

使用超临界流体色谱和质谱测定尿液中的 β -受体阻滞剂

应用简报

兴奋剂检测

作者

Maria Kristina Parr 教授
柏林自由大学
药学院
德国柏林

Edgar Naegele 和 Bernhard Wuest
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了利用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统对一系列极性药物化合物的分离。重点关注所用化合物库中包含的大量 β -受体阻滞剂。对于所有 β -受体阻滞剂，讨论了线性、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 以及保留时间 RSD 和峰面积 RSD 等性能数据。最终，对其中加入 β -受体阻滞剂的尿液样品进行了分析。



Agilent Technologies

前言

在被世界反兴奋剂机构 (WADA) 列为禁用物质的庞大极性化合物库¹ 中, 有一部分已在 HILIC 条件下得到分析²。

在本研究中, 利用超临界流体色谱 (SFC) 对该化合物系列进行了研究, 以评估对此类极性化合物的分析能力以及三重四极杆质谱对它们的检测性能。由于兴奋剂检测分析的样品量很大, 因此需要一种快速分析已知兴奋剂化合物的方法。SFC 凭借其快速分离能力, 可以在应对该应用领域中的样品数量方面发挥重要作用。在评估过程中, 利用所用化合物库中固有的 13 种 β -受体阻滞剂, 测定样品定量分析的典型检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)、保留时间 RSD 和峰面积 RSD 以及精度和准确度数据。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A):

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器, 配备高压 SFC 流通池
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 安捷伦分流器套装 G4309-68715

仪器设置

图 1 显示了 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置。

色谱柱

Agilent ZORBAX NH2, 4.6 × 150 mm, 5 μ m (部件号 883952-708)

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件, 07.01 版
- Agilent MassHunter 定性分析软件, 07.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件, 07.00 版

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS

补偿流组成

甲醇/水 (95/5), 0.5 mmol/L 甲酸铵 + 0.2% 甲酸

补偿流流速

0.5 mL/min

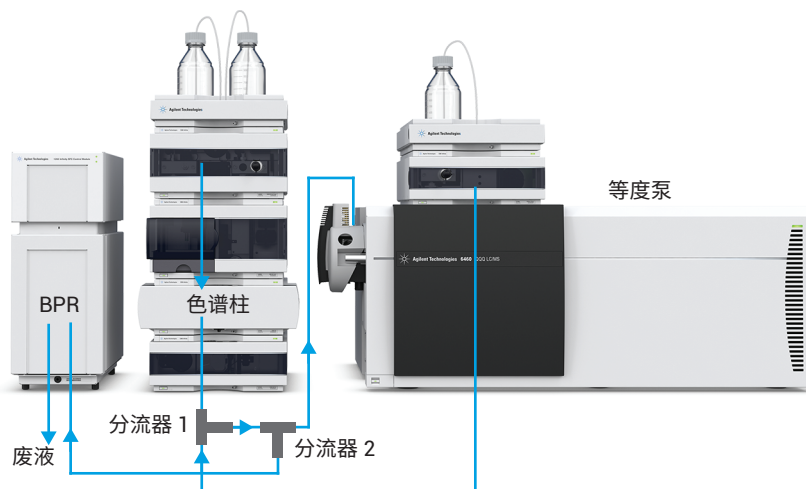


图 1. Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的配置。色谱柱直接连接至分流器组件中的分流器 1 (BPR = 反压调节器, 不使用紫外检测器, 分流器套装部件号 G4309-68715)

标准品

化合物库由极性药物化合物组成，其中包括 13 种 β -受体阻滞剂，每种化合物浓度分别为 1 mg/mL，溶于乙腈中。用甲醇制得 1:100 的稀释液，配制用于所述研究的储备液。

化学品

所有化学品均购自 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。所有溶剂均为 LC/MS 级。甲醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

样品前处理

向尿液中加入喷布洛尔 (250 ng/mL)，用甲醇按 1:5 的比例进行稀释，涡旋混合，然后在 14000 g 下离心 5 分钟。对上清液进行过滤，并将滤液直接进样分析。

SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
SFC 梯度	0 分钟, 2% B; 10 分钟, 50% B
停止时间	10 分钟
后运行时间	2 分钟
改性剂	甲醇 + 0.1% 甲酸 (FA)
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	150 bar
柱温	40 °C
进样量	5 μL , 定量环过量填充三倍

质谱方法

参数	值
电离模式	正离子
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
MRM 条件	见表 1, 其中显示了详细的保留时间、保留时间窗口、碎裂电压和碰撞能量

表 1. 用于研究 β -受体阻滞剂的 MRM 条件，列出了母离子质量数、碎片离子质量数以及碎裂电压和碰撞能量

	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	定量离子	CE (V)	定性离子	CE (V)
喷布洛尔	292	113	236	12	74	20
阿普洛尔	250	11	116	16	56	28
氧烯洛尔	266	113	116	12	72	16
比索洛尔	326	141	116	16	74	28
艾司洛尔	296	121	145	24	56	32
心得安	260	95	116	16	56	28
塞利洛尔	380	136	251	20	74	32
醋丁洛尔	337	145	116	20	56	28
奈必洛尔	406	151	151	28	44	44
心得乐	249	110	116	16	56	28
索他洛尔	273	83	255	8	133	28
阿替洛尔	267	110	145	28	56	28
纳多洛尔	310	88	254	12	56	36

结果与讨论

在氨基色谱柱上，采用甲醇（含 0.1% FA）作为改性剂，梯度从 2% 开始并在 10 分钟内增加至最高 50%，对 44 种药物混合化合物中固有的 13 种 β -受体阻滞剂进行分离。在该梯度条件下，所有 44 种化合物均可得到分离。在本例中，仅监测并详细讨论 13 种 β -受体阻滞剂（图 2）。

这些 β -受体阻滞剂在 4.68 至 7.38 分钟之间洗脱，共洗脱效应极小。药物混合物中第一种洗脱的化合物在保留时间 2.27 分钟处洗脱，最后一种洗脱的化合物在 8.19 分钟洗脱。

绘制所有 β -受体阻滞剂 1000 ng/mL 至 1 ng/mL（在改性剂中）的校准曲线，以测量线性、LOQ ($S/N > 10$) 和

LOD ($S/N > 3$)（表 2）。典型 LOD 低于 1.5 ng/mL，典型 LOQ 低于 5 ng/mL。所有化合物均获得了线性校准， R^2 优于 0.9990。

将浓度为 100 ng/mL 的校准标样进样分析 10 次，便于统计评估（表 2）。测得的保留时间 RSD 通常低于 0.25%，峰面积 RSD 低于 5%。

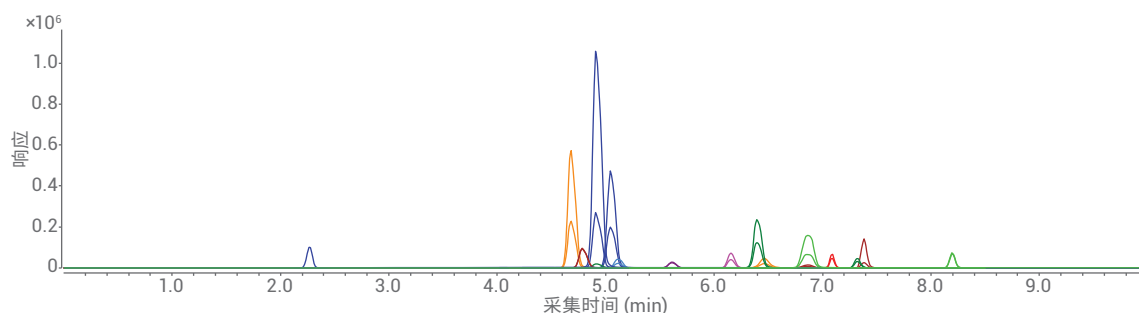


图 2. 包含 44 种化合物的混合物中 13 种 β -受体阻滞剂的分离。用于分离所有化合物的梯度为：甲醇含量在 10 分钟内从 2% 增加至 50%。最早洗脱的化合物保留时间为 2.270 分钟，最晚洗脱的化合物保留时间为 8.198 分钟。 β -受体阻滞剂在 4.68 至 7.38 分钟之间洗脱

表 2. 13 种 β -受体阻滞剂的保留时间、保留时间和峰面积的 RSD 以及 LOD、LOQ 和线性。利用 1 至 1000 ng/mL 之间绘制的校准曲线计算得到 LOD 和 LOQ。将浓度为 100 ng/mL 的校准标样进行分析 10 次，由此计算得出 RSD

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	R^2
喷布洛尔	4.680	0.18	3.54	0.20	1.60	0.9994
阿普洛尔	4.784	0.16	4.42	1.50	5.00	0.9990
氧烯洛尔	4.912	0.16	2.76	0.10	0.25	0.9992
比索洛尔	5.045	0.15	3.00	0.19	0.60	0.9991
艾司洛尔	5.111	0.15	6.83	1.41	4.71	0.9992
心得安	5.611	0.18	8.05	1.71	5.70	0.9997
塞利洛尔	6.158	0.26	3.29	0.37	1.25	0.9998
醋丁洛尔	6.397	0.26	1.68	0.66	2.19	0.9997
奈必洛尔	6.463	0.24	5.31	2.85	9.52	0.9996
心得乐	6.854	0.28	3.67	3.64	10.90	0.9994
索他洛尔	7.088	0.24	6.29	5.51	18.38	0.9995
阿替洛尔	7.322	0.28	3.73	1.98	6.66	0.9995
纳多洛尔	7.383	0.29	2.53	0.41	1.38	0.9997

作为实际样品的示例，将喷布洛尔以 250 ng/mL 的浓度加入尿液中，并按照“实验部分”所述的步骤进行样品前处理。由于纯水溶液样品不能进样至 SFC 中，因此用甲醇按 1:5 的比例对样品进行稀释。为定量测定喷布洛尔，绘制溶剂中浓度为 1000 ng/mL 至 2 ng/mL 范围内的校准曲线（图 3A）。测得稀释样品的平均浓度为 45.59 ng/mL，测得的样品浓度为

228.45 ng/mL。该化合物在 4.53 分钟洗脱，获得了良好的信号强度（图 3B），且定量/定性离子比处于预期范围内（图 3C）。为进行统计评估，将样品进样分析 10 次，计算得出的保留时间 RSD 和峰面积 RSD 分别为 0.14% 和 2.29%。计算得出的浓度精度和准确度分别为 2.28% 和 91.38%。

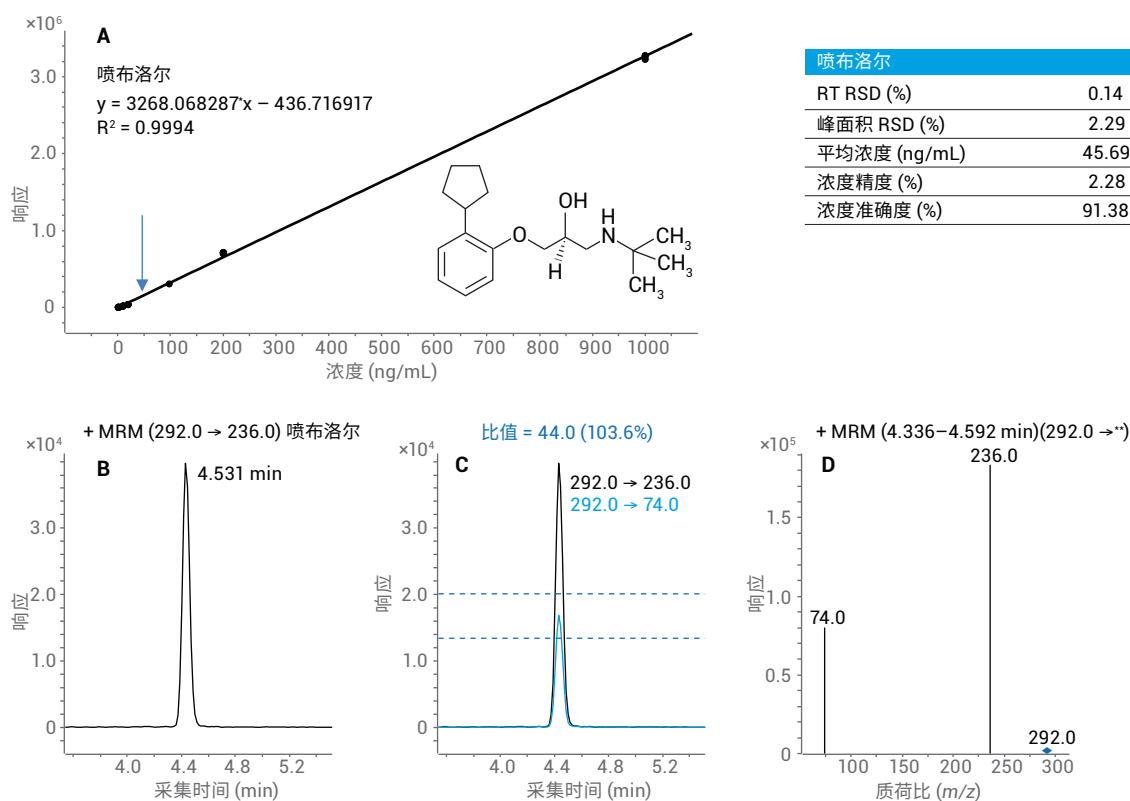


图 3. 尿液中喷布洛尔的测定。A) 喷布洛尔在 2 至 1000 ng/mL 之间的校准曲线。稀释样品中测得的浓度如箭头所示。B) 稀释样品中喷布洛尔的定量离子对。C) 所测样品的定量/定性离子比。D) 样品中测得的喷布洛尔的 MRM 离子对。内插表格中示出由样品进样分析 10 次计算得出的保留时间 RSD 和峰面积 RSD 以及平均浓度、浓度精度和浓度准确度

结论

本应用简报证明利用 SFC 能够在较短的运行时间内分离大量高极性药物化合物。将 SFC 与三重四极杆质谱仪结合使用所得的检测结果表明，检测限通常低于 1.5 ng/mL。保留时间 RSD 低于 0.25%，峰面积 RSD 低于 5%。

结果证明，通过用有机溶剂稀释实际水溶液样品，能够对样品中的药物化合物进行测量，并获得足够高的灵敏度以及浓度精度和准确度。

参考文献

1. The World Anti-Doping Code, The 2015 Prohibited List International Standard, World Anti-Doping Agency, Montreal, Canada, 20 September 2014, Available at www.wada-ama.org (2015 年 11 月 1 日访问)
2. Mazzarino, M.; *et al.* Screening and confirmation analysis of stimulants, narcotics and beta-adrenergic agents in human urine by hydrophobic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 8156–8167

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

用于司法鉴定。

本文中的信息、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，2017
2017年10月15日，中国出版
5991-6437ZHCN



Agilent Technologies