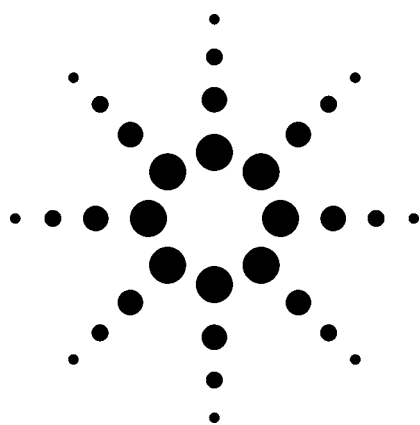




安捷伦液相色谱/飞行时间质谱 (LC/MSD TOF) 对人尿中 β_2 激动剂高分辨 LC/MS 定量分析 应用

法庭科学

作者

Bernhard Wüst
Agilent Technologies GmbH,
Hewlett-Packard str. 8, 76337 Waldbronn,
Germany

Mario Thevis
German Sport University,
Institute of Biochemistry,
Carl-Diem Weg 6, 50933 Cologne,
Germany

摘要

采用垂直电喷雾飞行时间质谱 (oa-ESI-TOF) 建立对克伦特罗, 马布特罗, 班布特罗, 拉克多巴胺等兴奋剂高灵敏定性定量的 LC/MS 分析方法。该方法在人尿中的最小检测限为 2 ng/mL, 远低于控制水平。同时考察了分析精度, 不同浓度的标准溶液和样品基质的检测中测量误差均小于 3 ppm。

前言

β_2 激动剂如克伦特罗, 马布特罗, 班布特罗和其他拟交感神经药物常用于肺部疾病如支气管哮喘等的治疗, 1992 年, 拟交感神经类药物被国际奥委会反兴奋剂机构 (IOC) 列入禁用药物名单。该类被用作刺激剂和蛋白同化制剂的药物在比赛和赛外检测中受到特别限制。

本文采用垂直电喷雾飞行时间质谱 (oa-ESI-TOF) 建立了对克伦特罗, 马布特罗, 班布特罗, 拉克多巴胺等兴奋剂的高灵敏定性定量 LC/MS 分析方法。

实验部分

所有 LC/MS 实验均在 Agilent 1100 液相色谱联用 Agilent 飞行时间质谱 (TOF) LC/MSD 分析系统上完成。TOF 采用垂直电喷雾的正离子模式。液相色谱采用梯度洗脱模式。Clenpenterol 作为所有分析物的内标 (ISTD)。分析条件见表 1。



Agilent Technologies

表 1. 实验条件

HPLC	Agilent 1100
色谱柱	ZORBAX XDB-C18, 50 mm x 2.1 mm x 3.5 μ m
洗脱溶剂	A: 水 + 5 mM 的 NH_4Ac + 0.1% 乙酸 B: 乙腈 + 0.1%-乙酸
淋洗梯度	5% A, 0-7 min; 80% A, 7-9 min
流速	0.3 mL/min
进样:	20 μ L (从 1000 μ L 样品溶液中取出)
Agilent LC/MSD TOF 系统	
离子源模式:	正 ESI 模式
喷雾器压力:	45 psi
干燥气流速:	11 L/min
干燥气温度:	350 $^{\circ}\text{C}$
全扫描模式	100 amu-1000 amu
自动参比离子	Ion 122 and Ion 922
定量	
Bambuterol 班布特罗	EIC of 368.20750 - 368.22959, 保留时间: 6.3 min
Clenbuterol 克伦特罗	EIC of 277.07858 - 277.09520, 保留时间: 5.8 min
Mabuterol 马布特罗	EIC of 311.10392 - 311.12258, 保留时间: 6.45 min
Ractopamine 拉克多巴胺	EIC of 302.16600 - 302.18413, 保留时间: 5.35 min
Clenpenterol (ISTD)	EIC of 291.09381 - 291.11128 + EIC of 293.09080 - 293.10839, 保留时间: 6.4 min
校正曲线:	数据权重为 1/x

样品处理

样品按照德国体育大学生物化学学院建立的协议进行前处理。根据协议，在 5 mL 的尿样中，加入 300 μ L 浓度为 10 M 的盐酸和 250 ng 的 clenpenterol。在 80 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 45 min。冷却至室温后，加入 5 mL 叔丁基甲基醚，混合物振摇 15 min。以转速为 620g 离心 5 min，弃去有机相。在保留的水相中，依次加入 0.65 mL of 5 M KOH 溶液，1 mL 叔丁醇，500 mg K_2CO_3 和 NaHCO_3 的混合物 (2:1, w/w)，2 g NaCl，以及 5 mL 的叔丁基甲基醚。该混合物振摇 15 min，然后以转速为 620g 离心 10 min。有机相转入干净试管，50 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。干燥后的残渣用 1 mL 的 0.06 M HCl 溶解，转入 HPLC 样品瓶中，取 20 μ L 进样至 LC/MS 系统中。

试剂

HCl 32% (例如，Merck 公司，100319)

叔丁醇

KOH, 85%

碳酸钾

无水碳酸氢钠

氯化钠 (Merck)

叔丁基甲基醚，使用前蒸馏，(KMF, St. Augustin, Germany)

无水醋酸钠，(Sigma)

结果与讨论

竞技体育兴奋剂控制需要对尿样中部分 β_2 激动剂进行检测。本方法检测的化合物结构见图 1。从尿样中液液萃取提取出 β_2 激动剂。采用飞行时间质谱 (TOF) 确定精确质量并定量分析控制样品。质谱质量扫描采取全扫描模式，可监测整个质量范围内所有可离子化的化合物。质谱参数不需要特殊设定。因此当需要增加新的分析物时，无需改变现有分析方法。

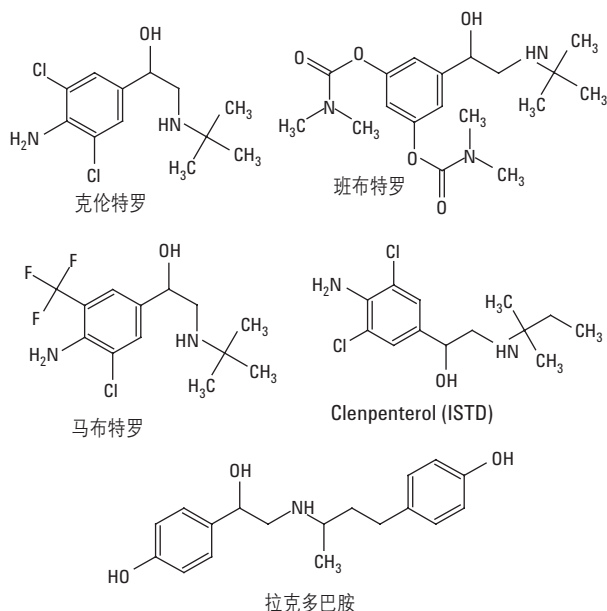


图 1. 本方法研究的 β_2 激动剂的化学结构式

选择准分子离子峰进行质谱监测，形成分析物和内标的提取离子色谱图 (EICs)，从而实现定量分析。图 2 为尿样基质中样品含量为 2 ng/mL 的提取离子色谱图。图 3 是以尿样为基质的标准工作曲线。表 2 为工作曲线的数据统计。国际奥委会列出了被禁用的部分 β_2 激动剂的控制限。作为蛋白同化剂的克伦特罗和沙丁胺醇类，其控制检出限为 1 $\mu\text{g/mL}$ ，如图所示本方法的检出能力远优于控制限。

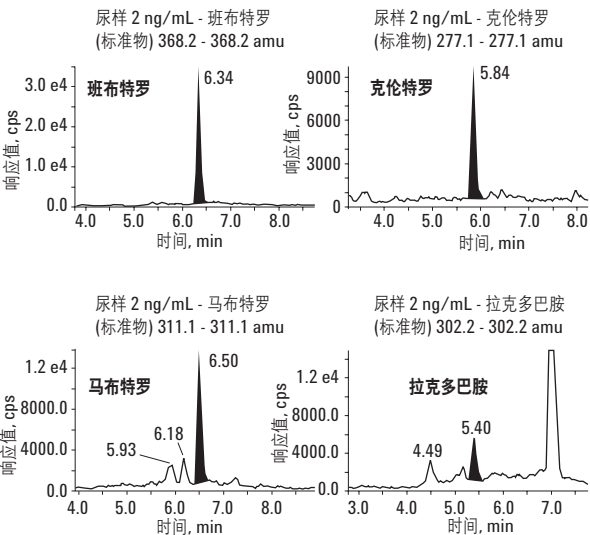


图 2. 添加 2 ng/mL 标样的尿样的标准提取离子色谱图

定性通过运用自动化的经验公式进行常规检索。运行时间工作表允许自动化的经验公式计算，后台采集，以超文本链接方式报告以及逗号分割数据的电子表格形式以便进一步进行数据处理。图 4 为添加标准样品的尿样的计算所得的质量精度曲线。它表明，对于标准样品和实际样品，该系统常规分析的质量精度分析误差小于 3 ppm。

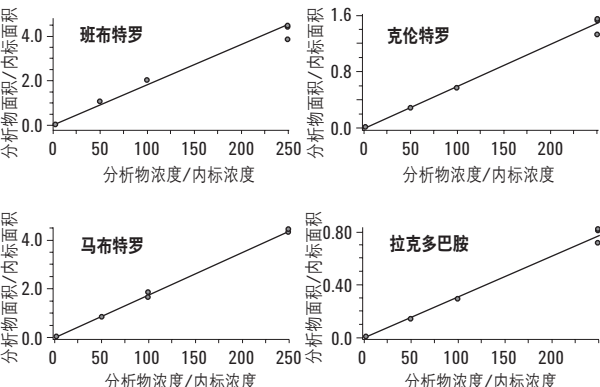


图 3. 添加尿样的校正曲线 (2 ng/mL-250 ng/mL)

表 2. 标准工作曲线数据统计

化合物	提取浓度 ng/mL	样品瓶	低值 ng/mL	高值 ng/mL	平均 ng/mL	标准偏差	%CV	%精确度
班布特罗	2	5	1.59	1.67	1.65	0.035	2.104	82.40
	50	5	58.11	58.56	58.36	0.185	0.318	116.72
	100	5	110.50	111.93	111.27	0.640	0.575	111.27
	250	5	211.46	247.25	232.40	17.934	7.717	92.96
马布特罗	2	5	2.02	2.09	2.06	0.026	1.243	102.90
	50	5	48.72	49.11	48.92	0.188	0.385	97.85
	100	5	95.62	108.17	98.39	4.807	4.886	98.39
	250	5	250.48	256.32	253.69	2.674	1.054	101.47
克伦特罗	2	5	2.05	2.17	2.09	0.051	2.455	104.50
	50	5	47.65	48.77	48.24	0.422	0.876	96.49
	100	5	96.27	98.05	97.25	0.715	0.736	97.25
	250	5	226.79	263.17	254.41	15.545	6.110	101.77
拉克多巴胺	2	5	2.14	2.24	2.21	0.040	1.832	110.51
	50	5	44.27	45.78	45.09	0.705	1.563	90.18
	100	5	95.13	96.59	95.71	0.632	0.661	95.71
	250	5	232.60	267.43	258.99	14.825	5.724	103.60

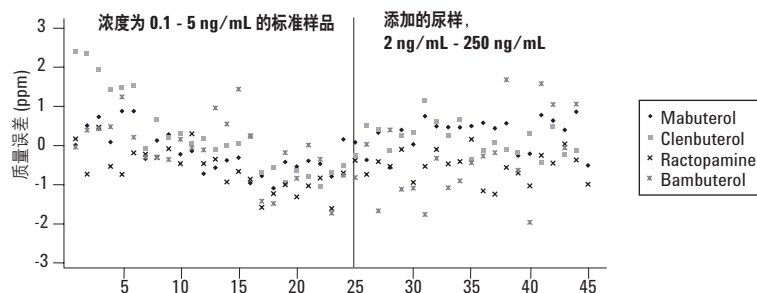


图 4. 被测 β_2 激动剂在一个 18 小时检测序列的质量精度变化曲线

结论

用 Agilent LC/MSD TOF 系统，建立了对人尿中 β_2 激动剂 LC/MS 定性及定量的分析方法。在人尿中的最小检测限为 2 ng/mL，远低于控制水平。并且质量分析精度的误差在标准样品和实际样品的各个浓度水平均低于 3 ppm。

参考文献

1. Mario Thevis, (2003) "Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Screening and Confirmation Methods for β_2 -Agonists in Human or Equine Urine" *J. Mass Spectrom.*, **38**, 1197-1206.

更多信息

如欲了解更多产品与服务信息，敬请浏览
www.agilent.com/chem/bioreagents

如想了解更详细的实验细节，请发送电子邮件至
bernhard_wuest@agilent.com
 与 Bernhard Wüst 联系

安捷伦科技公司对本材料中可能有的错误或与装置、性能及材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本材料内容如有改变，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2004

中国印刷
 2004 年 12 月 14 日
 5989-1946CHCN



Agilent Technologies