

## 应用通讯

## No.C142

## 液相色谱质谱法

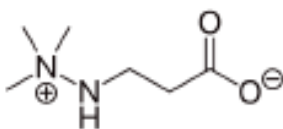
## 二维液相三重四极杆质谱联用法筛查分析尿液中高极性兴奋剂

运动员使用能提高成绩的药物或“服用兴奋剂”已有几十年历史。1999年，世界反兴奋剂机构（WADA）开始管理和协调全球体育运动中违禁药物的检测工作。如今，兴奋剂的检测需要适应新需求，天然物质类（如雄激素类固醇、激素原及相关代谢产物、肽类激素）兴奋剂不断被发现，人工合成类兴奋剂兴起，还出现调控血液和血液成分的手段，这些新型兴奋剂的使用促成一系列运动违禁药物检测方法。

在这篇应用通讯中，我们使用二维液相三重四极杆质谱联用法同时测定多种高极性兴奋剂，包括米屈胍和如辛弗林、去甲苯福林、依替福林、奥洛福林及奥克巴胺等肾上腺素能药物。

## [抗局部缺血药]

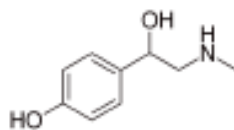
## 米屈胍



化学式:  $C_6H_{14}N_2O_2$   
精确质量: 146.1055

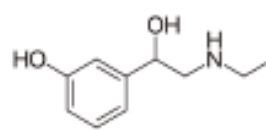
## [肾上腺素能药物]

## 辛弗林



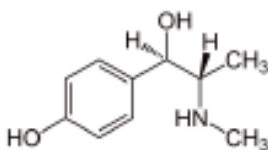
化学式:  $C_9H_{13}NO_2$   
精确质量: 167.0946

## 依替福林



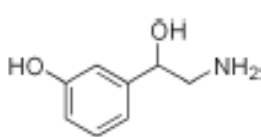
化学式:  $C_{10}H_{15}NO_2$   
精确质量: 181.1103

## 奥洛福林



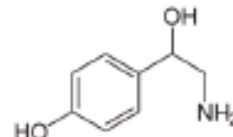
化学式:  $C_{10}H_{15}NO_2$   
精确质量: 181.1103

## 去甲苯福林



化学式:  $C_8H_{11}NO_2$   
精确质量: 153.079

## 奥克巴胺



化学式:  $C_8H_{11}NO_2$   
精确质量: 153.079

图 1 6 个化合物的结构

表 1 分析条件

[液相条件] NexeraX2 系统

分析柱:	Nucleodur HILIC (100 mm L. x 2 mm I.D., 1.8 $\mu$ m)
捕集柱:	Nucleodur HILIC (20 mm L. x 2 mm I.D., 3 $\mu$ m)
流动相:	A 相: 水+5% 缓冲液; B 相: 乙腈+5% 缓冲液; C 相: 乙腈+5% 缓冲液 (缓冲液: 200 mM 乙酸铵+0.15%冰醋酸)
柱温:	40 $^{\circ}$ C
进样体积:	30 $\mu$ L

[质谱条件] LCMS-8060

离子化模式:	ESI (+/-)
雾化气流速:	3.0 L/min.
干燥气流速:	15.0 L/min.
加热气流速:	15.0 L/min.
HB 温度:	500 $^{\circ}$ C
DL 温度:	300 $^{\circ}$ C
加热模块温度:	400 $^{\circ}$ C

MRM 参数:

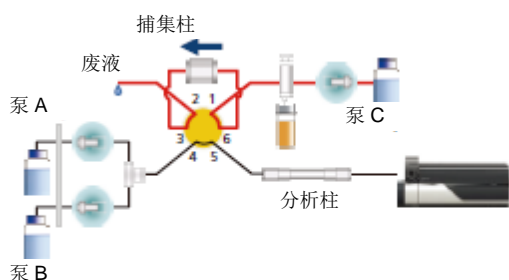
#	名称	+/-离子模式	Q1 前体离子	Q3 产物离子 1	Q3 产物离子 2	保留时间 (min)	碰撞能量 产物离子 1	碰撞能量 产物离子 2
1	米屈胍 Meldonium	+	147.20	58.25	59.25	8.18	-27	-18
2	依替福林 Etilofrine	+	182.30	135.25	91.25	5.34	-20	-27
3	去甲苯福林 Norfenefrine	+	154.20	91.25	65.25	6.01	-21	-35
4	奥克巴胺 Octopamine	+	154.20	91.25	119.20	6.00	-21	-15
5	奥洛福林 Oxilofrine	+	182.30	149.25	105.25	5.69	-20	-22
6	辛弗林 Synefrine	+	168.20	135.20	107.25	5.87	-20	-31
7	米屈胍-d3 Meldonium-d3	+	150.20	62.25	60.25	8.18	-18	-30
8	依替福林硫酸盐 Etilofrine sulphate	+	262.20	164.15		5.19	-19	
9	辛弗林硫酸盐 Synefrine sulphate	+	248.20	150.25	135.20	5.68	-15	-30
10	去甲苯福林硫酸盐 Norfenefrine sulphate	+	234.20	136.20	91.20	5.62	-18	-35
11	依替福林硫酸盐 Etilofrine sulphate	-	260.20	180.20	121.10	5.19	18	39
12	奥洛福林硫酸盐 Oxilofrine sulphate	-	260.20	77.10	178.20	5.49	26	12
13	辛弗林硫酸盐 Synefrine sulphate	-	246.20	148.20	106.10	5.70	20	30
14	去甲苯福林硫酸盐 Norfenefrine sulphate	-	232.20	152.20	121.15	5.69	17	36
15	奥克巴胺硫酸盐 Octopamine sulphate	-	232.20	134.15	107.10	5.81	22	30

#7: 内标物

#8 ~ 15: 含硫结合物

化合物列表包含未转化的原型药物分子及其相应的磺化代谢产物 MRM 转化参数。分析过程中使用了正负极性快速切换模式，便于所有化合物同时进行数据分析。

捕集



分析

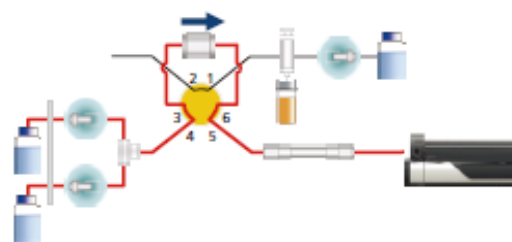


图 2 二维-HILIC 系统流路示意图

将稀释的尿液样品直接注入二维 HILIC 系统。样品先通过 HILIC 捕集柱进行除杂和预富集，然后通过 HILIC 分析柱进行有效分离。

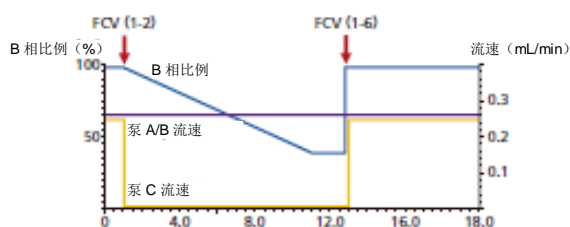


图 3 流速及梯度洗脱程序

■ 尿液样品的样品制备

1. 尿液样本室温离心 10 分钟，转速 3000 rpm;
2. 取上层清液 60  $\mu$ L 至另一新离心管中，加入内标溶液(\*)10  $\mu$ L 及乙腈 140  $\mu$ L，涡旋混匀;
3. 继续离心 5 分钟，转速 13000 rpm;
4. 取上层清液 180  $\mu$ L 至样品瓶中。

(\*)米屈胍-d3 溶液，溶剂为 200 mM 的醋酸铵溶液

■ 校准曲线

图 4 显示加标至尿液中 6 个化合物的校准曲线。2016 年 1 月 1 日，米屈肼被世界反兴奋剂机构（WADA）列入禁用清单，相关指导原则规定对于 2016 年 9 月 30 日之后收集的尿液样本，样品中米屈肼浓度大于 100 ng/mL 的视为正常阳性结果进行管理。本方法中，尿液中各化合物校准曲线的线性范围为 1~200 ng/mL，回归系数  $r^2 > 0.997$ 。

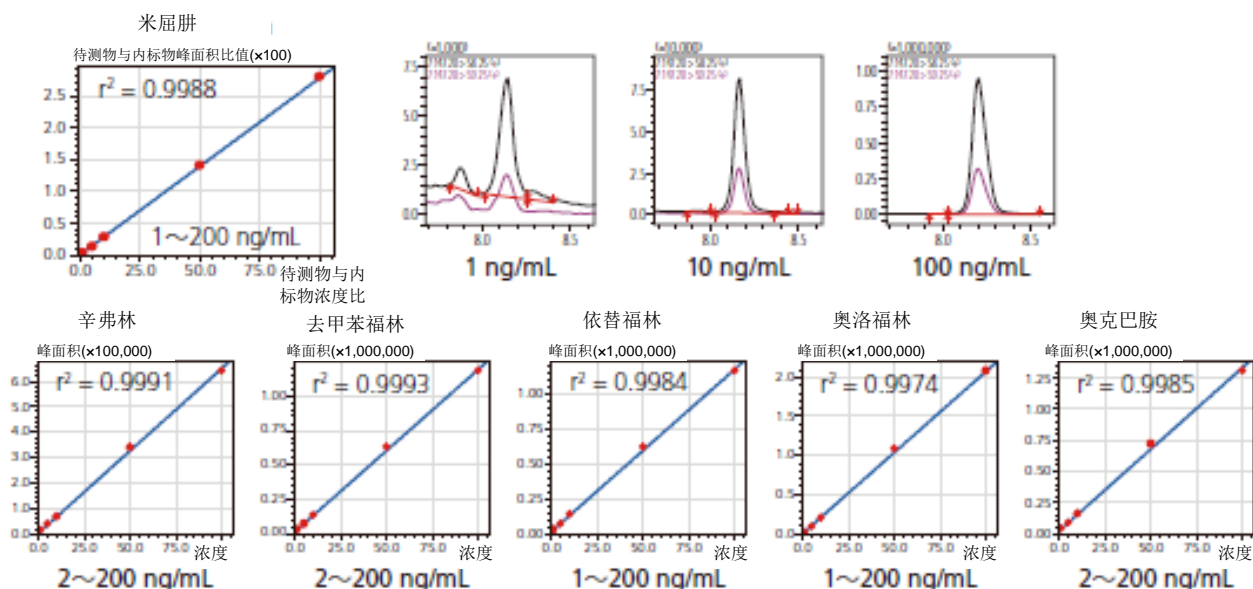


图 4 6 个化合物的校准曲线及米屈肼的 MRM 色谱图

■ 尿液中辛弗林、依替福林和奥洛福林的分析测定

使用二维 HILIC 系统分析加标辛弗林、依替福林和奥洛福林的尿液样品。在所有样品中均检测到各化合物未转化的原型及其相应的硫酸盐代谢产物。

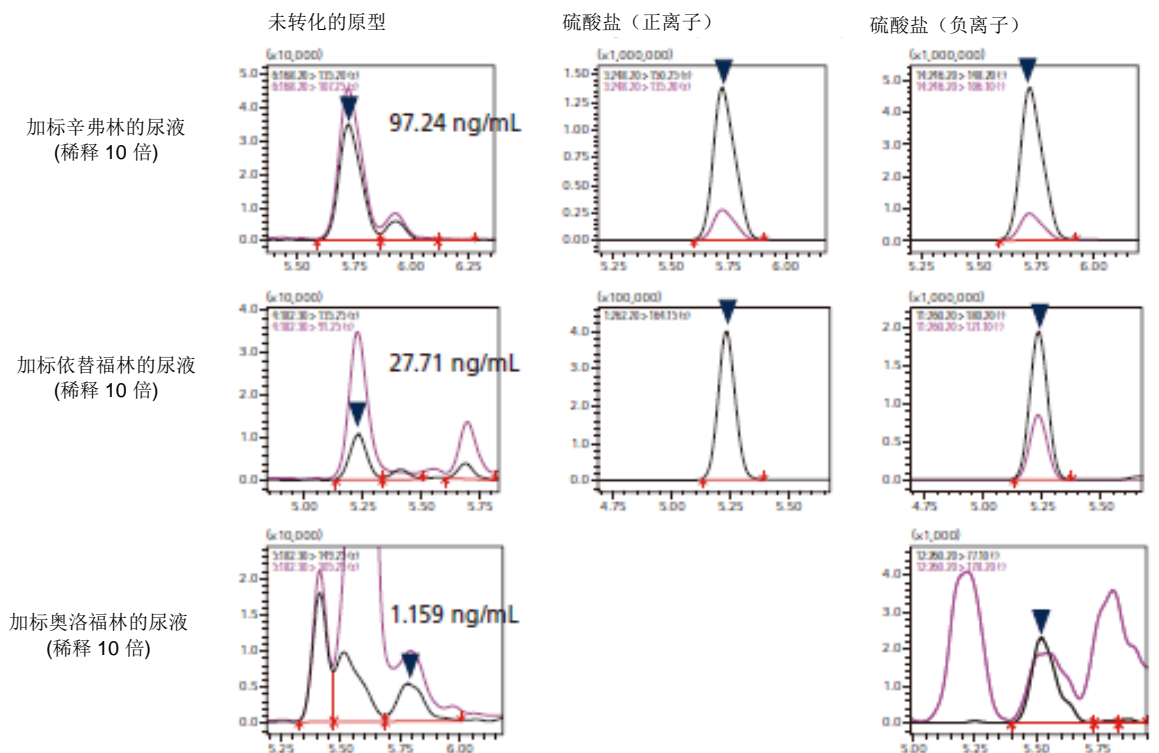
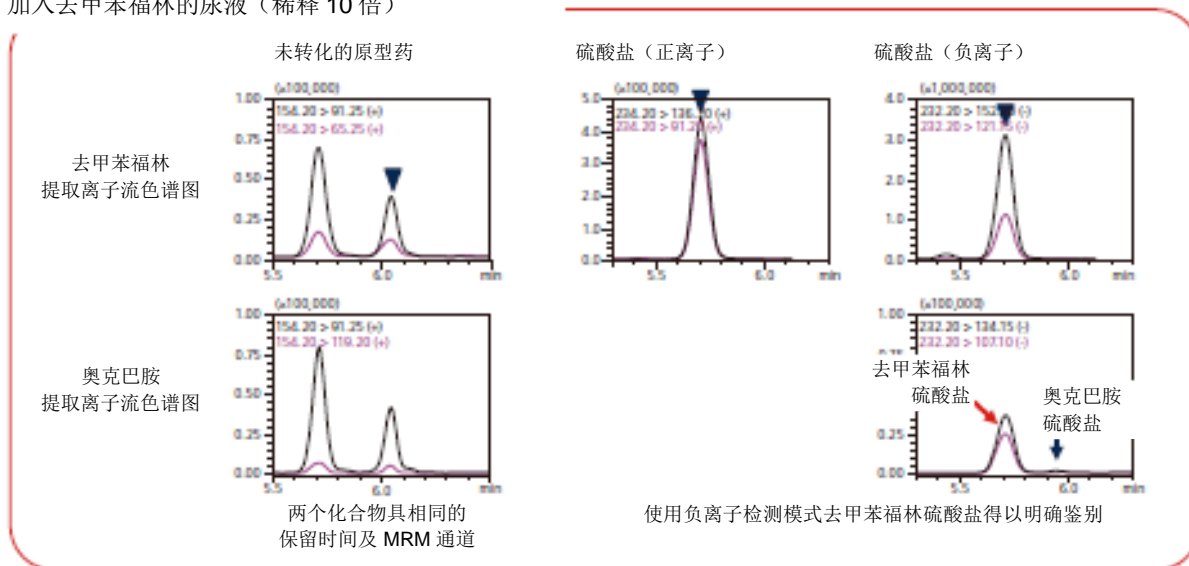


图 5 加入辛弗林、依替福林和奥洛福林的尿液测定结果

■ 尿液中去甲苯福林和奥克巴胺的区分

去甲苯福林是奥克巴胺的位置异构体，因此两者未转化的原型药物分子具有相同的保留时间和 MRM 通道。但是，通过正负极性快速切换模式检测其相应的硫酸盐代谢产物可对其明确区分鉴定。

加入去甲苯福林的尿液（稀释 10 倍）



加入奥克巴胺的尿液（稀释 10 倍）

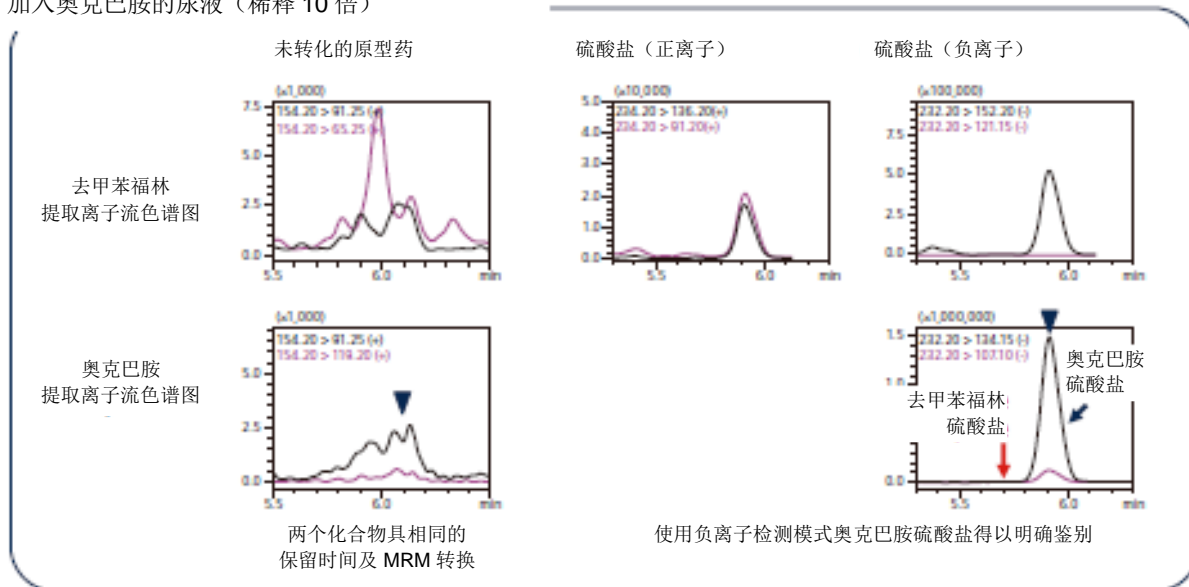


图 6 加入去甲苯福林和奥克巴胺的尿液测定结果

本实验所用样本由日本东京 LSI Medience 公司反兴奋剂实验室提供。

参考文献: Anal Bioanal. Chem. (2015), 407, 5354-5379

Drug Test. Analysis (2015), 7, 973-979

说明: 根据《药品及医疗器械法》，本文中的产品还未获批准作为医疗器械使用。

· 本文中的分析方法仅供研究使用 (RUO)，不可用于诊断。



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439

400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2016 年 9 月