

LC-MS/MS 法分析尿液中 20 种 β 受体阻断剂

LCMSMS-733

摘要: 采用岛津三重四极杆液质联用仪,建立了尿液中 20 种 β 受体阻断剂的定性定量方法。尿液经甲酸酸化, Styra MCX 固相萃取柱净化,反相色谱分离,三重四极杆质谱法测定。结果显示该方法在 0.1~5 ng/mL 范围内,普萘洛尔等 20 种 β 受体阻断剂,线性良好,相关系数 R 均 >0.997; 20 种 β 受体阻断剂的检出限 0.003-0.08 ng/mL,定量限为 0.01-0.24 ng/mL; 0.02、0.1 ng/mL 加标回收率在 53.9%-115.8% 之间,RSD 在 0.66%-15.75% 之间。该方法分析速度快,灵敏度高,适用于尿液中低浓度 β 受体阻断剂筛查定量。

关键词: 三重四极杆液质联用仪 β 受体阻断剂 尿液 兴奋剂

技术特点:

- ❖ 在 2022 北京冬奥会纯洁体育倡议下,开发 20 种 β 受体阻断剂分析方法,贡献岛津力量。
- ❖ 20 种兴奋剂在 Shim-pack GISS-HP 色谱柱上分离良好。

β 受体阻断剂是一类主要用于治疗各种心律失常,以应对心绞痛、高血压及甲状腺功能亢进的控制。常见的 β 受体阻断剂包括普萘洛尔、阿替洛尔、美托洛尔、卡替洛尔等,世界反兴奋剂中心(WADA)发布了《禁用清单》, β 受体阻断剂属于 P1 类兴奋剂,包括醋丁洛尔、阿普洛尔、阿替洛尔等 20 种。禁止运动员在赛车、射箭、滑雪等场合使用 β 受体阻断剂。除了使用药物导致的阳性,已有报道,肉类、化妆品中检测出 β 受体阻断剂,对食源性兴奋剂污染防控造成较大挑战。

因此,国家体育总局发布了《大型赛事食源性兴奋剂防控指南》,规定了动物源食品中普萘洛尔、阿替洛尔、美托洛尔、卡替洛尔 β 受体四种阻断剂检出限 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前, β 受体阻断剂的检测方法以液相色谱 - 串联质谱法为主,尚未见相关检测标准。

本文建立了 20 种 β 受体阻断剂的液相色谱 - 串联质谱测定方法。该方法快速、准确、灵敏度高,适合尿液中极低浓度的 β 受体阻断剂的筛查。

实验部分

1.1 仪器配置

岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8045。具体配置为

输 液 泵 :	LC-40D XR×2	系 统 控 制 器 :	CBM-40
自 动 进 样 器 :	SIL-40C XR	三 重 四 极 杆 质 谱 仪 :	LCMS-8045
柱 温 箱 :	CTO-40C	色 谱 工 作 站 :	LabSolutions Ver. 5.113

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack GISS-HP (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm), 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30084-02

流 动 相 : A 相 -0.1% 甲酸 5mM 乙酸铵水溶液;
B 相 - 甲醇

流 速 : 0.3 mL/min

柱 温 : 40°C

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 时间程序见表 1。

进 样 量 : 10 μL

洗 针 模 式 : 水: 甲醇 (1: 1)

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	20
5.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.20	Pumps	Pump B Conc.	20
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

质谱仪：	LCMS-8045	脱溶剂管温度：	150°C
离子源：	ESI+(1.0kV)	加热模块温度：	40°C
雾化气：	氮气 3 L/min	接口温度：	400°C
干燥气：	氮气 5 L/min	扫描模式：	MRM
加热气：	空气 20 L/min	MRM参数：	见表 2

表 2 MRM 参数

序号	中文名	英文名	前体离子 (m/z)	产物离子 1 (m/z)	CE1 (eV)	产物离子 2 (m/z)	CE2 (eV)
1	普萘洛尔	Propranolol	260.2	183.1*	-17	116.1	-18
2	阿替洛尔	Atenolol	266.9	145.0*	-26	225.1	-16
3	美托洛尔	Metoprolol	268.1	116.1	-18	191.1	-18
4	卡替洛尔	Carteolol	292.9	237.1*	-16	202.1	-21
5	阿普洛尔	Alprenolol	249.9	116.1*	-16	173.0	-18
6	倍他洛尔	Betaxolol	308.1	116.1*	-20	72.1	-24
7	卡维地洛	Carvedilol	406.9	224.0	-23	100.0*	-27
8	索他洛尔	Sotalol	273.2	133.1*	-27	213.0	-18
9	纳多洛尔	Nadolol	310.1	254.1*	-17	236.1	-21
10	噻吗洛尔	Timolol	317.2	261.0*	-17	244.0	-22
11	醋丁洛尔	Acebutolol	336.9	116.1*	-23	260.1	-21
12	布诺洛尔	Bunolol	291.9	236.1*	-16	201.0	-21
13	艾司洛尔	Esmolol	295.9	219.1*	-18	145.0	-26
14	塞利洛尔	Celiprolol	380.1	251.0*	-24	307.1	-18
15	比索洛尔	Bisoprolol	325.9	116.1*	-19	222.0	-13
16	氧烯洛尔	Oxprenolol	266.1	116.1*	-17	225.1	-13
17	奈必洛尔	Nebivolol	406.2	151.0*	-31	123.0	-44
18	吲哚洛尔	Pindolol	249.0	116.1*	-17	72.1	-23
19	喷布洛尔	Penbutolol	292.1	236.1*	-16	201.0	-21
20	卡拉洛尔	Carazolol	298.9	116.0	-21	222.0*	-19

* 定量离子对

1.3 样品前处理

取 5 mL 尿液加 0.1% 甲酸酸化, Styra MCX (60 mg/3 mL, P/N:380-00853-01) 固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化, 尿液全部上柱, 用 3 mL 水洗涤, 3 mL 甲醇清洗, 3 mL 10% 氨化甲醇洗脱, 氮吹至近干, 初始流动相定容至 0.5 mL, 待测。

1.4 基质标准溶液制备

标准系列工作液的配制: 取母液适量, 以不含待测药物的尿液基质为溶剂, 配制成浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、1、5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作曲线, 待上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 基质标准溶液色谱图

0.5 ng/mL 基质标准溶液上机测定, 20 种 β 受体阻断剂类的化合物 MRM 色谱图如下, 色谱峰形良好, 无干扰。此外, 由于纳多洛尔有手性异构体, 色谱峰有一定的分离趋势。

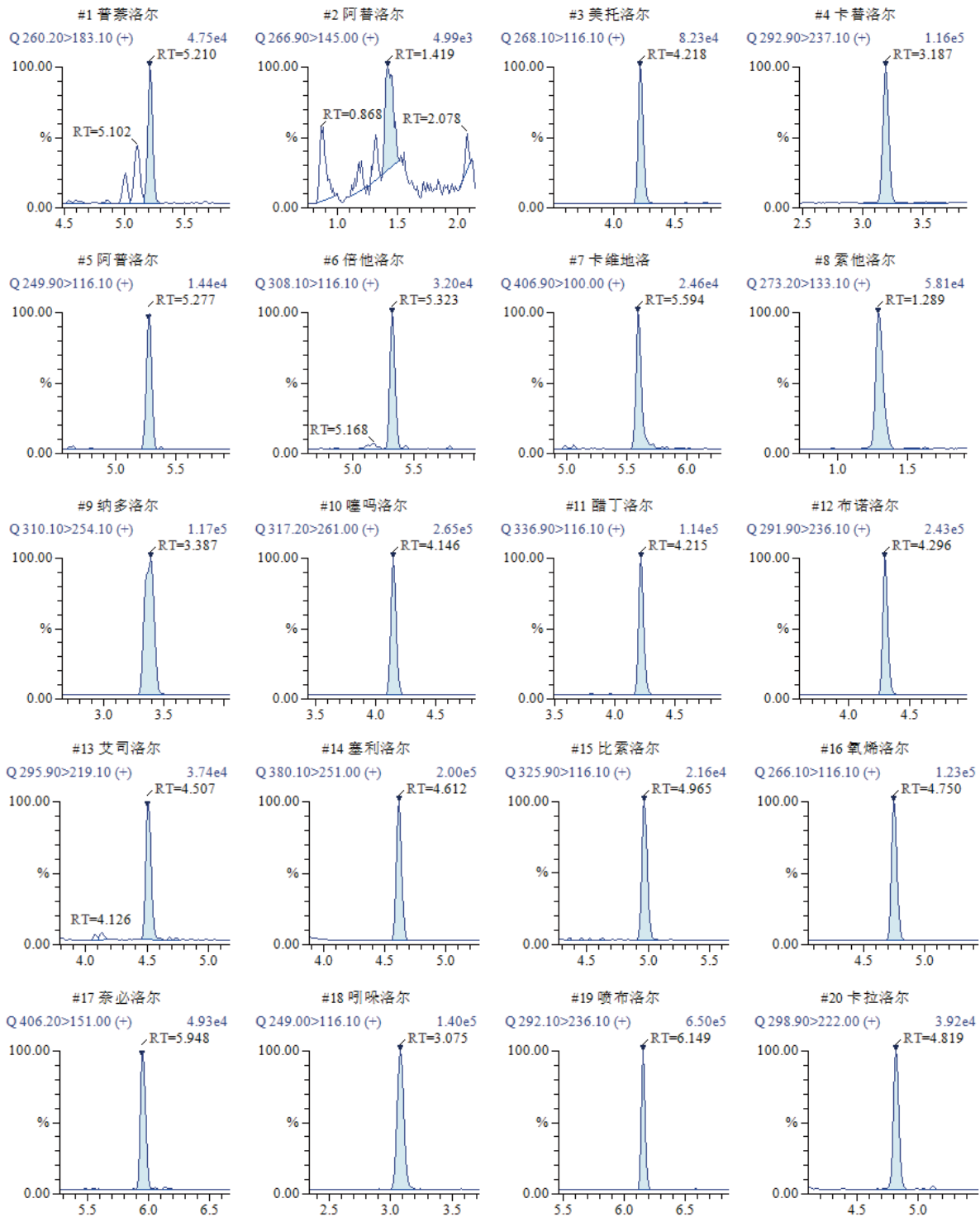


图 1 0.5 ng/mL 基质加标的 MRM 色谱图

2.2 前处理优化

本文对比了液液萃取 (LLE) 和混合型强阳离子交换固相萃取 (MCX)、强阳离子交换固相萃取 (SCX) 三种前处理方式。LLE 使用二氯甲烷对尿液进行萃取, 大部分化合物回收率 40%-70% 之间, 而阿替洛尔、索他洛尔、纳多洛尔等极性较强, 回收率低于 10%; SCX 对 20 种 β 受体阻断剂保留回收良好, 但是其上样、洗脱速度较慢, 需要负压装置辅助, 使用不方便; MCX 固相萃取采用聚合物基质, 无需负压装置, 常压下即可轻松过滤, 同时可以实现较大浓度的样品浓缩, 此外, β 受体阻断剂类的化合物具有一定碱性, pKa 一般在 >9.0 , 在 MCX 上容易实现较好的回收率, 1 ng/mL 20 种 β 受体阻断剂类化合物回收率均 $> 70\%$ 。因此, 本文最终采用 styra MCX(60 mg/3 mL, P/N:380-00853-01) 固相萃取柱。此外, 吲哚洛尔对 pH 敏感, 上样溶液的酸性不宜太强, pH > 2 为宜。

2.3 线性及灵敏度

除普萘洛尔、吲哚洛尔外, 其他 β 受体阻断剂均存在一定程度的基质抑制效应 (29%-87%), 因此, 采用基质匹配标准曲线进行定量。本文按照 1.4 方法配制标准系列溶液, 以峰面积对浓度作图, 进行线性拟合, 得标准曲线。结果表明, 20 种 β 受体阻断剂线性良好, 相关系数 R 均 >0.997 , 准确度 89.3%~117.6% 之间。 β 受体阻断剂标准曲线见图 2。根据信噪比, 计算其检出限 (S/N=3) 和定量限 (S/N=10)。检出限 0.003 -0.08 ng/mL, 定量限 0.01-0.24 ng/mL。

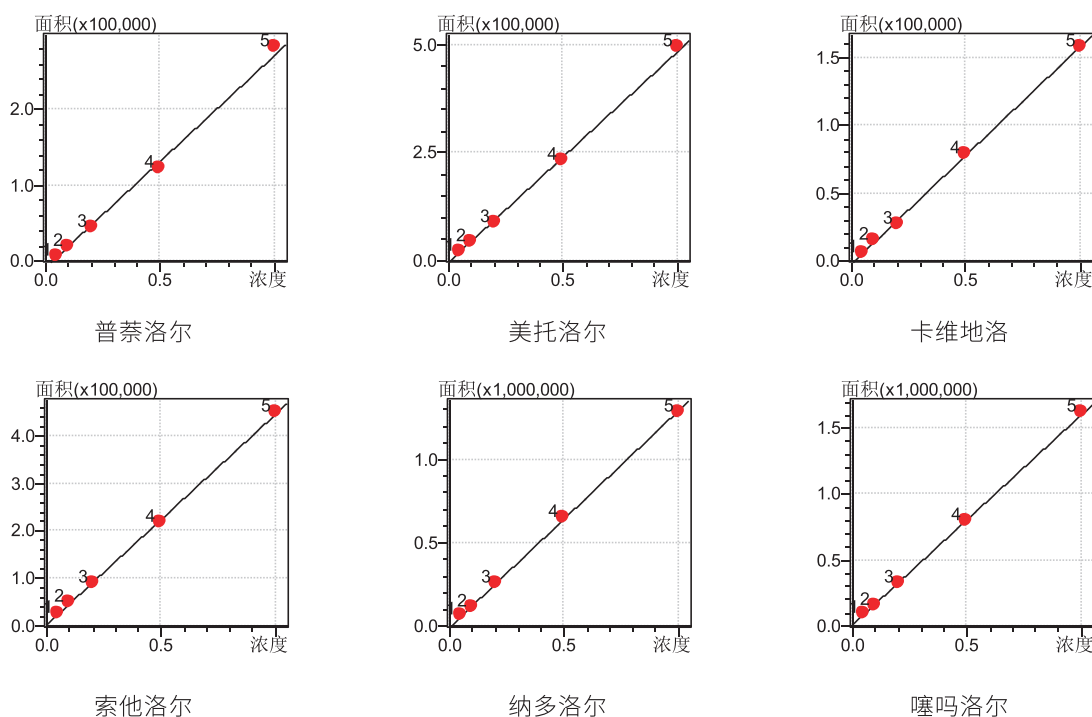


图 2 部分化合物标准曲线

表 3 β 受体阻断剂标准曲线的线性关系

编号	化合物	线性范围 / (ng/mL)	线性方程	相关系数 R	准确度 (%)	检出限 ng/mL	定量限 ng/mL
1	普萘洛尔	0.05-5	$Y = (278847)X + (-8047.59)$	0.9979	89.4-106.1	0.03	0.09
2	阿替洛尔	0.2-5	$Y = (83451.5)X + (-26791.3)$	0.9988	91.8-109.0	0.02	0.06
3	美托洛尔	0.05-5	$Y = (486526)X + (-2348.48)$	0.9992	89.3-113.9	0.01	0.02
4	卡替洛尔	0.05-5	$Y = (830723)X + (2807.08)$	0.9997	89.9-109.2	0.01	0.02

5	阿普洛尔	0.05-5	$Y = (87193.1)X + (-1742.09)$	0.9995	86.9-110.4	0.01	0.04
6	倍他洛尔	0.05-5	$Y = (207191)X + (-4383.99)$	0.9993	86.5-113.2	0.02	0.07
7	卡维地洛	0.05-5	$Y = (160529)X + (-2196.85)$	0.9993	91.2-117.6	0.02	0.07
8	索他洛尔	0.05-5	$Y = (441384)X + (3690.47)$	0.9998	96.7-103.1	0.01	0.03
9	纳多洛尔	0.05-5	$Y = (1.29517e+006)X + (-4615.29)$	0.9998	91.0-105.1	0.003	0.01
10	噻吗洛尔	0.05-5	$Y = (1.58637e+006)X + (13331.9)$	0.9995	92.2-115.4	0.003	0.01
11	醋丁洛尔	0.05-5	$Y = (676039)X + (-5382.42)$	0.9997	89.8-113.3	0.01	0.04
12	布诺洛尔	0.05-5	$Y = (1.45484e+006)X + (-4526.34)$	0.9994	93.7-109.0	0.003	0.01
13	艾司洛尔	0.05-5	$Y = (239428)X + (-2634.99)$	0.9990	91.3-116.5	0.08	0.24
14	塞利洛尔	0.05-5	$Y = (1.25011e+006)X + (-6394.04)$	0.9989	92.4-115.2	0.01	0.04
15	比索洛尔	0.05-5	$Y = (133698)X + (-2213.21)$	0.9995	83.0-111.0	0.05	0.15
16	氧烯洛尔	0.05-5	$Y = (777888)X + (-4196.29)$	0.9997	92.2-111.3	0.003	0.01
17	奈必洛尔	0.05-5	$Y = (304988)X + (-1907.56)$	0.9991	91.6-110.5	0.02	0.06
18	呋洛洛尔	0.05-5	$Y = (1.09070e+006)X + (-328.447)$	0.9998	93.9-109.0	0.01	0.02
19	喷布洛尔	0.05-5	$Y = (2.93109e+006)X + (-14210.8)$	0.9996	96.6-107.1	0.01	0.02
20	卡拉洛尔	0.05-5	$Y = (253009)X + (-2664.48)$	0.9994	90.6-109.3	0.03	0.08

2.4 回收率

取不含待测成分的空白尿液，加入混标工作液，使得加标浓度分别为 0.02、0.1 ng/mL，样品平行 3 次。样品制备后，按照前述条件测定，以标准曲线定量。结果显示，加标回收率在 53.9%-115.8% 之间，RSD 在 0.66%-15.75% 之间，适合于尿液中极低浓度 β 受体阻断剂定量分析。

表 4 回收率

序号	中文名	0.02 ng/mL		0.1 ng/mL	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	普萘洛尔	66.5	9.13	115.8	8.19
2	阿替洛尔	77.7	5.12	104.4	10.97
3	美托洛尔	99.9	6.54	108.1	0.42
4	卡替洛尔	101.3	2.83	93.2	4.29
5	阿普洛尔	57.4	15.75	113.4	2.68
6	倍他洛尔	70.8	5.50	109.8	0.77
7	卡维地洛	54.9	13.37	113.4	8.83
8	索他洛尔	98.0	2.50	105.2	2.14
9	纳多洛尔	80.3	1.08	95.3	1.11
10	噻吗洛尔	98.6	2.66	107.1	1.03
11	醋丁洛尔	91.8	1.96	111.5	2.08
12	布诺洛尔	89.3	3.19	107.5	2.67
13	艾司洛尔	73.2	12.57	99.5	2.38
14	塞利洛尔	91.0	3.30	106.5	0.66

15	比索洛尔	94.3	13.54	105.1	4.36
16	氧烯洛尔	88.2	4.24	113.9	2.18
17	奈必洛尔	53.9	15.07	108.9	2.30
18	吲哚洛尔	56.7	1.98	91.2	1.94
19	喷布洛尔	68.6	2.12	105.1	1.50
20	卡拉洛尔	76.7	5.21	96.9	4.07

2.5 样品测定

对比使用马来酸噻吗洛尔滴眼液前后的尿液，如下图 3，根据基质标曲计算，检出的噻吗洛尔浓度约为 0.03 ng/mL。



图 3 样品色谱图

■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8045 液质联用系统，开发了尿液中 20 种 β 受体阻断剂含量的检测方法。需要注意的是吲哚洛尔在强酸条件下不稳定，在前处理中应当注意溶液 pH 值不能太低；此外，大多数 β 受体阻断剂含有一个手性中心，例如纳多洛尔在反相色谱柱上呈双峰，有一定分离趋势，不影响定量计算。方法学试验结果表明，在 0.05~5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内，20 种 β 受体阻断剂线性良好，相关系数 R 均 >0.997 ； β 受体阻断剂的检出限为 0.003 -0.08 ng/mL，定量限 0.01-0.24 ng/mL；0.02、0.1 ng/mL 加标回收率在 53.9%-115.8% 之间，RSD 在 0.66%-15.75% 之间。

岛津应用云

