

质谱技术和奥运会兴奋剂检测

张亦农, 徐友宣, 吴侔天

(国家体育总局反兴奋剂中心, 北京 100029)

摘要: 检测仪器的发展, 特别是色谱质谱联用技术的长足进步, 使检测复杂生物基质中的微量成分成为目前的常规检测。本工作对 1972 年慕尼黑奥运会至 2008 年北京奥运会的文献进行综述, 即可以从近 40 年奥运会兴奋剂检测的历史看到奥运会兴奋剂检测的发展, 也可以看到质谱技术在常规检测中发展的脉络。

关键词: 质谱; 反兴奋剂; 奥运会

中图分类号: O 657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)05-0257-06

Mass Spectrometry and Anti-Doping Analysis in the Olympic Games

ZHANG Yi-nong, XU You-xuan, WU Mou-tian

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

Abstract: The development of analytical instrument, especially the combination of chromatograph and mass spectrometry, makes the detection of trace component in a complex biometrics as routine procedures. This paper reviews the technical data from 1972 Munich Olympic Games to 2008 Beijing Olympic Games. From the history of anti-doping analysis during the Olympic Games around 40 years, not only the development of anti-doping analysis, but also the trail of the mass spectrometry applied in routine analysis can be clearly demonstrated.

Key words: mass spectrometry; anti-doping; Olympic Games

1 相关历史背景

奥运会起源于公元前 776 年在希腊奥林匹亚举行的比赛^[1], 到公元 393 年罗马征服希腊后终止, 一般文献称为古代奥运会。1984 年成立国际奥委会, 并于 2 年后的 1896 年 4 月 6 日, 在希腊雅典举行第一届现代奥运会, 当时有 311 名运动员代表 13 个国家参赛^[2]。奥运会有漫长的

历史, 古代奥运会延续了将近 11 个世纪, 现代奥运会也有 100 多年的进程^[3]。许多作者认为, 使用名目繁多的所谓补剂来提高运动成绩的企图和体育比赛本身一样久远, 但不断出现的问题引起人们的警觉, 特别是 1952 年奥斯陆冬季奥运会上几名速滑运动员因服用苯丙胺而虚脱, 以及 1960 年罗马奥运会上自行车运动员在公路自行

车赛中死亡等事例。1960 年在旧金山国际奥委会全会上,时任国际奥委会主席的艾弗里·布伦戴奇就提醒委员注意某些项目中使用所谓的“兴奋药片(氨基丙苯硫酸盐)”,翌年,在雅典举行的国际奥委会全会上,为此目的成立了国际奥委会医务委员会^[4]。1964 年东京奥运会奥运村的盥洗室中到处都是运动员使用后丢弃的安培瓶和注射器;1976 年 1 名杰出的自行车运动员因服用苯丙胺死于比赛中;因滥用药物提高成绩而死亡的运动员名单还在不断扩大,迫于形势,国际奥委会在 1968 年的格勒诺布尔冬季奥运会和墨西哥城奥运会上第 1 次在奥运会中实施了兴奋剂检查。

1999 年世界反兴奋剂机构在瑞士洛桑成立,开始接替国际奥委会协调全球的反兴奋剂事项,并于 2004 年开始接替国际奥委会每年一度的公布禁用物质和禁用方法清单。国际奥委会(2004 年以前)或世界反兴奋剂机构(2004 年以后)公布的禁用物质和禁用方法就是兴奋剂检测的目标物质。

2 禁用物质的变化

1972 年慕尼黑奥运会禁用物质清单相对较少,示于图 1。

当时禁用一些中枢神经刺激剂和麻醉镇静剂,仅 27 种物质作为举例列在表中。这些物质都可以比较容易地使用气相色谱氮磷检测器检测。1974 年 4 月,国际奥委会将蛋白同化雄性类固醇列为禁用物质。随着生物工程的不断进展,1987 年重组人促红细胞生成素开始市售,虽然在 2000 年以前一直没有兴奋剂重组人促红细胞生成素的检测方法,但国际奥委会在 1990 年就将重组人促红细胞生成素列入禁用物质。进入 21 世纪,基因兴奋剂列入这份清单。到 2008 年北京奥运会,这份禁用物质和禁用方法清单已经囊括了蛋白同化制剂(S1),肽类激素(S2),b₂-激动剂(S3),有抗雌激素作用的制剂(S4),利尿剂和其他掩蔽剂(S5),刺激剂(S6),麻醉剂(7),大麻(酚)类(8),糖皮质类固醇(S9),禁用提高输氧能力(M1),禁用药物学的、化学的和物理的篡改(M2),禁用使用基因兴奋剂(M3)以及在特殊运动项目中禁用酒精(P1)和 b-阻断剂(P2),共计 14 大项 200 多种举例物质^[5]。

Substance	Specie	Unit	Spant
Cocaine	C ₁₇ H ₁₉ N	mg/L	0.001
Heroin	C ₁₇ H ₁₇ O	mg/L	0.001
Ecstasy	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	mg/L	0.001
Amphetamine	C ₉ H ₁₁ N	mg/L	0.001
Stimulant	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	mg/L	0.001
Heroin	C ₁₇ H ₁₇ O	mg/L	0.001
Heroin	C ₁₇ H ₁₇ O	mg/L	0.001

图 1 慕尼黑奥运会禁用清单(a)和阳性检测结果(b)
Fig. 1 The prohibited list (a) and the results of positive detection (b) in Munich Olympic Games

3 历届奥运会兴奋剂检测所用的质谱仪器

1972 年慕尼黑奥运会兴奋剂检测实验室有 20 名检测人员,操作 8 台气相色谱仪(HP7600/NPD)、5 台气相色谱仪检测酒精(HP7600/FID)、薄层色谱(TLC)、1 台气相色谱-质谱联用仪(Atlas MAT CH-5 GC/MS)。该气质联用仪是 1 台体积庞大的磁质谱,通过玻璃毛细管接口质谱仪和填充柱气相色谱相连,操作远不如现在的台式气相色谱-质谱检测器方便。慕尼黑奥运会的最后官方报告是从 2 079 份尿样中检出 7 份阳性结果,示于图 1。

1976 年蒙特利尔奥运会上开始检测外源性的蛋白同化雄性类固醇,由于当时气质联用还不是非常普及的一种常规检测手段,因此只能对 1 800 份尿样中的 275 份进行放射免疫分析初筛,如果免疫分析可疑,再用 GC/MS 进行确证。确证了 4 个离子的选择离子色谱图和保留时间。

到了 1984 年,气相色谱-质谱联用技术有了长足的进步,一些台式的气质联用仪投入使用。洛杉矶奥运会的兴奋剂检测对所有 1 510 份尿

样全部使用气质联用仪进行类固醇的筛选和确证,但同时放免分析仍然作为常规检测手段用于类固醇的检测。在洛杉矶实验室安装了 7 台气质联用仪(HP5996),其中 6 台用于类固醇的检测,1 台用于其他违禁物质的确证。当时已经开始使用毛细管气相色谱柱,分离效果和进样量有了极大的改善。值得一提的是,在洛杉矶奥运会上用选择离子的方式首次对内源性类固醇睾酮进行检测,最终报告了 12 个阳性检测结果。

由于在 1988 年汉城奥运会上加拿大运动员约翰逊(Ben Johnson)创造了 9.79 s 的 100 m

短跑成绩,获得冠军后被查出其尿样中的司坦唑醇(康力龙)令世人大惊。当时汉城实验室采用 12 台台式气相色谱-质谱检测器 GC/MSD(HP5890/5970B)和 2 台大型色质联用仪(HP5988A),其中 1 台与气相色谱联用,1 台与液相色谱联用。由于当时液质接口(热喷雾)还处于发展阶段,因此,液质联用并没有发挥很大的作用。约翰逊尿样中司坦唑醇阳性的选择离子图和德国杂志的封面报道,示于图 2^[6]。

从表 2 可以纵观近几届夏季奥运会的分析仪器配置。

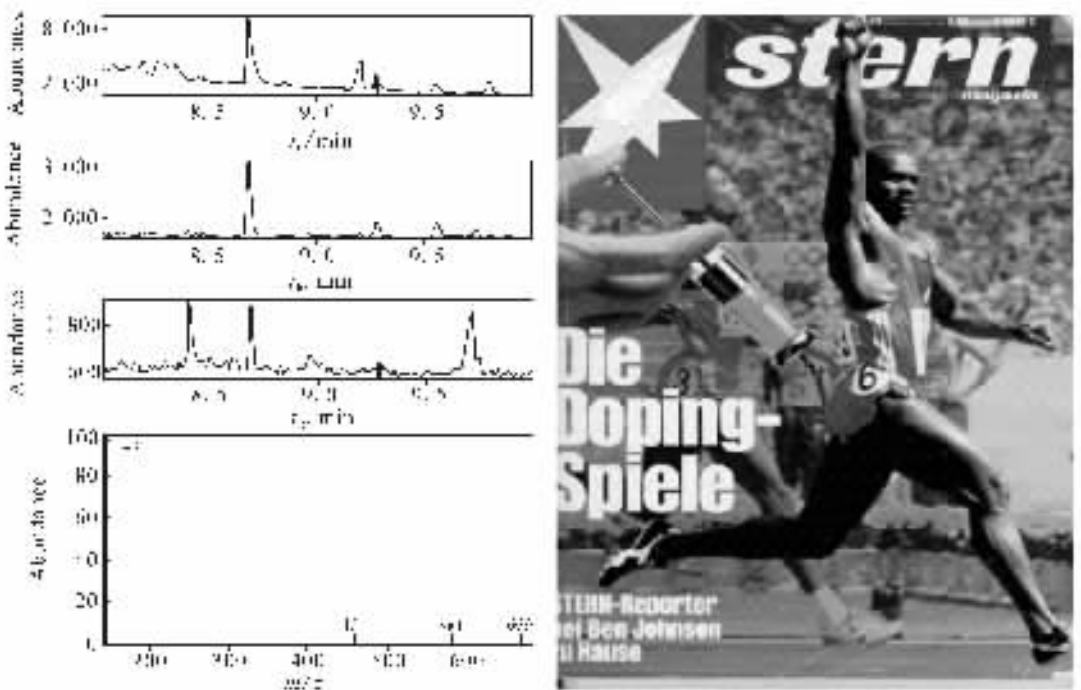


图 2 1988 年汉城奥运会约翰逊司坦唑醇阳性尿样图谱和报道^[6]

Fig. 2 The positive urine atlas of Ben Johnson's stanozolol and German report during Seoul Olympic Games in 1988^[6]

表 1 近几届夏季奥运会色谱质谱仪配置

Table 1 The configuration of chromatography and mass spectrometer during summer Olympic Games in recent years

	GC	GC/MS	GC/HRMS	GC/C/IRMS	LC/UV	LC/MS(n)	样品数
巴塞罗那	5	13	0	0	6	2	1 848
亚特兰大	5	18	3	0	6	0	1 775
悉尼	4	20	4	2	4	1	2 351(尿+血)
雅典	4	20	4	2	4	6(离子阱)	3 667(尿+血)
北京	2	22	4	3	2	5(单)+7(串)	5 599(尿+血)

进入 90 年代,检测仪器稳定发展,1992 年巴塞罗那奥运会上使用了 13 台 GC/MSD (HP5970, HP5971) 进行蛋白同化雄性类固醇等多类违禁物质的检测,2 台四极杆 LC/MS(粒子束接口)很方便地检出 1 个刺激剂(mesocarb)的代谢物,显示了液质联用的优越性,但当时的接口和离子化技术限制了液质在常规检测中的广泛应用。巴塞罗那奥运会上共报告 5 份阳性检测结果:土地宁(strychnine)、去甲麻黄碱(norephedrine)、美索卡(mesocarb)各 1 例,克伦特罗(clenbuterol)2 例。

从表 1 可以看到,1996 年亚特兰大奥运会

上第 1 次使用高分辨质谱(MAT 95 GC/HRMS)。由于高分辨质谱可以检测比较准确的质量数,因此,信噪比比常规检测用的 GC/MSD(一般是单位质量分辨率)要高。在亚特兰大奥运会上第 1 次报告检出 1 种新的“免疫刺激剂”布罗曼坦(bromantan)。当时除俄国外,大多数国家对此知之甚少。

从表 1 还可以看到,在 2000 年悉尼奥运会上第 1 次引进气相色谱/燃烧/同位素比质谱(GC/C/IRMS)。这种质谱技术广泛用于地质、石油等行业,用于测量目标化合物中碳 13 和碳 12 的比值,其原理示于图 3。

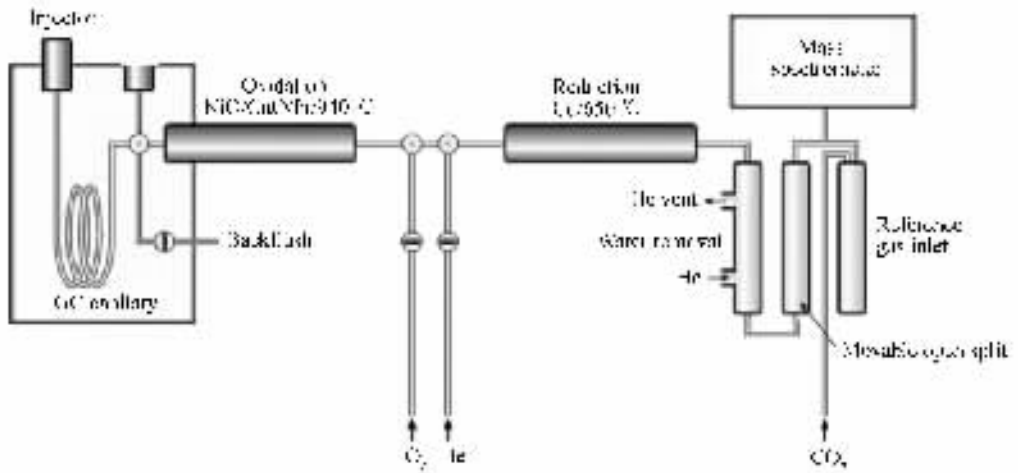


图 3 色谱/燃烧/同位素比质谱(GC/C/IRMS)的原理示意图

Fig. 3 Schematic diagram of GC/C/IRMS

目标化合物经由气相色谱分离后进入氧化炉,所有碳氢化合物催化氧化成二氧化碳和水,通过冷阱或膜除去水,二氧化碳进入质谱仪,由法拉第杯检测质量数 44、45 和 46 的信号,然后计算出该化合物碳 13 和碳 12 的比值。由于内源性类固醇碳 13 和碳 12 的比值和制药工业制备的相应化合物碳 13 和碳 12 的比值不同,因此需区分检测到内源性类固醇是自身分泌的还是用药引入的。

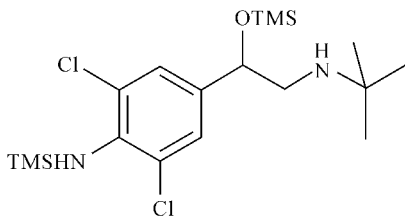
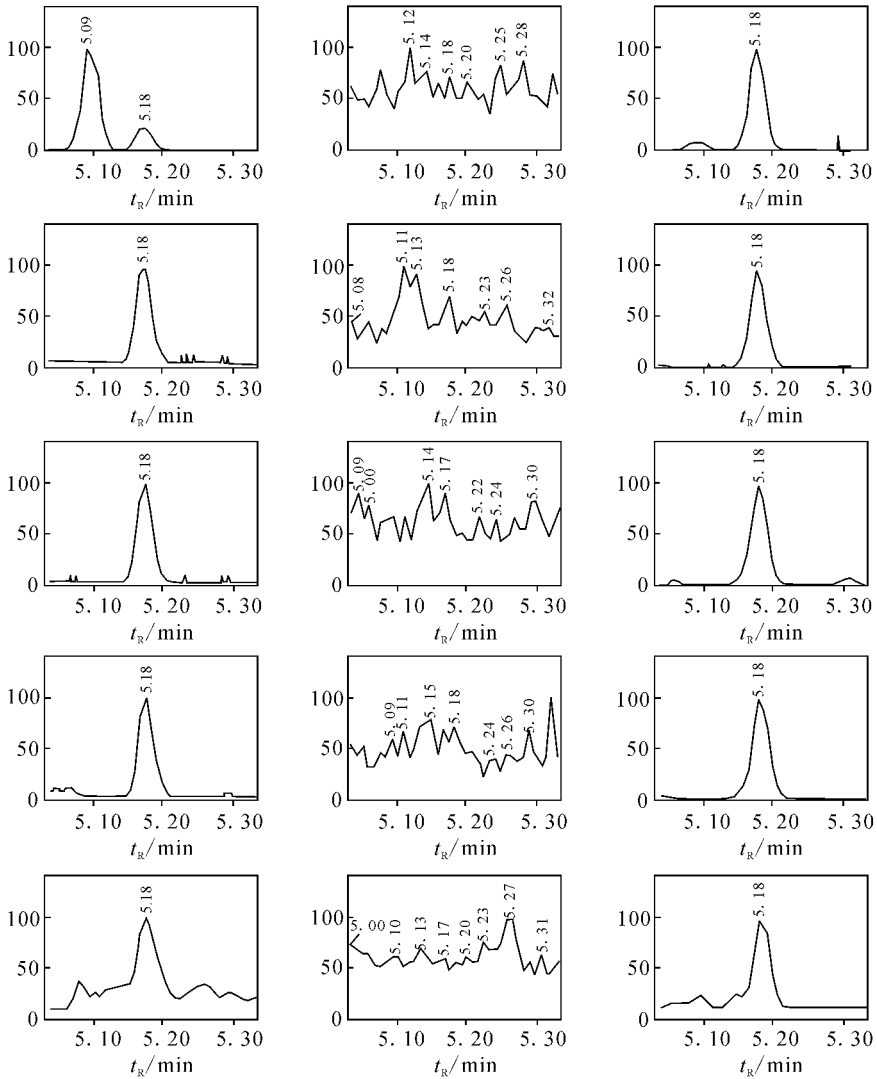
进入 21 世纪,液质联用的离子化技术,接口,仪器的稳定性、重现性和灵敏度等方面都有了长足的进步。计算机软件的发展使操作界面更加方便用户的使用。自 2004 年雅典奥运会首次将 6 台液质(串接离子阱,Agilent/1100 Series LC/MSD Trap SL)联用仪引入常规检测糖皮质类固醇和某些类固醇类化合物,共计 22 种目标

化合物^[8],而高分辨磁质谱(GC/HRMS)仍然用于检测类固醇类化合物,所不同的是雅典实验室使用 Micromass/AutoSpec Ultima 的 GC/HRMS,检测的克伦特罗(clenbuterol)图谱表明,在检测约 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (使用 2 mL 样品)时,仍然有很好的信噪比,示于图 4^[6]。

2008 年北京奥运会兴奋剂检测实验室的工作人员和志愿者共计 140 余人。从表 1 可以清楚的看到,北京奥运会第 1 次在奥运会兴奋剂检测中全面使用液质联用技术,既使用单四极杆液质仪检测利尿剂,也使用串接四极杆液质联用仪检测糖皮质类固醇和部分类固醇及其他目标化合物。每天通过气质和液质检测的样品数达历史之最。雅典奥运会期间,日最高样品检测量在 250 份尿样左右,而北京奥运会期间,日最高检测量在 380 份尿样,示于图 5。北京奥运会第 1

次在夏季奥运会中检出肽类激素阳性,2 份尿样(涉及 1 名自行车运动员)报告中检出外源性促红细胞生成素。1 名射击运动员的 2 份尿样 β -阻断剂阳性;1 名体操运动员的尿样利尿剂阳性;1 名田径运动员的尿样检出甲睾酮以及另外

2 名田径运动员的尿样通过气相色谱/燃烧/同位素比质谱(GC/C/IRMS)方法查出外源性睾酮;1 名举重运动员查出诺龙;1 名皮划艇运动员查出克伦特罗(俗称“瘦肉精”)阳性。此外,还准确报告所有双盲质量控制样品(5 份)。

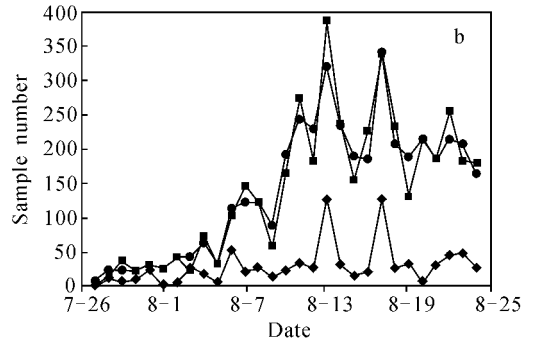
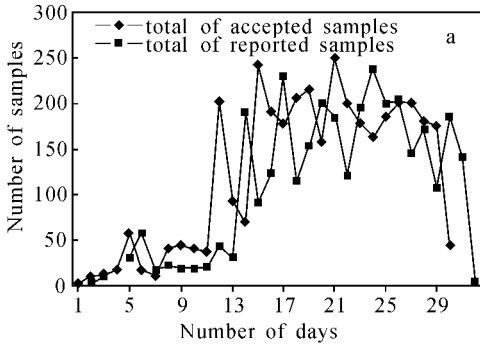


M^- : m/z 420
 m/z 337.066 6
 m/z 335.069 5
 m/z 300.100 7

注:左. 阳性样品;中. 空白尿样;右. $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 阳性对照

图 4 高分辨 GC/HRMS 选择离子色谱图^[6]

Fig. 4 Chromatography of selected ion by GC/HRMS



注:雅典数据摘自文献[7]

图 5 雅典(a)和北京(b)奥运会日样品量统计

Fig. 5 Number of days vs samples during Olympic Games in Athens(a) and Beijing(b)

4 对 2012 奥运会的展望

展望 2012 年伦敦奥运会将会采用何种质谱技术还为时过早。但网上对 2010 年温哥华冬季奥运会已有消息:“2010 年冬季奥运会购买 6 台安捷伦 7000AGCQQQ 和 6 台 5975,特别是计划用 GCQQQ 取代传统的高分辨质谱对类固醇的分析”。从这一点看,串接质谱将成为主要的常规检测手段。

5 小结

1) 历届奥运会兴奋剂检测所采用的都是当时先进的检测技术,与时俱进,每 4 年的奥运会都会引入新技术;

2) 历届奥运会兴奋剂检测所采用的都是成熟的常规检测技术,经得起仲裁和法庭质询,而且具有较高的灵敏度;

3) 历届奥运会兴奋剂检测所采用的技术必须能经受高强度连续工作负荷,即比较“皮实”;

4) 历届奥运会兴奋剂检测一直采用质谱技术为小分子化合物主要的定性和定量检测工具。

参考文献:

- [1] 不列颠百科全书[M]. 中文版. 北京:中国大百科全书出版社,2001,12:356.
- [2] 任海. 奥林匹克运动百科全书[M]. 北京:中国大百科全书出版社,2000:244.
- [3] BOTR F, PAVAN A. Enhancement drugs and the athlete[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2009, 20: 133-148.
- [4] 国际奥委会. 国际奥林匹克委员会一百年[M]. 洛桑,1995, 3: 156.
- [5] World Anti-Doping Agency. International standard prohibited list[R]. 2008.
- [6] HEMMERSBACH P. History of mass spectrometry at the Olympic Games[J]. J Mass Spectrom, 2008, 43: 839-853.
- [7] TSIVOU M, KIOUKIA-FOUCIA N, LYRIS E, et al. An overview of the doping control analysis during the Olympic Games of 2004 in Athens, Greece [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 555 (1): 1-13.