

人尿中卡鲁睾酮的代谢产物研究

张亦中 刘欣 张长久 叶荔

(国家体委运动医学研究所,北京 100029)

提要 使用 GC/MS 方法对人尿中卡鲁睾酮(calusterone)的代谢情况进行了研究。尿样经 XAD-2 树脂柱吸附、酶水解、乙醚萃取及三甲基硅烷衍生化处理后,使用毛细管柱进行 GC/MS 分析,鉴定了 7 种代谢物,从而推导出卡鲁睾酮在人体中的代谢模式。

关键词 卡鲁睾酮;尿分析;气-质联用法

卡鲁睾酮(17 β -OH-7 β ,17 α -二甲基- Δ^4 雄烯-3-酮)是一种被禁用的类固醇药物。它的 7 α 异构体——7 α ,17-二甲基睾酮(bolasterone)的代谢情况,我们曾有过简单描述⁽¹⁾,但也仅限于四氢的代谢物。卡鲁睾酮的人体代谢情况目前尚未见详细报道。为了有效禁止该药的使用,我们使用 GC-MSD 对人服用卡鲁睾酮后尿中出现的代谢物情况进行了分析。

实验部分

试剂及仪器

7 α ,17-二甲基睾酮标准品(Sigma 公司);甲睾(methyltestosterone)标准品(内标); β -葡萄糖醛酸酐酶(β -glucuronidase *E. coli* IX-A 型, Sigma 公司); β -葡萄糖醛酸酐酶(β -glucuronidase *H. pomatia* H-2 型, Sigma 公司);*N*-甲基-*N*-三甲基硅基三氟乙酰胺(MSTFA, Sigma 公司);三甲基碘硅烷(TMSI, Aldrich Chemical 公司);XAD-2 树脂,经丙酮、甲醇、水抽提处理(100~200 目, Serva);水、有机溶剂等均经二次重蒸后使用。

0.2 mol/L pH 6.84 磷酸缓冲液, pH 8.9 的固体缓冲剂(NaHCO_3 : Na_2CO_3 = 8 : 1)。

衍生化试剂混合溶液与使用: MSTFA/TMSI = 1000 : 1, 5 ml MSTFA 加入 1 μ l 三乙胺, 20 mg 二硫代赤藓糖醇和 5 μ l TMSI 置棕色瓶中混匀, -10 $^{\circ}$ C 保存。使用时取 50 μ l 加至尿样提取最终残余物, 70 $^{\circ}$ C 下反应 30 min。抽取 1 μ l 进行 GC-MSD 分析。

气相色谱仪(GC): HP5890A; 质量选择检测器(MSD): HP5970B; 化学工作站: HP300 59970; 自动进样器: HP7673A。

尿样收集

健康男性口服 40 mg 卡鲁睾酮后收集 0~48 h 尿(德国兴奋剂实验室提供), -20 $^{\circ}$ C 冰箱冰冻保存。

尿样预处理(游离甾体和结合甾体的分离提取)

在 XAD-2 树脂装填的玻璃小柱中,加入 5.0 ml 尿,加入甲睾(250 ng)作为内标。待尿流过柱后,以 5 ml 蒸馏水洗涤小柱,然后用 2 ml 甲醇分两次洗脱。洗脱液经旋转蒸干(45℃)后:
 (1)游离组分提取:加 1 ml pH 6.8 的缓冲溶液和 5 ml 乙醚,振荡萃取,离心后,转移出醚层;
 (2)结合组分提取:在上述萃取后的水相中,加入 100 μ l β -葡萄糖醛酸甙酶(10000 Fishman 单位)混匀,在 55℃ 恒温水浴中酶解 3 h 取出,加入 100 mg pH 8.9 的固体缓冲剂和 5 ml 乙醚,振荡萃取,离心后,转移出醚层。在加热(45℃)情况下,用氮气吹干乙醚,残渣中加入 50 μ l 混合衍生化试剂,70℃ 反应 30 min,供 GC-MSD 进样分析。

GC-MSD 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 μ m (固定相为交联甲基聚硅氧烷,含 5% 苯基);载气:氮气;进样口温度:280℃;检测接口温度:300℃;进样方式:无分流进样;离子源电压:70 eV;柱升温程序:起始温度 100℃,停留 1 min,以 16℃/min 的速率升温至 220℃,再以 3.8℃/min 升至 299℃,保持 6 min。

结果与讨论

卡鲁睾酮代谢方向推测

以前的研究发现,类固醇激素的代谢是一个在多种酶和辅酶催化下的复杂而又很有规律的过程⁽²⁾。第二相反应中常与葡萄糖醛酸或硫酸结合,而代谢和第一相反应一般又有三种情况:(1) Δ^4 双键在 5 α (或 5 β)还原酶催化下加氢成 5 α (或 5 β)二氢代谢物⁽³⁾;(2) Δ^4 还原后,二氢代谢物在 3 α (或 3 β)羟甾脱氢酶催化下还原成 3 α (或 3 β)羟基的四氢代谢物。典型的例子如甲睾和大力补(methendienone)的四氢还原代谢^(3,4);(3)在 1,2 两步还原的同时,还常伴有羟化酶催化下的羟化反应。6 位、16 位的羟化代谢物较为常见。如大力补、4-氯-大力补(oral-turinabol)等,以 6 β -OH 化产物为主要代谢物,而司坦唑(stanozolol)、夫拉扎勃(furazabol)则以 16-OH 产物为主要代谢物⁽⁴⁾。

根据以上规律,推测出卡鲁睾酮的代谢方向(图 1),并对所推测的各个代谢物用 GC-MS 为手段进行有目的寻找。

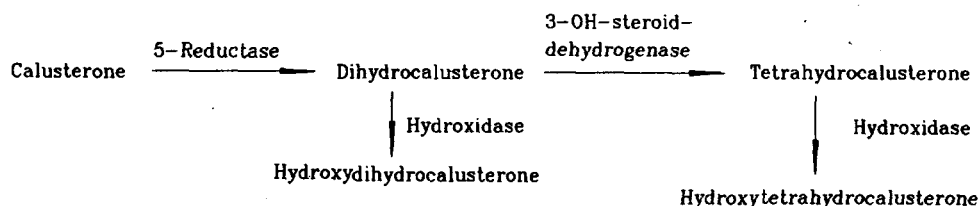


Fig 1 Enzymes in the metabolism of calusterone.

卡鲁睾酮代谢物寻找

根据上面对卡鲁睾酮代谢情况的推测,在其阳性尿中找到了原型药和 7 个代谢物,其 GC-MS 特征如表 1,相应的气相色谱和全扫描质谱见图 2~6。

Tab 1 GC-MS properties of calusterone and its metabolites

Compound	RT(min)	RRT	M/Z
Parent	21.72	1.09	460(M ⁺), 445, 355, 315
Met-1	16.65	0.84	462(M ⁺), 447, 372
Met-2	16.68	0.84	Same as Met-1
Met-3	19.70	0.99	464(M ⁺), 449, 374, 143
Met-4	21.67	1.09	550(M ⁺), 460, 445, 355, 315, 143
Met-5	22.07	1.11	Same as Met-4
Met-6	23.0	1.15	552(M ⁺), 231, 218
Met-7	23.31	1.17	552(M ⁺), 462, 231, 218

To calculate the RRT, endogenous testosterone was used as internal standard (RT=19.93 min).

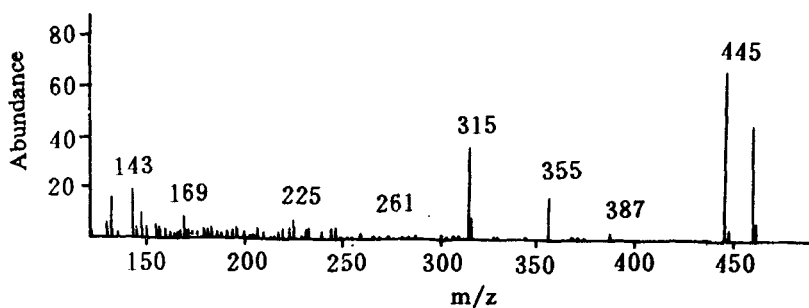


Fig 2 Mass spectrum of calusterone.

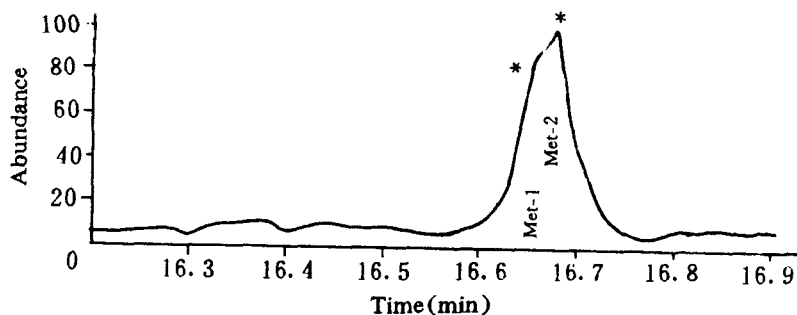
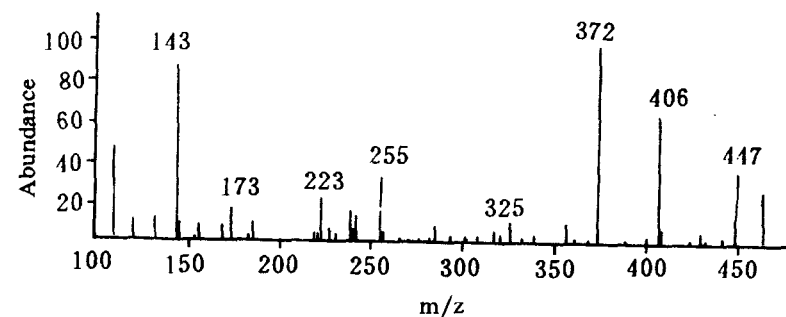


Fig 3 Chromatogram and mass spectrum of Met-1, Met-2 of calusterone. * Peak of metabolite.

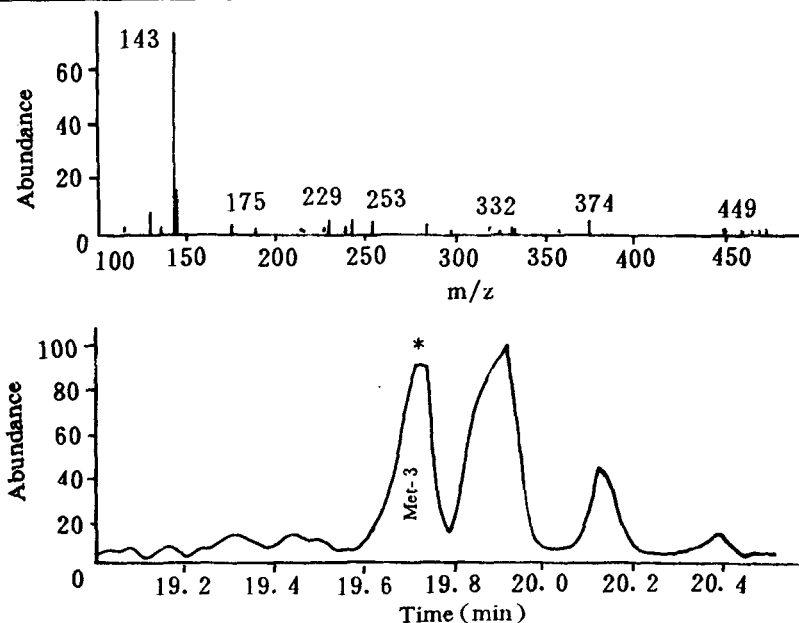


Fig 4 Chromatogram and mass spectrum of Met-3 of calusterone. *Peak of metabolite.

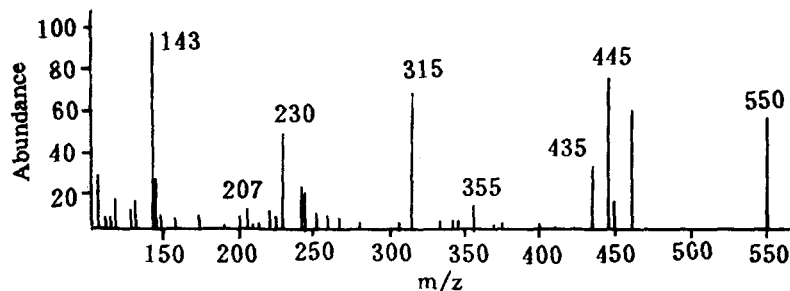


Fig 5 Mass spectrum of Met-4, Met-5 of calusterone.

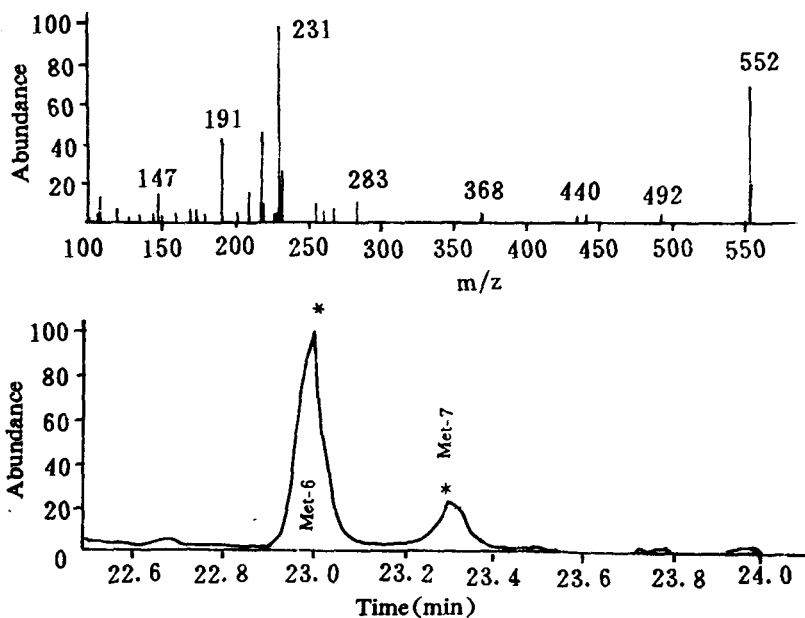


Fig 6 Chromatogram and mass spectrum of Met-6, Met-7 of calusterone. *Peak of metabolite

Met-1 与 Met-2 从质谱上看互为立体异构产物,但在本实验方法中未能达到基线分离。Met-4 在尿中的浓度很低,除 143 和分子离子峰 550 等碎片峰尚能勉强分辨外,其它离子均被尿本底掩盖。从可辨的几个碎片分析, Met-4 是 Met-5 的立体异构产物。

代谢物结构判断

实验结果中,原型药、Met-6 和 Met-7 浓度最高。图 6(质谱图)的 218,231 两个典型 D 环碎片峰说明 Met-6, Met-7 均为 16 羟基代谢物⁽¹⁾。在所用实验条件下, α 异构体在 β 前出峰,因此 Met-6 为 16 α -OH 异构体。这也从二者量的比较中得到了证实(图 6 色谱图)。因为正常人体内, 16 α -羟化酶的活性强于 16 β -羟化酶。这一现象在司坦唑的代谢分析中特别明显⁽⁵⁾。

和 7 α ,17-二甲基睾酮相似,在卡鲁睾酮的阳性尿中也找到了 Δ^4 和 3-羰基全部被还原了的四氢代谢产物 Met-3。由于体内 3 α -羟甾脱氢酶的活性远高于 3 β ,认为 Met-3 的 3 位羟基是 α 构象。在寻找四氢代谢物时,只发现一个代谢物 Met-3。而从理论推断应有 2 对四氢代谢物(3 α ,5 β ;3 α ,5 α ;3 β ,5 β ;3 β ,5 α)。原因在于体内 3 β -羟甾脱氢酶的活性远小于 3 α ,使 3 β 代谢物浓度低于仪器的检测限。尽管这样,仍至少还有一个 3 α -OH-代谢物的 5 位异构体。观察 Met-3 色谱峰后,发现峰形有平顶,估计该峰中包含了两个四氢代谢物,只是现有分离条件未能将二者分开。相似的情况在甲睾的代谢研究中有发现⁽³⁾。

一般情况下,由于 3-羟甾脱氢酶的活性很高,而 5 α (5 β)-还原酶的活性相对较低,所以 Δ^4 双键一旦被还原后,立即继续进行下一步加氢还原反应,故二氢还原代谢物浓度通常很低,有时根本检不出,例如甲睾和大力补⁽³⁾。有趣的是,在卡鲁睾酮的代谢研究中,我们查到了相当浓度的二氢代谢物 Met-1 和 Met-2。这可能是 7 β 位的甲基对 3-羰基的还原产生了影响。与 Met-3 同样,未能将两个异构体分开。

由于对 3-羰基还原速度的减慢,二氢代谢物的羟化反应变为较主要的代谢方向。因此检到了二个羟化的二氢卡鲁睾酮 Met-4, Met-5。B 环开裂产生的 315 碎片表明羟基位置在 A 或 B 环上。

综上所述,卡鲁睾酮的代谢情况如图 7 所示。

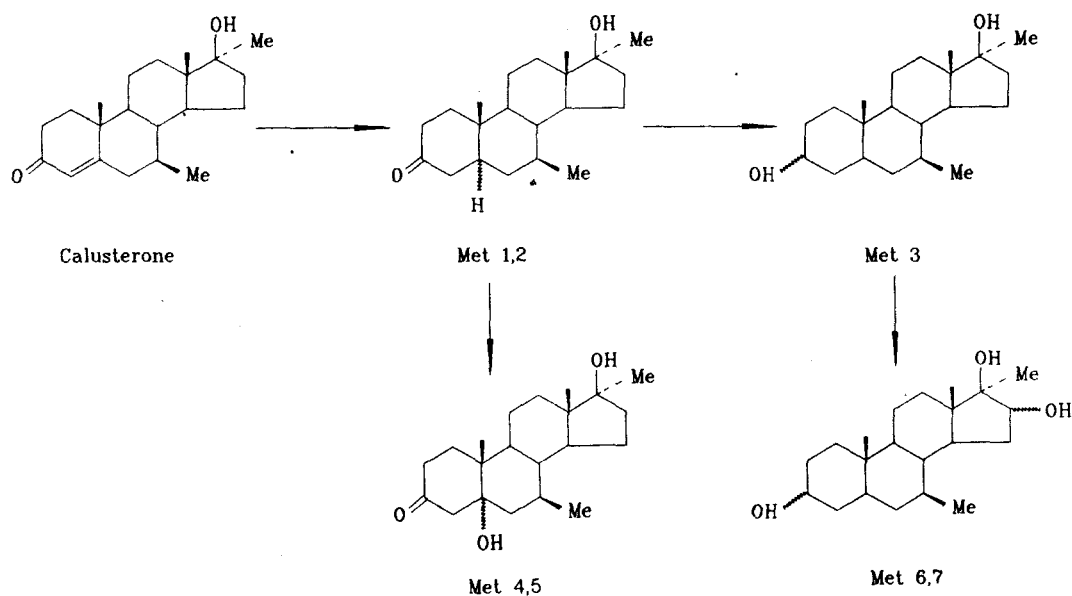


Fig 7 Metabolic pathway of calusterone.

卡鲁睾酮代谢的第二相反应

17 α -甲睾类化合物在代谢过程中常见与葡萄糖醛酸或硫酸结合的情况,对卡鲁睾酮比较了其结合与游离两个组分中的情况,发现该药以结合型代谢为主,在游离组分中未发现可辨的卡鲁睾酮代谢物。经实验比较,大肠杆菌酶(*E. coli*)对卡鲁睾酮结合型代谢物的水解作用优于蜗牛酶(*H. pomatia*)。

检出限

因未能得到卡鲁睾酮的标准品,我们使用其 7 α 异构体——7 α ,17-二甲基睾酮测定,GC-MS 上检出限为 0.1 ng。

参 考 文 献

- 1 张霁,等. 尿中多种蛋白同化激素药物的 GC/MS 分析及代谢研究. 药学报 1991;26: 598.
- 2 王明运主编. 激素生物化学. 北京:人民卫生出版社,1987: 307~308.
- 3 Robert M, et al. The sequential reduction of methandienone and structurally related steroid A-ring substituents in human. *J Chromatogr* 1991;562: 323.
- 4 Robert M, et al. Integrated methodological approach to the GC-MS analysis of anabolic steroid metabolites in urine. *Ibid* 1989;489: 23.
- 5 Robert M, et al. Studies on anabolic steroids. III. *Ibid* 1989;497: 17.

STUDIES ON URINARY METABOLITES OF CALUSTERONE IN MAN

YZ Zhang, X Liu, CJ Zhang and L Ye

(National research Institute of Sports Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT The metabolites of calusterone (17 β -OH-7 β , 17 α -dimethyl-androst-4-ene-3-one) in man has been investigated by GC/MS. After oral administration, the parent compound and seven metabolites were detected in the conjugated fraction. The extraction and fractionation of these metabolites were achieved by using XAD-2 column. The sample was derivatized with MSTFA/TMSI before GC/MS analysis. The mass spectra of the metabolites are presented and the metabolic pathway was discussed.

Key words Calusterone; Urine analysis; GC/MS