

ATLAS-USIS 和 LCMS-8045 联用检测尿液中 9 种兴奋剂的含量

LCMSMS-401

摘要： 本文利用岛津 ATLAS-USIS 和 LCMS-8045 联用，建立了尿液中 9 种常见兴奋剂的分析方法。该方法前处理采用 ATLAS-USIS，在 10 min 之内即可自动完成样品从萃取、取上清、真空干燥全流程；同时实验结果表明：各组线性相关系数均在 0.995 以上，线性良好。对高、中、低水平的标准溶液重复进样 6 针，保留时间和峰面积均表现出了良好的重复性。加标回收实验中，各物质回收率在 42.3% ~ 122.1% 之间，峰面积 RSD% 值分别在 0.58~7.09 之间，表明 ATLAS-USIS 精密度良好。采用样品加标方式考察方法灵敏度，9 种兴奋剂的定量限在 0.02-0.54 $\mu\text{g/L}$ 之间，满足兴奋剂检定规程小于 2 $\mu\text{g/L}$ 的要求。该方法操作简捷、灵敏度高、分析速度快，特别适合大批量样品检测。

关键词： ATLAS-USIS LCMS-8045 兴奋剂 尿液

为维护竞技体育的公平和纯洁，保护运动员的身心健康，兴奋剂检测已成为所有体育比赛中不可或缺的重要环节。兴奋剂种类繁多，结构差异大，并且随着时间的推移不断有新的兴奋剂涌现。为满足兴奋剂检测的要求，兴奋剂检测实验室需要不断完善检测程序，提高检测方法的简便性、灵敏度和准确性。

所有的合成雄性激素类固醇都有与睾酮相似的化学结构，因而具有与睾酮类雄性激素相似的生理作用，能够加速肌肉增长，增强肌肉力量。因此这类药物是目前使用频率最高、范围最广的一类兴奋剂，最常用的有：甲睾酮、康力龙、苯丙酸诺龙等。

检测兴奋剂的方法主要有两种：尿液检测和血液检测，其中尿液检测为主。兴奋剂检测由于基质复杂，对灵敏度要求较高，故主要检测手段为 LC-MS 和 GC-MS。同时岛津推出的全自动样品前处理仪 ATLAS-USIS，可自动进行液-液萃取，实现兴奋剂检材样品制备自动化，大量减少人力物力消耗，避免有机试剂等对操作人员的身体伤害，提高工作效率。本文利用岛津 ATLAS-USIS 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，建立一种简便、快速、准确的尿液中 9 种类固醇兴奋剂的分析方法。供相关人员参考。

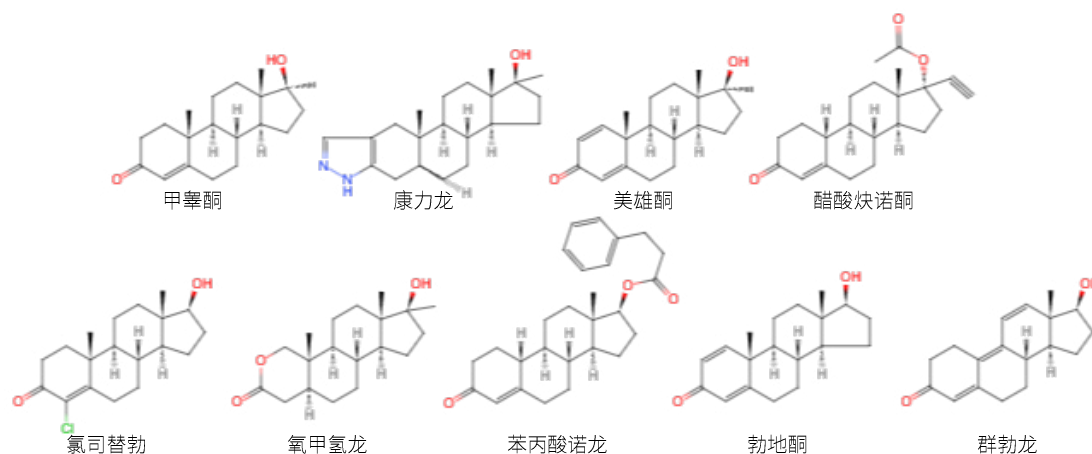


图 1 9 种常见兴奋剂的结构式

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津全自动样品前处理仪 ATLAS-USIS 和超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8045 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件:

色谱柱: Shim-pack GISS C18 (2.1 mm I.D. × 50 mm L., 1.9 μm)

流动相: A 相 -0.1% 甲酸 +5 mM 乙酸铵水 B 相 - 乙腈

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 10 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 30%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 4.50 | Pumps | Pump B Conc. | 90 |
| 5.00 | Pumps | Pump B Conc. | 90 |
| 5.10 | Pumps | Pump B Conc. | 30 |
| 6.50 | Controller | Stop | |

LCMS-8045 质谱条件:

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

| No. | 名称 | CAS | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE(V) | Q3 Pre Bias(V) |
|-----|-------|------------|--------|---------|----------------|-------|----------------|
| 1 | 甲睾酮 | 58-18-4 | 303.20 | 109.05* | -15 | -27 | -18 |
| | | | | 97.10 | -12 | -27 | -17 |
| 2 | 康力龙 | 10418-03-8 | 329.10 | 81.10* | -21 | -49 | -13 |
| | | | | 95.15 | -21 | -42 | -18 |
| 3 | 美雄酮 | 72-63-9 | 301.20 | 121.15* | -21 | -24 | -20 |
| | | | | 149.20 | -20 | -14 | -14 |
| 4 | 醋酸炔诺酮 | 51-98-9 | 341.20 | 281.25* | -23 | -14 | -18 |
| | | | | 109.05 | -17 | -27 | -18 |
| 5 | 氯司替勃 | 1093-58-9 | 323.20 | 143.15* | -11 | -25 | -22 |
| | | | | 131.05 | -11 | -29 | -25 |
| 6 | 氧甲氢龙 | 53-39-4 | 307.30 | 289.15* | -15 | -12 | -18 |
| | | | | 271.15 | -15 | -15 | -16 |

| | | | | | | | |
|---|-------|------------|--------|---------|-----|-----|-----|
| 7 | 苯丙酸诺龙 | 62-90-8 | 407.20 | 105.05* | -21 | -40 | -29 |
| | | | | 133.05 | -21 | -20 | -11 |
| 8 | 勃地酮 | 846-48-0 | 287.20 | 121.20* | -20 | -21 | -21 |
| | | | | 135.20 | -19 | -14 | -12 |
| 9 | 群勃龙 | 10161-33-8 | 271.10 | 253.20* | -18 | -19 | -16 |
| | | | | 199.20 | -18 | -23 | -20 |

注：*表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

取浓度为 1.0 mg/L 对照品混合溶液，以 ATLAS-USIS 处理的尿液空白基质作为稀释溶剂，依次配制成 1、2、5、8、10、20、50 μg/L 的系列浓度。

1.4 样品前处理方法

在 ATLAS-USIS 样品管中，先后加入 2.5 mL 的尿液、1 mL 磷酸缓冲液（1 M, pH 7）、25 μL 酶活为 3000 u 的葡萄糖酶制剂，在 55°C 温浴 1 h 酶解，酶解结束后将样品冷却到室温，上 ATLAS-USIS 进行液液萃取。萃取流程：向样品中加入 4 mL 乙酸乙酯，震荡离心后进行乳化检测，之后取 3.0 mL 上清液进行干燥处理。干燥完成后加入 1 mL 的 50% 甲醇水溶液复溶，0.22 μm 滤膜过滤上机分析。

结果与讨论

2.1 标准溶液的 MRM 色谱图

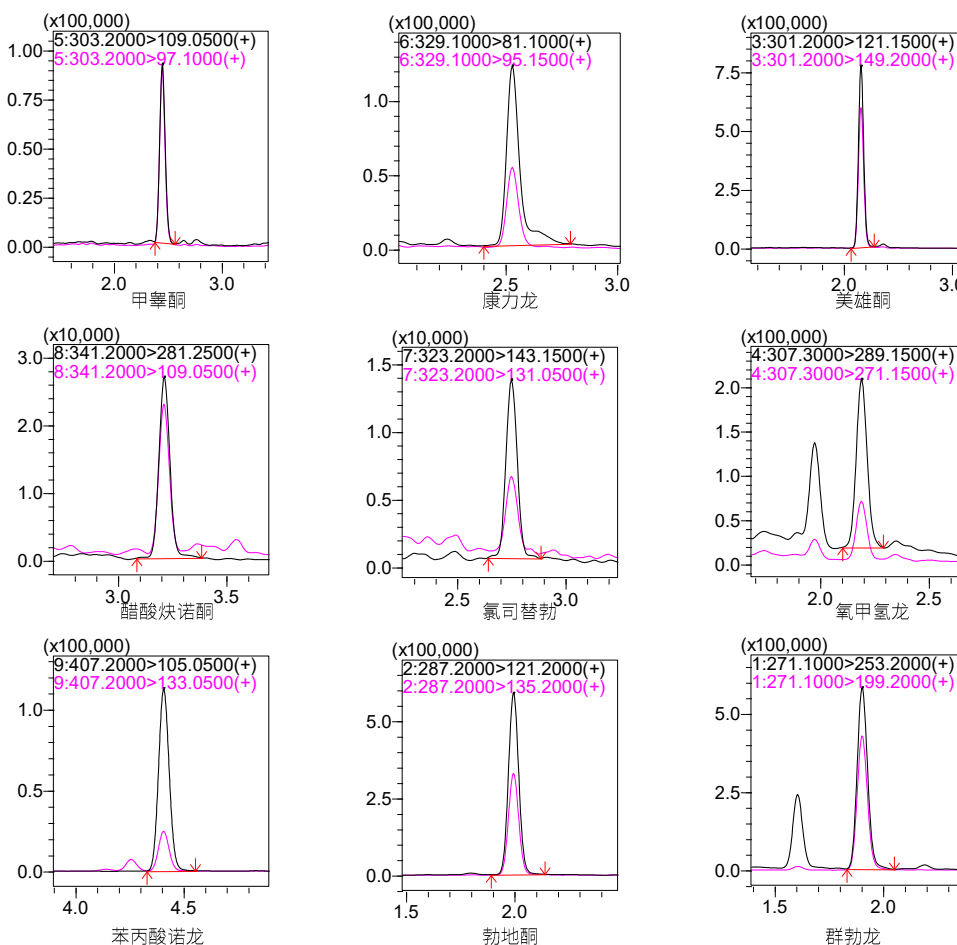


图 2 9 种兴奋剂 MRM 色谱图 (10 μg/L)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制各浓度混合标准溶液，以各目标物浓度为横坐标，目标物峰面积为纵坐标，以外标法绘制标准曲线（见图 3），所得校准曲线线性关系良好，均大于 0.995。线性方程及相关系数见表 3。

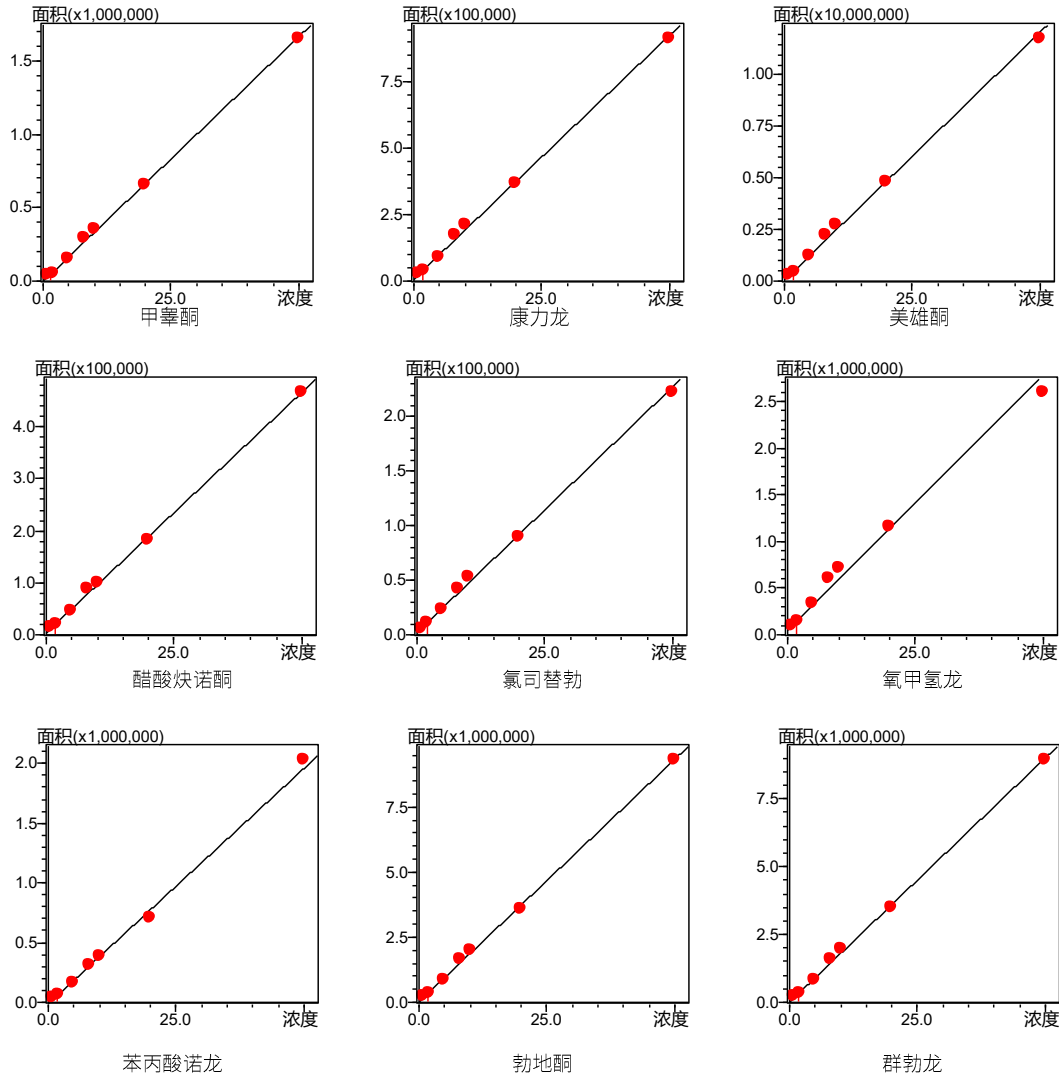


图 3 9 种兴奋剂的标准曲线

表 3. 校准曲线 (权重 1/C)

| 序号 | 名称 | 校准曲线 | 线性范围 ($\mu\text{g/L}$) | 相关系数 r | 准确度 % |
|----|-------|------------------------------|-----------------------------|--------|------------|
| 1 | 甲睾酮 | $Y = (33168.0)X + (3379.47)$ | 1-50 | 0.999 | 90.9-109.4 |
| 2 | 康力龙 | $Y = (18387.4)X + (8329.88)$ | 1-50 | 0.998 | 88.3-108.1 |
| 3 | 美雄酮 | $Y = (240614)X + (46803.3)$ | 1-50 | 0.997 | 86.9-111.1 |
| 4 | 醋酸炔诺酮 | $Y = (9250.09)X + (3797.76)$ | 1-50 | 0.998 | 89.1-111.4 |
| 5 | 氯司替勃 | $Y = (4511.57)X + (1951.80)$ | 1-50 | 0.997 | 89.2-112.6 |
| 6 | 氧甲氢龙 | $Y = (53576.2)X + (53017.8)$ | 1-50 | 0.996 | 86.1-114.5 |

| | | | | | |
|---|-------|-------------------------------|------|-------|------------|
| 7 | 苯丙酸诺龙 | $Y = (39420.3)X + (-12163.5)$ | 1-50 | 0.997 | 89.2-118.3 |
| 8 | 勃地酮 | $Y = (186459)X + (12618.8)$ | 1-50 | 0.998 | 89.5-109.0 |
| 9 | 群勃龙 | $Y = (180196)X + (750.767)$ | 1-50 | 0.998 | 86.5-109.2 |

2.3 重复性

按照 1.3 步骤配制低、中、高三个浓度标准溶液，连续进样 6 次，考察分析方法保留时间和峰面积的重复性。结果表明：9 种兴奋剂的保留时间的 RSD 均小于 0.5% 和峰面积的 RSD 均小于 10%，数据表明方法重复性良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

| 样品名称 | RSD% (2 µg/L) | | RSD% (8 µg/L) | | RSD% (20 µg/L) | |
|-------|---------------|------|---------------|------|----------------|------|
| | R.T. | Area | R.T. | Area | R.T. | Area |
| 甲睾酮 | 0.19 | 8.68 | 0.08 | 2.14 | 0.20 | 1.31 |
| 康力龙 | 0.17 | 7.21 | 0.10 | 1.98 | 0.18 | 2.32 |
| 美雄酮 | 0.24 | 2.12 | 0.08 | 0.42 | 0.24 | 0.98 |
| 醋酸炔诺酮 | 0.12 | 5.37 | 0.09 | 2.20 | 0.12 | 1.33 |
| 氯司替勃 | 0.18 | 6.66 | 0.13 | 6.74 | 0.16 | 3.28 |
| 氧甲氢龙 | 0.22 | 4.97 | 0.08 | 3.13 | 0.24 | 4.22 |
| 苯丙酸诺龙 | 0.08 | 2.50 | 0.08 | 1.88 | 0.08 | 1.07 |
| 勃地酮 | 0.28 | 1.98 | 0.08 | 1.02 | 0.29 | 0.72 |
| 群勃龙 | 0.31 | 2.60 | 0.08 | 0.71 | 0.32 | 0.58 |

2.4 基质加标实验

取尿样，按照 1.4 步骤中制备样品和加标样品，两个水平加标浓度如下表 5 所示，各样品平行测定 4 次。测试结果显示：9 种兴奋剂的加标回收率在 42.3% ~ 122.1% 之间，相对标准偏差在 0.58% ~ 7.09% 之间。

表 5 基质加标实验结果

| 序号 | 名称 | 样品浓度 (µg/L) | 加标 1 (n=4) | | | 加标 2 (n=4) | | |
|----|-------|----------------|----------------|-------|------|----------------|-------|------|
| | | | 加标浓度 (µg/L) | 回收率 % | RSD% | 加标浓度 (µg/L) | 回收率 % | RSD% |
| 1 | 甲睾酮 | ND | 2 | 51.3 | 7.09 | 10 | 44.9 | 4.59 |
| 2 | 康力龙 | ND | 2 | 104.3 | 3.90 | 10 | 82.5 | 1.33 |
| 3 | 美雄酮 | ND | 2 | 65.0 | 6.64 | 10 | 67.9 | 1.11 |
| 4 | 醋酸炔诺酮 | ND | 2 | 102.4 | 1.91 | 10 | 122.1 | 2.19 |
| 5 | 氯司替勃 | ND | 2 | 107.6 | 5.69 | 10 | 106.6 | 1.35 |
| 6 | 氧甲氢龙 | ND | 2 | 106.5 | 2.90 | 10 | 92.1 | 0.58 |
| 7 | 苯丙酸诺龙 | ND | 2 | 42.3 | 1.59 | 10 | 51.4 | 1.67 |
| 8 | 勃地酮 | ND | 2 | 64.7 | 1.07 | 10 | 62.3 | 0.72 |
| 9 | 群勃龙 | ND | 2 | 61.3 | 3.25 | 10 | 61.8 | 1.13 |

注：ND 表示未检出

2.5 灵敏度实验

在尿液中加入浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ (康力龙、醋酸炔诺酮、苯丙酸诺龙、氯司替勃) 和 0.2 $\mu\text{g/L}$ (甲睾酮、美雄酮、氧甲氢龙、勃地酮、群勃龙) 兴奋剂标样, 按照 1.4 进行样品前处理, 考察方法的灵敏度, 将处理好的样品按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过软件计算信噪比, 检出限和定量限, 9 种兴奋剂的信噪比和方法检出限如下表 6 所示。在上述回收率的条件下, 所有检测目标物的定量限在 0.02-0.54 $\mu\text{g/L}$ 之间, 满足兴奋剂检定规程小于 2 $\mu\text{g/L}$ 的要求。

表 6 信噪比 (S/N) 和方法检出限以及定量限

| 名称 | 浓度水平 ($\mu\text{g/L}$) | S/N | 检出限 ($\mu\text{g/L}$) | 定量限 ($\mu\text{g/L}$) |
|-------|--------------------------|-----|-------------------------|-------------------------|
| 甲睾酮 | 0.2 | 76 | 0.01 | 0.03 |
| 康力龙 | 2 | 58 | 0.03 | 0.11 |
| 美雄酮 | 0.2 | 110 | 0.01 | 0.02 |
| 醋酸炔诺酮 | 2 | 118 | 0.05 | 0.17 |
| 氯司替勃 | 2 | 37 | 0.16 | 0.54 |
| 氧甲氢龙 | 0.2 | 46 | 0.01 | 0.04 |
| 苯丙酸诺龙 | 2 | 494 | 0.01 | 0.04 |
| 勃地酮 | 0.2 | 97 | 0.01 | 0.02 |
| 群勃龙 | 0.2 | 70 | 0.01 | 0.03 |

结论

本文利用岛津 ATLAS-USIS 和 LCMS-8045 联用, 建立一种简便、快速、准确的尿液中 9 种兴奋剂分析方法。该方法采用外标法定量, 在 1-50 $\mu\text{g/L}$ 的范围内, 各组分线性相关系数均在 0.995 以上, 线性良好。对高、中、低水平的标准溶液重复进样 6 针, 保留时间和峰面积均表现出了良好的重复性。加标回收实验中, 各物质回收率在 42.3% ~ 122.1% 之间, 虽然个别化合物回收率较低, 但平行 4 份样品的峰面积 RSD% 值分别在 0.58~7.09 之间, ATLAS-USIS 精密度良好。该方法操作简捷、灵敏度高、分析速度快, 特别适合大批量样品检测, 可以为尿液中兴奋剂的检测提供很好的借鉴和参考。