

苯吡磺苯酸 GC/MSD 检测方法研究

杨树民 朱绍棠 秦 旻

(国家体委运动医学研究所兴奋剂检测中心 北京 100029)

[摘要] 本文采用乙酸乙酯酸性条件下萃取,对甲基化和硅烷基化后的苯吡磺苯酸进行了GC/MSD分离及检测方法的研究,建立了在人尿中检出该药的实用方法,并以HPLC测定了该药的消除曲线。

关键词: 苯吡磺苯酸 GC/MSD 检测

体育竞赛中,利尿剂多被用于控制体重及对其它违禁药物的稀释。苯吡磺苯酸是一种强效利尿剂,近年来较多地被运动员滥用^[1],国内外尚无成熟的方法对其控制。我们采用甲基化和硅烷基化方法对该药的色谱、质谱行为进行了研究,建立了可靠的实用检测方法,使该药物得以控制。

1 实验部分

1.1 药品与试剂

苯吡磺苯酸(AR,由加拿大蒙特利尔兴奋剂试验室提供);碘甲烷(AR,北京兴福精细化学研究所重蒸处理);硅烷化试剂(BSTFA+1%TMCS,REGIS化学试剂公司,USA);其它均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与操作

HP5890气相色谱/HP5970质谱检测器;15m×0.2mm HP-1石英毛细柱;柱温程序:80℃~200℃(20℃/min),200℃~280℃(10℃/min);进样口温度:250℃;接口温度:280℃;载气流速:20mL/min(180℃);离子源温度:198℃;电离能:70 eV;倍增器电压:2000V。

1.3 衍生化方法

取苯吡磺苯酸甲醇储备液(1.8mg/mL)10μL,以氮气吹干。

(1)甲基化:加入重蒸碘甲烷及无水丙酮各50μL,混合3分钟,于60℃加热3小时。

(2)硅烷基化:加入BSTFA+1%TMCS 50μL,充分混合后,于90℃加热1小时。

1.4 阳性尿前处理

取阳性尿2mL,加入酸性固体缓冲剂(磷酸二氢钠/磷酸氢二钠 99:1, pH5.0)100mg,与4mL乙酸乙酯混合,振荡20分钟,分离后于有机相中加入2mL 5%醋酸铅水

1993年2月23日收

液,振荡 5 分钟,离心分离后,萃取物以氮气彻底吹干,以上述方法进行衍生化处理。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 甲基化结果

苯吡磺苯酸标准品的甲基化衍生物 TIC 及质谱如图 1 所示。 m/z 404($362+3\times 14$)为分子离子峰,表明此衍生物为苯吡磺苯酸的三甲基化产物。图中 m/z 295 的出现为被衍生化了的磺氨基基团的脱去后的产物。

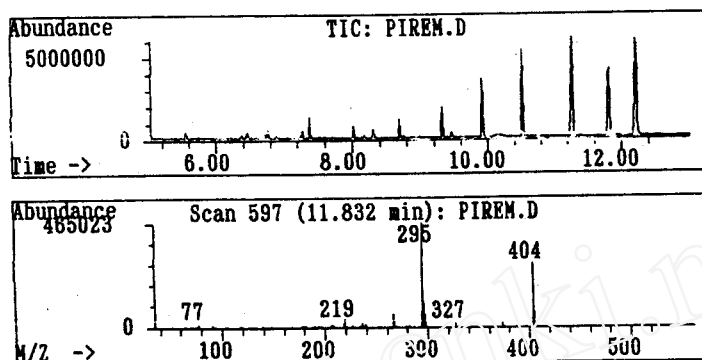


图 1 甲基化衍生物 TIC 及质谱图

2.1.2 硅烷基化结果

硅烷基化产物的 TIC 及质谱如图 2 所示。 m/z 506 ($362+2\times 72$)为分子离子峰,表明此衍生物为苯吡磺苯酸二硅烷化产物。图中 m/z 353 的存在说明磺氨基的脱去如甲基化一样在硅烷化产物的开裂中也同样发生,同时说明两个硅烷化反应位置一为分子中的磺氨基,另一个为羧基。

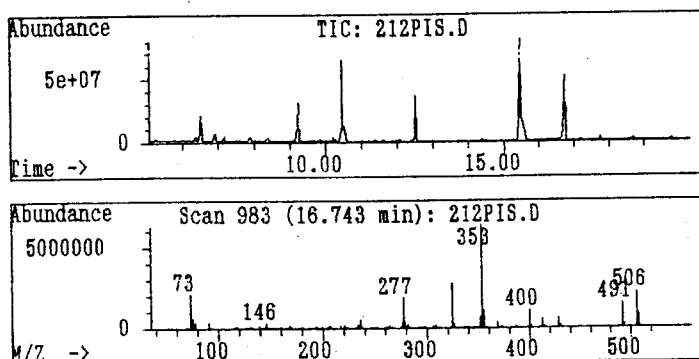


图 2 硅烷基化衍生物 TIC 及质谱图

2.1.3 苯吡磺苯酸在阳性尿中的检出。

以甲基化和硅烷化方法均可在 1.5h 到 20h 的阳性尿中准确地检出苯吡磺苯酸的药物原型,并可在国际奥委会要求的检出农度($0.2\sim 0.5\mu\text{g}/\text{mL}$)^[2]以下确证该药的存在,其检出结果如图 3 及 4。

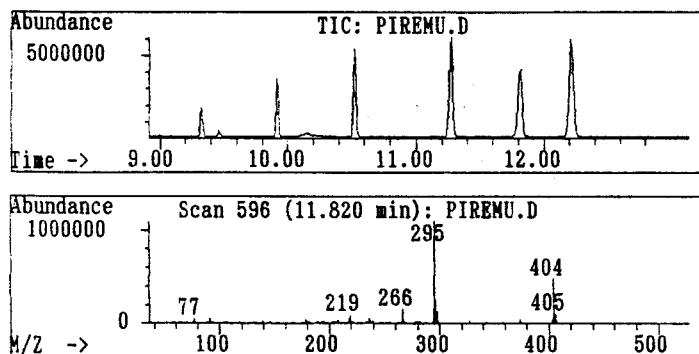


图 3 阳性尿中甲基化衍生物的 TIC 及质谱图

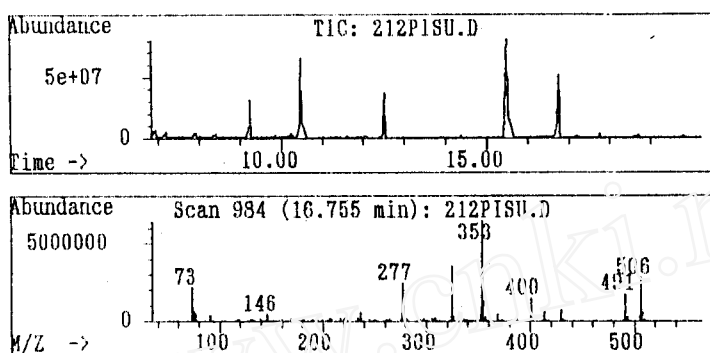


图 4 阳性尿中硅烷基化衍生物的 TIC 及质谱图

2.1.4 苯吡磺苯酸的消除

在酸性条件下对该药的阳性尿用乙酸乙酯进行萃取,萃取物溶于 300 μ L 甲醇中,进样 10 μ L 作 HPLC 定量分析^[3],以该药的含量对相应的阳性尿收集时间作图得该药的消除曲线,如图 5 所示。图中表明该药排出较快,其峰值出现在 3 小时左右,20 小时后没有检出该药的原型。

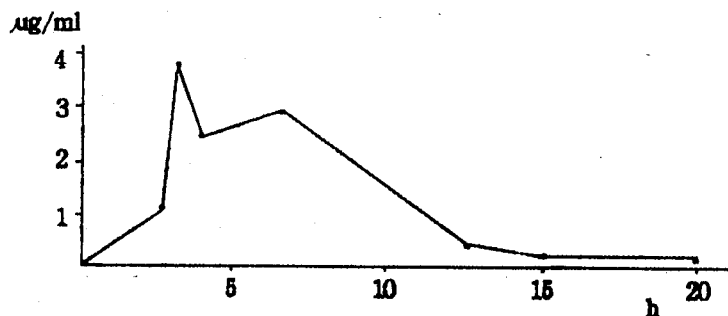


图 5 苯吡磺苯酸的消除曲线

2.2 讨论

2.2.1 两种衍生化方法的灵敏度与可靠性

甲基化和硅烷基化对于苯吡磺苯酸都具有较高的检出灵敏度。其绝对检出量以 $\geq 2N$

量计算,硅烷化方法可达 1.5ng,甲基化方法为 1.0ng。如在数据采集时采用“选择离子”(SIM)方式,则灵敏度可望有进一步的提高。

两种衍生化方法的可靠程度可以说都是相当高的,而硅烷化衍生物具有 4 个较高质量数且丰度较高的特征离子,相对来说更可靠些。

2.2.2 有关苯吡磺苯酸的代谢

由于该药为一作用于髓祥的强效利尿剂^[4],体内排出速度快,在我们的研究中未发现常见的代谢途径,对阳性尿进行酶解和酸解处理后,检出的仍为该药原型。

参 考 文 献

- 1 The banned list of abused drugs in sports 1989. Jan.
- 2 The official documents of MEDICAL SUBCOMMISSION of IOC, Köln, Germany.
- 3 Merkel W *et al.* Eur J Med Chem, 1976,11: 399.
- 4 Pozet N *et al.* Brit J Clin Pharmacol, 1980, 9:577.

Determination of Piretanide by GC/MSD

Yang Shumin, Zhu Shaotang, Qin Yang

(Doping Centre, National Institute of Sports Medicine
An Wai, An Ding Road No. 1 Beijing 100029, China)

Received 1993-02-23

Abstract

This paper dealt with the determination of piretanide, a kind of strong diuretics banned by IOC, using GC/MSD. The human piretanide positive urine sample extracted with ethyl acetate at pH 5. The dry residue of extract was methylated or silylanized and then the derivatives were determined. The method suggested was practical and reliable. The excretion profile of piretanide was investigated by HPLC.

Key Words: piretanide, GC/MSD, determination.