

# 尿中多种蛋白同化激素药物的GC/MS 分析及代谢研究

张 霁 刘春胜 毕红钢 张亦中\* 叶 荔\* 周同惠

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050; \* 国家体委运动医学研究所, 北京100061)

**提要** 本文对国际奥委会禁用的 19 种蛋白同化激素进行了人体服药试验; 从尿中富集提取所排泄的这类激素, 对它们在人体内的代谢情况进行研究, 弄清了各药物的主要代谢途径; 获得了药物原型及其主要代谢物的 GC, MS 数据; 在此基础上, 建立了系统分析和检测尿中蛋白同化激素的最优化方法。

**关键词** 同化激素; 尿样分析; 气相色谱质谱法。

蛋白同化激素是一类具有甾体结构的药物。目前, 这类激素已成为体育比赛中最常用的兴奋剂。国际奥委会 (IOC) 明令禁止在各类比赛中使用这类激素并加以检测监督。

对蛋白同化激素正式检测, 始于 1972 年 Montreal 奥运会, 近十几年来, 分析检测技术有很大发展。目前检测这类激素的方法有: RIA 法<sup>(2)</sup>, HPLC 法<sup>(3, 4)</sup>, GC 法<sup>(5, 6)</sup> 和 GC/MS 法<sup>(7, 8)</sup>。RIA 法是最早用于检测同化激素的方法, 其灵敏度较高, 可用于筛检分析, 但由于专属性较差, 难以进行结构鉴定; HPLC 法主要用于定量检测单个甾体化合物及其代谢物, 不适于作筛检分析; GC 法不能鉴定各色谱峰; GC/MS 集合了毛细管色谱的高分辨率及质谱的结构鉴定特征, 目前已发展为较完善的分析检测同化激素的方法, 其突出优点是灵敏度高、专属性强; 同时, GC/MS 为同化激素药物体内代谢研究提供了有效的技术手段。本文对 IOC 禁用的 19 种同化激素进行了人体服药试验; 从尿中富集提取所排泄的这类激素, 对它们在人体内的代谢情况进行研究; 并在此基础上, 进一步完善 GC/MS 分析的各种条件, 确定了系统分析和检测尿中蛋白同化激素的最优化方法。

## 实 验 部 分

### 一. 药物与试剂

**药物** 氯司替勃 (clostebol), Farmitalia Carlo Erba: 意大利; 大力补 (methendienone): 上海第十二制药厂; 美睾酮 (mesterolone), 美替诺龙 (methenolone), 脱氢氯甲睾酮 (oral-turinabol) 及康复龙 (oxymetholone), INRS-Sante: 加拿大; 甲基睾丸素 (methyltestosterone), 睾丸素 (testosterone): 上海第九制药厂; 乙诺龙 (norethandrolone), 氧雄龙 (oxandrolone), 羟甲睾酮 (oxymesterone): 民主德国兴奋剂中心; 康力龙 (stanozolol), 广州侨光制药厂。

无制剂的药, 在志愿者服药试验中, 均用化学标准品装入胶囊后服用。

试剂 *N*-甲基-*N*-三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA): Sigma, 美国; 三甲基碘硅烷 (TMSI): Aldrich, 美国; 二硫代赤藓糖醇: Aldrich, 美国;  $\beta$ -葡萄糖醛酸甙酶: H-2 型、IX 型来自 *E. Coli*, Sigma, 美国; XAD-2 树脂, Serva 西德; 甲醇、乙醚、丙酮 (均为 AR): 北京化工厂, 均经二次重蒸处理; 乙酸钠、乙酸、碳酸钠、碳酸氢钠、无水硫酸钠 (均为 AR): 北京化学试剂厂; 水经二次重蒸处理。

TMSI 溶液配制: 取二氯甲烷 430  $\mu$ l 加 TMSI 70  $\mu$ l, 再加三乙胺 1  $\mu$ l 制成溶液, 密闭避光冷藏待用。

XAD-2 柱制备: 将 100 ~ 200 目 XAD-2 树脂先以丙酮回流抽提 24 h, 继以甲醇抽提 24 h, 然后水洗多次, 用水浸泡待用。取小柱 (10  $\times$  1.0 cm) 下置玻璃砂板, 以 XAD-2 悬浮液装柱至树脂层约高 3 cm, 用 5 ml 水洗后即可处理尿样。

固体缓冲剂 (pH 8.7) 配制: 将碳酸氢钠与碳酸钠按 8:1 比例, 配成固体混合物, 用 pH 计检验其水溶液 pH 值约 8.7, 上述混合物即可装瓶待用。

## 二. 仪器及设备

气相色谱仪: HP 5890 A, 质量选择检测器 HP 5970 B, 毛细管气相色谱柱 HP-5, 以上均为 Hewlett-Packard 公司产品; 干热反应器, 吹氮气接头, Pierce 美国; 恒温水浴, 北京医疗设备厂; 往复式振荡器, 江西医用设备厂; 旋转蒸发器, 瑞士; 离心机 LDS-2A, 北京离心机厂。

## 三. 尿样预提取

取尿样 3 ~ 5 ml, 离心后取上清尿样加至 XAD-2 柱, 用水 5 ml 洗涤, 甲醇 5 ml 洗脱。洗脱液蒸干后, 加 0.2 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液 (或乙酸缓冲液, 根据所用酶而定) 1 ml, 加  $\beta$ -葡萄糖醛酸甙酶 100  $\mu$ l (相当于 10,000 Fishman 单位), 在 55  $^{\circ}$ C 下培养 3 h (或 37  $^{\circ}$ C, 培养 16 h), 取出后加固体缓冲剂约 100 mg, 调节酶解液到 pH 约 8.7, 加乙醚 5 ml, 加试管盖, 振荡萃取 10 min。离心后, 取上层醚液, 加无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水后转至干净无水试管, 氮气挥干乙醚, 残渣以甲醇溶解后转入衍生化小瓶, 加抗氧化剂二硫代赤藓糖醇约 0.1 mg, 需要时加入内标, 继以氮气流挥干甲醇, 加盖密封供衍生化反应用。

## 四. 衍生化反应

经上述预处理尿样, 用注射器加入 MSTFA 49  $\mu$ l, TMSI 溶液 1  $\mu$ l, 在 70  $^{\circ}$ C 下反应 30 min 可供 GC/MSD 进样分析。

如分析同化激素标准品, 则将该标准品溶液定量加入衍生化小瓶, 同时加抗氧化剂约 0.1 mg, 氮气流挥干溶剂, 封盖, 按上述相同条件进行衍生化反应。

## 五. GC/MS 分析条件

色谱柱: 毛细管气相色谱柱 HP-5, 17 m  $\times$  0.22 mm  $\times$  0.33  $\mu$ m (固定相为交联甲基硅氧烷, 含 5% 苯基); 载气: 氮气; 进样口温度: 280  $^{\circ}$ C; 检测接口温度: 290  $^{\circ}$ C; 进样方式: 无分流进样; 柱升温程序: 起始温度 100  $^{\circ}$ C, 停留 1 min, 以 16  $^{\circ}$ C/min 速率升温至 220  $^{\circ}$ C, 再以 3.8  $^{\circ}$ C/min 升至 299  $^{\circ}$ C, 保持 6 min。

## 六. 尿样收集

以健康男性青年为志愿者, 给药前先收集空白尿样一份, 然后给药 (给药剂量及方法见表 1)。给药后第一天取尿 4 ~ 5 次, 次日起每日晨收集尿一次至尿中甙体消失为止。收集的尿样置 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中长期保存。

## 七. 尿中同化激素及其代谢产物的分析

根据各同化激素标准品的 GC 保留时间和质谱特征离子, 寻找尿样中是否有原型药排

Tab 1. The dosage, administration methods of anabolic steroids and their life time in urine

Anabolic steroid	Dosage (mg)	Administration method	Life time in urine (h)
Bolasterone	50	po (single)	84
Boldenone	50	po (twice)	83
Clostebol	20	im (single)	15 d (above)
Drostanolone	30	po (single)	84
Fluoxymesterone	20	po (single)	34
Furazabol	1	po (single)	50
Mestanolone	40	po (single)	38
Mesterolone	25	po (single)	108
Methenolone	25	po (single)	8 d
Methendienone	20	po (twice)	50
Methyltestosterone	20	po (single)	68
Nandrolone	50	im (single)	15 d (above)
Norethandrolone	20	po (single)	58
Oral-turinabol	10	po (twice)	63
Oxandrolone	5	po (single)	35
Oxymesterone	20	po (twice)	6 d
Oxymetholone	8	po (twice)	32
Stanozolol	10	po (single)	82
Testosterone	50	im (single)	73

泄; 通过空白尿样与各药物阳性尿样对照分析, 鉴定各药物代谢产物, 并排除内源性杂质的干扰; 根据代谢物质谱特征离子, 以选择离子检测方式(SIM)检测, 对药物阳性尿样进一步分析, 直至代谢物在尿中消失。

#### 八. 同化激素标准品检测限

将各药物标准品配成不同浓度标准溶液(100, 10, 1 ng/ $\mu$ l), 每一药物分别进样 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 ng, 设定该药物特征检测离子, 以 SIM 方式分析, 观察所检特征离子信号刚可辨认时的药物进样量, 以此作为该药物在 SIM 方式下的检测下限。

## 结果与讨论

### 一. GC 分析条件最佳化

对二十种同化激素及其代谢物分析、检测, 要求 GC 能充分将各药物相互分离, 尤其是要将内源性的睾丸素与 11-羟雄酮(11-OH-androsterone) 及 11-羟本胆烷醇酮(11-OH-etiocholanolone) 分离, 从而达到对睾丸素准确定量的目的。在实验中, 用含 5% 苯基的交联甲基硅氧烷毛细管柱, 液膜厚 0.33  $\mu$ m, 并采用溶剂效应技术, 睾丸素与 11-羟雄酮及 11-羟本胆烷醇酮达基线分离, 其它同化激素均获较好分离(见图 1)。

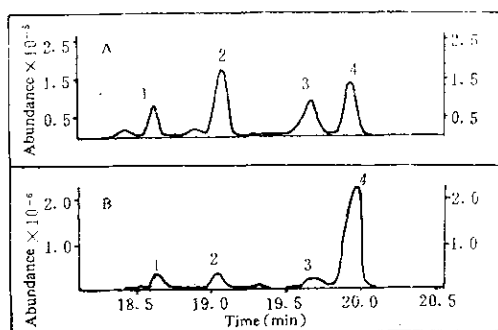


Fig 1. The ion ( $m/z$  432) chromatograms of testosterone and epitestosterone in (A) a normal urine sample and (B) a testosterone positive urine sample. 1. DHEA; 2. Epitestosterone; 3. 11-OH-Androsterone and 11-OH-etiocholanolone; 4. Testosterone.

## 二. 同化激素代谢研究

大部分同化激素经体内代谢后,以代谢物形式从尿中排泄,原型药或不出现或出现时间较短。因此在兴奋剂检测中,是以检测同化激素代谢产物为主,弄清各药物的主要代谢途径,对实际检测具有重要意义。通过对各药物阳性尿样的 GC/MS 分析,并参考有关文献<sup>(8~10)</sup>,发现、鉴定了各药物的代谢产物。表 2 列出了各同化激素或其代谢物的 GC 保留时间、质谱特征离子;按确定的特征离子,对志愿者尿样依次做 SIM 分析,确定尿中药物原型及代谢物的消失时间,见表 2。

Tab 2. Some GC/MS properties of anabolic steroids and their metabolites

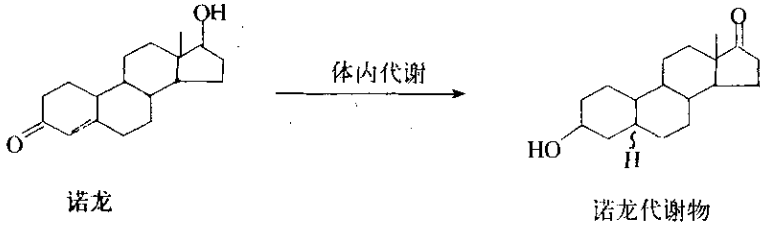
Steroid or its Met.	RT (min)	Characteristic ions			
5 $\alpha$ -Androstan-17-one (ISTD)	14.1	272	331		
Bolasterone Met	20.3	449	374	143	
Boldenone Met 1	16.1	430	415	194	
Boldenone Met 2	16.4	432	417	194	
Clostebol	20.5	466	451		
Clostebol Met	21.0	468	453		
Drostanolone Met 1	17.9	448	433	343	
Drostanolone Met 2	20.7	536	521		
Fluoxymesterone Met	22.3	642	552	447	143
Furazabol	24.8	402	387	143	
Furazabol Met	28.9	490	231	218	
Mestanolone Met	19.3	450	435	143	
Mesterolone	18.8	448	433		
Metandienone Met	23.7	532	517		
Meihenolone Met	18.7	446	431		
Methenolone	20.8	446	431		
Methyltestosterone Met	18.8	450	435	143	
Nandrolone Met 1	16.1	420	405	315	
Nandrolone Met 2	16.9	420	405	315	
Norethandrolone	23.1	446	287		
Norethandrolone Met 1	22.8	421	331	245	
Norethandrolone Met 2	23.0	421	331	245	
Oral-Turinabol	24.7	478	240	143	
Oral-Turinabol Met	29.2	552	315	231	218
Oxandrolone	23.0	378	363	143	
Oxymesterone	24.8	534	444	389	
Oxymetholone Met 1	25.0	550	460	143	
Oxymetholone Met 2	25.4	640	550	460	143
Stanozolol Met 1	29.3	560	545	254	143
Stanozolol Met 2	29.4	560	545	254	143
Stanozolol Met 3	31.7	560	470	380	218
Stanozolol Met 4	33.0	648	558	254	218
Stanozolol Met 5	33.4	648	558	254	218
Testosterone	20.0	432	417		
Epitestosterone	19.1	432	417		

根据各药物原型及代谢物的质谱,可推测各代谢物的大致结构,对这些代谢物结构进行归纳,可总结出同化激素在人体内代谢的几种主要途径:

(一)羟化 同化激素在体内代谢易发生单羟化及多羟化反应,羟化位点因各自结构不同而有差别。但6位是主要易于羟化的位点。如:去氢甲睾酮,氟羟甲睾酮(flouxymesterone),脱氢氯甲睾酮的6位羟化分别是它们各自的主要代谢途径。此外,12位,16位也是易于羟化的位点,夫拉扎勃(furazabol),氧雄龙(oxandrolone),脱氢氯甲睾酮,康力龙都有16位羟化代谢物,脱氢氯甲睾酮有12位羟化代谢物。

(二)还原 同化激素结构中大多有双键及酮羰基,在代谢中易发生还原加氢反应。羰基、双键均被还原分别是勃拉睾酮(bolasterone),甲基睾丸素,诺乙龙,康复龙的主要代谢途径;此外还有许多药物在代谢中只发生部分还原,双键被还原的趋势大于酮羰基,此时,3位酮羰基常变位到17位。

(三)3位羰基变构到17位 不少同化激素重要代谢产物由3位羰基变构到17位产生。如勃地酮(boldenone),诺龙,美睾酮等药物均有此代谢过程,其方式如下:



另外,氧雄龙(oxandrolone),大力补等在代谢中还有17位差向异构产生的代谢物。

同化激素的体内代谢较复杂,有许多药物在代谢中上述几种反应同时发生,如部分还原时发生羰基变位;还原同时发生单羟化或多羟化等;此外,药物代谢中存在个体差异,不同受试者服药后,代谢物及其浓度有差别;有些同化激素,在代谢中还可能转变成内源性的甾体激素<sup>(1)</sup>,对此有待进一步的研究。表3总结了各同化激素在人体内的主要代谢途径。

Tab 3. The main metabolic pathways of anabolic steroids

Anabolic steroid	Metabolic pathway
Bolasterone	Full red.
Boldenone	Parent, part red. and keto 3 to 17, 17-epi
Clostebol	Parent, part red. and keto 3 to 17
Drostanolone	Parent, Keto 3 to 17, Hydroxy
Flouxymesterone	6-Hydroxy
Furazabol	Parent, 16-hydroxy
Mestanolone	Parent, Full Red., 16-hydroxy
Mesterolone	Parent, keto 3 to 17
Methenolone	Parent, Keto 3 to 17
Methandienone	6-Hydroxy, 17-epi
Methyltestosterone	Full red.
Nandrolone	Part red. and keto 3 to 17
Norethandrolone	Parent, full red., full red. and hydroxy
Oral-turinabol	Parent, 6-hydroxy, 6, 16-dihydroxy, 6, 12-dihydroxy
Oxandrolone	Parent, 17-epi, 16-hydroxy
Oxymesterone	Parent, full red.
Oxymetholone	Full red.
Stanozolol	Parent, 3'-hydroxy, 4-hydroxy, 3', 16-dihydroxy, 4, 16-dihydroxy, 16-hydroxy
Testosterone	Endogenous steroid
Epitestosterone	Endogenous steroid

The full reduction is represented by "full red." and the partial reduction is represented by "part red." The hydroxylation at position 6 is represented by "6-hydroxy". The position change of keto-group from 3 to 17 is represented by "keto 3 to 17" and the epimerization at position 17 is represented by "17-epi".

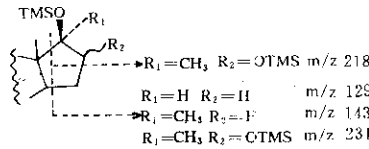
### 三. 同化激素 TMS 衍生物的质谱裂分规律

经对各同化激素或其代谢产物 TMS 衍生物的质谱进行研究, 并参考有关文献<sup>(9, 10)</sup>, 发现这些化合物质谱裂分很有规律性, 这对解析质谱碎片离子, 推断代谢物结构很有帮助。(图 2 列出了一些同化激素或其代谢物 TMS 衍生物质谱), 现将这些规律总结如下:

(一)产生分子离子峰  $M^+$  各同化激素或其代谢物 TMS 衍生物质谱中一般都可观察到分子离子峰, 据此可判断这些化合物的分子量。当化合物结构中有酮羰基时, 其质谱中  $M^+$  丰度较高, 如羟甲睾酮(图 2A), 睾丸素。代谢后分子结构中没有不饱和键, TMS 衍生物  $M^+$  丰度则很低, 如勃拉睾酮代谢物(图 2B), 甲基睾丸素代谢物(图 2C)。

(二)产生  $(M-15)^+$  及  $(M-90)^+$ ,  $(M-90 \times 2)^+$  碎片 同化激素 TMS 衍生物质谱裂分时, 易失去 19 位角甲基, 产生碎片离子  $(M-15)^+$ ; 同时也易顺序失去一个或多个三甲基硅醇 (TMS-OH), 产生碎片离子  $(M-90)^+$ ,  $(M-90 \times 2)^+$  等, 上述碎片同样有助于判断这些化合物的分子量。

(三)D 环裂分产生碎片 同化激素的 D 环结构大致分两种, 一种在 17 位没有甲基取代基, 此结构的 TMS 衍生物 D 环裂分产生碎片  $m/z$  129, 另一种在 17 位有甲基, D 环裂分产生碎片  $m/z$  143, 上述裂分产生碎片丰度均较高, 常为质谱基峰, 见图 2C, 图 2D。如药物经代谢后, 在 16 位发生羟化时, D 环结构变化, 此种结构的 TMS 衍生物 D 环裂分常产生较高丰度碎片  $m/z$  218 及 231。D 环裂分常见模式如下:



在康力龙 16 位羟化代谢物质谱中可观察到碎片离子  $m/z$  218, 231 (图 2E)。

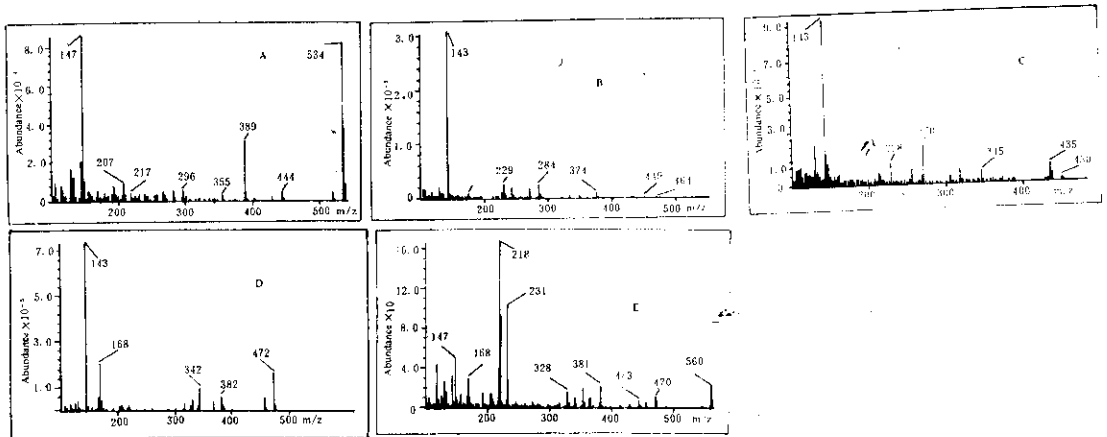


Fig 2. The mass spectrum of oxymesterone (A) bolasterone metabolite (tetra-hydrobolasterone) (B), methyltestosterone metabolite (tetra-hydromethyltestosterone)(C), stanozolol (D) and stanozolol metabolite (16-OH-stanozolol)(E).

#### 四. 同化激素的检测限

因化学结构不同, 各同化激素在 GC/MS 分析中响应值不同, 检测灵敏度有差别。对不同进样量的各同化激素标准品进行 GC/MS 分析, 获得它们各自的检测限见表 4。

Tab 4. The detection limits of anabolic steroids

Anabolic steroid	Detection limit	
	Lowest injection amount (ng)	Concen. in urine (ng/ml)
Bolasterone	0.1	1.0
Boldenone	0.05	0.5
Drostanolone	0.1	1.0
Fluoxymesterone	0.5	5.0
Mestanolone	0.1	1.0
Methyltestosterone	0.05	0.5
Nandrolone	0.05	0.5
Norethandrolone	0.5	5.0
Oral - turinabol	0.3	3.0
Oxandrolone	0.3	3.0
Oxymesterone	0.1	1.0
Oxymetholone	0.5	5.0
Stanozolol	0.5	5.0

#### 五. 睾酮定量分析

睾酮是人体内源性的甾体激素, 故检测尿样是否含禁用外源性睾酮不能采取定性方法。但人体分泌另一种内源性甾体激素表睾酮, 通常尿样中睾酮与表睾酮浓度比约为 1。但人体外源服用睾酮后, 体内的睾酮浓度会迅速升高, 睾酮与表睾酮浓度比大大高于 1。故 IOC 规定, 如果被检查样品, 睾酮与表睾酮浓度比超过 6 时, 就确认为是服用了外源性睾酮。由此用相对定量方法解决了检测外源性睾酮的问题。具体方法是: 在选择离子  $m/z$  432.4 下, 测定得到睾酮、表睾酮色谱峰面积比浓度比相关曲线; 在样品分析时, 测得样品中睾酮、表睾酮与表睾酮色谱峰面积比, 按相关曲线换算成浓度比。图 1 分别表示出一正常尿样和一睾酮阳性尿样的睾酮、表睾酮选择离子流色谱图。

#### 参 考 文 献

1. Zurer PS. Drugs in sports. *Chem Eng News* 1984; 62: 69.
2. Brooks RV, et al. Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. *Brit J Sports Med* 1975; 9: 89.
3. 毕红钢, 等. 人尿中几种雄激素及蛋白同化激素的 HPLC 测定. *药学报* 1989; 24: 207.
4. Darney Jr KJ, et al. Simultaneous measurement of four testicular-3-ketosteroids by isocratic high performance liquid chromatography with on-line ultraviolet absorbance detection. *Ibid* 1983; 257: 81.
5. Uralets VP, et al. Analysis of anabolic steroids in body fluids by capillary gas chromatography with a two-channel detection system and a computer. *J Chromatogr* 1983; 279: 695.
6. R Adatia, et al. An improved method for steroid profile analysis using capillary gas chromatograph. *Chromatographia* 1988; 25: 598.
7. Robert M, et al. Studies on anabolic steroids II. *Biomed Environ Mass Spec* 1989; 18: 429.
8. Catlin DH, et al. Analytical chemistry at the XXIIIrd Olympic Games in Los Angeles, 1984. *Clin Chem* 1987; 33: 319.

9. Robert M, et al. Studies on anabolic steroids I. *J Chromatogr* 1989; **489**: 23.
10. Donike M, Doping analysis. *Proceedings World Symposium on Doping in Sports, International Athletic Foundation, Florence*. 1987; 53 ~ 80.
11. Galletti F, et al. Metabolism of 1-dehydroandrostane in man. *Steroids* 1971; **18**: 39.

## THE CHROMATOGRAPHIC – MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS AND DETECTION OF ANABOLIC STEROIDS IN HUMAN URINES AND METABOLIC STUDY

J Zhang, CS Liu, HG Bi, YZ Zhang\*, L Ye\* and TH Zhou

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050; \* National Research Institute of Sports Medicine, Beijing 100061*)

**ABSTRACT** Nineteen anabolic steroids were separately administered to healthy men. Anabolic steroid metabolites were isolated and extracted from the collected urine samples following an integrated procedure. The main metabolic pathways of these drugs were made clear after the investigation by GC-MS. Based on the obtained chromatographic-mass spectrometric data of anabolic steroids, a method for large scale and routine analysis of anabolic steroids was set up.

**Key words** Anabolic steroids; Urine analysis; GC/MS

### 中国药学杂志 1992 年征订

中国药学杂志(原名药学通报)为中国药学会主办的、国内外公开发行的综合性药学术刊物,是一本反映我国药理学各科进展和动态的高、中级专业性学术期刊,以高、中级药学工作者及其他医药卫生人员为读者对象。

本刊内容包括药剂学、临床药学、药理学、药品检验学、药物化学、药品生物化学、中药及天然药物学等。辟有专题笔谈、药品生产、中药及天然药物、药理、药剂、药品质量与检验、药物与临床、药物不良反应、新药评介、综述、药学史、知识介绍、科学管理、问题讨论、科研简讯、文摘与资料、药学信息等 20 多个栏目,欢迎订阅。现已开始 1992 年征订,请及早到当地邮局订阅。

本刊国内统一刊号 CN11-2162/R, 邮发代号 2-232, 为 16 开本 64 页, 每期定价 2.00 元。

中国药学杂志编辑部