

液相色谱-质谱法快速筛选人尿中 26 种利尿剂

秦 旻, 徐友宣, 吴侔天

(国家体育总局运动医学研究所兴奋剂检测中心, 北京 100029)

摘要:采用 Zorbax 30×2.1 mm, 1.8 μm 短柱, 对 26 种利尿剂的液相色谱-质谱的测定方法进行了研究。建立了 6 min 快速分离检测人尿中 26 种利尿剂的测定方法, 检测限低于 5 ng。该方法适用于兴奋剂的筛选及确证工作。

关键词:高效液相色谱-质谱; 利尿剂; 快速

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2007)04-229-04

Screening for 26 Diuretics in Human Urine by Rapid HPLC-MS

QIN Yang, XU You-xuan, WU Mou-tian

(China Doping Control Center, National Research Institute of Sports Medicine,
General Administration of Sport of China, Beijing 100029, China)

Abstract: Diuretics are banned by International Olympic Committee and World Anti-Doping Agency due to their capacity of masking doping agents in urine, diuretics are also prone to be misused regarding weight categories, screening procedures to check their presence in urine in doping control are mandatory. A fast and sensitive liquid chromatography mass spectrometric (LC-MS) method for the screening of 26 diuretics in human urine was described. Analyses were performed on Agilent 1100 quadrupolar instrument equipped with ESI-interface. 26 diuretics were analyzed in 6 min after liquid-liquid extraction with ethyl acetate in human urine by rapid resolution HPLC-MS with Zorbax 30×2.1 mm, 1.8 μm column. The mobile phase consisted of formic ammonium-formic acid buffer (pH 3.5) and acetonitrile. In the full scan mode, the LOD of these substances were below 5 ng. The method was applied to detect diuretics after the oral administration of several drugs and also detect routine samples. It is suitable for doping screening and confirmation in doping control.

Key words: HPLC-MS; diuretics; rapid

利尿剂属于兴奋剂中的一大类^[1],除了用于涉及重量的比赛项目中,也可作为稀释手段掩盖其他的禁用药物,因此在比赛及赛外抽查中均必须检查。2008 年奥运会计划样品量将超过历史

水平(约 4 500 个),因此如何保证在大约半个月的时间内快速有效地完成检测,已成为迫在眉睫的问题。采用高通量快速分析柱的液相色谱-质谱测定方法对兴奋剂进行筛查,可以大大提高

工作效率,降低运营成本。常规利尿剂大多采用高效液相色谱(HPLC)法及气相色谱-质谱联用(GC/MS)的检测方法^[2-3],但由于这些方法灵敏度较差、需要生化等缺点,近年来,越来越多的实验室已开始采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)的方法进行检测^[4-5]。本工作采用高通量快速柱对人尿中的 26 种利尿剂进行检测,建立快速高效的 RP-HPLC-MS 检测方法,以便成功应用于常规兴奋剂的检测中。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

HP1100 高效液相色谱-质谱仪;美国 Agilent 公司产品,配有自动进样器,二极管阵列检测器(DAD),电喷雾接口(ESI)及 Rev. A09.03 化学工作站。

1.2 主要材料与试剂

克罗帕米(Cloпамide),利多速尿(Xipamide),托拉沙米(Toraseмide),吡咯它尼(Piretanide),聚噻嗪(Polythiazide),氟甲噻嗪(Flumethiazide),三氯噻嗪(Trichloromethiazide),氯噻嗪(Chloromethiazide),甲氯噻嗪(Methylchlorothiazide),氢氟噻嗪(Hydroflumethiazide),环噻嗪(Cyclothiazide),喹噻酮(Quethazone),氨氯吡咪(Amiloride),倍可降(Mefruside),美托拉宗(Metolazone);均由韩国兴奋剂实验室,加拿大 INRS-Sante 实验室及德国科隆实验室等友情提供;乙酰唑胺(Acetazolamide),双氢克尿塞(Hydrochlorothiazide),氨苯喋啶(Triamterene),氯噻酮(Chlorothalidone),速尿(Furosemide),苄氟噻嗪(Bendroflumethiazide),利尿酸(Ethacrynic acid),丁苯氧酸(Bumetanide),安体舒通(Spironolactone),烯萆丙内酯(Canrenone),苄噻嗪(Benthiазide),吲满速尿(Indapamide)的标准品:Sigma 公司产品;乙腈:色谱纯,Fisher 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 分析柱为 RP-HT-ZorbaxSB-C₁₈(30 mm×2.1 mm,1.8 μm)。流动相采用 pH 3.5 甲酸胺缓冲液(A)和乙腈(B)进行梯度洗脱;淋洗梯度:0 min,90%A:10%B,5 min 10%A:90%B;流速:0.5 mL·min⁻¹。

1.3.2 质谱条件 干燥气温度:300 ℃;干燥气流速:7.0 L·min⁻¹;雾化气压力:241.15 kPa;毛细管电压:3 000 V;正负离子模式;运

行时间:6 min。

1.4 样品处理

取两份 3 mL 尿样,分别加入 0.5 g 酸性固体缓冲剂(磷酸二氢钠:磷酸氢二钠=99:1,pH 5.0)和 0.5 g 碱性固体缓冲剂(碳酸氢钠:碳酸钾=3:2,pH 9.0),然后各加入 4 mL 乙酸乙酯,振荡提取 15 min,离心分离出有机相。酸性部分加入 2 mL 5%醋酸铅溶液,振荡离心,取有机相。酸碱有机相合并吹干,溶解残渣于初始流动相中,进样 20 μL。

2 结果与讨论

按上述 HPLC 条件,用快速分析柱分析,26 种利尿剂在 6 min 内便得到很好的检测。根据色谱中的保留时间及其特征质谱,可初步筛选并确认尿中可疑化合物的存在,其液相色谱图示于图 1。26 种化合物的保留时间,相对保留时间及其特征离子列于表 1,大多数化合物是以负离子模式检测较佳。

分别取不同量的 26 种标准品溶液加入空白尿中,按上述方法提取后进样分析,观察各进样量获得的色谱图,找出其最小进样量,以 3 倍信噪比测定检测限。利尿剂的检测限列于表 1,基本小于 5 ng,完全可以满足国际奥委会的最低检测限要求(MRPL)。

阳性尿由健康志愿者服药后提供,分别对多种药物的阳性尿进行检测。除安体舒通(Spironolactone)外,大多数利尿剂在服药后主要以原型的形式从尿样中排出;安体舒通在尿中主要以代谢物烯萆丙内酯(Canrenone)形式存在,故实际检测以检测烯萆丙内酯为主,其他利尿剂则主要检测其原型药物。对于一些无法获得阳性尿的药物,将一定量标准品加入尿中进行检测,结果同样令人满意。在常规检测中,如发现可疑样品,可以通过与阳性尿图谱的保留时间及其特征质谱的对照,加大碎裂电压,获得全谱进行定性。双氢克尿塞阳性尿的液相色谱及质谱图示于图 2,当碎裂电压为 200 V,可获得令人满意的质谱图,符合世界反兴奋剂委员会(WADA)对实验室确证结果的要求。

在实际尿样的检测中发现有些尿样会遇到一些干扰,可采用增加多个离子进行筛选,或加大电压等方式提高筛选效率。确证时也可适当的改变梯度进行分离,以解决实际工作中遇到的问题。

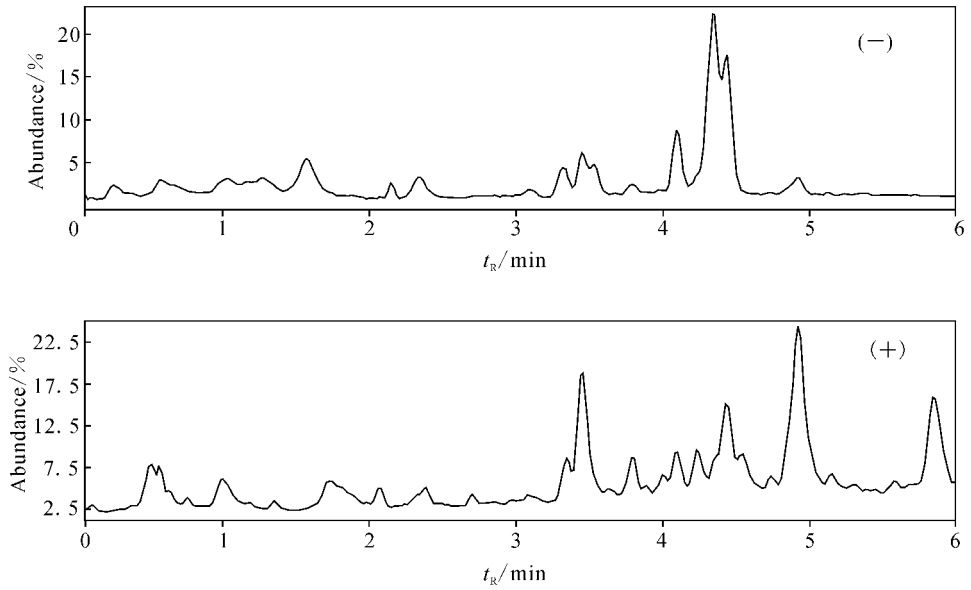


图 1 26 种利尿剂的液相色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of 26 diuretics

表 1 利尿剂的特征离子,保留时间及其检测限

Table 1 Characteristic ions, retention time and LOD of diuretics

| 化合物 Compound | 相对分子量 Molecular mass | 保留时间 t_R /min | 相对保留时间 RRT/min | 特征离子 Characteristic ions | 检测限 LOD/ng |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|---------------|
| 氨氯吡咪 Amiloride * | 229 | 0.454 | 0.111 | 230,232,171,173,143 | 0.2 |
| 乙酰唑胺 Acetazolamide | 222 | 0.538 | 0.132 | 221,83,58 | 1 |
| 苄氟噻嗪 Bendroflumethiazide | 421 | 4.437 | 1.086 | 420,341,328,224,197 | 0.8 |
| 苄噻嗪 Benthiazide | 431 | 4.088 | 1.001 | 430,432,339,308 | 0.08 |
| 丁苯氧酸 Bumetanide | 364 | 4.773 | 1.168 | 363,319,80 | 0.8 |
| 烯睾丙内酯 Canrenone * | 340 | 4.909 | 1.202 | 341,323,283 | 0.02 |
| 环噻嗪 Chlorothiazide | 295 | 0.657 | 0.161 | 294,296,214,179 | 0.8 |
| 氯噻酮 Chlorothalidone | 338 | 3.068 | 0.751 | 337,339,146,319 | 5 |
| 克罗帕米 Clopamide | 345 | 3.303 | 0.809 | 344,346,231,189, | 1.5 |
| 环噻嗪 Cyclothiazide | 389 | 4.140 | 1.013 | 388,390,353 | 2.5 |
| 利尿酸 Ethacrynic acid | 302 | 4.234 | 1.036 | 301,303,243,245,207 | 2.5 |
| 氟甲噻嗪 Flumethiazide | 329 | 1.248 | 0.306 | 328,184,248 | 0.2 |
| 速尿 Furosemide | 330 | 3.689 | 0.903 | 329,331,205,285 | 2.5 |
| 双氢克尿塞 Hydrochlorothiazide | 297 | 0.768 | 0.188 | 296,298,205,269 | 0.5 |
| 氢氟噻嗪 Hydroflumethiazide | 331 | 1.546 | 0.378 | 330,239,160,226 | 0.3 |
| 吲满速尿 Indapamide | 365 | 4.773 | 1.168 | 364,366,132,190 | 10 |
| 倍可降 Mefruside(ISTD) | 382 | 4.085 | 1.000 | 381 | — |
| 甲氯噻嗪 Methylchlorothiazide | 360 | 3.518 | 0.861 | 359,323,344 | 10 |
| 美托拉宗 Metolazone * | 365 | 3.761 | 0.921 | 366,259,179 | 0.2 |
| 吡咯它尼 Piretanide | 362 | 4.222 | 1.034 | 361,317,205 | 0.08 |
| 聚噻嗪 Polythiazide | 439 | 4.293 | 1.051 | 438,418,398,324 | 0.05 |
| 喹噻酮 Quinethazone | 289 | 2.310 | 0.565 | 288,290,258 | 0.08 |
| 安体舒通 Spironolactone * (canrenone) | 416 | 4.909 | 1.202 | 341,323,283 | 0.02 |
| 托拉沙米 Torasemide | 348 | 3.436 | 0.841 | 347,247,88,349,264,290 | 0.2 |
| 氨苯喋啶 Triamterene * | 253 | 1.731 | 0.424 | 254,237,195 | 0.1 |
| 三氯噻嗪 Trichloromethiazide | 380 | 3.295 | 0.807 | 379,381,343,307,242 | 0.08 |
| 利多速尿 Xipamide | 354 | 4.337 | 1.062 | 353,318,254 | 0.01 |

注: * 为正离子模式,其余为负离子模式

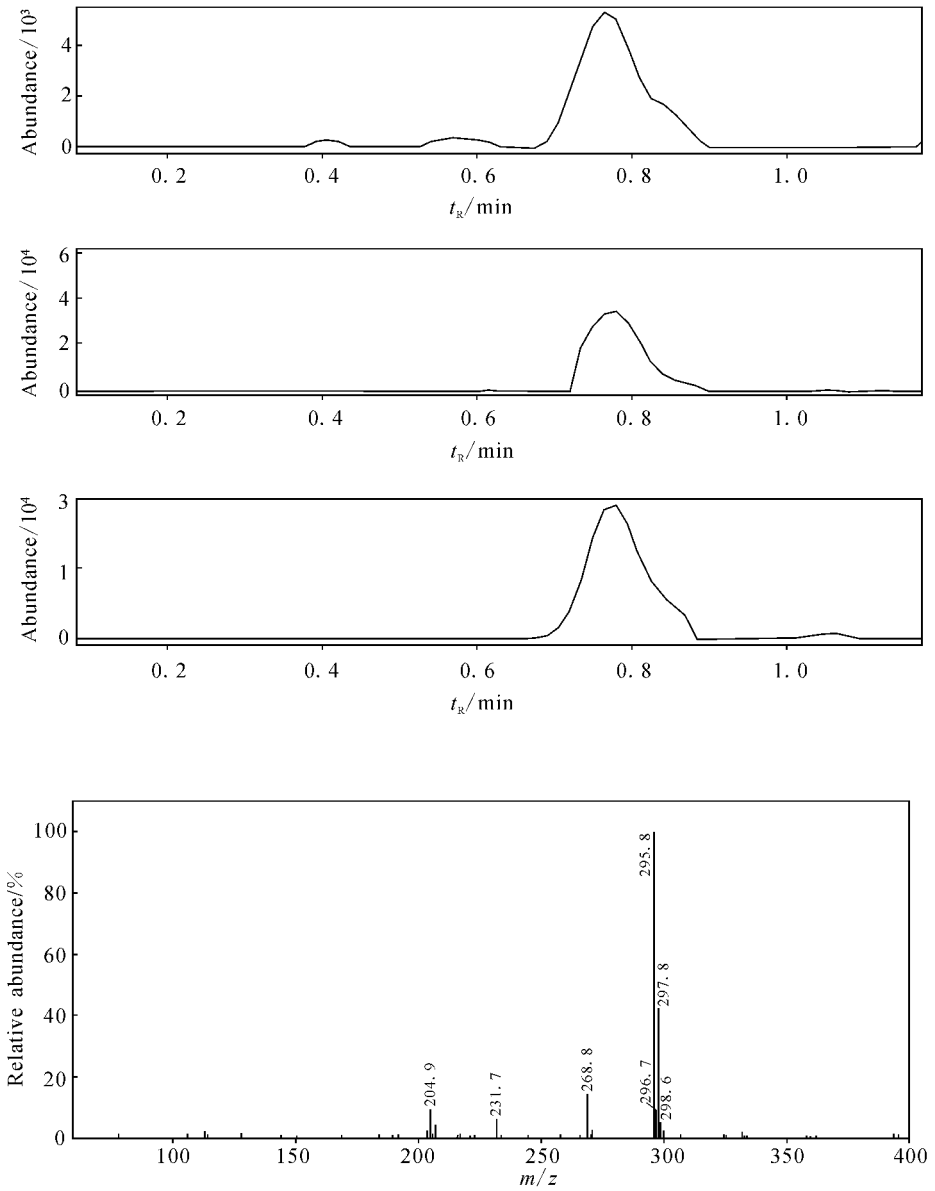


图 2 双氢克尿塞阳性尿的液相色谱图及其质谱图

Fig. 2 The HPLC chromatogram and MS spectrum of hydrochlorothiazide positive urine

参考文献:

- [1] World Anti-Doping Agency. Prohibited List[EB/OL]. <http://www.wada-ama.org/en/prohibitedlist.ch2>.
- [2] 秦 旻, 朱绍棠, 张长久. 兴奋剂中利尿剂的检测方法[J]. 分析测试学报, 2001, 20(2): 82-86.
- [3] PARK S L, PYO H S, KIM Y J, et al. Systematic analysis of diuretic doping agents by HPLC screening and GC/MS confirmation[J]. J Anal Toxicol, 1990, 14(2): 84-90.
- [4] QIN Y, WANG X B, WANG C, et al. Application of high-performance liquid chromatography-mass spectrometry to detection of diuretics in human urine[J]. J Chromatogr B, 2003, 794(1): 193-203.
- [5] DEVENTER K, DELBEKE F T, ROELS K, et al. Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2002, 16(8): 529-535.