

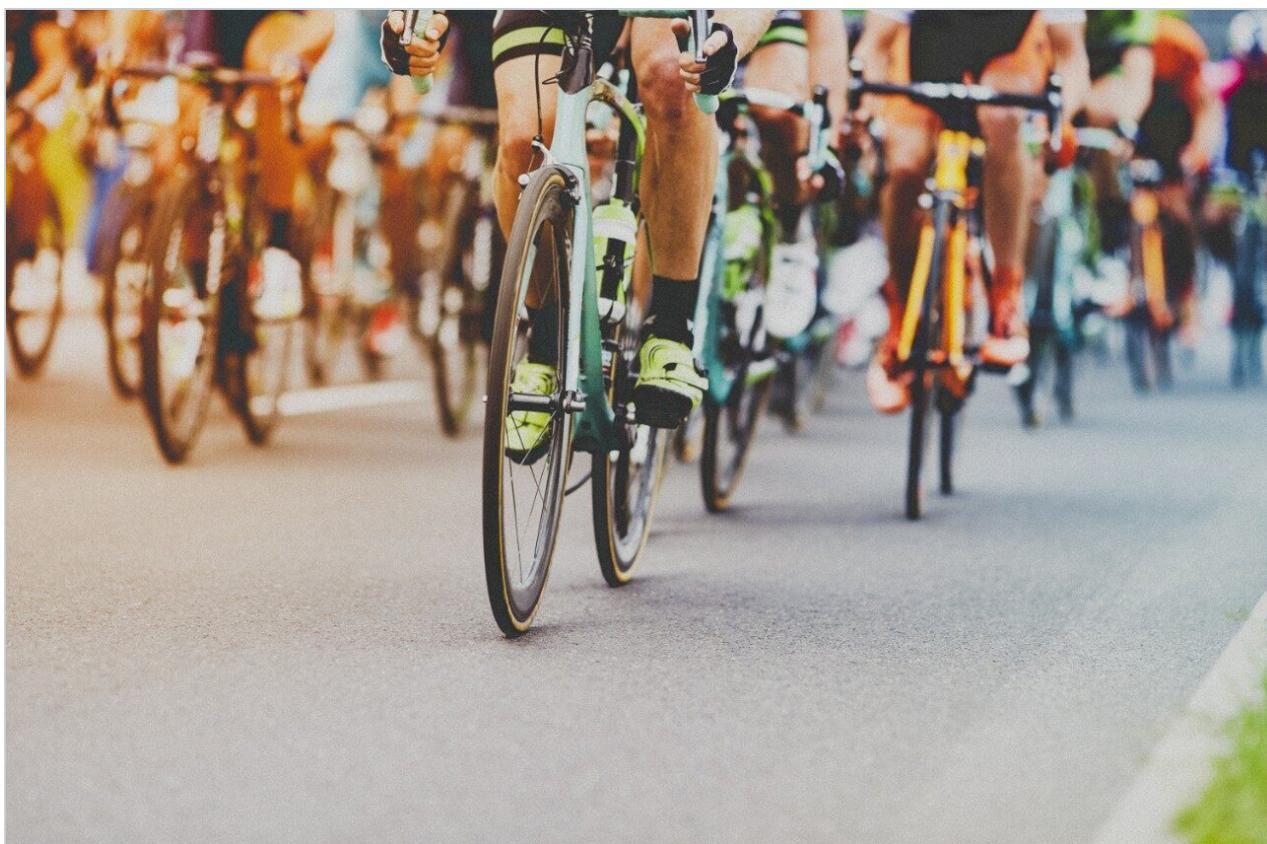
应用纪要

## 利用UPC<sup>2</sup>-MS/MS分析兴奋剂

---

Jonathan P. Danaceau, Ivana Gavrilovi<sup>☒</sup>, Peter Christensen, Michelle Wood

Waters Corporation, Drug Control Centre, King' s College London



仅适用于法医毒理学应用。

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

### 摘要

UPC<sup>2</sup>-MS/MS是一种与GC和LC正交的色谱技术，我们利用UPC<sup>2</sup>-MS/MS开发出一种检测各种兴奋剂的方法。米屈肼、阿米洛利和乙基葡萄糖醛酸苷等强极性化合物得到很好的保留，且大多数其他化合物表现出优异的色谱性能。批内和批间所有化合物的保留时间均保持稳定，%RSD<0.6%。该方法具有良好的分析灵敏度和选择性，可准确检测所有达到或低于WADA最低要求执行限量(MRPL)的化合物。此技术是对GC和LC的重要补充，可以更全面地覆盖反兴奋剂分析所需的色谱空间。

## 优势

- 正交选择性和保留性，能够保留在GC或LC中表现不佳的化合物
- 可对各种兴奋剂进行稳定、可重现的色谱分析
- 具有满足兴奋剂最低要求执行限量(MRPL)所需的分析灵敏度

---

## 简介

世界反兴奋剂机构(WADA)禁用清单[WADA, 2021]目前包含数百种明确禁用的物质，以及未明确命名但属于禁用药物类别的体能增强药物。反兴奋剂实验室面临的挑战之一是需要分析检测的化合物具有各种各样的理化性质。其中许多化合物目前通过LC-MS (LC-HRMS和LC-MS/MS) 和GC-MS (GC-HRMS和GC-MS/MS) 进行分析，但仍有许多物质使用这些技术难以实现可靠鉴定和确认，其中多为极性化合物，在传统色谱平台上的保留性极低，或由于其化学性质导致峰形较差。UPC<sup>2</sup>-MS/MS是一种与GC和LC正交的分离技术，通常可提供其他色谱技术无法实现的分离、分离度和选择性[Nováková, 2015; Losacco, 2020]。本应用简报详细介绍了UPC<sup>2</sup>-MS/MS进行的色谱方法开发，用于分析各种具有不同理化性质的违禁物，包括兴奋剂、类固醇、滥用药物、糖皮质激素、利尿剂、β-受体阻滞剂及其他违禁物。UPC<sup>2</sup>-MS/MS方法可以保留并分离通过其他色谱技术难以分析的化合物（例如米屈肼、阿米洛利和乙基葡萄糖醛酸苷）以及数十种其他检测化合物。对1000个匿名反兴奋剂样本的分析表明，不存在不利的分析结果。批内和批间所有分析物的保留时间均保持稳定，且该方法具有良好的分析灵敏度，能够准确鉴定WADA最低要求执行限量(MRPL)下的所有化合物[WADA, 2019]。

---

## 实验

### 材料

所有分析物的参比标准品和内标均由伦敦国王学院药物控制中心（DCC，英国伦敦）慷慨提供。利用八种化合物进行初始色谱柱筛选和方法开发，这些化合物及其具体的MS条件见表1。

在本研究的第二阶段，考察了范围更大的一组化合物（同样由伦敦国王学院药物控制中心提供；见附录）。将各种参比标准品合并，得到两种混合溶液：QC1和QC2。在甲醇中制备的混合溶液用于方法开发和保留时间验证，在空白尿液中制备的混合溶液用作加标参比样品，分析真实样品批次时将其包含在内。附录列出了化合物、相关浓度、保留时间和具体MS条件。

内标(IS)溶液包含浓度为10 µg/mL的美夫西特、麻黄碱-d<sub>3</sub>和沙丁胺醇-d<sub>3</sub>。

## 真实样品

1000个真实的匿名反兴奋剂尿样由DCC慷慨提供，并使用所列的最终条件进行分析。

## 样品前处理

样品前处理方法改编自Nováková等人[Nováková, 2015]所述的方法。将200 µL尿样用790 µL乙腈和10 µL内标混合物(10 µg/mL)稀释，在5000 rcf下离心10 min；取2 µL上清液注入色谱柱。

## 液相色谱条件

### UPC<sup>2</sup>-MS/MS

液相色谱系统：	ACQUITY UPC <sup>2</sup> 系统
检测器：	Xevo TQ-XS
色谱柱：	Torus Diol (OH)色谱柱, 130 Å, 1.7 µm, 3.0 × 100 mm。
柱温：	35 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	2 µL
流速：	1.2 mL/min
流动相A：	CO <sub>2</sub>
流动相B：	含0.1%浓氨水的甲醇溶液

UPC<sup>2</sup>-MS/MS

补液流速： 甲醇，0.2 mL/min

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
起始	1.2	90	10	6
1.0	1.2	90	10	6
4.0	1.2	50	50	6
4.5	1.0	43.3	56.7	6
5.0	1.0	43.3	56.7	6
5.1	1.2	90	10	6
7.0	1.2	90	10	6

## 质谱条件

质谱系统： Xevo TQ-XS

电离模式： ESI+和ESI-

毛细管电压： 2.0 kV(-2.0 kV)

碰撞能量(CE)： 取决于不同化合物（见附录）

锥孔电压(CV)： 取决于不同化合物（见附录）

## 初始色谱柱测试条件

筛选两个色谱维度以找出最佳条件；这两个维度是有机改性剂组成和色谱柱填料。筛选以下改性剂用于流动相 B (MPB)：无改性剂、0.1%甲酸、0.1%浓氨水和10 mM甲酸铵。将各种改性剂加入甲醇中，用作MPB。

还筛选了四种色谱柱，这些色谱柱具有相同的尺寸和粒径(130 Å, 1.7 μm, 3.0 × 100 mm)。筛选的固定相为：Viridis BEH 2-乙基吡啶(2-EP)、Torus 2-PIC、Torus 1-AA和Torus Diol (OH)。所有色谱柱均使用最终方法中详述的溶剂梯度；除Diol色谱柱以外，所有其他色谱柱的流速均为1.5 mL/min。

化合物	RT (min)	电离模式	CV (V)	[M+H] <sup>+</sup> / [M-H] <sup>-</sup>	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)	CE1 (eV)	CE2 (eV)
达那唑	1.46	Pos	20	338.2	303.3	321.3	15	15
丙酸氟替卡松	1.77	Pos	20	501.2	293.2	313.1	20	15
丙磺舒	3.25	Neg	20	284.1	240.1	140.1	20	20
GW 1516	3.33	Pos	20	454.2	188.1	256.1	45	45
布美他尼	4.10	Neg	20	363.1	207.1	80.0	20	20
米屈肼	4.26	Pos	25	147.1	59.1	132.1	20	15
乙基葡萄糖醛酸苷(EtG)	4.62	Neg	25	221.1	85.0	75.0	15	15
3-OH司坦唑醇-葡萄糖醛酸苷	5.28	Neg	20	519.3	343.2	175.1	40	20

表1. 用于初始UPC<sup>2</sup>测试的化合物

## 结果与讨论

### 色谱柱和改性剂测试

最初使用有限的化合物测试混标评价了四种UPC<sup>2</sup>色谱柱和四种改性剂。使用Viridis 2-EP色谱柱进行的初步测试表明，与使用0.1%甲酸、10 mM甲酸铵或根本不使用改性剂相比，使用0.1%浓氨水可以获得更出色的峰形和保留性。使用其他色谱柱的进一步测试表明，Torus Diol色谱柱在保留性、峰形、减小拖尾和分析灵敏度方面的性能优于其他三种色谱柱，对3-OH司坦唑醇-葡萄糖醛酸苷和米屈肼而言尤其如此。采用Diol色谱柱得到的色谱图示例见图1。该色谱柱对初始的八种被测兴奋剂化合物表现出优异的色谱性能。反相LC或GC方法难以保留的乙基葡萄糖醛酸苷和米屈肼均得到很好的保留，并表现出非常出色的峰形，拖尾很小。其他化合物尽管化学性质多样，但也表现出良好的保留并获得对称峰形。因此继续采用Diol色谱柱分析更大的一组兴奋剂物质以及1000个真实的匿名运动员样本。

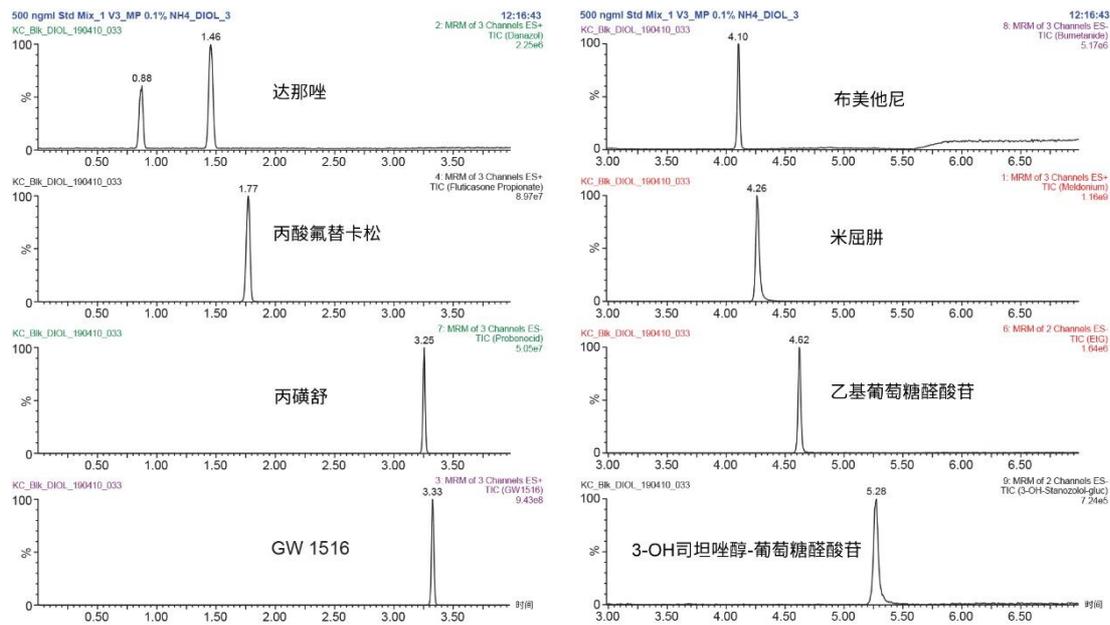


图1.初始筛选实验中兴奋剂化合物的最终色谱图。此分离结果由Torus Diol (OH)色谱柱(130 Å, 1.7 μm, 3.0 × 100 mm)得到。所有分析物的浓度均为500 ng/mL。

## 真品样本分析

利用附录中列出的化合物扩展组筛选1000个真实的反兴奋剂样本。这份物质清单由反兴奋剂实验室的科学家汇编；从中选择化合物，确保其代表WADA禁用清单中的多个关键药物类别。这些化合物的色谱图见图2。大多数化合物在保留性、峰形和选择性方面均表现出良好的色谱性能。例如，尼可刹米虽较早洗脱，但表现出良好的峰形和保留时间稳定性，不同于Losacco等人[2020]所述：使用BEH色谱柱，以甲酸铵作为流动相改性剂时，出现一些保留时间稳定性问题。其他大多数峰均表现出优异的色谱特性。但也有一些例外，比如化合物芬太尼始终表现出双峰。章鱼胺发生明显拖尾，羟吗啡酮和去甲伪麻黄碱发生轻微拖尾。许多硫酸化类固醇发生共流出，或者未与其结构类似物实现完全的基线分离。但是，代表多种化学型的大多数化合物均表现出优异的色谱性能。



UPC<sup>2</sup>成为一种重要的补充方法，扩大了传统色谱方法（例如LC和GC）的适用范围，并通过替代色谱技术提供确认。

## 保留时间稳定性

每批参比标准品（QC1和QC2）在进样开始、中间和结束时的结果显示，所有分析物的保留时间保持稳定。所有化合物的批间保留时间%RSD低于0.6%。其中大多数%RSD低于0.5%，有63%低于0.3%。这些结果轻松满足WADA有关阳性鉴定的保留时间标准[WADA, 2015]。此外，监测每个样品中包含的内标发现，批内保留时间%RSD均低于0.3%。

## 灵敏度

WADA将分析阈值定义为最低要求执行限量(MRPL)。这些值列于附录中，是尿液QC标准品（QC1和QC2）中使用的浓度，但氢氯噻嗪、普萘洛尔和苄氟噻嗪除外，它们的加标浓度为MRPL的50%。未对酮康唑和曲马多确定MRPL，按附录中列出的浓度加标。除酮康唑外，研究的所有化合物均可在所述浓度下通过该系统轻松鉴别。酮康唑的响应接近检测限(50 ng/mL)，但在所有23个批次的所有加标QC样品中仍被检出。丁丙诺啡和芬太尼可分别在5 ng/mL和2 ng/mL的浓度下轻松检出。

---

## 结论

研究证明，使用Xevo TQ-XS的Waters UPC<sup>2</sup>-MS/MS系统对于GC和LC-MS分析是一种可靠的正交替代技术，尤其适用于通过其他色谱方法无法充分保留的极性化合物。所有23批分析物（>1200次进样）的保留时间保持稳定。方法开发表明，在考察的分析参数中，Torus Diol色谱柱与作为流动相改性剂的0.1%浓氨水相结合，使几乎所有化合物都获得理想的色谱结果。即使采用简单的稀释和进样方法，该系统在正离子和负离子ESI模式下所具备的灵敏度和选择性也能够对MRPL浓度的所有加标化合物进行阳性鉴定，在许多情况下，甚至能够鉴定50% MRPL浓度的化合物。

---

## 参考资料

1. World Anti-Doping Agency (WADA) The 2021 Prohibited List.2021 Montreal [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf) <[https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf)> .(Accessed 8 Jan, 2021).

2. World Anti-Doping Agency, TD2019MRPL (WADA) Minimum Required Performance Levels for Identification of Non-Threshold Substances.2019, Montreal, [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl\\_eng.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf) <[https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl\\_eng.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf)> .(Accessed 8 Jan, 2021).
3. World Anti-Doping Agency.TD2015IDCR.Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes.2015. Montreal, <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2015idcr> <<https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2015idcr>> .(Accessed 8 Jan, 2021).
4. Nováková, L, Rentsch M, Grand-Guillaume Perrenoud, A, Nicoli, R., Saugy, M., Veuthey, J, Guillaume, D. Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Screening of Doping Agents.II: Analysis of Biological Samples.Analytica Chimica Acta 2015 (853); 647–659.
5. Losacco, G, Rentsch, M, Plachká, K, Monteau, F, Bichon, E, LeBizec, B, Nováková, L, Nicoli, R, Kuuranne, T, Veuthey, J, Guillaume, D. Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Antidoping Analyses: Assessment of the Inter-Laboratory Reproducibility with Urine Samples.Analytical Science Advances 2020; 1–8.

## 致谢

Jonathan P. Daneaceu、Peter Christensen和Michelle Wood - 沃特世公司

Ivana Gavrilovi☒ - 伦敦国王学院药物控制中心

## 附录. 所有分析物的保留时间(RT)、浓度和MS条件

化合物	RT (min)	浓度 (ng/mL)	电离模式	[M+H] <sup>+</sup> / [M-H] <sup>-</sup>	CV (V)	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)	CE1 (eV)	CE2 (eV)
阿米洛利	4.40	100	正	230.0	4	171.0	116.1	18	30
安非他命	2.54	100	正	136.1	10	91.1	119.0	10	10
19-去甲硫酸雄酮	3.81	50	负	355.1	30	355.1	231.1	25	40
19-去甲硫酸本胆烷醇酮	3.83	50	负	355.2	30	355.2	231.1	25	40
5a-DHT-硫酸盐	3.81	50	负	369.2	30	369.1	285.2	25	40
硫酸雄酮	3.81	200	负	369.2	30	369.2	259.1	25	40
阿替洛尔	3.51	100	正	267.2	10	116.0	190.2	18	20
苄氟噻嗪	3.51	100	负	420.1	56	289.0	328.2	22	30
苯甲酰芽子碱	3.07	100	正	290.2	2	168.1	105.1	30	18
倍他米松	2.82	30	正	393.2	20	355.0	279.0	20	20
丁丙诺啡	1.55	5	正	468.3	58	414.2	55.0	32	4
去甲伪麻黄碱	3.16	100	正	134.1	44	117.1		25	
可待因	2.05	50	正	300.1	28	215.1	165.0	24	38
皮质醇	2.74	30	正	363.2	25	121.1	91.1	22	50
可的松	2.83	30	正	361.2	25	343.2	325.2		
地塞米松	2.79	30	正	393.2	20	355.0	279.0	20	20
硫酸脱氢表雄酮	3.81	200	负	369.2	30	369.1	285.2	25	40
麻黄碱-d3 (内标)	<b>2.65</b>	<b>100</b>	<b>正</b>	<b>169.1</b>	<b>2</b>	<b>151.1</b>	<b>115.1</b>	<b>10</b>	<b>25</b>
麻黄碱	2.64	100	正	166.1	2	148.1		10	
依替福林	3.32	100	正	182.1	20	135.0	164.1	12	30
非诺特罗	4.17	20	正	304.2	38	135.1		16	
芬太尼	0.92	2	正	337.2	30	188.2	105.1	20	35
福莫特罗	3.61	20	正	345.1	10	149.1		18	
氢氯噻嗪	4.19	100	负	295.9	62	269.0		20	
酮康唑	2.33	50	正	531.3	20	489.0		20	
美夫西特 (内标)	<b>2.21</b>	<b>100</b>	<b>正</b>	<b>383.3</b>	<b>20</b>	<b>285.0</b>	<b>190.0</b>	<b>10</b>	<b>25</b>
米屈胍	4.26	200	正	147.1	25	59.1	132.2	20	15
甲基苯丙胺	2.05	100	正	150.1	18	91.1	119.1	16	9
吗啡	3.04	50	正	286.1	25	201.1	165.1	25	35
硫酸诺龙	3.94	50	负	353.2	30	353.1	271.1	25	40
尼可刹米	0.66	100	正	179.1	44	108.1		18	
章鱼胺	4.09	1000	正	136.0	40	91.1		16	
奥洛福林	3.51	100	正	182.0	20	105.0		20	
羟吗啡酮	2.08	50	正	302.1	34	227.1	242.1	25	25
泼尼松龙	2.25	30	正	361.2	25	343.2	325.2	20	20
丙磺舒	2.95	100	负	284.1	50	240.1	139.9	16	24
普萘洛尔	2.62	50	正	260.2	10	116.1	183.2	16	16
伪麻黄碱	2.64	100	负	166.1	2	148.1		10	
利他林酸	3.54	100	正	220.1	25	84.0	56.0	40	40
沙丁胺醇-d3 (内标)	<b>3.43</b>	<b>500</b>	<b>正</b>	<b>243.2</b>	<b>20</b>	<b>225.1</b>	<b>151.1</b>	<b>7</b>	<b>25</b>
沙丁胺醇	3.43	500	正	240.1	20	222.0	166.0	7	10
沙美特罗	3.56	20	正	416.2	50	380.2		18	
硫酸表睾酮	3.87	50	负	367.2	30	367.2	351.1	25	30
硫酸睾酮	3.90	50	负	367.2	30	367.2	351.1	25	30
THC-COOH	2.51	150	正	345.2	25	193.0	299.2	25	25
曲马多	1.67	50	正	264.2	25	58.0		15	
异庚胺	2.18	100	正	116.0	18	57.1		10	

---

## 特色产品

ACQUITY UPC2系统 <<https://www.waters.com/134658367>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007172ZH, 2021年2月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.