

# 用 GC/MS 法定性检测人尿中的 可的松类药物

徐友宣\* 申利 王杉 吴筠 崔凯荣 张长久 朱绍棠

(国家体委运动医学研究所兴奋剂检测中心 北京 100029)

**[摘要]** 本文采用固相提取、酶解及甲肟-三甲基硅醚衍生化的方法,用 GC/MS 的多离子检测技术成功地检出人尿中多种可的松类药物及某些代谢产物,方法灵敏、可靠。

**关键词:** 可的松类药物 人尿 GC/MS

## 1 引言

可的松类药物,医学上称为糖皮质激素,在临床上有着广泛而复杂的用途,主要用于抗炎、抗病毒、抗休克及免疫抑制等。由于这类药物还有提高中枢神经系统兴奋性的作用,有时被运动员采用,以提高运动成绩,因而这类药物被国际奥委会列入禁用药物,可的松类药物的分析检测也就成为兴奋剂控制工作的一部分。这类药物的分析方法有放射免疫法<sup>[1]</sup>、HPLC 法<sup>[2]</sup>、GC 法<sup>[3]</sup>、LC/MS 法<sup>[4]</sup>及 GC/MS 法<sup>[5,6]</sup>。这些方法中能用于可靠定性分析的方法有 LC/MS 法及 GC/MS 法。由于 LC/MS 法操作复杂,仪器及运行成本昂贵,因而 GC/MS 法就成为常规检测中可行的方法。以往的 GC/MS 法仅对单个药物进行研究,本文针对这类药物建立了系统分析方法,涉及的药物有可的松、氢化可的松、泼尼松、氢化泼尼松、倍他米松、甲基强的松龙、地塞米松、去氧皮甾酮、去炎松、氟氟舒松等。

## 2 实验部分

**2.1 仪器条件:** HP5890-HP5970 GC/MSD; 25m×0.2mm×0.33μm HP-5 石英毛细柱; 柱温程序: 100℃ $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220℃ $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300℃(18min); 进样口温度 290℃; 接口温度 300℃; 采集范围为 50~750amu。

**2.2 药品及试剂:** 所有药物标准品均为 Sigma 公司标准品; LH-20 树脂、Sep-pak 柱、TMSIM (Trimethylsilylimazole)、β-葡萄糖醛酸酐、甲氧基胺(CH<sub>3</sub>ONH<sub>2</sub>)也购自 Sigma 公司。其它均为国产分析纯试剂。

**2.3 提取步骤:** 5mL 尿中加入 500ng 内标(雄甾烷),将尿通过 Sep-pak 柱。柱子用 5mL 水洗后,用 2mL 甲醇洗脱。洗脱液在旋转蒸发仪上蒸发至干,加入 1mL 0.2mol/L 的醋酸盐缓冲液(pH=6.8)及 100μL 的 β-葡萄糖醛酸酐酶(1 万单位),在 55℃ 的水浴中温孵

1996 年 1 月 31 日收

\* 通讯联系人

3h。之后,在溶液中加入 100mg 固体缓冲剂(碳酸盐,pH8.5~9)及 5mL 乙醚,在振荡器上振荡 10min,在 2500r/min 下离心 5min,将有机相在氮气流下挥干,加入 50 $\mu$ L 甲氧基胺(50 $\mu$ g/ $\mu$ L)的吡啶溶液,混匀后在 80 $^{\circ}$ C 下反应 3h。将溶液在 50 $^{\circ}$ C 下用氮气挥干,加入 50 $\mu$ L TMSIM,在 100 $^{\circ}$ C 下反应 3h。冷却后将反应液倾入 LH-20 柱(10mmID,300mmH),用 2mL 己烷/氯仿(1:1, V/V)混合液洗脱,将洗脱液在氮气下挥干,然后取 20 $\mu$ L 己烷溶解残渣,在 GC/MS 上进样 2 $\mu$ L 分析。

### 3 结果与讨论

3.1 由以上实验得到的质谱及色谱数据列于表 1 中,质谱图因限于篇幅仅列出图 1。

表 1 可的松类药物的保留时间及质谱特征离子

药名	保留时间(min)	特征离子
可的松	21.462	562,531,453,441
四氢可的松	24.345	609,578,488,453
氢化可的松	22.091	636,605,515,425
四氢氢化可的松	24.740	683,652,562,472
波尼松	21.036	560,529,439,309
氢化波尼松	21.959	634,603,519,423
20-羟基波尼松	29.250	648,589,558,468
倍他米松	24.729	666,635,563,364
甲基强的松龙	22.408	648,617,527,496
地塞米松	24.418	666,635,364
去氧皮甾酮	20.363	460,445,429,339
去炎松	26.590	709(M-31),618,529
氯氟舒松	26.282	555,498,379,310
雄甾烷(内标)	19.683	403,372

### 3.2 讨论

3.2.1 可的松类药物由于 20 位羰基的热不稳定性,在进行 GC 或 GC/MS 分析时在进样口分解,因而,人们采用了许多方法将此羰基进行结构改造,比较成功的有氧化法<sup>[7]</sup>、缩酮法<sup>[5]</sup>、烯醇-硅烷化法<sup>[2]</sup>及肟-硅烷化<sup>[6]</sup>法。其中应用最广的是方法是肟-硅烷化法。对于 16 位无取代基的药物,肟化及硅烷化反应都较易进行,但对于 16 位有取代基时,由于空间位阻的影响,二步反应都难于进行,肟化在 80 $^{\circ}$ C 反应 3h,硅烷化在 100 $^{\circ}$ C 反应 3h 才能完成。

3.2.2 衍生化后所得 TMSIM 溶液对色谱柱有破坏作用,甲氧基胺也会在分流口冷凝,

严重时发生阻塞,故在进样前必须除去。采用溶剂洗涤法<sup>[8]</sup>费时费力,而采用凝胶树脂 LH-20 可将产物与其它试剂分开,且快速、简便。

3.2.3 这类药物在尿中浓度很低,又多以结合态存在,故在提取前须用酶解法将药物游离出来。在酶解前过 Sep-pak 柱,将尿中无机及部分有机杂质除去,可提高酶解效率及纯化样品。

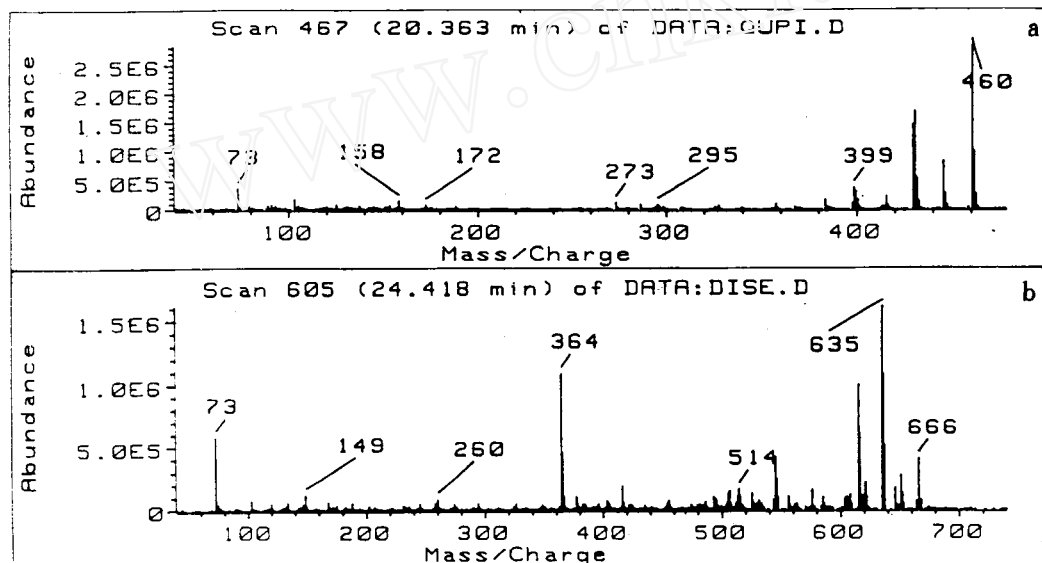


图 1 去氧皮甾酮(a)及地塞米松(b)的质谱图

### 参 考 文 献

- 1 M C Dumasia, D I Chapmann, M S Moss *et al.* Biochem J, 1973; 133; 401
- 2 L G Mclaughlin, J D Henion. J Chromatogr, 1990; 529; 1
- 3 W L Gardiner, E C Horning. Biochim Biophys Acta, 1966; 115; 524
- 4 S J Park, Y J Kim, H S Pyo *et al.* J Anal Toxicol, 1990; 14(2); 102
- 5 H Shibasaki, T Furuta, Yasuji Kasuya. J Chromatogr, 1992; 579; 193
- 6 G M Rodchenkov, A N Vedenin, V P Uralets *et al.* J Chromatogr, 1991; 565; 45
- 7 G R Her, J T Watson. Biomed Environ Mass Spectrom, 1986; 13; 57
- 8 G M Rodchenkov, V P Uralets, V A Semenov. J Chromatogr, 1988; 426; 399

## Systematic Analysis of Corticosteroids in Human Urine by GC/MS

Xu Youxuan\*, Shen Li, Wang Shan, Wu Yun,  
Cui Kairong, Zhang Changjiu, Zhu Shaotang

(China Doping Control Centre, National Research Institute of Sports Medicine,  
Beijing 100029, China)

Received 1996-01-31

### Abstract

A systematic procedure is established in this paper. Corticosteroids are extracted from human urine by Sep-pak column, and derivatized by methoxyamine and trimethylsilylimazole. The results show that the drugs can be detected confirmatorily in selected ion monitoring mode.

Key Words: corticosteroids, human urine, GC/MS

\* To whom the correspondence should be addressed.