

液相色谱-串联质谱法确证人尿中的利他林及其主要代谢物

陆江海, 王 杉, 秦 旻, 邓 静, 徐友宣, 吴侔天

(国家体育总局反兴奋剂中心, 北京 100029)

摘要:建立了固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时确证人尿中的利他林及其主要代谢物利他林酸的方法。尿样中的药物经反相 C_{18} 固相萃取柱净化、氮气吹至干, 以甲睾为内标, 用流动相溶解后进行液相色谱-串联质谱法测定。该方法的最低检出限为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 利他林和利他林酸的回收率分别为 80.6% 和 68.4%; 批内和批间的相对标准偏差小于 6.0%, 能满足国际反兴奋剂机构(WADA)对其最低检测能力 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的要求。

关键词:固相萃取-液相色谱-串联质谱; 利他林; 利他林酸; 人尿; 兴奋剂

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2009)05-0267-04

Confirmation of Methylphenidate and Its Major Metabolite in Human Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LU Jiang-hai, WANG Shan, QIN Yang, DENG Jing, XU You-xuan, WU Mou-tian

(China Anti-Doping Agency, The State Sport General Administration, Beijing 100029, China)

Abstract: A solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) for simultaneous determination of methylphenidate and its major metabolite, ritalinic acid in human urine was developed and validated. The analytes were extracted by passing through C_{18} revised phase extraction cartridge. The elution was evaporated by nitrogen blow, and dissolved by mobile phase, and then assayed by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. The limit of detection (LOD) is $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for two analytes. Recoveries of methylphenidate and ritalinic acid are 80.6% and 68.4%, and inter-relative standard deviation ($n=6$) are less than 6.0%. The method can answer the requirements of the minimum required performance limit (MRPL) that doping control laboratories need to accomplish for stimulants at the concentration of $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ as established by WADA.

Key words: solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry; methylphenidate; ritalinic acid; human urine; doping

利他林 (α -phenyl-2-piperidineacetic acid methyl ester, methylphenidate) 为中枢神经兴奋药,能提高精神活动,可对抗抑郁症^[1],同时也能用于治疗注意缺陷多动障碍(儿童多动综合症,轻度脑功能失调),发作性睡病以及巴比妥类、水合氯醛等中枢抑制药过量引起的昏迷^[2]。口服利他林药片后,80%的剂量在 24 h 内通过尿液排泄到体外,其中的 60%~80% 转化为利他林酸(ritalinic acid),尿液只有少量的原药利他林出现^[3]。2008 年国际反兴奋剂机构(WADA)把利他林列为特定刺激剂^[4],在赛内被禁止使用。

利他林和利他林酸的结构式示于图 1。目前,该药物的检测方法主要有气相色谱-质谱法^[5]和液相色谱-质谱法^[6-7]。但还没有采用固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时检测人尿中的利他林及其主要代谢物利他林酸的方法。在现阶段,本实验室的 4 种初筛方法(刺激剂、麻醉剂、利尿剂和甾体类药物)只能检测到原药利他林,而尿液中的主要代谢物利他林酸却未能检出。所以在初筛程序中,检测到利他林后,建立一套同时确证这两种化合物的方法非常必要,并且对本实验室通过 WADA 的每季度水平考试,保证本实验室具有检测国际比赛样品的资格有着非常重要的现实意义。本工作拟对样品前处理方法、质谱条件等方面进行优化,建立同时检测这两种化合物的固相萃取-液相色谱-串联质谱方法。

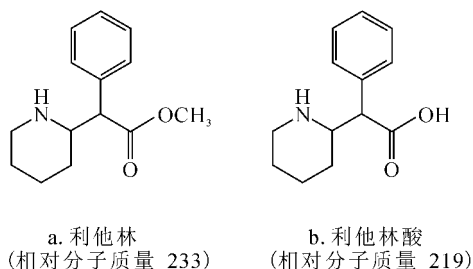


图 1 利他林(a)和利他林酸(b)的结构式

Fig. 1 The structures of methylphenidate(a) and ritalinic acid(b)

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

6410 Triple Quad LC/MS;美国 Agilent 公

司产品;电子天平;瑞士 Mettler Toledo 公司产品;吹氮头(Bibby Scientific);低速离心机:北京雷勃尔离心机有限公司产品;低温恒温浴液循环两用槽;杭州雪中炭恒温技术有限公司产品;Millipore 超纯水机。

利他林和利他林酸:澳大利亚兴奋剂检测实验室提供;甲醇、醋酸铵、冰醋酸(均为分析纯);国药集团化学试剂有限公司产品;乙腈、甲酸、甲酸铵:Dima 公司产品;内标甲睾:德国科隆兴奋剂检测实验室提供。

1.2 标准溶液配制

称取 0.95 mg 利他林和 0.78 mg 利他林酸对照品,配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。该储备液用超纯水稀释成系列对照品,供分析用。

称取 1.23 mg 内标甲睾,配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。该储备液用甲醇稀释成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标溶液,供分析用。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件 Agilent Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱($2.1 \text{ m} \times 50 \text{ mm} \times 3.5 \mu\text{m}$);流动相采用 pH 3.5 甲酸铵缓冲液(A)和乙腈(B)进行梯度洗脱;淋洗梯度:0 min, 90% A-10% B, 7 min, 10% A-90% B;流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 运行 7 min, 平衡 3 min;进样量 $10 \mu\text{L}$;柱温 40°C 。

1.3.2 质谱条件 多反应离子检测(MRM)和子离子扫描;离子极性:正离子(positive);电喷雾离子化(ESI);毛细管电压:4 000 V;干燥气温度: 330°C ;干燥气流速: $10.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$;雾化气压力: $2.41 \times 10^5 \text{ Pa}$;毛细管出口电压:100 V;用于定量的离子对为 m/z 220 $\rightarrow$ 84 和 234 $\rightarrow$ 84,碰撞能量 10 eV;用于定性的离子对为 m/z 220 $\rightarrow$ 56 和 234 $\rightarrow$ 56,碰撞能量 40 eV。

1.4 尿样的处理

在 2 mL 尿样中加入 $20 \mu\text{L}$ $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标和 0.5 mL 醋酸铵-冰醋酸缓冲液 $w(\text{NH}_4\text{OAC}) : V(\text{ACOH}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 60 : 22 : 100$, pH = 6.0, 混匀后过 C₁₈ 反相 SPE 柱(此柱依次用 4 mL 甲醇和 4 mL 去离子水活化)。先用 4 mL 5% 甲醇-水溶液洗柱子,抽干,用 5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液至玻璃试管中, 55°C 氮气吹干。残留物用流动相($V(\text{甲酸-甲酸铵-水}(\text{pH } 3.5)) : V(\text{乙腈}) = 90 : 10$)定容至 $200 \mu\text{L}$, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,进样体积 $20 \mu\text{L}$, 进行液相色谱-串联质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 提取条件

由于利他林酸用常规的液液提取方法所提取的回收率非常低(小于 1%),所以在本实验室的初筛程序中难以检测。换用 C₁₈ 反相固相萃取法提取后,其回收率能达到 65% 以上。所以在确证这两种化合物时,采用固相萃取法提取能收到很好的效果,同时也能达到 WADA 对这两种化合物的最低检测要求(500 μg · L⁻¹)。

2.2 质谱分析

因为利他林和利他林酸都含有氮原子,所以在 ESI+ 模式下容易得到 1 个 H⁺, 形成较为稳定的 [M+H]⁺ 准分子离子。子离子扫描发现,利他林和利他林酸都能得到 *m/z* 91、84、56 子离子,示于图 2 和图 3。*m/z* 84 离子在碰撞能量(5~10 eV)较低时,有很高的响应,而 *m/z* 91 和 *m/z* 56 这 2 个离子就需要较高的碰撞能量(40~60 eV)。子离子扫描同时发现,利他林和利他林酸的子离子较少,所以可以用多重反应

监视(MRM)的模式对这两种化合物进行确证工作,具体的检测条件列于表 1。

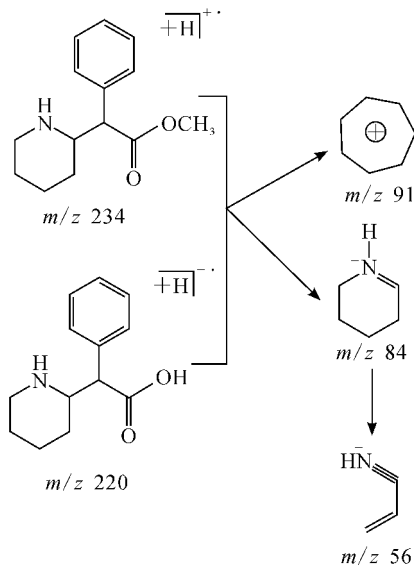


图 2 利他林和利他林酸的裂解过程

Fig. 2 The potential fragmentation pathway of methylphenidate and ritalinic acid

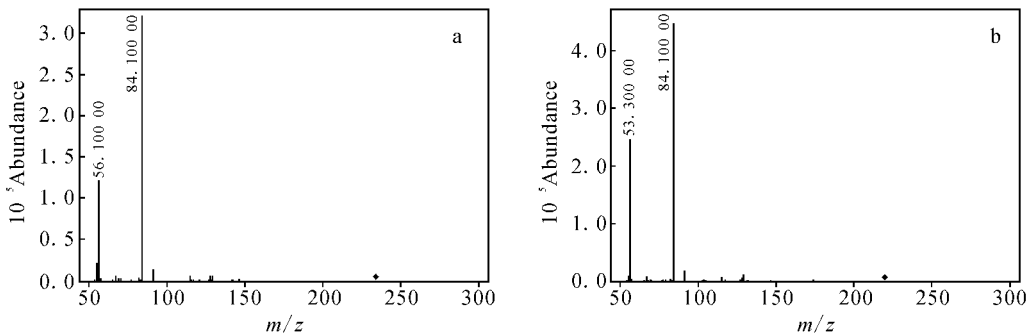


图 3 利他林(a)和利他林酸(b)子离子扫描质谱图

Fig. 3 The production scan mass chromatogram of methylphenidate(a) and ritalinic acid(b)

表 1 MRM 监测模式下利他林和利他林酸的检测条件

Table 1 The optimized MRM conditions for methylphenidate and ritalinic acid

组分	离子对/(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞电压/eV	驻留时间/ms
利他林	234→84	100	10	50
	234→56	100	40	50
	234→91	100	60	50
利他林酸	220→84	100	10	50
	220→56	100	40	50
	220→91	100	60	50

2.3 方法专属性

在上述色谱条件下,利他林和利他林酸出峰时间分别在 1.5 min 和 3.2 min,内标出峰时间在 5.5 min,示于图 4。取常规检测为阴性的 6 份尿样(3 男,3 女),按 1.4 项操作。结果表明:空白人尿中的杂质不干扰样品和内标的测定,基线噪音小,在此条件下测得的结果能代表原药的浓度。

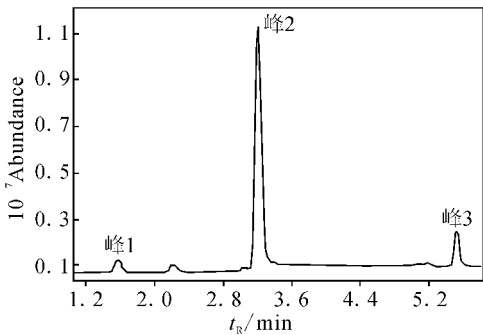


图 4 利他林酸(峰 1)、利他林(峰 2)和内标(峰 3)的 LC/MS 全扫描总离子流图

Fig. 4 The total ion chromatogram of ritalinic acid (peak 1), methylphenidate (peak 2) and internal standard (peak 3) by LC/MS

2.4 提取回收率

取 2 mL 空白尿($n=5$),按 1.4 项操作,但 20 μL 内标以及 1 μg 利他林和 1 μg 利他林酸分别在 55 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干前加入,进样分析。计算利他林,利他林酸对内标的峰面积比值(f_s)。

取 2 mL 空白尿($n=5$),分别在空白人尿中

加入 1 μg 利他林和 1 μg 利他林酸,按 1.4 项操作,但 20 μL 内标在 55 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干前加入,进样分析。得到利他林、利他林酸对内标的峰面积比值(f_x),提取回收率(R)按 $R=f_x/f_s\times 100\%$ 计算。利他林和利他林酸在浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的提取回收率分别为 80.6%(RSD:3.81%)和 68.4%(RSD:4.27%)。

2.5 最低检测下限

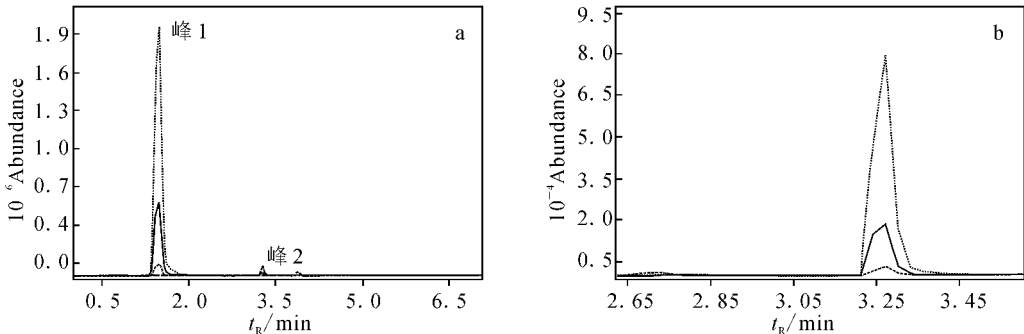
取适量利他林和利他林酸对照液,用氮气吹干,加入 2 mL 空白人尿,使人尿中睾内脂浓度的增加为 1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,按 1.4 项操作,测得利他林和利他林酸的最低检测下限都为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N=3$)。

2.6 精密度试验

取 2 mL 空白尿,按 1.4 项操作,使人尿中利他林和利他林酸的浓度都为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,每个样品进行 5 样本分析,连续测定 3 天,同时做标准曲线,以当日的标准曲线计算每个样本的浓度。利他林在浓度 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,日内和日间 RSD 分别为 3.20%、3.57%;利他林酸在浓度 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,日内和日间 RSD 分别为 5.78%、3.58%。结果表明,日内和日间精密度符合要求。

2.7 样品分析

应用本方法对利他林阳性尿中的利他林和利他林酸进行分析,均能很好的检出这两种成分,示于图 5。检测结果证明,该方法完全能满足 WADA 对运动员尿样中利他林和利他林酸进行监控的要求。



注:峰 1 为利他林酸,提取的离子对为 $m/z\ 220\rightarrow84,220\rightarrow56,220\rightarrow91$;峰 2 为利他林,提取的离子对为 $m/z\ 234\rightarrow84,234\rightarrow56,234\rightarrow91$

图 5 利他林阳性尿的提取离子对图(a)和利他林的放大图(b)

Fig. 5 The extracted transitions chromatogram(a) and magnified chromatogram(b) of a positive control urine of methylphenidate

2.3 方法的检测限和回收率

除阿卡波糖和二甲双胍的检测限为 20 mg · kg⁻¹ 外,其他降糖药的检测限均不高于 1 mg · kg⁻¹。

阿卡波糖和二甲双胍在低(20 mg · kg⁻¹)、中(100 mg · kg⁻¹)、高(200 mg · kg⁻¹) 3 种浓度下的回收率分别为 75. 8% ~ 81. 6%, 75. 2%~83. 1%; 格列喹酮、格列本脲、格列美脲、格列吡嗪、格列齐特、那格列奈、苯乙双胍在低(1 mg · kg⁻¹)、中(5 mg · kg⁻¹)、高(10 mg · kg⁻¹) 3 种浓度下的回收率分别为 76. 0% ~ 82. 3%, 81. 7% ~ 96. 1%, 78. 4% ~ 93. 5%, 91. 7%~108. 5%, 88. 8%~100. 8%, 94. 1%~108. 4%, 99. 8%~116. 9%, 96. 1%~111. 1%。

3 结 论

建立了同时检测保健品中非法添加的 10 种降糖药的定性分析方法。该方法简便、准确可靠,适合保健品中非法添加该类药物的常规检测。

参考文献:

[1] 董 宇,孔 璋,钟大放. 液相色谱-质谱联用法检测中药降糖制剂中非法掺入的苯乙双胍和格列苯脲[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(1):

19-22.

[2] 夏铮铮,杨成钢,张小松,等. 中药保健品中非法掺入格列苯脲的检测[J]. 中国药房, 2006, 17(4): 314-316.
[3] 余 倩,车宝泉. RP-HPLC 检查中药保健品中的西药降糖成分[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(4): 316-317.
[4] 朱炳辉,龙朝阳,吴西梅,杨杏芬. 固相萃取/高效液相色谱法中成药和保健品中 7 种降糖化学药物的检测[J]. 分析测试学报, 2008, 27(5): 534-537.
[5] 李 莉,徐海娥. HPLC 法测定保健食品及中药制剂中化学降糖药的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1 271-1 272.
[6] 万 庆,管玉云,程 正. 保健食品中非法添加磺酰脲类降糖药的定性方法研究[J]. 安徽医药, 2008, 12(10): 899-900.
[7] 刘起中,李慧义,杭太俊. 中药降糖制剂中非法掺入的化学降糖药物成分的检测[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(1): 61-63.
[8] 郭继芬,陈笑艳,钟大放. 6 种口服降糖药的液相色谱-质谱分析[J]. 分析测试学报, 2000, 19(6): 5-8.
[9] 林艳萍,司端运,刘昌孝. 液质联用分析中药降糖制剂中掺入的西药成分[J]. 天津大学学报, 2008, 41(6): 720-724.

=====

(上接第 270 页)

3 结 论

本实验采用液相色谱-串联质谱法结合固相萃取技术,建立了同时确证人尿中利他林和利他林酸的方法。在本实验的仪器条件下,检测时间较短(7 min),同时检测灵敏度较高。实验结果表明,该条件易于控制、结果准确、加样回收率稳定、重现性好,能满足 WADA 对此类药物最低检测能力(500 μg · L⁻¹)的要求。该方法可以应用于常规的尿样检测。

参考文献:

[1] AOYAMA T, KOTAKI H, SASAKI T. Nonlinear kinetics of threo-methylphenidate enantiomers in a patient with narcolepsy and in healthy volunteers [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1993, 44(1):79-84.
[2] DEVANE C L, MARKOWITZ J S. New methylphenidate formulations for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. Drug Metab Dispos, 2000, 28(6):620-624.
[3] MOFFAT A C, OSSELTON M D, WIDDOP B.

Clarke's analysis of drugs and poisons[M]. London: Pharmaceutical Press, 2004.

[4] 世界反兴奋剂药物,2008 年禁用清单[R]. 北京: 国家体育总局科教司,2008.
[5] NAKAJIMA K, KOTAKI H. Determination of methylphenidate and its main metabolite in plasma by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry[J]. Chem Pharm Bullet, 1986, 34(4): 1 701-1 708.
[6] MARCHEI E, FARRE M. Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry determination of methylphenidate and ritalinic acid in conventional and non-conventional biological matrices[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(2): 434-439.
[7] FERNANDEZ M, LALOUP M, WOOD M, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of multiple hallucinogens, ketamine, ritalinic acid and metabolites in urine [J]. J Anal Toxicol, 2007, 31(8): 497-504.