

# 利尿剂氨氯吡咪、苄硫噻嗪和三胺喋啶的 LC/MS 分析

朱绍棠

(国家体委运动医学研究所兴奋剂检测中心)

**[摘要]**国际奥委会规定检测的利尿剂采用甲基化和硅烷化后进行 GC/MS 确证分析。目前国际上用 LC/MS 对这类药物进行确证分析的报道不多,主要原因是 LC/MS 分析灵敏度不高。本文就上述问题对不同流动相和离子化试剂做了一些灵敏度对比研究实验,分别对标准品和阳性尿进行了 LC/TS/MS 分析,得到比较理想的结果。为进一步提高灵敏度,还需对流动相、离子化试剂等做更深入的研究。

**关键词** TS/MS; 热喷雾质谱, LC/TS/MS; 液相色谱热喷雾质谱,  $[M+H]^+$ ; 分子加氢离子,  $[M+NH_4]^+$ ; 分子加铵离子, 氨氯吡咪 (Amiloride, mw229), 苄硫噻嗪 (Benzthiazide, mw431), 三胺喋啶 (Triamterene, mw253)。

## 引 言

目前国际奥委会规定检测的十三种利尿剂绝大多数属于难挥发化合物,其中有十二种可通过衍生化进行 GC/MS 分析,它们的最低检出浓度为  $0.2-0.5\mu\text{g/ml}^{[1]}$ 。但是苄硫噻嗪难以进行衍生化,因此成了利尿剂确证分析的难题。液相色谱与质谱联用 (LC/MS) 可对利尿剂一类的难挥发化合物直接进行质谱分析。有关利用热喷雾接口 (TS) 进行 TS/MS 分析的报道较少<sup>[2]</sup>。

、 本文通过研究不同流动相组成对 TS/MS 检测灵敏度的影响,获得了苄硫噻嗪和另外两种利尿剂氨氯吡咪和三胺喋啶的 TS/MS 质谱图,以及这三种药物的标准品和阳性尿的 LC/TS/MS 分析结果。

## 实 验

### 1. 仪器和试剂

高压液相色谱仪: HP model 1090L, 质谱仪: HP 热喷雾接口和 HP 5988A 质谱仪, 试剂: 甲醇、水和醋酸铵 (HPLC 级)。

1990 年 2 月 19 日收

## 2. 实验条件

## 高压液相色谱条件

流动相 A: 甲醇, 含 0.1 克分子/升醋酸铵; 流动相 B: 甲醇: 水 = 1: 1, 含 0.1 克分子/升醋酸铵, 色谱柱: HP RP-18 46×200mm, 流速: 1 毫升/分钟, 柱温: 40℃。

## 质谱条件

热喷雾接口温度: 流动相 A 为 90℃、流动相 B 为 96℃, 离子源温度: 276℃, 电子能量: 1000eV, 电子倍增器电压: 2650V, 质量范围: 100~500amu。

## 3. 实验过程及结果

## (1) TS/MS 分析

利用流动相 A 和 B 分别对氨氯吡咪、苄硫嘧啶和三胺嘧啶直接进行 TS/MS 分析, 获得了这三种纯品在不同流动相时的 TS/MS (图 1—6) 及它们的总离子流强度和  $[M+H]^+$  的丰度 (表 1)。

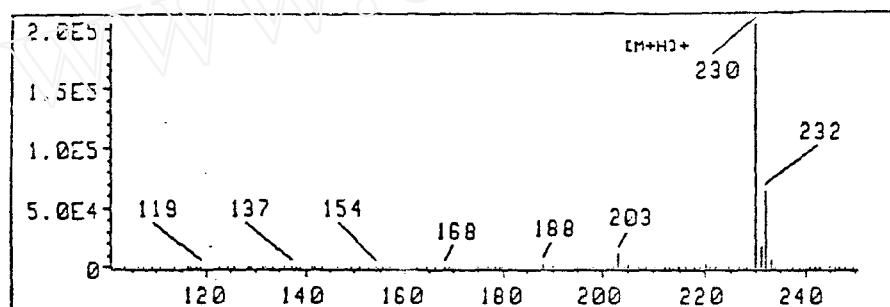


图 1 氨氯吡咪(mw229)的 TS/MS (甲醇含 0.1M 醋酸铵)

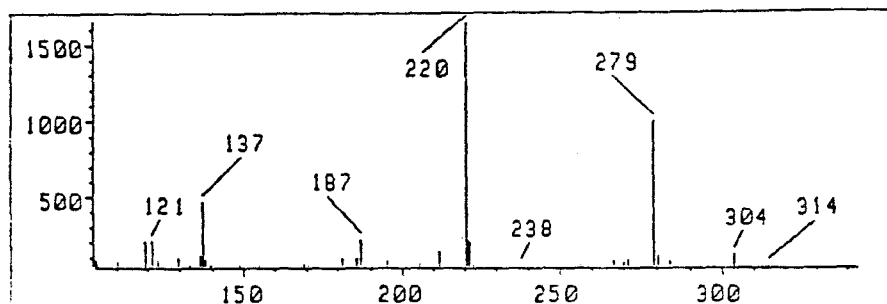


图 2 苄硫嘧啶(mw431)的 TS/MS (甲醇含 0.1M 醋酸铵)

表 1 用流动相 A 和 B 氨氯吡咪、苄硫嘧啶和三胺嘧啶的 TIC 和  $[M+H]^+$  丰度比较

| Drugs        | Mobile phase A |                   | Mobile phase B |                   |
|--------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
|              | TIC (area)     | $[M+H]^+$ (abund) | TIC (area)     | $[M+H]^+$ (abund) |
| Amiloride    | 7685033        | 203840            | 10784777       | 52776             |
| Benzthiazide | 67084          | no                | 67084          | 12316             |
| Triamterene  | 465148         | 9143              | 465148         | 92104             |

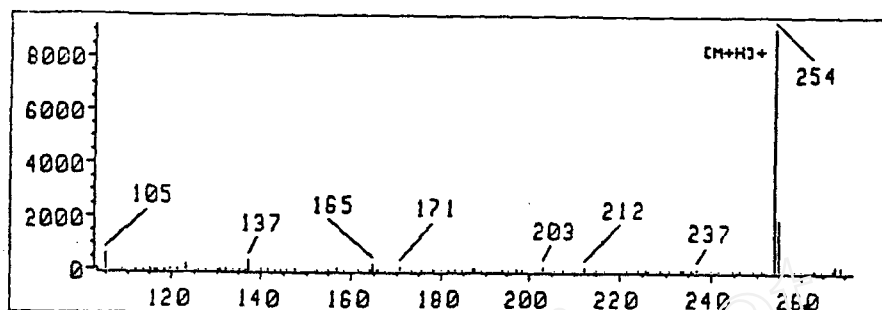


图3 三胺嘧啶(mw253)的 TS/MS(甲醇含 0.1M 醋酸铵)

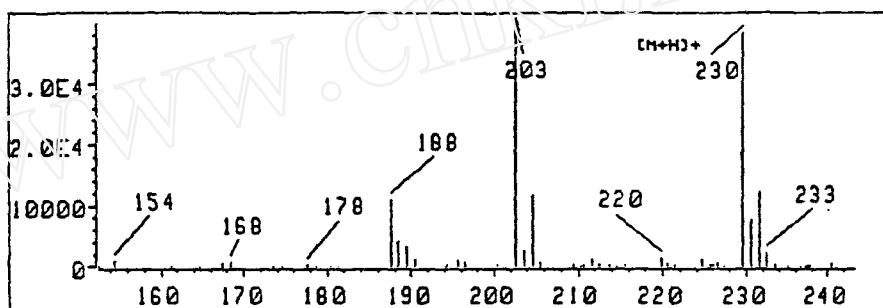


图4 氮氯吡咪的 TS/MS(甲醇:水=1:1, 0.1M 醋酸铵)

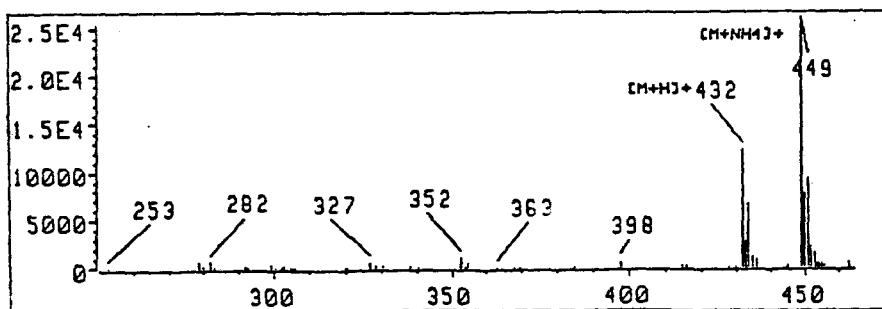


图5 苄硫嘧啶的 TS/MS(甲醇:水=1:1, 0.1M 醋酸铵)

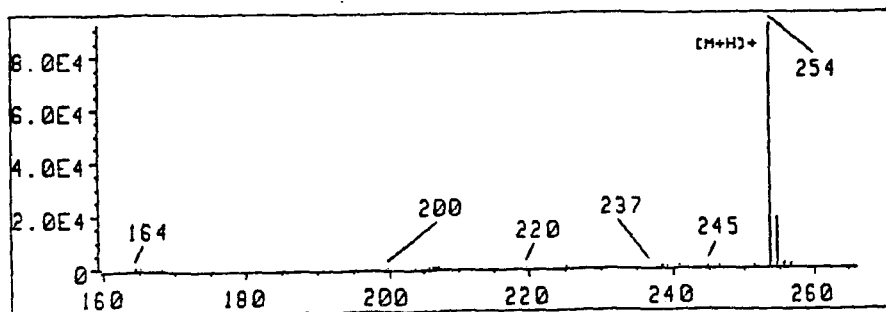


图6 三胺嘧啶的 TS/MS(甲醇:水=1:1, 0.1M 醋酸铵)

由于采用了流动相 B, 上述三种标样的 TIC 强度都有所提高, 尤其是苄硫噻嗪不仅提高了 TIC 强度, 而且还检测到  $[M+H]^+$  和  $[M+NH_4]^+$

三种利尿剂中苄硫噻嗪的检测灵敏度最低, 其最小检出限为  $0.25\mu\text{g}$ 。表 2 列出了用流动相 B 进行的 TS/MS 检测限比较。

表 2 用流动相 B 进行的 TS/MS 检测限实验比较

| Drugs        | (2 $\mu\text{g}$ ) |                      | (1 $\mu\text{g}$ ) |                      | (0.25 $\mu\text{g}$ ) |                      |
|--------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
|              | TIC<br>(area)      | $[M+H]^+$<br>(abund) | TIC<br>(area)      | $[M+H]^+$<br>(abund) | TIC<br>(area)         | $[M+H]^+$<br>(abund) |
| Amiloride    | 10782002           | 52776                | 6171118            | 39904                | 1652250               | 20216                |
| Benzthiazide | 3102218            | 12316                | 782487             | 488                  | 159772                | 133                  |
| Triamterene  | 3685758            | 92104                | 1964102            | 31664                | 431834                | 6756                 |

## (2) 阳性尿的 LC/TS/MS 分析

现有的氨氯吡咪、苄硫噻嗪和三胺喋啶阳性尿经 HPLC 定量分析结果是: 氨氯吡咪  $1.10\mu\text{g/ml}$  尿, 苄硫噻嗪  $1.78\mu\text{g/ml}$  尿, 三胺喋啶  $4.55\mu\text{g/ml}$  尿。

分别取上述三种阳性尿各 5ml, 经碱提取<sup>[1]</sup>并将有机相浓缩至 50 $\mu\text{l}$ 。在进行 LC/TS/MS 分析之前分别对这三种药物的标准品做了 LC/TS/MS 分析, 得到各自的保留时间为: 氨氯吡咪: 4.68 分, 苄硫噻嗪: 6.35 分, 三胺喋啶: 6.58 分。图 7~9 为它们的 LC/TS/MS。

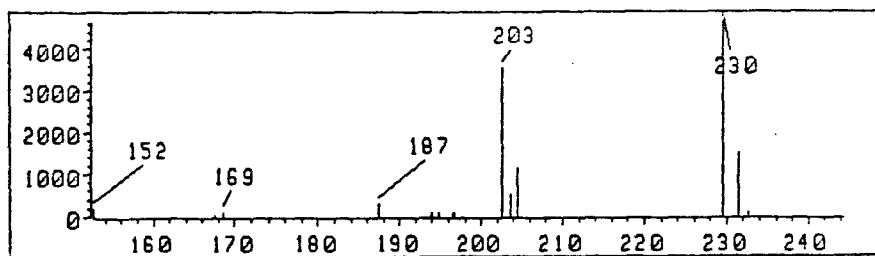


图 7 氨氯吡咪的 LC/TS/MS

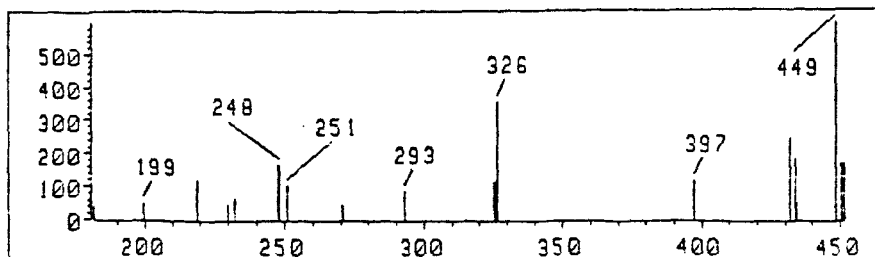


图 8 苄硫噻嗪的 LC/TS/MS

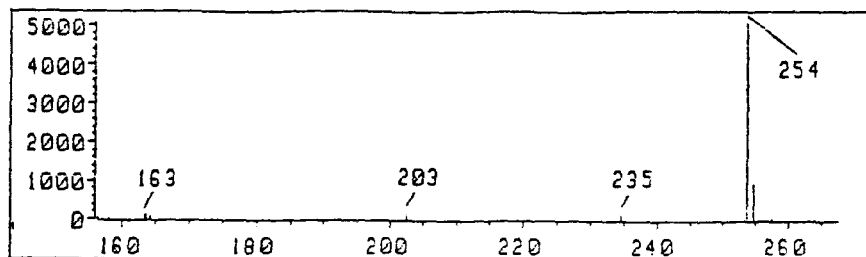


图9 三胺喋啉的 LC/TS/MS

分别注入 10 $\mu$ l 浓缩的样品,得到了这三个阳性尿提取物的离子色谱图和其中所含利尿剂的质谱图(图 10~12)。

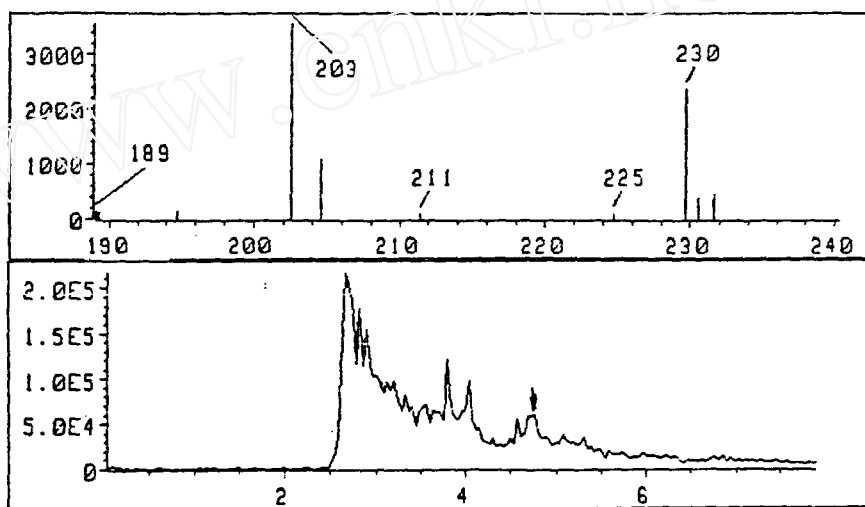


图 10 氯噻嗪阳性尿的 LC/TS/MS 总离子流图和质谱图

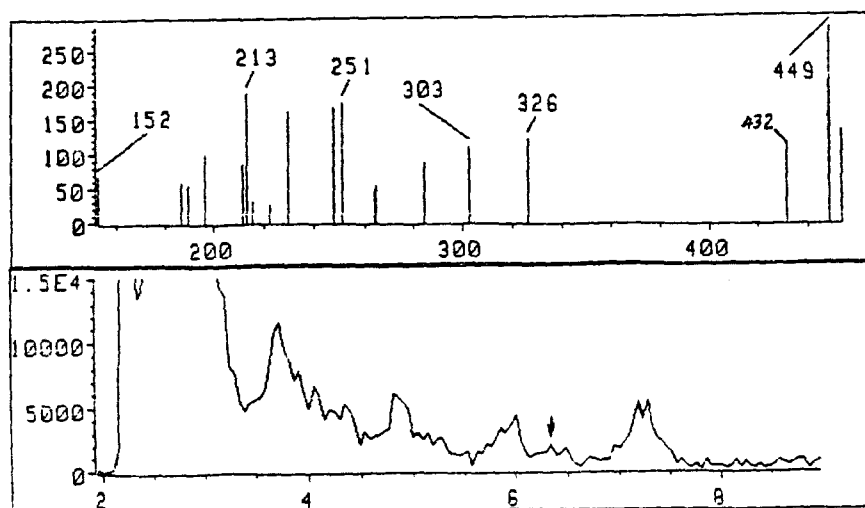


图 11 苄硫嘧啶阳性尿的 LC/TS/MS 总离子流图和质谱图

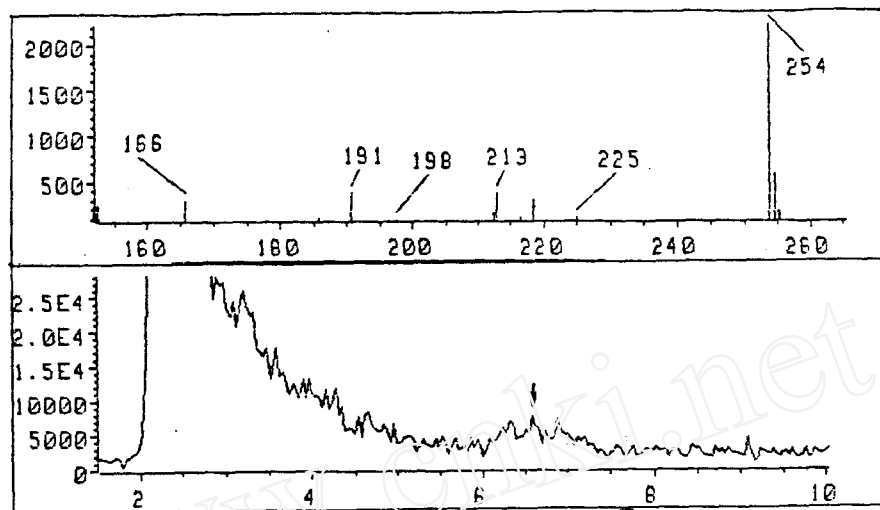


图 12 三胺噻唑阳性尿的 LC/TS/MS 总离子流图和质谱图

表 3 列出了采用流动相 B 时不同进样量和阳性尿中这三种利尿剂  $[M+H]^+$  离子的丰度比较。

表 3 用流动相 B 时不同进样量和阳性尿中三种利尿剂  $[M+H]^+$  丰度比较

| Drugs        | TS/MS (1 $\mu$ g)<br>$[M+H]^+$ (abund) | LC/TS/MS (1 $\mu$ g)<br>$[M+H]^+$ (abund) | positive urine (10 $\mu$ l)<br>$[M+H]^+$ (abund) |
|--------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Amiloride    | 39904                                  | 4642                                      | 2376                                             |
| Benzthiazide | 488                                    | 290                                       | 115                                              |
| Triamterene  | 31664                                  | 5094                                      | 2230                                             |

分析结果表明,同样进样量直接进行 TS/MS 分析要比经色谱柱做 LC/TS/MS 分析的灵敏度高。若提高样品浓度,减少进样体积会对 LC/TS/MS 分析的检测灵敏度有所提高。另外标样在进行 LC/TS/MS 分析时检测到的离子流很不稳定,噪音大,峰形不佳。这种情况对阳性尿的分析结果也产生一定的影响。由于样品中所含利尿剂的浓度较低和本底的干扰,使得质谱图与标样稍有差异。

LC/TS/MS 分析的关键是如何提高检测灵敏度。影响检测灵敏度的因素主要有:(1)流动相的选择;(2)缓冲剂醋酸铵的浓度;(3)液相色谱的分离效率等。这些因素不仅影响灵敏度,而且对质谱分析结果也有一定影响,因而出现  $[M+H]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  和碎片离子的丰度随条件不同而异。

## 参 考 文 献

- [1] INRS, Montreal, Canada  
[2] P. C. Goodley, Compilation of Thermospray Mass, HP Company

## LC/MS Analysis of Diuretics in Human Urine

Zhu Shaotang

(Doping Control Centre, National Research Institute  
of Sports Medicine, Beijing, China)

Received 19 Feb. 1990

## Abstract

There are thirteen banned diuretics by IOC. Most of them can be analysed by GC/MS after methyl derivatives. The detection limits are 0.2~0.5 µg/ml. Amiloride, benzthiazide and triamterene are difficult to be derivatized by methylation. LC/MS is widely used for the direct analysis of nonvolital compounds, but there are very few reports about diuretics.

The LC/MS analysis of the three drugs were reported in this paper. The effect of different combination of mobile phases on the sensitivities of amiloride, benzthiazide and triamterene were studied. The standards of the three drugs and drug positive urine samples were analysed with LC/TS/MS.