

一种使用 Agilent 7000 系列三重四极杆 GC/MS 系统测定人尿中蛋白同化制剂的高灵敏度、可靠方法

应用简报

法医/兴奋剂

作者

Lorena Garrostras, Óscar J. Pozo, Rosa Ventura, Jordi Segura, Josep Marcos
生物分析研究组
IMIM, Hospital del Mar
巴塞罗那
西班牙

Miguel A. Delgadillo, Benjamín Velasco
墨西哥预防和兴奋剂控制国家重点实验室
Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte
墨西哥城
墨西哥

摘要

使用连接安捷伦 7890 气相色谱仪的 7000 系列三重四极杆气质联用系统，开发了一种检测人尿中选定蛋白同化制剂的筛查方法 [1]。通过在世界反兴奋剂机构（WADA）要求的执法限量水平上验证化合物以后，该方法用于第十六届泛美运动会兴奋剂控制收集到的 1367 种样品分析中，在 80 多个分析批次中表现出较高的灵敏度，充分证明了方法出色的稳定性。

前言

在体育赛事中，为非法提高运动员的成绩滥用药物是世界反兴奋剂机构（WADA）严令禁止的。WADA 每年都要公布违禁药物清单 [2]，并建立每个违禁药物的最低允许限量（MRPL）[3]。清单包括了几百种化合物，可分为 11 种不同的类别。尽管 WADA 从 1998 年成立以来付出了很大努力，但蛋白同化制剂作为一类滥用药物，其阳性检出率始终维持着越来越高的趋势。由于蛋白同化类固醇激素代谢物，无论是外源性的还是内源性的，均有可能存在于人尿中，对这类化合物的检测是一项艰巨的分析挑战。



Agilent Technologies

由于通过 WADA 认证的实验室都被要求证明可以在 MRPL 水平上对所有违禁药物进行常规筛查，每个实验室都创建了特定的分析方法。这种反兴奋剂检测方法目前大多以两种仪器设备为基础：单四极杆 GC/MS 系统和三重四极杆 LC/MS 系统。

然而，现在这个普遍采纳的方案可能要发生改变。安捷伦 7000 系列三重四极杆 GC/MS 联用系统采用 SRM 模式，可以极大地提高违禁药物的检测灵敏度。应用此仪器为平台已经建立了某些特定类固醇（甲醇和脱氧氯甲基睾酮的代谢物）的长期检测方法 [4]，完成 150 种禁用药物的复杂检测仅需要 8 分钟 [5]。

从实用角度出发，三重四极杆 GC/MS 筛查方法必须满足两方面要求：

1. 可以检测到 GC/MS 和 LC/MS/MS 无法检测的 MRPL 水平的化合物，例如 2 ng/mL 的 17 α -甲基-5 β -雄烷-3 α ,17 β -二醇（甲睾酮的代谢产物）
2. 可以在最苛刻的情况下证明其稳定性

本应用介绍了使用 7000 系列三重四极杆 GC/MS 系统在 7.3 分钟内筛查和验证 7 种蛋白同化制剂的检测方法 [1]，选定的目标物包括 17 α -甲基-5 β -雄烷-3 α 、17 β -二醇以及其他蛋白同化制剂，使用三重四极杆 GC/MS/MS 检测这些化合物可获得比传统 GC/MS 和 LC/MS/MS 更全面的信息。方法的稳定性通过两个星期内对西班牙第十六届泛美运动会兴奋剂控制中收集到的 1367 个样本分析进行了验证。

实验

标准品和试剂

甲睾酮用作内标物，克伦特罗来自 Sigma 公司（圣路易斯市，密苏里州，美国），17 α -甲基-5 β -雄烷-3 α ,17 β -二醇，3 α -羟基康力龙，16 α -羟基咪唑甲氢龙，甲雄烯二醇，19-去甲雄酮和 19-去甲原胆烷醇酮购于 National Measurement Institute（Pymble，澳大利亚）， β -葡萄糖醛酸酶制剂（*E. Coli* K12）购于 Roche Diagnostics GmbH（Mannheim，德国），分析纯磷酸氢二钠、磷酸氢钠、甲基叔丁基醚、氢氧化钾、碘化铵，乙硫醇和甲醇购于 Merck 公司（Darmstadt，德国）。N-甲基-N-（三甲基硅烷基）三氟乙酰胺（MSTFA）购于 Macherey-Nagel（德国），超纯水用 Millipore Milli-Q Integral A 10 超纯水系统制备。

仪器

本研究使用 7890 系列 GC 与 7000 系列三重四极杆质谱联用系统，配置分流/不分流毛细管色谱柱进样口，使用选择反应监测采集模式，仪器条件列于表 1。

表 1. 安捷伦 7890/7000 GC/MS 工作条件

GC 运行条件

分析色谱柱	Agilent J&W HP- 超高惰性色谱柱 25 m \times 0.2 mm, 0.11 μ m (部件号 19091A-002)
进样	2 μ L, 分流比 1:10
载气	氮气, 恒流 1 mL/min
色谱柱升温程序	185 $^{\circ}$ C 以 30 $^{\circ}$ C/min 升至 230 $^{\circ}$ C 以 15 $^{\circ}$ C/min 升至 290 $^{\circ}$ C 以 70 $^{\circ}$ C/min 升至 310 $^{\circ}$ C (保持 1.5 min)
传输线温度	280 $^{\circ}$ C
溶剂延迟	2 minutes

MS 条件

调谐	自动调谐
EMV 增益	20
采集参数	EI 源, 选择反应监测模式
碰撞气体流量	氮气 1.5 mL/min
淬灭气体流量	氮气 2.25 mL/min
质谱温度	离子源 220 $^{\circ}$ C, 四极杆 180 $^{\circ}$ C

样品制备

向尿样 (2.5 mL) 中加入 1 mL 磷酸盐缓冲溶液 (1M, pH7), 用 25 μ L β -葡萄糖醛酸酶制剂在 55 $^{\circ}$ C 下培养 1 h。将样品冷却至室温后, 加入 135 μ L KOH (5M) 将 pH 调节至 9.5, 再加入 5 mL 甲基叔丁基醚进行液-液萃取。离心后, 将有机层蒸发至干, 加入 59 μ L MSTFA-NH₄I-乙硫醇 (100:2:6,v/w/v) 在 60 $^{\circ}$ C 衍生化 30 min, 转移至进样瓶中。

采集参数

本分析使用的安捷伦三重四极杆 GC/MS 系统参数列于表 2。

结果

方法开发

质谱条件优化过程分两步进行。首先，采集每个化合物衍生化标准溶液的全扫描谱图。分别采集全扫描谱图中的主要母离子在 5 个不同碰撞能量下的子离子质谱图。通过这些研究确定母离子和子离子在选择反应监测模式 (SRM) 下的最佳仪器条件。

通过分析空白尿样萃取液和基体 5 倍最低允许限量 (MRPL) 加标萃取液对优化结果进行最终确定。对每一个可能的母离子，都要在 5 个不同的碰撞能量下获取不同的子离子，包括前期实验确定的最佳能量值。最后确定获得最大信噪比 (S/N) 而非最大绝对响应的参数为最优参数，因为基体和内源性类固醇的背景噪声会产生显著的影响。为了提高方法整体的定性能力，每个化合物优化确定两个跃迁，表 2 汇总了为每个化合物建立优化条件后的分析结果。

表 2. Agilent 7000 系列三重四极杆 GC/MS/MS 采集参数

化合物	衍生化产物	RT (min)	母离子	子离子	CE (V)
甲睾酮 (ISTD)	Bis-0-TMS	5.00	446	301	20
		5.00	446	169	30
克伦特罗	N-TMS,0-TMS	2.45	335	300	10
		2.45	335	227	15
19-去甲雄酮 (诺龙代谢物)	Bis-0-TMS	3.68	405	315	15
		3.68	405	169	20
19-去甲原胆烷醇酮 (诺龙代谢物)	Bis-0-TMS	3.85	405	315	15
		3.85	405	169	20
Epi甲雄烯二醇 (美雄酮代谢物)	Bis-0-TMS	3.73	358	301	20
		3.73	358	196	5
17 α -甲基-5 β -雄烷-3 α ,17 β -二醇 (甲睾酮代谢物)	Bis-0-TMS	4.38	435	345	10
		4.38	435	255	20
3'-羟基康力龙 (康力龙代谢物)	Bis-0-TMS,	6.65	545	455	40
	N-TMS	6.65	545	147	30
16 α -羟基呋喃甲氢龙 (呋喃甲氢龙代谢物)	Mono-0-TMS	6.57	490	231	15
		6.57	490	143	35

RT: 保留时间

CE: 碰撞能量

方法验证

定性筛查方法的验证方案不像定量方法那么严格 [6]。通过对一系列不同的空白尿样进行分析和监测信噪比 (S/N) 不大于 3 的干扰信号, 评价方法的选择性, 以此为目的, 选择了 6 个来自不同测试者且未服用任何违禁药物的尿液样本进行分析。

在 WADA 设置的 MRPL 水平上进行方法重复性测试。用上述方法对含有目标分析物的一系列质控样品 (每个分析物 6 个平行样) 进行分析, 以目标物主要跃迁和内标物峰面积比值的相对标准偏差 (RSD) 表示重复性的好坏, 表 3 为测得的结果列表。

表 3. 方法验证结果

化合物	MRPL (ng/mL)	浓度 (ng/mL)	重复性 (RSD, %)
克伦特罗	2	0.1	4.9
19-去甲雄酮 (诺龙代谢物)	2	1	10.2
19-去甲原胆烷醇酮 (诺龙代谢物)	10	5	7.8
17 β -methyl-5 β -androst-1-ene-3 α , 17 α -diol (metabolite of methandienone)	2	1	13.4
17 α -甲基-5 β -雄烷-3 α ,17 β -二醇 (甲睾酮代谢物)	2	1	9.4
3'-羟基康力龙 (康力龙代谢物)	2	1	9.2
16 α -羟基咪唑甲氢龙 (咪唑甲氢龙代谢物)	10	5	7.0

MRPL: 最低允许限量

RSD: 相对标准偏差

实际样品测定

在第十六届泛美运动会期间，在 CONADE（墨西哥全国体育文化和运动委员会）共对 1367 份运动员尿样进行了检测。作为违禁药物筛查方案的一部分，所有样本均采用上述方法进行分析。每一分析批次样品都包含一个以 MRPL 浓度加标的阳性样本和一个阴性样本。

作为定性的依据，每个化合物监测到的两个跃迁的峰面积比值在 82 个分析批次过程中保持不变（RSD 低于 7%）。图 1 为分析得到的所有化合物两个跃迁的灵敏度。

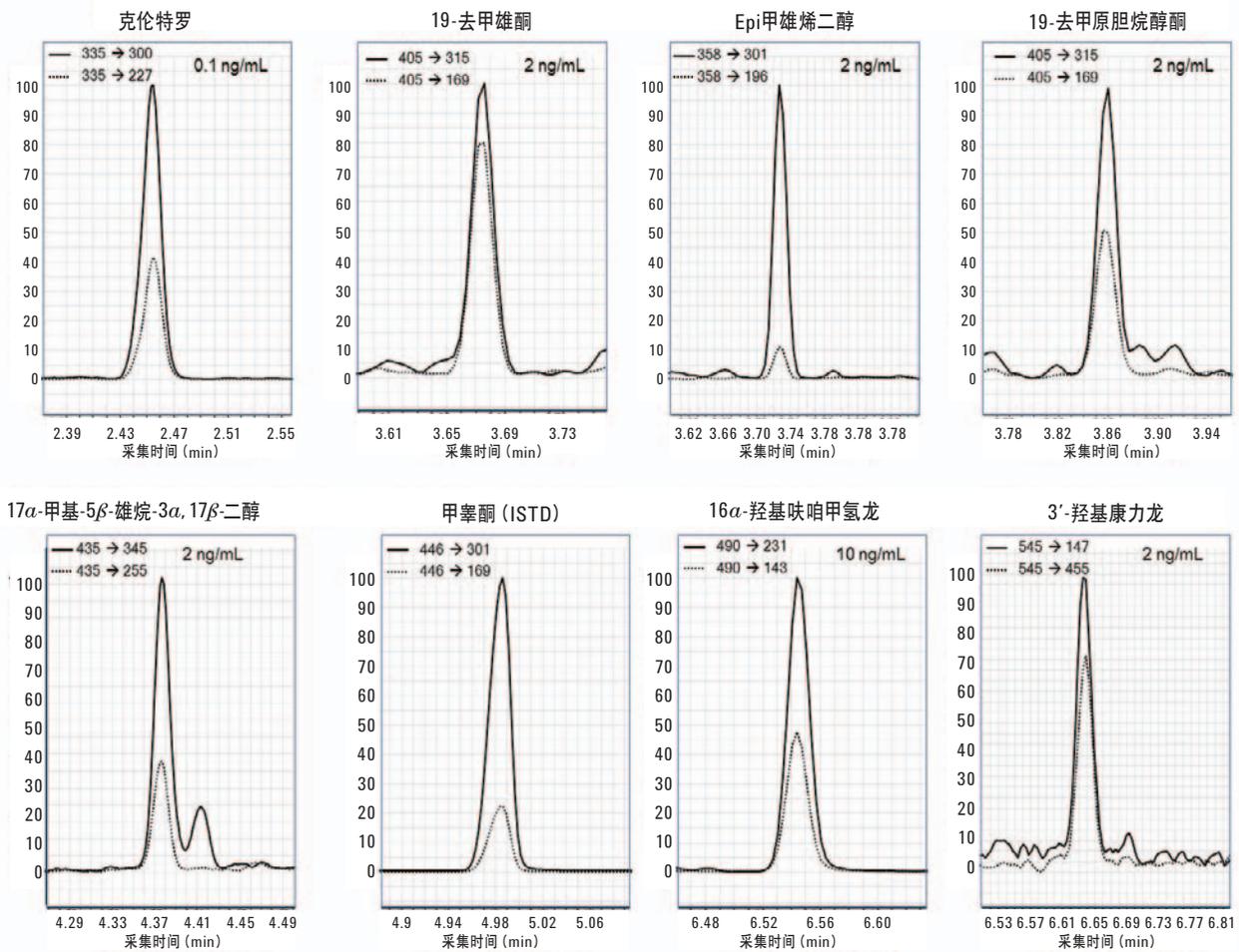


图 1. 最低允许限量下，监测跃迁的代表性谱图

除此之外，图 2 还显示，阳性质控样本中每个化合物对应的特征性跃迁的 S/N 在整个分析过程中保持不变。

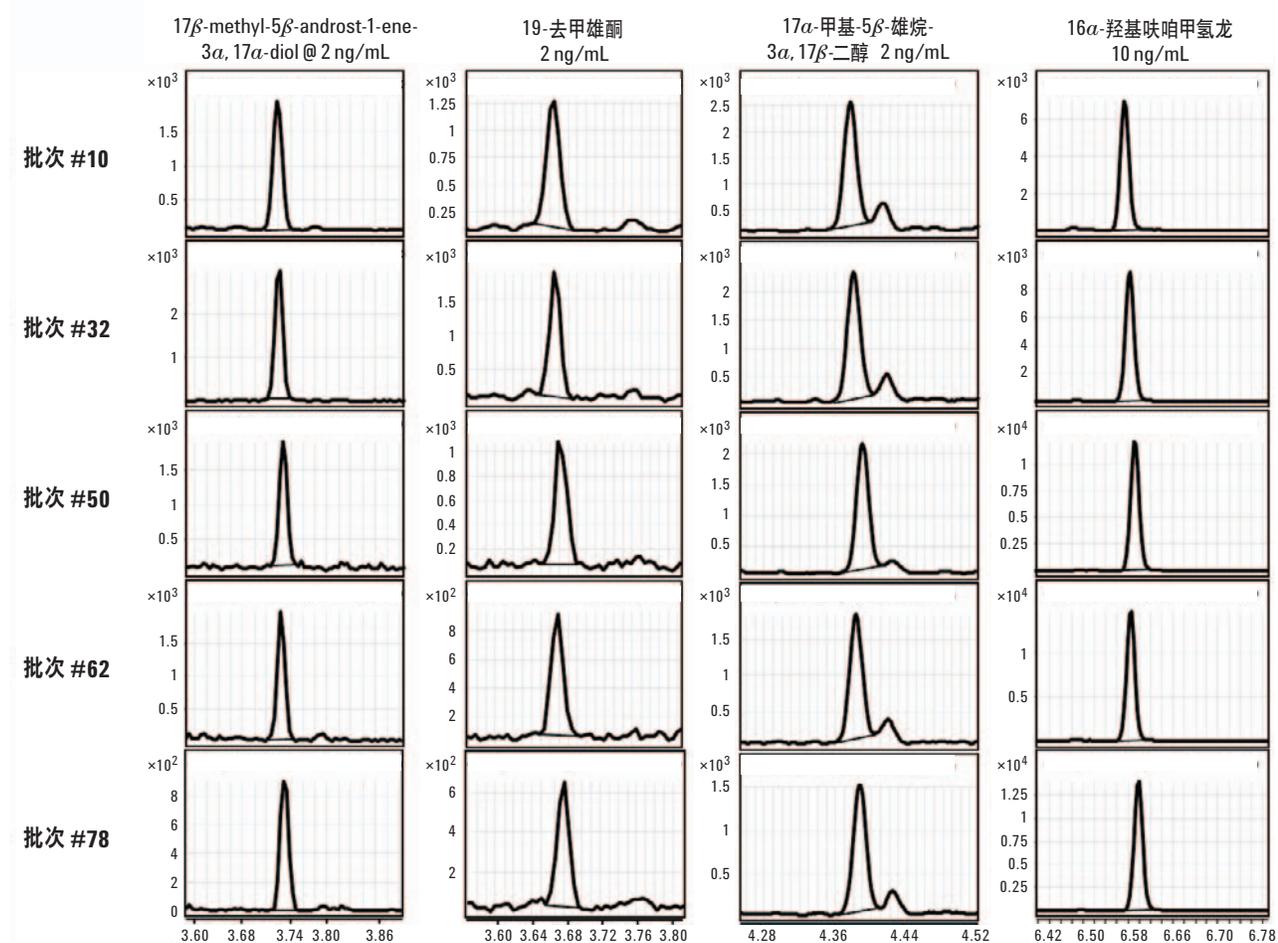


图 2. 泛美运动会期间，阳性质控样本里代表性类固醇的特征性跃迁的 S/N 在 78 批次样本分析过程中的稳定性

结论

为适应 MRPL 的要求，在 7000 系列三重四极杆 GC/MS 系统上开发了一种快速、稳定的方法，测定 WADA 检测列表上的蛋白同化制剂，并将方法应用到第十六届泛美运动会上采集到的 1300 多个样本中进行验证。鉴于已有文献在相同的仪器平台上开发了合成代谢类固醇长期检测的方法和复杂兴奋剂的筛查方法 [4,5]，这些都充分证明了 7000 系列三重四极杆 GC/MS 是兴奋剂实验室理想的药物分析解决方案。

参考文献

1. M.A. Delgadillo, L. Garrosta, O.J. Pozo, R. Ventura, B. Velasco, J. Segura, J. Marcos. "Sensitive and robust method for anabolic agents in human urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry" J. of Chromatogr. B. 2012 Apr 1 [Epub ahead of print].
2. WADA. The 2011 Prohibited List. International Standard. <http://www.wada-ama.org>
3. WADA. TD2010MRPL. <http://www.wada-ama.org>
4. S. Baumann "Longterm Detection of Anabolic Steroid Metabolites in Urine" Agilent Technologies Application Note 5990-5748EN.
5. 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. 1218, 3306-3316 (2011).
6. International Conference on Harmonization. ICH Topic Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH: Geneva, 1996.

更多信息

本文中的数据仅代表测定的典型结果。有关产品和服务的更多信息，请访问：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。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012年6月21日，中国印刷

5991-0414CHCN



Agilent Technologies