17β-二醇 (卡普睾酮代谢物)	229.0 → 105.0	30	5	/	10
			269.0 → 159.0	5			
	5.07	1α-甲基-5α-雄烷-3α-醇-17-酮 (美睾酮代谢物)	448.0 → 433.0	10	20	5	10
			448.0 → 253.0	20			
	5.63	4-氯-4-雄烯二酮-3α-醇-17-酮 (氯司替勃代谢物)	466.0 → 181.0	20	15	10	10
			466.0 → 431.0	15			
	6.47	诺司替勃	452.0 → 216.0	20	15	2	10
			452.0 → 321.0	15			
	6.67	氟甲睾酮 PC	552.0 → 407.0	15	15	/	10
			552.0 → 357.0	15			
			552.0 → 319.0	15			
6.93	6β-OH-氟甲睾酮	640.0 → 640.0	10	25	20	10	
		640.0 → 143.0	25				
5.04	9α-氟-17,17-二甲基-18-正-雄烷-4,13-二烯-11β-醇-3-酮	462.0 → 208.0	15	15	5	10	
		462.0 → 337.0	15				
6.17	氧雄龙	363.0 → 161.0	15	15	10	10	
		308.0 → 117.0	15				
5.56	表氧雄龙	363.0 → 161.0	15	15	20	10	
		308.0 → 117.0	15				
6.68	脱氢氟甲睾酮 PC	478.0 → 285.0	20	5	10	10	
		478.0 → 353.0	5				
6.82	6β-羟基-脱氢氟甲睾酮	315.0 → 227.0	20	15	20	10	
		315.0 → 241.0	15				
5.19	17α-群勃龙	307.0 → 291.0	10	20	10	10	
		307.0 → 275.0	20				
7.1	2-羟甲基-17α-甲基雄烷二烯-11α,17β-二醇-3-酮 (甲腺勃龙代谢物)	444.0 → 356.0	25	25	/	10	
		367.0 → 257.0	25				
6.48	17α-甲基-4-雄烯-11α,17β-二醇-3-酮 (甲腺勃龙代谢物)	534.0 → 389.0	15	25	10	10	
		534.0 → 339.0	25				
5.85	米勃酮	446.0 → 431.0	15	20	10	10	
		446.0 → 341.0	20				
6.14	炔孕酮	456.0 → 316.0	15	15	1	10	
		456.0 → 301.0	15				
4.76	3α,5α-四氢去甲炔孕酮	431.0 → 167.0	20	20	2	10	
		431.0 → 193.0	20				
7.11	16-OH-夫拉扎勃	490.0 → 231.0	15	35	10	10	
		490.0 → 143.0	35				
5.94	甲基双烯醇酮	430.0 → 285.0	10	10	10	10	
		430.0 → 325.0	10				
5.97	13β,17α-二乙基-5α-甾烷-3α,17β-二醇 (诺勃酮代谢物)	435.0 → 255.0	10	15	20	10	
		435.0 → 159.0	15				
6.14	13β,17α-二乙基-5β-甾烷-3α,17β-二醇 (诺勃酮代谢物)	435.0 → 255.0	20	5	5	10	
		435.0 → 345.0	5				
3.68	madol	345.0 → 255.0	15	15	10	10	
		345.0 → 201.0	15				
6.11	2α,17α-二甲基-17β-羟基-5α-雄烷-3-酮	462.0 → 141.0	15	15	10	10	
		462.0 → 143.0	15				
6.27	4-OH-诺龙 (羟勃龙)	506.0 → 147.0	20	25	2	10	
		506.0 → 93.0	25				
		506.0 → 195.0	20				
6.48	4-OH-睾酮	520.0 → 225.0	15	15	2	10	
		520.0 → 431.0	15				
6.33	6-OH-androstenedione	518.0 → 319.0	15	15	1	10	
		518.0 → 413.0	15				
5.19	7β-OH-DHEA	430.0 → 325.0	10	10	20	10	
		430.0 → 220.0	10				

PC = 母体化合物

表 3. Agilent 7890/7000A 三重四极杆气相色谱质谱系统分析参数, 针对内源性 AAS, 当服用了外源性的其它蛋白同化剂、β2-受体激动剂、激素拮抗剂和调节剂、利尿剂和其它掩蔽剂时 (禁用种类分别是 S1b、S1c、S3、S4 和 S5)

类别	保留时间 (min)	物质	离子对	碰撞能量 (eV)	LOD (ng/mL)	MRPL (ng/mL)
S1b	4.04	19-去甲雄酮	405.0 → 225.0	10	1	2
			405.0 → 315.0	5		
	4.12	5β-雄烷-3,17-二酮	290.0 → 275.0	10	EAAS	/
			290.0 → 185.0	10		
	4.64	5α-雄烷-3,17β-二醇	256.0 → 185.0	15		
			256.0 → 157.0	15		
	4.71	5β-雄烷-3,17α-二醇	256.0 → 185.0	15		
			256.0 → 157.0	15		
	4.58	雄酮	239.0 → 167.0	35		
			239.0 → 117.0	35		
	4.63	还原尿睾酮	239.0 → 167.0	35		
			239.0 → 117.0	35		
	5.09	5α-雄烷-3,17-二酮	290.0 → 275.0	10		
			290.0 → 185.0	10		
	4.98	DHEA	432.0 → 327.0	10		
			432.0 → 237.0	10		
	5.14	表睾酮	432.0 → 209.0	10		
			432.0 → 327.0	10		
	5.13	5α-雄烷-3β,17β-二酮	421.0 → 255.0	20		
			421.0 → 213.0	20		
5.29	4-雄烯二酮	430.0 → 209.0	15			
		430.0 → 234.0	15			
5.24	DHT	434.0 → 195.0	20			
		434.0 → 182.0	20			
5.41	睾酮	432.0 → 209.0	10			
		432.0 → 327.0	10			
5.52	11β-OH-雄酮	522.0 → 236.0	10			
		522.0 → 324.0	10			
5.6	11β-OH-还原尿睾酮	522.0 → 236.0	10			
		522.0 → 324.0	10			
4.13	单 TMS 雄酮	347.0 → 253.0	20	qas	/	
S1c	3.37	齐帕特罗	308.0 → 218.0	10	5	10
			308.0 → 203.0	15		
			291.0 → 219.0	15		
	6.43	折仑诺	433.0 → 295.0	15	10	10
			433.0 → 309.0	15		
2.42	克伦特罗	335.0 → 227.0	10	0.2	2	
		335.0 → 300.0	10			
5.37	3α-羟基替勃龙	443.0 → 193.0	35	5	10	
		443.0 → 167.0	30			
S3	2.17	沙丁胺醇	369.0 → 207.0	15	25	100
			369.0 → 191.0	15		
	1.96	特布他林	356.0 → 267.0	25	50	100
			356.0 → 355.0	25		
	6.07	非诺特罗	322.0 → 68.0	15	100	100
		322.0 → 279.0	15			
6.6	非诺特罗 C,N-亚甲基	308.0 → 207.0	15	/	50	
		308.0 → 179.0	15			
S4	6.73	福莫特罗	178.0 → 121.0	20	50	100
			178.0 → 135.0	20		
	7.82	沙美特罗	311.0 → 149.0	15	100	100
			311.0 → 121.0	25		
	5.02	班布特罗	354.0 → 72.0	25	5	100
			354.0 → 282.0	10		
	3.63	氨鲁米特衍生物 1	361.0 → 206.0	30	5	50
			361.0 → 221.0	10		
	5.26	氨鲁米特衍生物 2	580.0 → 551.0	20	/	50
			580.0 → 519.0	20		
	3.16	阿那曲唑	293.0 → 70.0	10	50	50
			293.0 → 209.0	15		
	3.17	来曲唑代谢物	291.0 → 160.0	15	2.5	50
			291.0 → 217.0	20		
	6.94	依西美坦 PC	441.0 → 307.0	20	/	50
			441.0 → 193.0	20		
	6.94	17β-羟基-6-亚甲基-雄烷-1,4-二烯-3-酮	443.0 → 207.0	20	25	50
			443.0 → 193.0	20		
	6.43	4-OH-雄烯-3,17-二酮 (福美坦)	518.0 → 221.0	15	2	10
			518.0 → 190.0	10		
6.57	托瑞米芬	405.0 → 58.0	15	25	50	
		405.0 → 72.0	5			
6.86	4-羟基-甲氧基他莫昔芬 1	489.0 → 72.0	5	25	50	
		489.0 → 58.0	15			
7.02	4-羟基-甲氧基他莫昔芬 2	489.0 → 72.0	5	25	50	
		489.0 → 58.0	15			
5.78	4-OH-他莫昔芬	459.0 → 72.0	5	2.5	50	
		459.0 → 58.0	15			
7.74	雷洛昔芬	578.0 → 193.0	35	25	50	
		578.0 → 413.0	30			
6.57	4-OH-环芬尼	512.0 → 422.0	10	2.5	50	
		512.0 → 343.0	5			
S5	3.13	丙磺舒	328.0 → 103.0	25	12.5	250
			328.0 → 193.0	15		

PC = 母体化合物

表 4. Agilent 7890/7000A k 三重四极杆气相色谱系统分析参数, 针对兴奋剂、麻醉剂和大麻素类 (禁用种类分别为 S6、S7 和 S8)

类别	保留时间 (min)	物质	离子对	碰撞能量 (eV)	LOD (ng/mL)	MRPL (ng/mL)	
S6	2.16	卡非多	272.0 → 104.0 272.0 → 229.0	25 15	50	500	
	4.98	6-OH-布罗曼坦	395.0 → 91.0 393.0 → 91.0	30 30	2.5	500	
	2.08	匹莫林	178.0 → 104.0 392.0 → 178.0	10 10	5	500	
	2.28	奥克巴胺	174.0 → 866.0 426.0 → 206.0 426.0 → 179.0	5 15 15	100	500	
	7.14	士的宁	316.0 → 144.0 316.0 → 220.0	15 10	100	200	
	1.37	克罗乙胺	154.0 → 86.0 154.0 → 69.0	10 15	50	500	
	1.97	香草二乙胺	295.0 → 223.0 295.0 → 265.0	25 20	50	500	
	1.36	芬坎法明	215.0 → 186.0 215.0 → 98.0	5 15	50	500	
	4.24	芬司匹利	241.0 → 96.0 241.0 → 154.0	10 10	25	500	
	2.57	3,3-二苯基丙胺	174.0 → 86.0 174.0 → 100.0	15 15	50	500	
	4.65	普尼拉明	238.0 → 58.0 238.0 → 91.0	20 20	50	500	
	1.94	氟吡雷司	168.0 → 125.0 168.0 → 89.0	20 35	100	500	
	2.51	环唑酮	360.0 → 178.0 360.0 → 247.0	15 15	10	500	
	6.57	泛普法宗	286.0 → 72.0 286.0 → 214.0	20 15	50	500	
	1.66	苄非他明	148.0 → 91.0 148.0 → 65.0	20 35	10	500	
	1.74	哌甲酯	156.0 → 45.0 156.0 → 84.0	35 10	100	500	
	6.47	阿米庚酸	193.0 → 115.0 193.0 → 178.0	15 15	10	500	
	4.53	阿米庚酸 C5 代谢物	193.0 → 115.0 193.0 → 178.0	15 15	50	500	
	2.7	可卡因	303.0 → 82.0 303.0 → 198.0	15 5	50	500	
	3.07	苯甲酰爱康宁	240.0 → 82.0 361.0 → 82.0	20 20	100	500	
	3.56	普罗林坦代谢物 14	322.0 → 293.0 322.0 → 205.0	20 20	excr	500	
	2.28/2.34	普罗林坦代谢物 5a/b	304.0 → 142.0 304.0 → 75.0	20 20	excr	500	
	2.67	普罗林坦代谢物 e9	228.0 → 158.0 228.0 → 138.0	20 20	excr	500	
	2.52	西布曲明代谢物 1	158.0 → 116.0 158.0 → 102.0	10 10	excr	500	
	2.74/2.82	西布曲明代谢物 2/3	246.0 → 84.0 246.0 → 84.0	20 20	excr	500	
	S7	7.47	丁丙诺啡	554.0 → 522.0 554.0 → 450.0	15 20	0.5	10
		6.57	右吗拉胺	265.0 → 166.0 265.0 → 98.0	15 10	20	200
		4.91	海洛因	369.0 → 327.0 369.0 → 268.0	10 25	2.5	200
4.66		MAM	399.0 → 287.0 399.0 → 340.0	15 10	20	200	
5.37		芬太尼	245.0 → 189.0 245.0 → 146.0	10 15	/	10	
2.19		去甲芬太尼	175.0 → 120.0 175.0 → 56.0	5 15	/	10	
4.32		氢吗啡酮	429.0 → 234.0 429.0 → 357.0	15 25	100	200	
2.73		美沙酮	296.0 → 191.0 296.0 → 281.0	20 10	10	200	
2.93		美沙酮 2	296.0 → 191.0 296.0 → 281.0	20 10	40	200	
2.37		去甲美沙酮 1	224.0 → 103.0 224.0 → 191.0	35 35	100	200	
2.73		去甲美沙酮 2	296.0 → 191.0 296.0 → 252.0	20 20	10	200	
2.14		EDDP	277.0 → 105.0 277.0 → 220.0	25 20	40	200	
4.42		吗啡	429.0 → 287.0 429.0 → 220.0	20 35	10	200	
4.37		羟考酮	459.0 → 368.0 459.0 → 312.0	15 15	200	200	
4.76		羟吗啡酮	502.0 → 70.0 517.0 → 355.0	30 15	40	200	
3.12		喷他佐辛	357.0 → 246.0 357.0 → 289.0	15 15	100	200	
1.47		哌替啶	247.0 → 71.0 247.0 → 173.0	5 5	4	200	
3.97		可待因	371.0 → 229.0 371.0 → 234.0	5 5	10	200	
4.21		乙基吗啡	385.0 → 214.0 385.0 → 234.0	35 10	10	200	
2.51		哌苯甲醇	239.0 → 161.0 239.0 → 221.0	20 20	5	200	
5.25		芬布酯	261.0 → 103.0 261.0 → 175.0	35 15	50	200	
S8		6.06	THC-COOH	371.0 → 289.0 371.0 → 265.0	15 15	<5	7.5

PC = 母体化合物

表 5. Agilent 7890/7000A 三重四极杆气相色谱系统分析参数, 针对 β -受体阻断剂在某些体育竞赛中禁用 (禁用类别 P2) 和内标 (ISTD)

类别	保留时间 (min)	物质	离子对	碰撞能量 (eV)	LOD (ng/mL)	MRPL (ng/mL)	
P2	1.91	氟烯洛尔	150.0 → 109.0 221.0 → 72.0	15 15	50	500	
	3.62	倍他洛尔	364.0 → 209.0 364.0 → 172.0	10 10			100
	2.94	比索洛尔	405.0 → 56.0 405.0 → 172.0	25 15	100	500	
	3.07	呋咪洛尔 1	204.0 → 133.0 220.0 → 75.0	15 15	500	500	
	3.65	呋咪洛尔 2	205.0 → 130.0 292.0 → 218.0	15 15	50	500	
	3.05	艾司洛尔	352.0 → 193.0 352.0 → 56.0	5 15	100	500	
	3.02	美替洛尔	366.0 → 281.0 366.0 → 239.0	5 15	25	500	
	2.64	心得安	316.0 → 231.0 316.0 → 75.0	5 15	25	500	
	3.15	噻吗洛尔	373.0 → 186.0 373.0 → 70.0	15 35	50	500	
	4.12	卡替洛尔	421.0 → 186.0 421.0 → 365.0	15 5	50	500	
	4.12	左布诺洛尔	234.0 → 233.0 234.0 → 217.0	5 10	25	500	
	2	塞利洛尔 1	319.0 → 129.0 205.0 → 89.0 205.0 → 117.0	15 15 15	/	500	
	3.45	塞利洛尔 2	200.0 → 128.0 200.0 → 144.0	15 15	500	500	
	4.53	纳多洛尔	510.0 → 70.0 510.0 → 186.0	35 20	250	500	
	6.2	醋丁洛尔 1 + 2	278.0 → 166.0 278.0 → 208.0	30 30	500	500	
	1.72	阿普洛尔	321.0 → 72.0 306.0 → 203.0	15 15	250	500	
	6.67	拉贝洛尔	383.0 → 265.0 383.0 → 251.0	15 15	100	500	
	ISTD	4.66	5 β -雄烷-3a,17b-二醇-d5	246.0 → 190.0 246.0 → 164.0	15 15	ISTD	/
		4.62	5 α -雄烷-3a,17b-二醇-d3	244.0 → 202.0 244.0 → 188.0	15 15		
		4.51	雄酮-d4	423.0 → 333.0 423.0 → 243.0	20 20		
4.56		还原尿睾酮-d5	424.0 → 334.0 424.0 → 244.0	20 20			
5.12		表睾酮-d3	435.0 → 330.0 435.0 → 209.0	5 20			
5.38		睾酮-d3	435.0 → 330.0 435.0 → 209.0	20 20			
5.17		DHT-d3	437.0 → 205.0 437.0 → 195.0	15 15			
2.16		沙丁胺醇-d3	372.0 → 210.0 372.0 → 193.0	20 20			
5.97		17 α -甲基睾酮	446.0 → 301.0 446.0 → 198.0	25 20			

PC = 母体化合物

表 6. 进行定量分析的目标物质

物质	内标	校正浓度 (ng/mL)	相关系数 (R ²)
睾酮	d3-T	2-5-20-50-100-200	0.9918
表睾酮	d3-E	2-5-20-50-100-200	0.9933
雄酮	d4-A	48-120-600-1200-2400-4800	0.9903
还原尿睾酮	d5-E	48-120-600-1200-2400-4800	0.9716
11β-OH-雄酮	d4-A	40-100-500-1000-2000-4000	0.9769
11β-OH-还原尿睾酮	d5-E	40-100-500-1000-2000-4000	0.9877
雄诺龙	d3-DHT	4-10-40-100-200-400	0.9755
脱氢表雄酮	d3-DHT	4-10-40-100-200-400	0.9927
4-雄烯-3,17-二酮	d3-DHT	4-10-40-100-200-400	0.9908
5α-雄烷-3α,17β-二醇	d3-aab	4-10-40-100-200-400	0.9841
5β-雄烷-3α,17β-二醇	d5-bab	4-10-40-100-200-400	0.9603
5α-雄烷-3β,17β-二醇	d3-aab	4-10-40-100-200-400	0.9933
5α-雄烷-3,17-二酮	MT	4-10-40-100-200-400	0.9975
5β-雄烷-3,17-二酮	MT	4-10-40-100-200-400	0.9853
19-去甲雄酮	MT	1-3-5-10-15-20	0.9902
沙丁胺醇	d3-sal	100-300-500-1000-1500-2000	0.9807
THC-COOH	MT	5-15-25-50-75-100	0.9862

结论

建立和验证了一个用于类固醇类化合物、沙丁胺醇、THC-COOH 和去甲雄酮，以及 142 种违禁剂（或其代谢物）定性检测的气相色谱-串联质谱快速定量分析方法。多种内标的使用实现了对样品制备效果的评价，确保了分析结果的准确性。使用氢气作为载气，采用一根短（12.5 m）毛细管柱和 Agilent 7000A 三重四极杆气相质谱系统，所有违禁剂可以在少于 8 min 的单个运行时间内被检测。

致谢

本研究在世界反兴奋剂机构的支持下完成。衷心感谢 ir. B. Tienpont 博士（色谱研究所，科特赖克，比利时）的技术支持！

参考文献

1. P. Van Eenoo, W. Van Gansbeke, N. De Brabanter, K. Deventer, F. T. Delbeke "A fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry." *J Chromatogr A*. 2010 Oct 8. [Epub ahead of print].
2. WADA. TD2010MRPL. <http://www.wada-ama.org>
3. M. K. Parr, G. Fußhöller, N. Schlörer, G. Opfermann, T. Piper, G. Rodchenkov, W. Schänzer "Metabolism of androsta-1,4,6-triene-3,17-dione and detection by gas chromatography/mass spectrometry in doping control." *Rapid Commun Mass Spectrom* 23, 207-218 (2009).
4. EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998 (<http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf>)
5. WADA. TD2010MRPL. <http://www.wada-ama.org>
6. M.K. Henze, G. Opfermann, H. Spahn-Langguth, W. Schänzer "Screening of beta-2 agonists and confirmation of fenoterol, orciprenaline, reproterol and terbutaline with gas chromatography-mass spectrometry as tetrahydroisoquinoline derivatives." *J Chromatogr B* 751, 93-105 (2001).
7. P. Kiousi, Y. S. Angelis, E. Lyris, M. Koupparis, A. C. Calokineros, J 405. Atta-Politou, C.G. Georgakopoulos "Two-step silylation procedure for the unified analysis of 190 doping control substances in human urine samples by GC-MS." *Bioanalysis* 1, 1209-1224 (2009).

更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误，或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明及技术指标如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2011
中国印刷
2011年2月22日
5990-7234CHCN



Agilent Technologies