

应用纪要

使用基于UNIFI的沃特世法医毒物筛查应用解决方案测定尿液中的利尿剂

Robert Lee, Michelle Wood

Waters Corporation



仅适用于法医毒理学应用。

摘要

随着运动兴奋剂检测的兴起，人们迫切需要一种快速、准确、可靠且稳定的分析方法来初步筛查大量样品。利用UNIFI扩展法医毒理学应用解决方案测定负离子化合物，可用于稀释尿液中利尿剂含量的检测，因此，该方法能够应用于遵循WADA指导原则的反兴奋剂实验室。

优势

利用UNIFI扩展法医毒物筛查应用解决方案，可以检测和定量尿液中的负离子利尿剂。

简介

利尿剂是一类药物化合物，以促进尿液生成为主要目的。因此，它们可用于治疗包括充血性心力衰竭和高血压在内的多种疾病。在体育运动中，运动员可能会滥用利尿剂，目的是快速减轻体重或保持低体重。利尿剂还可以通过稀释尿液和帮助排泄来掩盖禁用或违禁物质的存在。因此，世界反兴奋剂机构(WADA)禁止运动员使用利尿剂。禁用化合物列表可参见WADA技术文档¹，其中包括至少25种具有利尿特性的化合物。为确保兴奋剂控制实验室之间测定结果的一致性，WADA规定了最低要求执行限量(MRPL)，即实验室预期应检出的违禁物浓度；目前的浓度设定为200 ng/mL²。

UNIFI法医毒物筛查应用解决方案目前包括使用正交加速飞行时间质谱仪以MS^E模式（使用电喷雾电离正离子模式(ESI+)）采集精确质量数，然后将数据与包含1000多种毒理学相关物质的综合数据库进行比对³⁻⁵。然而，许多利尿剂只能在电喷雾电离的负离子模式(ESI-)下电离，因此，我们近期的工作重点便是进一步扩展基于UNIFI的法医毒物筛查应用解决方案的应用范围，将只能在负离子模式下电离的化合物纳入分析范围，并使用该方法测定尿液中利尿剂的存在，特别是当利尿剂浓度低于WADA规定的MRPL时。

实验

ACQUITY UPLC条件

UPLC系统： ACQUITY UPLC I-Class

(FTN)

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS C₁₈,
100A, 1.8 μm, 2.1 mm ×
150
mm (P/N: 186003534)

样品瓶: 12 × 32 mm 螺纹颈口最大
回收样品瓶 (P/N: 186000327c)

柱温: 50 °C

样品温度: 10 °C

进样体积: 10 μL

流速: 0.4 mL/min

流动相A: 含0.001%甲酸的水溶液

流动相B: 含0.001%甲酸的乙腈溶液

梯度: 87% A 等度保持0.5 min,
在4.5 min 时降至5% A, 保
持1 min, 然后切换至87%
A

运行时间: 7.5 min

MS^E条件:

质谱系统:	Xevo G2-S QTof
电离模式:	ESI
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	400 °C
脱溶剂气流速:	800 L/h
参比质量数:	亮氨酸脑啡肽[M-H] ⁻ $m/z = 554.2620$
采集范围:	m/z 50~1000
扫描时间:	0.1 s
毛细管电压:	1.5 KV
锥孔电压:	20 V
碰撞能量:	功能通道1: 6 eV 功能通道2: 从10 eV升至 40 eV

材料

loxinyl, 用作内标(ISTD), 购自Sigma-Aldrich (英国普尔)。用甲醇制备浓度为1 mg/mL的储备液, 并储存在-20 °C条件下。使用前先用0.001%甲酸溶液将储备液稀释至100 ng/mL。

使用的所有其他化学品均为最高级别, 并根据供应商的说明进行储存。

Bio-Rad正常对照尿液购自Bio-Rad Laboratories（英国赫默尔亨普斯特德）。

样品前处理

将乙腈(0.1 mL)加入0.2 mL尿液和ISTD (0.7 mL)中。将样品在1200 rpm转速下涡旋混合5 min，然后在8000 *g*下离心10 min。将上清液转移至最大回收样品瓶（P/N: 186000327c）中。

结果与讨论

本次分析中使用了16种能够在ESI-模式下电离的利尿剂，并在表1中列出了它们的精确中性质量数和UPLC保留时间。列表中包括了五种只能在负离子模式下电离的化合物（苄氟噻嗪、苄噻嗪、呋塞米、氢氯噻嗪和氢氟噻嗪）。

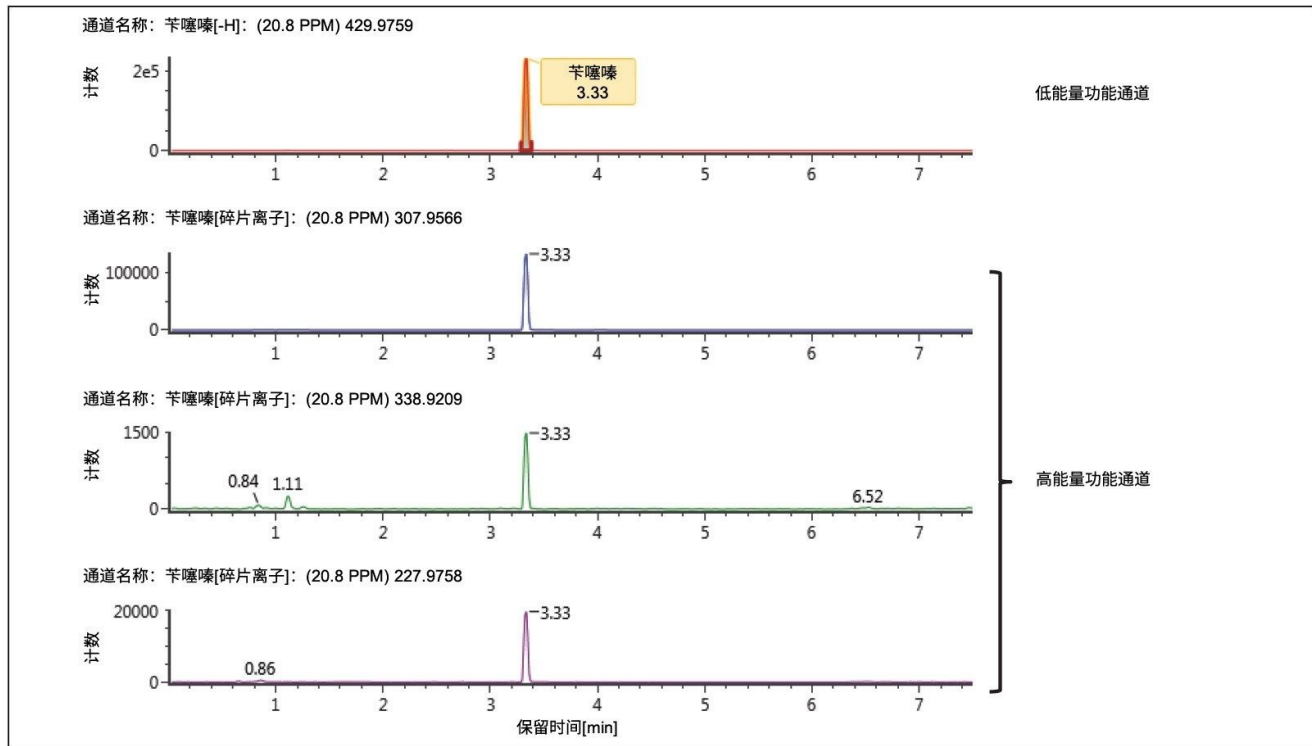


图1.加标WADA MRPL标准芬噻啉(200 ng/mL)的空白尿液样品中的数据信息；高能量功能通道中存在三个碎片离子进一步证实了结果。

每种分析物阳性鉴定结果的可接受标准如下：保留时间与参比值偏差在0.35 min以内，实测母离子质量数与预期值的偏差在5 ppm以内。为了进一步确认，还必须在高能量功能通道中发现至少一种诊断碎片离子。

图2进一步展示了在高能量条件下MS^E方法的实用性和生成的相关碎片离子数据。图中所示为美托拉宗和呋达帕胺的高能量数据，这两种物质具有相同的元素组成(C₁₆H₁₆ClN₃O₃S)，在本研究采用的色谱条件下，洗脱时间也很接近，即相差在0.2 min内。因此，在这些条件下，要区分这两种利尿剂可能比较困难。然而，图中清晰地展示出它们的诊断碎片离子存在明显差异。

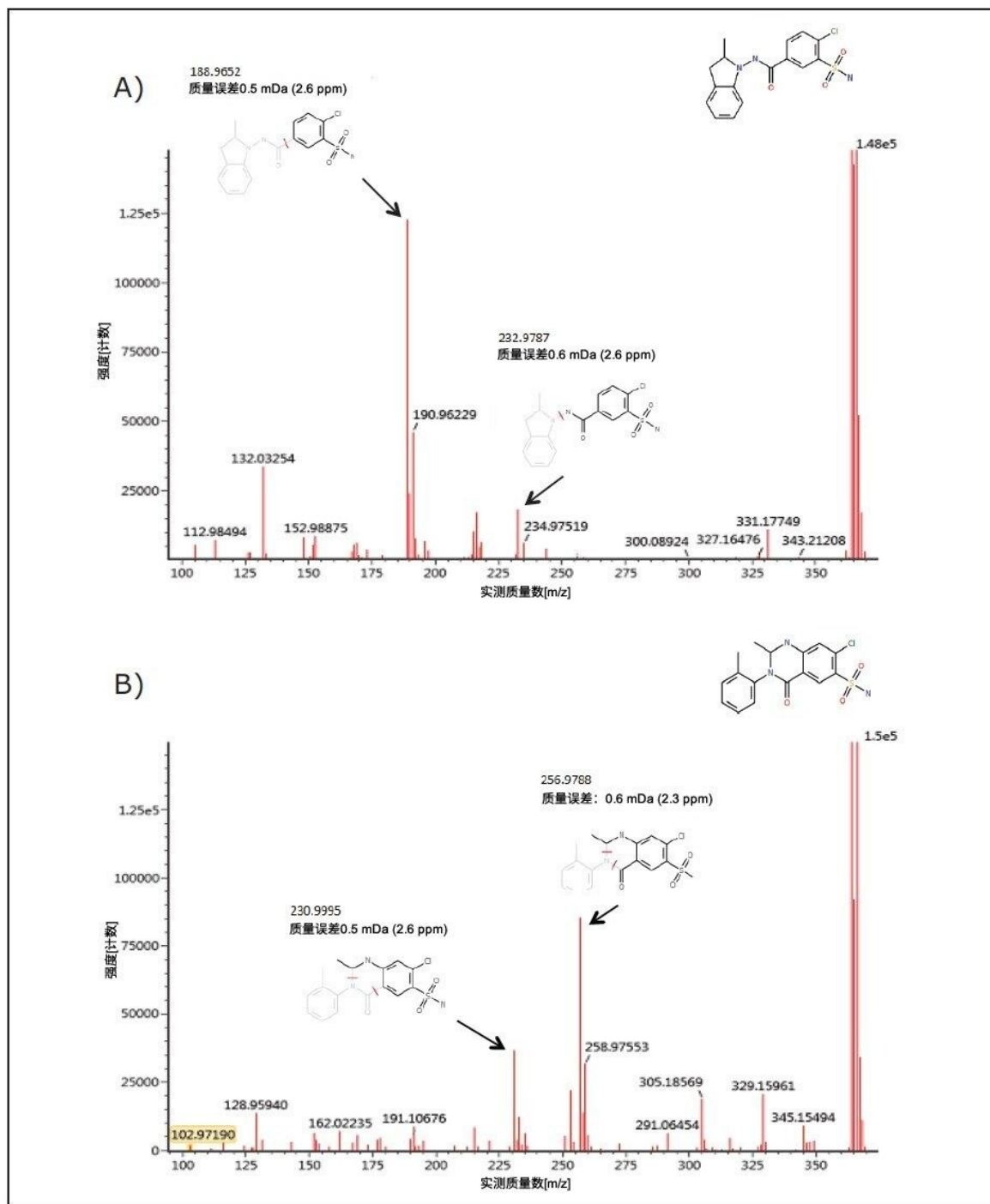


图2.吲达帕胺（图2A）和美托拉宗（图2B）的高能量数据谱图，突出显示了检测到的高能碎片离子差异。

为研究线性，我们按上述方法，在对照尿液样品中加标利尿剂，浓度范围为0~2000 ng/mL，制备了两份样品。每种分析物的响应迹线在处理过程中自动生成，并以ISTD响应为参照。使用1/x加权绘制半定量标准曲线，并对所有分析物应用二次拟合。每种分析物的相关系数均大于0.99。图3所示为呋塞米在0~2000 ng/mL范围内的标准曲线。根据相关标准曲线对加标（按WADA MRPL标准）的尿液样品进行定量分析；所有分析物在该浓度下均得到成功鉴定（阳性）。

图4中展示了分析标准品与加标呋塞米的空白尿液样品中鉴定出的高能碎片离子之间的比较。

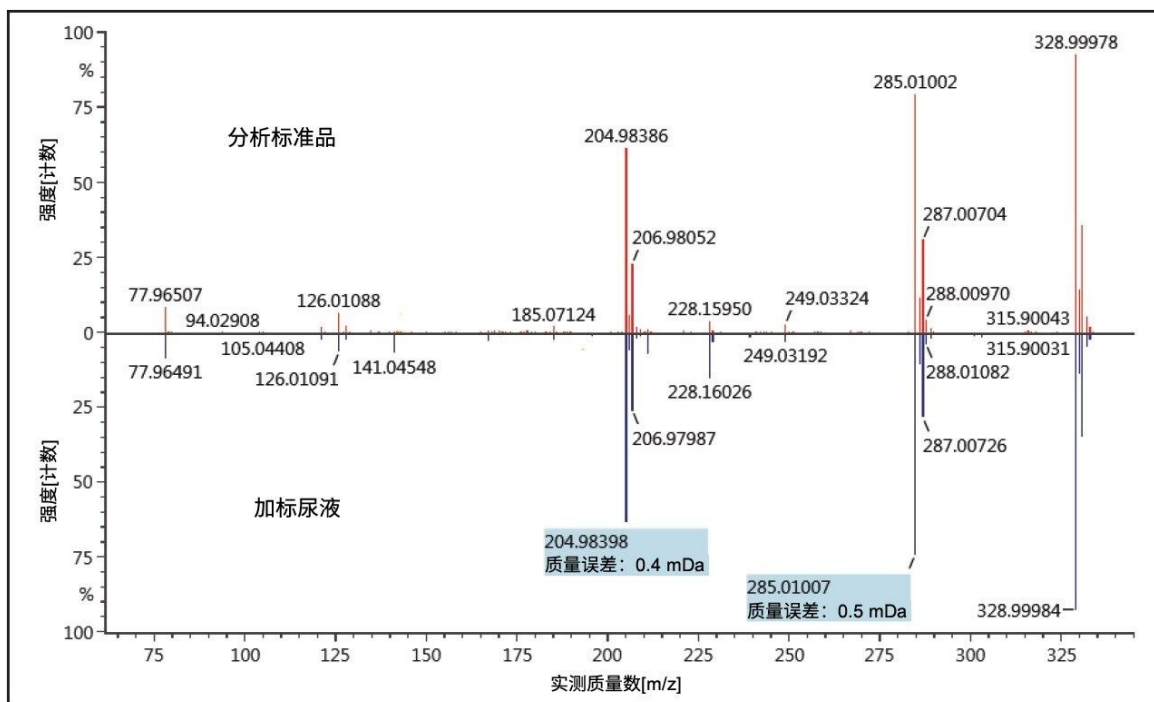


图4.呋塞米的二元比对分析结果（图中已按照鉴定出碎片离子的相对百分比进行了缩放）。这些数据由UNIFI中的二元比对工具生成，突出显示了标准品（上方迹线）与样品数据（下方迹线）之间的质量误差。

真品尿液样品分析

我们按照文中所述的样品前处理方法对一份真实尿液样品进行了分析，结果显示其中含有利尿剂呋塞米。使用UNIFI的代谢物鉴定(Met ID)工具进一步研究数据，结果表明存在第1阶段和第2阶段代谢物。图5所示为母体分子

和最常见代谢物（一种葡糖苷酸结合物）的保留时间(2.69 min)。软件突出展示了代谢转化以及实测保留时间以及实测 m/z 和质量误差（以ppm为单位）。

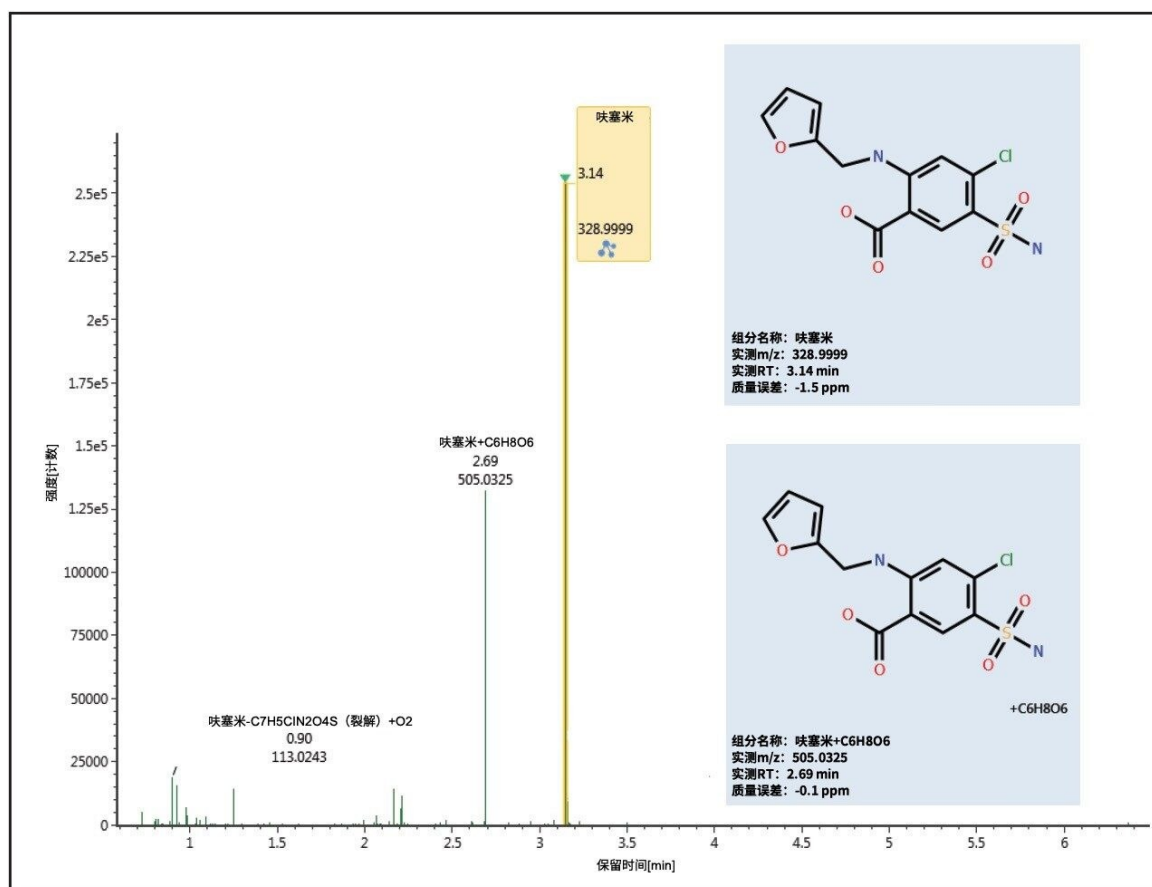


图5.UNIFI Met ID推测在真实尿液样品中检测到的一组可能代谢物（显示了实测 m/z 、质量误差(ppm)、保留时间和转化情况）。

结论

随着运动兴奋剂检测的兴起，人们迫切需要一种快速、准确、可靠且稳定的分析方法来初步筛查大量样品。利用UNIFI扩展法医毒理学应用解决方案测定负离子化合物，可用于稀释尿液中利尿剂含量的检测，因此，该方法能够应用于遵循WADA指导原则的反兴奋剂实验室。

使用UNIFI中的二元比对和代谢物鉴定工具可以突出显示高能碎片离子匹配，从而提高数据的可信度，并有助于在样品中发现数据库中不存在的代谢物。这些代谢物随后可以添加到数据库中。

参考资料

1. The World Anti-Doping Code: The 2015 Prohibited List, International Standard.
<https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-prohibitedlist-en.pdf> (于2015年1月30日访问).
2. The World Anti-Doping Code: Minimum Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-Threshold Substances.WADA技术文档TD2013MRPL 2013.
3. Wood M. MS^E在毒物筛查中的实用性.沃特世技术简报.2010. P/N 720005198ZH.
4. 法医毒物筛查应用解决方案.沃特世产品手册. P/N 720004830ZH.
5. Roberts M和Wood M. 使用UPLC结合精确质量数筛查分析β-受体阻滞剂.沃特世应用纪要.2014. P/N 720005188ZH.

实验室在应用本方法之前，用户有必要对方法进行一次完整的验证。

特色产品

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

UNIFI法医毒理学筛查应用解决方案 <<https://www.waters.com/134779723>>

可在线购买

ACQUITY UPLC HSS C18色谱柱, 100Å, 1.8 μm, 2.1 mm × 150 mm, 1/pkg <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003534>>

LCGC认证透明玻璃12 × 32 mm螺纹颈口最大回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，2 mL体积，100个/包 <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186000327C>>

720005391ZH, 2015年4月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)