

液质联用-同位素内标法测定赛马血液、尿液中茶碱残留

宋小霞^{a,b}, 白玉廷^{a,b}, 秀仁高娃^{a,b}, 毛伟^{a,b,c}, 斯琴塔娜^{a,d}, 李培锋^{b,c}, 曹金山^{b,c*} (内蒙古农业大学, a.马违禁药品检测实验室, b.兽医学院, c.农业部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, d.理学院, 内蒙古 010018)

摘要: 目的 建立液质联用-同位素内标法测定赛马血液和尿液中茶碱残留的方法。方法 采用 6D-茶碱作为内标物, 利用强阳离子固相萃取小柱提取茶碱。采用 Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 2.7 μm), 0.1% 甲酸水溶液(5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵)-0.1% 甲酸乙腈为流动相, 梯度洗脱; 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 电喷雾源(ESI)离子源; 正离子模式; 茶碱以 181.1>124.1, 96.0 m/z(内标物 187.1>126.9, 99.0 m/z)以多反应监测(MRM)扫描方式进行定性定量。结果 使用 Waters Oasis PRIME MCX 3CC/60 mg 固相萃取小柱最优, 血清和尿液茶碱浓度在 1.00~100.00 ng·mL⁻¹, 2.50~100.00 ng·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好(r^2 分别为 0.999 9 和 0.999 6), 检测限为 0.30, 0.75 ng·mL⁻¹, 定量限为 1.00, 2.50 ng·mL⁻¹, 相对回收率分别为 98.93%~114.49%、94.85%~116.25%, 批内精密性≤3.81%, 批间精密性≤15.53%, 血清基质对茶碱有较强抑制作用, 尿液抑制作用较弱。结论 经方法学验证, 该方法操作简单、快速、准确、灵敏度高, 可适用于马兴奋剂中茶碱残留量的检测。

关键词: 茶碱; 液质联用; 兴奋剂; 血液; 尿液

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)11-1332-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.11.009

引用本文: 宋小霞, 白玉廷, 秀仁高娃, 等. 液质联用-同位素内标法测定赛马血液、尿液中茶碱残留[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1332-1338.

Determination of Theophylline Residues in Racehorse Serum and Urine by Liquid-mass-isotope Internal Standard Method

SONG Xiaoxia^{a,b}, BAI Yuting^{a,b}, XIUREN Gaowa^{a,b}, MAO Wei^{a,b,c}, SIQIN Tana^{a,d}, LI Peifeng^{b,c}, CAO Jinshan^{b,c*} (Inner Mongolia Agricultural University, a.Equine Anti-doping Laboratory, b.College of Veterinary Medicine, c.Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease, Ministry Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, d.College of Science, Hohhot 010018, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of theophylline residues in racehorse serum and urine by liquid-mass-isotope internal standard method. **METHODS** The strong cation exchange solid phase extraction was used to extract theophylline combined 6D-theophylline as internal standard. The Poroshell 120 SB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 2.7 μm) was chosen, with 0.1% formic acid(containing 5 mmol·L⁻¹ ammonium formate)-0.1% formic acid acetonitrile by gradient elution. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. Electrospray source(ESI) ion source was used. Multi-reaction positive mode was used and ion pair of 181.1>124.1, 96.0 m/z and 187.1>126.9, 99.0 m/z were used for qualitative of theophylline and internal standard respectively. **RESULTS** Waters Oasis PRIME MCX 3CC/60 mg solid phase extraction column was optimal. The concentrations of serum and urine ranged 1.00–100.00 ng·mL⁻¹ and 2.50–100.00 ng·mL⁻¹ had a good linear relationship with the peak area(r^2 were 0.999 9 and 0.999 6, respectively). The detection limits were 0.30, 0.75 ng·mL⁻¹, and the quantitative limits were 1.00, 2.50 ng·mL⁻¹. The relative recoveries were 98.93%–114.49% and 94.85%–116.25%, respectively. The intra-batch precision RSD was≤3.81%, and the inter-batch precision RSD was ≤15.53%. The serum matrix had a strong inhibitory effect on theophylline, and the inhibition effect of urine was weak. **CONCLUSION** The method was proved to be simple, rapid, accurate and sensitive, and can be applied to the determination of theophylline residue in horse race doping control samples.

KEYWORDS: theophylline; LC-MS/MS; doping; serum; urine

茶碱(1,3-二甲基黄嘌呤)属于黄嘌呤类药物, 广泛存在于自然界植物中, 如可可豆、茶叶^[1-2]等。茶碱具有舒张平滑肌的作用, 临床上广泛用

于治疗哮喘和慢性阻塞性肺病^[3], 最新研究表明, 低剂量的茶碱具有抗炎和免疫调节作用^[4-5]。自内蒙古农业大学马违禁药物检测实验室成立以来,

基金项目: 内蒙古自治区重大专项(201602053); 内蒙古农业大学引进优秀博士人才科研启动项目(RZ1900003570)

作者简介: 宋小霞, 女, 硕士生 Tel: 13404803963 E-mail: sxx799112099@163.com *通信作者: 曹金山, 男, 博士, 教授 Tel: (0471)4309175 E-mail: jinshancao@imau.edu.cn

茶碱便是中国马会主办赛事中筛出最多的违禁物质之一。作为常见药物成分及天然活性化合物,茶碱是赛马运动中被明确禁止的化学物质^[6],同时是另一种违禁物质——咖啡因的体内代谢产物^[7-8]。比赛中不当使用茶碱会对马匹造成多种不良后果并存在体育伦理问题^[9-12]。为完善茶碱自初筛到确证的定量方法,使中国赛马兴奋剂检测水平与国际接轨。本研究对赛马血液及尿液样本中茶碱的确证方法进行了研究。

目前,茶碱浓度的检测样本普遍是血清,尿液中检测方法较少,检测方法主要有气相色谱法^[13-14]、液相色谱法^[15-19]、石墨电极法^[20-21]、免疫法^[22]以及最新的纸喷质谱法^[23]等。气相色谱法检测茶碱虽灵敏度较高,但不易气化需衍生化,导致其操作复杂、耗时较长等。液相色谱法检测茶碱虽用时不长,但由于临床检测的需要导致茶碱检测限较高,或者多种药物同时检测也会增加检测时间。免疫法是基于与底物反应检测,容易受基质内源性物质干扰,可能造成假阳性的检测结果。石墨电极法虽然检测灵敏度高,但是由于电极法检测具有局限性,很多实验室无此仪器不能完成检测。这些检测方法都无法满足赛马运动中违禁物质检测要求。并且人尿样本与马尿样本在成分及理化性质上也有巨大差异,如黏度及酸度。目前还没有一种专门针对马体液且是单独检测茶碱的方法。

通常赛马违禁药物检测样本多是尿液或者血液,由于基质复杂,干扰化合物种类较多,使用普通前处理方法和检测方法很难达到其检测限要求^[24]。质谱技术具有高灵敏度和专属性,但容易受到生物样本基质的影响,所以针对血样和尿样,常使用阳离子交换的固相萃取小柱进行富集,从而提高检测灵敏度。本研究采用固相萃取结合液相色谱串联三重四级杆的方法检测马血液和尿液中茶碱残留。

1 仪器与试剂

Agilent 1290/6460 型液相色谱串联三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司); Thermo MULTIFUGE X3R 冷冻离心机(美国 Thermo 公司); ME55/02 型电子分析天平、SevenCompact™ S220 pH/离子计(瑞士梅特勒托利多公司); KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 不同规格的移液

枪(德国 Eppendorf 艾本德股份公司)。

茶碱对照品(Sigma-Aldrich, CAS: 58-55-9; 批号: J1H052; 纯度>99.9%); 6D-茶碱对照品(加拿大 C/D/N Isotopes Inc, CAS: 117490-39-8; 批号: M-380; 纯度: 99.9%); 乙腈, 乙酸乙酯, 异丙醇、甲醇均为色谱纯, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 超纯水(香港屈臣氏集团有限公司); 氨水、甲酸、甲酸铵、二氯甲烷、磷酸均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 0.22 μm 针式过滤器(美国 Agilent 公司)。茶碱和内标(6D-茶碱)的结构图见图 1。

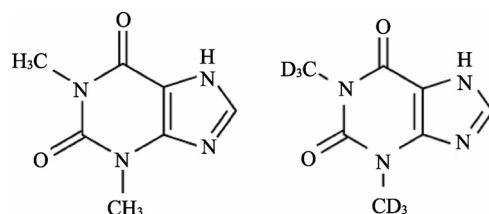


图 1 茶碱与 6D-茶碱结构示意图

Fig. 1 Structures of theophylline and 6D-theophylline

5 种不同厂家及不同规格的固相萃取小柱:

Waters Oasis PRIME MCX 3CC/60 mg; Waters Oasis MCX 3CC/60 mg; Quiclean MCX(北京尚维理化科技有限公司) 3CC/60 mg; Agilent Bond Elut PRS 200 mg/3 mL; Agilent Bond Elut Certify 130 mg/3 mL。

阴性尿样采集于青海省都兰县宗加镇柴达木盆地散养 4 岁公马尿; 马血清来源于草原绿野公司, 实验所用生物样品均保存为-20℃冰箱(说明: 本实验血液样本采用血清替代)。

2 方法与结果

2.1 仪器条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Poroshell 120 SB-C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 2.7 μm)及配套保护柱; 柱温 35℃; 流速 0.4 mL·min⁻¹; 流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液(5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵), B 为 0.1%甲酸乙腈, 梯度洗脱(0~2.5 min, 8%B; 2.5~4.0 min, 8%→100%B; 4.0~5.0 min, 100%B; 5.0~6.0 min, 100%→8%B); 后运行 2 min。

2.1.2 质谱条件 电喷雾源(ESI)离子源; 多反应监测(MRM)正离子模式; 毛细管电压 4 000(+), 3 500(-); 源温度: 350℃; 载气流量 8 L·min⁻¹; 驻留时间(Dwell): 78; 茶碱和内标定性定量离子对、碎裂电压以及碰撞能量见表 1。

表 1 茶碱和内标的离子对、碎裂电压以及碰撞能量
Tab. 1 Ion pair, fragment voltage and collision energy of theophylline and internal standard

化合物	定性离子对	定量离子对	碎裂电压/V	碰撞能量/eV	碰撞池加速电压/V
茶碱	181.1>124.1	181.1>124.1	110	18	3
	181.1>96.0			25	3
6D-茶碱	187.1>126.9	187.1>126.9	110	20	3
	187.1>99.0			26	3

2.2 溶液的制备

2.2.1 茶碱及内标对照品溶液配制 精密称取茶碱对照品 10.00 mg, 精密量取定量甲醇溶解, 使浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为储备液, -20°C 冰箱保存。用甲醇依次梯度稀释至 $10.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为茶碱对照品溶液, 4°C 冰箱保存备用。

6D-茶碱对照品溶液配制: 精密称取 6D-茶碱对照品 10.00 mg, 精密量取定量甲醇溶解, 使浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为储备液, -20°C 冰箱保存。用甲醇依次梯度稀释至 $500.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为内标对照品溶液, 4°C 冰箱保存备用。

4%磷酸溶液: 准确移取磷酸溶液 11.76 mL 至 250 mL 量瓶, 用去离子水定容至刻度, 摇匀备用。

2.2.2 加标试样的制备 在空白血清(尿液)中加入茶碱对照品溶液, 梯度稀释浓度为 $100.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的血清(尿液)溶液, 其他浓度溶液以此稀释, 采取现用现配的方式。

2.2.3 质控样品的制备 在空白基质(血清或尿液)中加入茶碱对照品溶液, 梯度稀释浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的茶碱基质(血清或尿液)溶液, 用空白基质(血清或尿液)稀释为相应质控点浓度的溶液, 现用现配。尿液茶碱质控点浓度为 2.5, 10, $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 血清茶碱质控点浓度为 1, 10, $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 生物样品处理

精密取血清样品 1.00 mL 加 6D-茶碱对照品溶液 40.0 μL , 加入 200 μL 10%三氯乙酸脱蛋白, 静置 10 min、离心($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 移取上清液(尿液样品需预离心, 取澄清液 1.00 mL 加 6D-茶碱对照品溶液 40.0 μL), 加 4% 磷酸溶液 1.5 mL(尿样加 2.0 mL)混匀, 静置 10 min。移入固相萃取小柱(Oasis PRIME MCX 3CC/60 mg), 流速为 3~4 s 间隔滴落每滴样品。依次以 2%甲酸溶液(含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵)2 mL、10%甲醇水溶液

2 mL 淋洗、抽干。最后血清样品以 3%氨水甲醇溶液 1 mL $\times$ 2 次洗脱[尿样用 2%氨水的乙酸乙酯/二氯甲烷/异丙醇(5:4:1)混合液 1 mL $\times$ 2 次洗脱], 合并洗脱液, 于 40°C 加热炉中氮气吹干, 残渣用 200 μL 水/乙腈(92:8)流动相复溶, 用 0.22 μm 针式过滤器过滤, 利用 LC-MS/MS 上机检测($n=6$), 进样量 5 μL 。通过积分软件自动积分分别求得茶碱和内标物定量离子的峰面积。

2.4 样品前处理方法的优化

2.4.1 固相萃取柱选择 固相萃取柱的填料类型、粒径以及容量会对被测物的保留、操作时间产生重要影响。准确移取“2.2.2”项下制备的 $100.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茶碱血清待测溶液 1.00 mL, 根据每种固相萃取小柱厂家推荐步骤分别对该样本提取、吹干、上机检测, 得峰面积 A_1 。每种类型固相萃取小柱平行样 3 个, 共 5 种固相萃取柱。同时各取 1.00 mL 空白血清操作同上, 吹干后用 $500.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茶碱对照品溶液定容上机、检测, 得峰面积 B_1 。 A_1/B_1 即为提取回收率, 以提取回收率为纵坐标, 固相萃取柱类型为横坐标作图。结果可知 Oasis PRIME MCX 与 Oasis MCX 均有较高提取率, 由于 Oasis MCX 上样前需要活化, 因而选择前处理相对简便的 Oasis PRIME MCX 进行下面试验。结果见图 2。

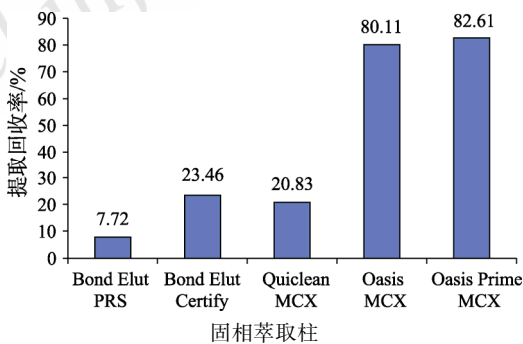


图 2 固相萃取柱类型提取回收率的影响

Fig. 2 Effect of solid phase extraction column type on recovery

2.4.2 上样溶液酸碱性的选择 溶液上固相萃取柱之前必须通过加酸或碱保证被测物质处于合适的电离状态, 从而达到与固相萃取柱较好的吸附效果。本实验选用 4%磷酸调节上样溶液 pH 值, 将茶碱分子变为阳离子状态, 此外磷酸可以稀释样品降低黏度, 保证样品与吸附剂的充分吸附, 同时有助于破坏样品中蛋白质结合。根据“2.2.2”

项下方法制备 $100.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茶碱血清溶液,精密移取马血清样品 1.00 mL 3 份,每份平行样 3 个。按照“2.3”项下方法操作,样品前处理时分别加 $1.00, 1.50, 2.00 \text{ mL}$ 4%磷酸,其他步骤不变。最后以不同体积的磷酸溶液作为横坐标,茶碱定量离子 124.1 m/z 峰面积为纵坐标作图。实验测得加 $1.00, 1.50, 2.00 \text{ mL}$ 4%磷酸对应茶碱定量离子峰面积平均值为 $10\,401, 10\,672, 11\,174$,峰面积相差不大,但加入 1.50 mL 磷酸对应的茶碱峰面积 RSD 为 $1.10\%, 1.38\%, 1.18\%$,RSD 较稳定,因此最终选择 1.50 mL 磷酸作为血清上样酸化体积。

2.4.3 淋洗液的选择 增加淋洗液的步骤目的是尽可能多的除去杂质干扰,但不影响被测物质的保留。根据“2.2.2”项下方法制备 $100.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茶碱血清溶液,精密移取 1.00 mL 6 份,每份平行样 3 个。按照“2.3”项下方法操作,淋洗步骤分别用不同浓度甲醇水溶液($10\%, 20\%, 30\%, 50\%, 80\%, 100\%$)进行淋洗,其他步骤不变。以不同浓度的甲醇水溶液作为横坐标,茶碱定量离子峰 124.1 m/z 面积为纵坐标作图。结果显示,选用 10% 甲醇水溶液得到茶碱定量离子 124.1 的峰面积最大,即最终 10% 甲醇水溶液对茶碱保留能力最大。故选用 10% 甲醇水溶液作为该实验淋洗液。结果见图 3。

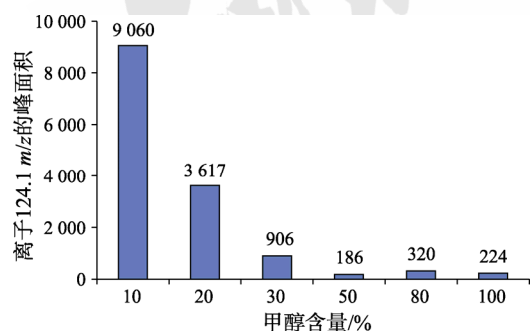


图3 淋洗液的甲醇含量对组分回收率的影响
Fig. 3 Effect of methanol concentration on the recovery

2.4.4 洗脱液的影响 洗脱液要求能最大程度地洗脱下被测组分,最小程度洗下无关物质,使基质效应最小。根据“2.2.2”项下方法制备 $100.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茶碱血清溶液,精密移取 1.00 mL 5 份,每份平行样 3 个。按照“2.3”项下方法操作,洗脱步骤分别用不同浓度氨水甲醇溶液($3.0\%, 4.0\%, 5.0\%, 6.0\%, 7.0\%$)进行洗脱,其他步骤不变。以不同浓度氨水甲醇溶液为横坐标,茶碱定

量离子 124.1 m/z 峰面积为纵坐标作图。结果显示,选用 3% 氨水甲醇洗脱效果较好,该浓度下对应茶碱绝对回收率最高,故选用 3% 氨水甲醇作为血清最终洗脱液。结果见图 4。

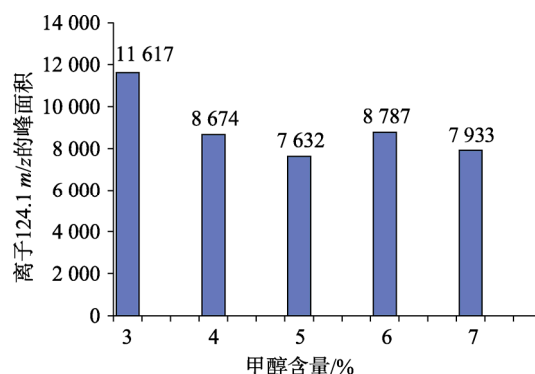


图4 洗脱液的氨水含量对回收率的影响
Fig. 4 Effect of ammonium hydroxide concentration on recovery

2.5 方法学的验证

2.5.1 专属性考察 考察不同血清和尿液中内源性物质对茶碱的干扰情况。分别取 6 份不同来源的血清和尿液,取 6 份不同来源的阴性血清和尿液,以及在阴性样本中分别添加 $50.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茶碱和内标工作液,按照“2.3”项下方法操作,色谱图见图 5。茶碱及内标在基质中保留时间固定,茶碱和内标物拖尾因子为 $1.59, 1.53$,拖尾因子稳定性较好,不影响定量且满足实验对定量离子要求。血清和尿液中内源性物质不会对茶碱和内标测定造成干扰,说明该方法专属性强。

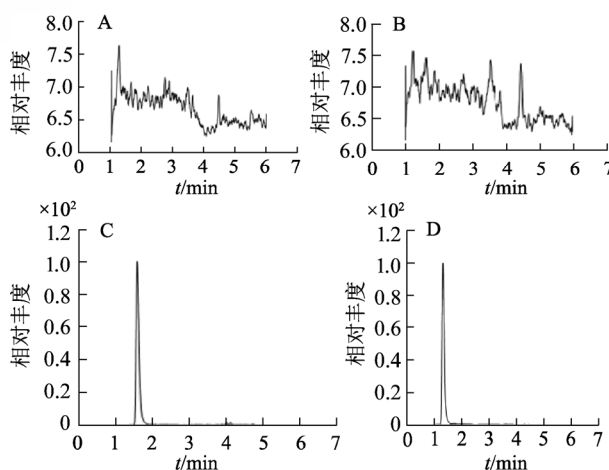


图5 色谱-质谱条件优化结果
A-空白血清; B-空白尿液; C- $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 茶碱于血清; D- $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标物于血清。
Fig. 5 Result of condition optimization chromatogram /mass spectrometry
A-blank serum; B-blank urine; C- $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ theophylline in serum; D- $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IS in the serum.

2.5.2 线性关系考察 根据“2.2.2”项下方法制备 100.00 ng·mL⁻¹ 茶碱基质(血清或尿液)溶液, 然后依次稀释至茶碱浓度为 1.00, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 ng·mL⁻¹ 的茶碱血清溶液和茶碱浓度为 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 ng·mL⁻¹ 的茶碱尿液溶液, 分别按“2.3”项下方法操作。以基质中茶碱浓度为横坐标(*X*), 茶碱定量离子 124.1 *m/z* 与内标物 126.9 *m/z* 定量离子峰面积比值为纵坐标(*Y*)绘制线性回归曲线, 并求出对应的方程。当信噪比 *S/N*=3 和 *S/N*=10 时, 茶碱的浓度作为检出限和定量限, 同时定量限要求精密度 *RSD*<20%。

计算得茶碱在血清、尿液中的线性方程为 $Y=0.060\ 4X-0.013\ 7(r^2=0.999\ 9)$; $Y=0.050\ 3X-0.064\ 4(r^2=0.999\ 6)$, 检出限为 0.30, 0.75 ng·mL⁻¹, 定量限为 1.00 ng·mL⁻¹(*n*=6, *RSD*=3.47%) 和 2.5 ng·mL⁻¹(*n*=6, *RSD*=3.17%)。表明茶碱在血清 1.00~100.00 ng·mL⁻¹ 和尿液 2.50~100.00 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.5.3 准确度和精密度考察 分别按照“2.2.3”项下方法配制高、中、低浓度质控样品, 按“2.3”项下方法操作。每个浓度样品 3 份, 连续测定 3 批。根据测定结果计算批内、批间精密度与准确度。结果显示, 茶碱在血清和尿液批内精密度 ≤ 3.81%, 批间精密度 ≤ 15.53%, 血清和尿液中回收率 98.93%~114.49%, 94.85%~116.25%, 说明该方法精密度良好, 准确度达到定量分析要求。结果见表 2。

表 2 准确度与精密度试验结果($\bar{x} \pm s$, *n*=3)
Tab. 2 Results of accuracy and precision test($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

样品	理论浓度/ ng·mL ⁻¹	实测浓度/ ng·mL ⁻¹	回收率/ %	批内精 密度/%	批间精 密度/%
血清	1.00	1.14±0.03	114.49	3.30	6.26
	10.00	9.89±0.19	98.93	3.23	3.84
	50.00	49.66±0.84	99.33	3.81	8.19
尿液	2.50	2.90±0.00	116.25	2.97	15.53
	10.00	9.49±0.01	94.85	1.72	9.85
	50.00	48.77±0.07	97.53	0.24	5.26

2.5.4 提取回收率与基质效应 分别按“2.2.3”项下方法配制高、中、低浓度质控样品各 3 份, 按“2.3”项下方法操作, 即为基质前加标样品; 另取阴性空白基质样本(血清或尿液)各 3 份, 按照“2.3”项下方法操作吹干后, 以相当量浓度的茶

碱对照品溶液进行定容上机, 即为基质后加标样品; 另取相应浓度茶碱对照品溶液上机测定, 即为茶碱对照品溶液。计算如下: 提取回收率为基质前加标与基质后加标的比值, 绝对回收率为基质前加标与纯对照品溶液的比值, 基质效应为基质后加标溶液与纯对照品溶液的比值。结果显示, 血清和尿液提取回收率均达到痕量分析的基本要求(>60%), 血清样品中提取率效率极佳, 均>97%, 尿液样品中提取回收率相对较差且不稳定, 但也能>65%。该方法前处理用于 ESI-MS/MS 定量分析时, 血清与尿样均有不同程度的抑制性基质效应。其中血清样品基质成分对茶碱的离子化抑制较强, 基质效应值高达 82.45%, 尿液样品抑制较弱。结果见表 3。

表 3 提取回收率、绝对回收率和基质效应
Tab. 3 Extraction recovery, absolute recovery and matrix effects

样品	浓度/ng·mL ⁻¹	提取回收率/%	绝对回收率/%	基质效应/%
血清	1.00	98.12	32.81	33.44
	10.00	98.05	29.15	29.73
	50.00	97.50	34.19	35.07
尿液	2.50	77.67	70.41	78.67
	10.00	80.01	61.54	76.91
	50.00	65.38	53.91	82.45

2.5.5 稳定性试验 稳定性可能对检测结果的可靠性、可重复性产生影响, 因此有必要对影响稳定性的各因素(样本采集、处理、保存等)进行考察^[25]。稳定性试验分为样本(血清、尿液)稳定性试验和样品稳定性试验。样本稳定性考察了一定时间内不同贮藏条件对样本中茶碱含量的影响。样品稳定性试验考察了样本经前处理后上机测试之前, 一定条件放置对待测组分茶碱含量的影响。分别按照“2.2.3”项下方法操作, 配制高、中、低浓度质控样本(尿液), 样本分别室温放置 24 h, -20 °C 放置 28 d 和 -20 °C 放置 28 d 期间反复冻融 3 次进行处理, 最后按照“2.3”项下方法操作。同时将高、中、低浓度质控样本(血清、尿液)按照“2.3”项下方法操作, 处理后样品分别室温放置 24 h, 室温、4 °C 和 -20 °C 放置 1 周, 上机检测。

经测定, 血清和尿液样本室温放置 24 h 后, 茶碱发生明显降解, 尤其是低浓度茶碱血清中浓度降解 36.12%, 尿液降解高达 49.16%。血清和尿液样本在 -20 °C 保存 28 d 或反复冻融 3 次以后,

血清和尿液样本浓度下降不到 8.36%。样品室温保存、4℃、-20℃保存 24 h 至 1 周, 样品浓度下降了不到 5%, 测定结果无显著性差异($n=5$), 说明样品经前处理后水中稳定性较好。样本初检到复检的 28 d 内, 建议冷冻保存。检样期间反复冻融过程对测定结果影响不大。

2.6 实际样品测定

应用本研究建立的方法对赛马比赛的真实样品(5 个尿液和 5 个血清样本)进行检测。检测结果显示其中 2 个尿液样本茶碱呈阳性, 3 个血液样本呈阳性, 带入相应的标曲可测得茶碱含量; 其余样本均为阴性。本实验结果与马兴奋剂检测实验室结果比较, 检测结果及检测含量均相同。

3 讨论

茶碱具有较高的水溶性和极低的脂水分配系数, 乙腈相和水相均有较大分配, 同时在不同比例的水和乙腈流动相中茶碱显示出明显的离子化差异。提高水相比比例对于提高单位浓度质谱响应值具有明显作用, 但单纯高水相洗脱在血液及尿液样本检测时存在基质析出造成堵塞柱体现象, 而加入一定量甲酸(0.1%, pH 2.5)可以在一定程度上促进茶碱离子化, 同时可以减少非特异性吸附降低拖尾效应^[26]。

采用内标物可以明显减少提取过程及进样造成的随机误差。而同位素(6D-茶碱)具有与茶碱相似的理化性质、接近的离子化特性及明显不同的特征碎片。在多反应监测模式下, 选用同源母/子离子(181.1→124.1, 187.1→126.9), 更有利于准确定量。

样本中的茶碱在阳离子交换固相萃取柱中的吸附与解吸过程易受到样本 pH 和基质中氨含量的影响。由于样本个体差异较大, 要求所加 pH 缓冲溶液需要有足够缓冲容量(2.0 mL 4%磷酸每样)。而样本中(尤其是尿液)中的氨对于茶碱的吸附有较大影响, 因而茶碱在尿液样本中的精密度及灵敏度均劣于血样。血样洗脱过程中氨水甲醇溶液具有较好效果, 而尿液采用同法则基质背景过高, 采用 2%氨水的乙酸乙酯/二氯甲烷/异丙醇(5:4:1)混合液^[27]洗脱则可以避免上述情况。

4 结论

本实验具有样品前处理步骤简单、快速, 回收率好, 针对性强的优点, 可适用赛马比赛违禁药物茶碱残留的检测及复检。

REFERENCES

- [1] MONTEIRO J, ALVES M G, OLIVEIRA P F, et al. Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(16): 2597-2625.
- [2] ZHOU B X, MA C Q, REN X Y, et al. Production of theophylline via aerobic fermentation of pu-erh tea using tea-derived fungi[J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 261.
- [3] BARNES P J. Theophylline[J]. Pharmaceuticals, 2010, 3(3): 725-747.
- [4] BARNES P J. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: New horizons[J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(4): 334-339.
- [5] MA Y J, JIANG D Q, MENG J X, et al. Theophylline: a review of population pharmacokinetic analyses[J]. J Clin Pharm Ther, 2016, 41(6): 594-601.
- [6] HERTZSCH R, RICHTER A. Systematic analysis to assess the scientific validity of the international residue limits for caffeine and theophylline in horse-racing[J]. Vet Rec, 2019, 185(8): 230.
- [7] MACHNIK M, KAISER S, KOPPE S, et al. Control of methylxanthines in the competition horse: Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies on caffeine, theobromine and theophylline for the assessment of irrelevant concentrations[J]. Drug Test Anal, 2017, 9(9): 1372-1384.
- [8] FERRAZ G C, TEIXEIRA-NETO A R, MATAQUEIRO M I, et al. Effects of intravenous administration of caffeine on physiologic variables in exercising horses[J]. Am J Vet Res, 2008, 69(12): 1670-1675.
- [9] BADOUD F, GUILLARME D, BOCCARD J, et al. Analytical aspects in doping control: Challenges and perspectives[J]. Forensic Sci Int, 2011, 213(1/2/3): 49-61.
- [10] WONG J K, WAN T S. Doping control analyses in horseracing: A clinician's guide[J]. Vet J, 2014, 200(1): 8-16.
- [11] DELBEKE F T, DE BACKER P. Threshold level for theophylline in doping analysis[J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1996, 687(1): 247-252.
- [12] ZHAO B, XIE X C, WANG Z H, et al. Retrospective analysis of the adverse drug reaction induced by theophylline drugs[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(5): 638-642.
- [13] KASUYA Y, FURUTA T, SHIMOTA H. Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of stable isotopically labelled and unlabelled theophylline in serum and urine and of 1, 3-dimethyluric acid in urine[J]. J Chromatogr, 1989, 494: 101-108.
- [14] SAKA, UEMURA K, SHINTANI-ISHIDA K, et al. Acetic acid improves the sensitivity of theophylline analysis by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 846(1/2): 240-244.
- [15] KERTYS M, URBANOVA A, MOKRY J. Quantification of theophylline in Guinea pig plasma by LC-MS/MS using hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase:

- Method development, validation, and application in study[J]. *Acta Med Martiniana*, 2017, 17(3): 5-15.
- [16] FERNANDES T A P, AGUIAR J P, FERNANDES A I, et al. Quantification of theophylline or paracetamol in milk matrices by high-performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Anal*, 2017, 7(6): 401-405.
- [17] XIAO C Q, LI H, LI W, et al. Simultaneous determination of four theophylline drugs in human plasma by LC-MS/MS[J]. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志), 2014, 30(8): 724-726.
- [18] YAO Z H, WU X M, SUN L, et al. Analysis of theophylline and its metabolites in human urine by precolumn derivatization coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2015, 34(7): 795-801.
- [19] CHAREHSAZ M, GÜRBAY A, AYDIN A, et al. Simple, fast and reliable liquid chromatographic and spectrophotometric methods for the determination of theophylline in urine, saliva and plasma samples[J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(2): 431-439.
- [20] KESAVAN S, GOWTHAMAN N S K, ALWARAPPAN S, et al. Real time detection of adenosine and theophylline in urine and blood samples using graphene modified electrode[J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2019, 278: 46-54.
- [21] WANG Y, WU T, BI C Y. Simultaneous determination of acetaminophen, theophylline and caffeine using a glassy carbon disk electrode modified with a composite consisting of poly(Alizarin Violet 3B), multiwalled carbon nanotubes and graphene[J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(2): 731-739.
- [22] DE LA TORRE R, BADIA R, GONZÁLEZ G, et al. Cross-reactivity of stimulants found in sports drug testing by two fluorescence polarization immunoassays[J]. *J Anal Toxicol*, 1996, 20(3): 165-170.
- [23] BARTELLA L, DI DONNA L, NAPOLI A, et al. A rapid method for the assay of methylxanthines alkaloids: Theobromine, theophylline and caffeine, in cocoa products and drugs by paper spray tandem mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 2019, 278: 261-266.
- [24] NICOLI R, GUILLARME D, LEUENBERGER N, et al. Analytical strategies for doping control purposes: Needs, challenges, and perspectives[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(1): 508-523.
- [25] SUN X Y, ZHANG M W, LI S J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the monitoring of theophylline concentration in serum and its application to external quality assessment[J]. *Lab Med*(检验医学), 2014, 29(11): 1144-1150.
- [26] LEUNG G N, CHUNG E W, HO E N, et al. High-throughput screening of corticosteroids and basic drugs in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 825(1): 47-56.
- [27] YANG M Z, CHENG D, SHEN L H. Rapidly detection of four chemical substances illegally added in traditional Chinese medicine by UHPLC-Q-TOF-MS[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2019, 36(20): 2543-2547.

收稿日期: 2020-07-20

(本文责编: 李艳芳)