

应用纪要

在反兴奋剂分析中使用混合模式SPE和UPLC-MS/MS同时分析利尿剂和 β -受体阻滞剂

Jonathan P. Danaceau, Michelle Wood, Lisa J. Calton

Waters Corporation



仅适用于法医毒理学应用。

摘要

本研究旨在同时鉴定尿液样品中的禁用利尿剂和 β -受体阻滞剂，为反兴奋剂实验室提供支持。

使用混合模式SPE和ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro系统，可清洁、快速、高效地萃取并分析尿液利尿剂和 β -受体阻滞剂，用于反兴奋剂研究。Oasis MAX μ Elution板能够高效且可重现地萃取20种 β -受体阻滞剂和20种利尿剂化合物。与稀释样品相比，基质效应显著降低。Xevo TQ-S micro拥有极快的速度和极高的灵敏度，可在4分钟内准确鉴定所有分析物，即使在MRPL的20%水平，也能满足WADA严格的离子丰度比标准。该系统能够在扫描间进行快速的极性切换，只需一次进样即可完成分析，与正负离子化合物的连续进样相比，可节省时间并减少仪器损耗。这种方法能够快速、准确地分析这些化合物，同时保持UPLC-MS/MS系统的洁净度。

优势

固相萃取联合快速极性切换功能可以清洁、快速、高效地分析禁用利尿剂和 β -受体阻滞剂。

简介

世界反兴奋剂机构(WADA)禁止使用利尿剂和 β -受体阻滞剂¹。尽管它们的化学性质不同，但许多反兴奋剂实验室出于工作流程考虑，会更倾向于将这两类分子一起分析²⁻⁴。 β -受体阻滞剂是碱性物质，在电喷雾电离(ESI)正离子模式下电离，而利尿剂主要是酸性物质，在ESI负离子模式下电离。因此，通常需要使用LC-MS进行连续分析；一个在正离子模式下，另一个在负离子模式下。此外，这些化学差异使同时萃取颇具挑战，因为任何SPE吸附剂都必须能够适应各种极性和化学类型。

结果与讨论

使用Oasis MAX μ Elution板从尿样中清洁、高效地萃取利尿剂和 β -受体阻滞剂，可解决上述挑战。然后分别通过Waters ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQ-S micro质谱仪进行UPLC-MS/MS分析。采用Waters ACQUITY UPLC CSH C₁₈色谱柱(1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm)进行分离。流动相由0.01%甲酸(MPA)和乙腈(MPB)组成。

本研究中使用的化合物及其保留时间如表1所示。所有化合物在四分钟内洗脱，整个UPLC循环周期为五分钟(图1)。所有化合物均采集2~3个MRM通道。即使同时分析24种正离子化合物和18种负离子化合物，Xevo TQ-S

micro的快速极性切换功能也能够实现快速、高效的色谱分析。

	ESI正离子			ESI负离子	
	名称	保留时间		名称	保留时间
1	索他洛尔	0.56	24	乙酰唑胺	1.13
2	阿替洛尔	0.58	25	氯噻嗪	1.22
3	阿米洛利	0.57	26	氢氯噻嗪	1.31
4	卡替洛尔	0.93	27	氢氟噻嗪	1.66
5	吲哚洛尔	0.94	28	双氯非那胺	1.90
6	纳多洛尔	0.97	29	氯噻酮	1.94
7	氨苯蝶啶	1.01	30	三氯噻嗪	2.22
8	噻吗洛尔	1.20	31	甲氯噻嗪	2.33
9	醋丁洛尔	1.23	32	美托拉宗	2.53
10	美托洛尔	1.24	33	呋塞米	2.67
	美托洛尔-d7 (IS)	1.24		呋塞米-d5 (IS)	2.66
11	左布诺洛尔	1.30	34	吲达帕胺	2.73
12	艾司洛尔	1.37	35	苄噻嗪	2.77
13	塞利洛尔	1.47	36	环噻嗪	2.84
14	氧烯洛尔	1.48	37	苄氟噻嗪	2.94
15	拉贝洛尔	1.57	38	布美他尼	3.33
16	比索洛尔	1.58	39	丙磺舒	3.52
17	美替洛尔	1.68	40	依他尼酸	3.64
18	普萘洛尔	1.69			
19	阿普洛尔	1.73			
20	倍他洛尔	1.79			
21	氯帕胺	2.21			
22	卡维地洛	2.08			
23	坎利酮	3.50			

表1.β-受体阻滞剂和利尿剂的名称及保留时间（按电离模式排序）。

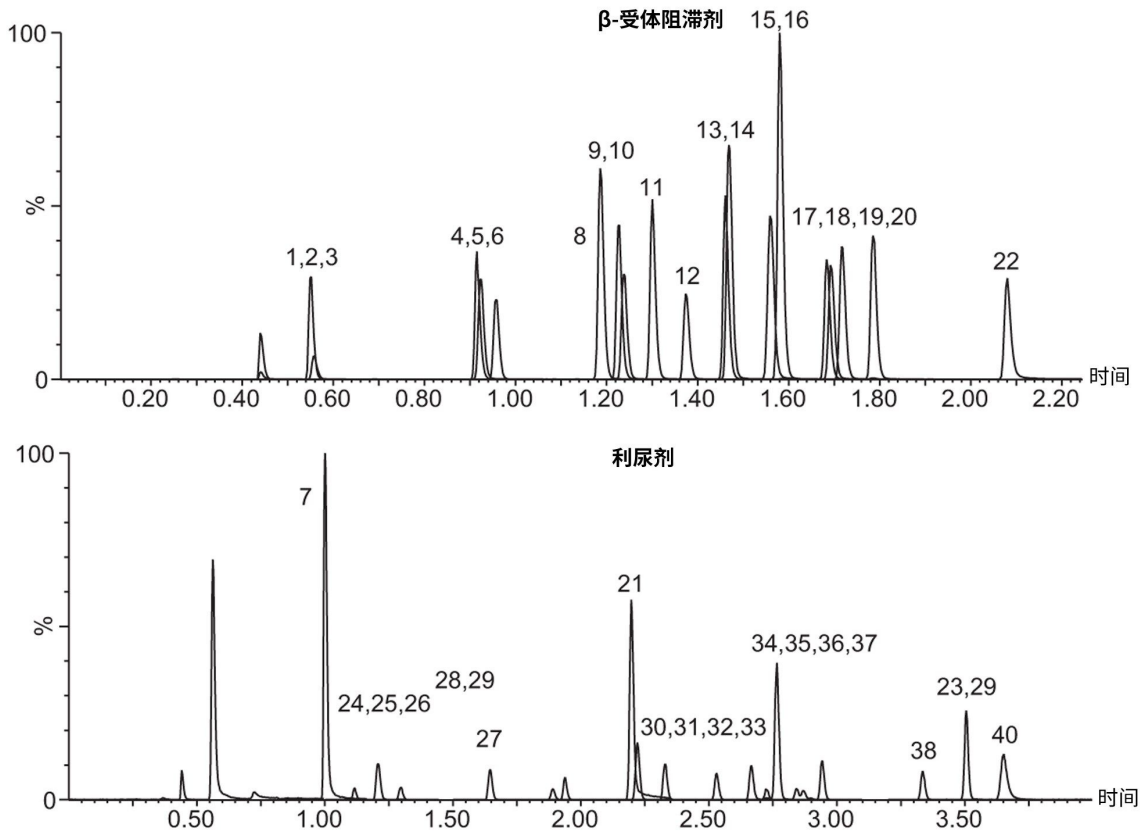


图1.β-受体阻滞剂和利尿剂的色谱图。所有化合物在四分钟内完成洗脱。分析物标签见表1。

使用Oasis MAX μ Elution板进行的固相萃取步骤如下：取50 μ L尿样，使用5%的浓氨水按1:1的比例对样品进行预处理，然后上样至SPE板，用5:95甲醇:水溶液清洗，然后用50 μ L 75:25 甲醇:乙腈溶液（含2%甲酸）洗脱，然后用200 μ L水进行稀释。所有化合物均实现了高效回收。图2展示了12个不同批次尿液的平均回收率。阿米洛利、氯帕胺和坎利酮与β-受体阻滞剂归为一组，因为它们是通过ESI正离子电离的碱性化合物。β-受体阻滞剂（和碱性利尿剂）的平均回收率为85%，除一种药物外，其余药物的回收率均达到80%或更高；%RSD均<20%。利尿剂的回收率范围为65%~94%；除乙酰唑胺外，所有%RSD均小于20%。使用Oasis MAX μ Elution板显著降低了简单样品稀释相关的基质效应。如图3所示，许多β-受体阻滞剂的基质效应（尤其是离子抑制效应）从可忽略的水平增加到高达60%以上，对于许多利尿剂而言，基质效应则从20%~40%增加到了60%~90%，即使在1:10的稀释比例下也是如此。单因素方差分析显示，除醋丁洛尔、美托拉宗、布美他尼、丙磺舒和依他尼酸外，所有化合物的基质效应均显著增加。

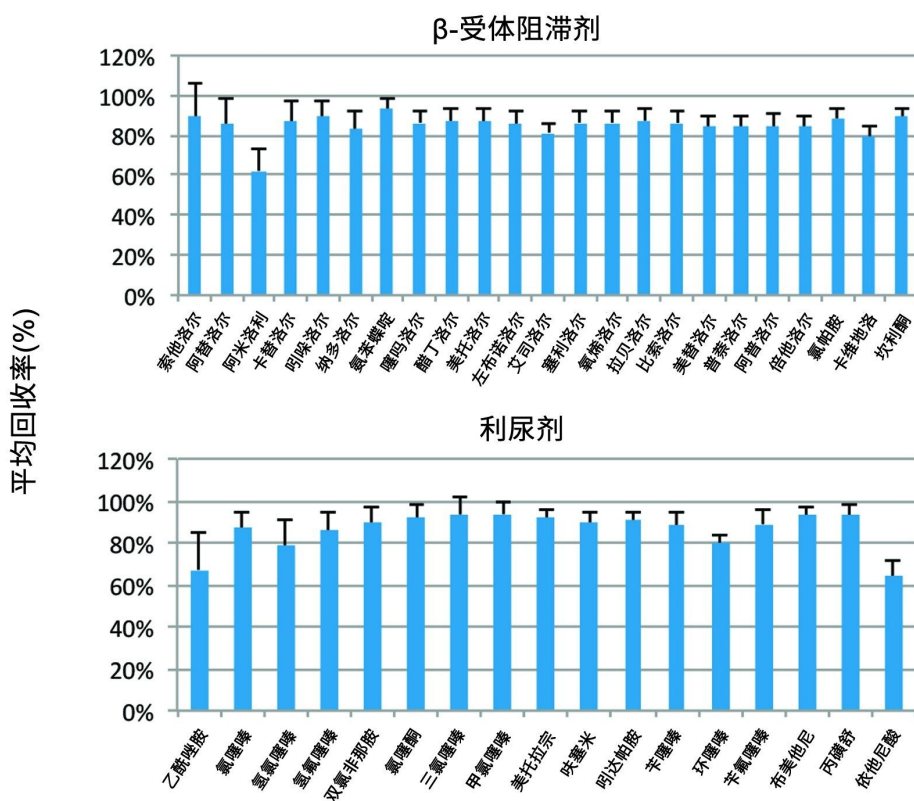


图2.12个不同批次的尿液基质中β-受体阻滞剂和利尿剂的平均回收率。β-受体阻滞剂的平均回收率为85%，所有%RSD均<20%。利尿剂（负离子ESI）的回收率范围为64%~94%。除乙酰唑胺(26%)外，其他样品的%RSD均小于20%。数据条和误差棒表示平均值±S.D.(N=12)。

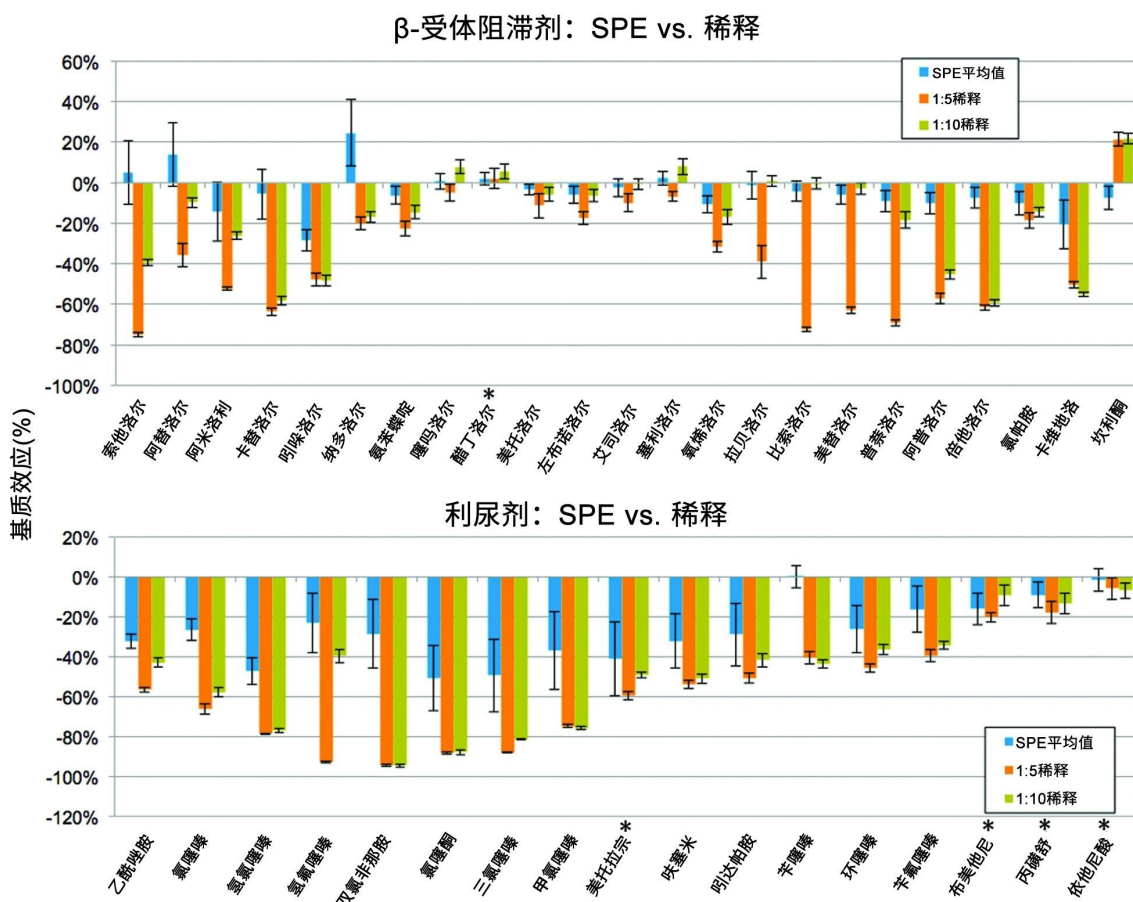


图3.β-受体阻滞剂和利尿剂的基质效应。将12个尿液批次的平均基质效应与混合空白尿液（与97:2:1水:乙腈:甲酸1:5和1:10稀释）的基质效应进行比较。与使用MAX μ Elution板进行SPE前处理的样品相比，即使在1:10的稀释倍数下，稀释样品中的离子抑制效应也显著增强（SPE平均基质效应 $N=12$ ，稀释样品 $N=4$ ）。星号表示在SPE制备样品和稀释样品之间基质效应无差异的化合物。

所有化合物，即使在WADA最低要求执行限量(MRPL)（β-受体阻滞剂为100 ng/mL和利尿剂化合物为200 ng/mL）的20%时，都能够轻松检出⁵。保留时间容差也完全符合WADA的要求⁵。尽管分析速度很快且需要进行极性切换，但所有化合物的离子丰度比，即使在MRPL的20%时，也均满足WADA的确认标准⁶。

结论

使用混合模式SPE和ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro系统，可清洁、快速、高效地萃取并分析尿液利尿剂和 β -受体阻滞剂，用于反兴奋剂研究。Oasis MAX μ Elution板能够高效且可重现地萃取20种 β -受体阻滞剂和20种利尿剂化合物。与稀释样品相比，基质效应显著降低。Xevo TQ-S micro拥有极快的速度和极高的灵敏度，可在4分钟内准确鉴定所有分析物，即使在MRPL的20%水平，也能满足WADA严格的离子丰度比标准。该系统能够在扫描间进行快速的极性切换，只需一次进样即可完成分析，与正负离子化合物的连续进样相比，可节省时间并减少仪器损耗。这种方法能够快速、准确地分析这些化合物，同时保持UPLC-MS/MS系统的洁净度。

参考资料

1. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code: WADA Prohibited List 2019, 2019, WADA: Montreal, Canada.请访问：<http://www.wada-ama.org>
2. Musenga, A and Cowan, D. Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control.*Journal of Chromatography A*.1288: p. 82-95.2013.
3. Murray, G and Danaceau, J. Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS.*Journal of Chromatography B*.877(30): p. 3857-3864.2009.
4. Deventer, K, Van Eenoo, P and Delbeke, F. Simultaneous determination of beta-blocking agents and diuretics in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry with scan-to-scan polarity switching.*Rapid Communications in Mass Spectrometry*.19(2): p. 90-98.2005.
5. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code: *WADA Technical Document TD2018MRPL*, World Anti-Doping Agency, Montreal, Canada, 2018, 请访问：<http://www.wada-ama.org>.
6. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code: *WADA Technical Document TD2015ICR*, World Anti-Doping Agency, Montreal, Canada, 2015, 请访问：<http://www.wada-ama.org>.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

可在线购买

ACQUITY UPLC CSH C18色谱柱, 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005297>>

Oasis HLB 96孔μElution板, 每孔装填2 mg吸附剂, 粒径30 μm <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186001828BA>>

720006516ZH, 2019年3月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie](#)
[设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号