

# 人尿中脱氢睾酮代谢物的 GC/MS 分析

张 霁 刘春胜 周同惠

(中国医学科学院药物研究所分析室, 北京 100050)

**摘要** 本文用 GC/MS 方法, 对人尿中脱氢睾酮 (boldenone) 代谢物进行了研究。志愿者口服 20 mg 脱氢睾酮后, 收集阳性尿。尿样经过包括 XAD-2 树脂柱吸附、酶水解、有机相萃取及三甲基硅烷衍生化反应的预处理后, 用毛细管气相色谱与质谱检测器联用进行分析, 鉴定了脱氢睾酮的几个主要代谢物和它们的代谢模式; 总结了兴奋剂检测中具有意义的代谢物及其碎片离子; 对收集的阳性尿中脱氢睾酮浓度进行测定; 对预处理方法的回收率进行了研究。

**关键词** 脱氢睾酮; 尿样分析; 气相色谱质谱法

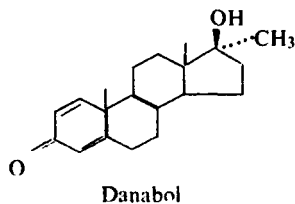
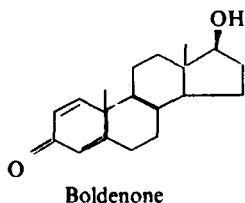
脱氢睾酮 (boldenone) 化学名为  $17\beta$ -羟基- $\Delta^1,4$ -雄烯-3-酮, 是一种蛋白类同化激素, 具有促进动物体内蛋白质合成的功能。此药多为兽用, 但近年来, 在体育运动中, 一些运动员滥用此药, 试图非正常地增加自身肌肉组织量, 增强体能。国际奥委会明令禁止使用包括脱氢睾酮在内的同化激素。为了有效控制此类药物的滥用, 需要有特征、灵敏的检测手段。GC/MS 方法是目前检测同化激素的主要手段<sup>(1~4)</sup>。在 GC/MS 分析中, 主要检测浓度高且特征性强的原型药物或其代谢物。在建立系统检测方法前, 必须对药物的代谢模式、尿中代谢产物进行研究, 总结具有检测意义的代谢物及其质谱碎片离子。脱氢睾酮具有甾体结构, 对其检测国际上各兴奋剂实验室存在差别<sup>(5,6)</sup>。对脱氢睾酮代谢研究较少并集中于动物体内<sup>(7)</sup>, 在人体内代谢研究未见报道。本文通过包括预处理、衍生化在内的 GC/MS 分析方法, 对脱氢睾酮人体内代谢进行分析, 并对方法回收率及检测限进行研究。

## 实 验 部 分

### 药品和仪器

脱氢睾酮标准品 Sigma 公司; 大力补 (danabol) 标准品 (内标) 上海第十二制药厂;  $\beta$ -葡萄糖醛酸甙酶 ( $\beta$ -glucouronidase) 上海生化试剂厂; N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA)、三甲基碘硅烷 (TMSI) Sigma; 甲醇、乙醚为分析纯并经过两次重蒸处理; 水由蒸馏水经纯水器制备; XAD-2 树脂 Sigma, 经丙酮、甲醇分别抽提处理。

气相色谱 HP 5890 A、质量选择检测器 (MSD) HP 5970 B、毛细管气相色谱柱 HP-5 (17 m  $\times$  0.22 mm  $\times$  0.33  $\mu$ m) Hewlett-Packard 公司; 离心机 LD5-2A 北京离心机厂; 往复式振荡器 江西医用设备厂。



### 尿样预处理

尿样 5 ml 加入 XAD-2 树脂小柱 (10×30 mm), 以水 5 ml 选涤柱层, 继以甲醇 5 ml 洗脱游离及结合甾体。甲醇洗脱液旋转蒸干, 残余物加 0.2 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液 1 ml 溶解, 再加入  $\beta$ -葡萄糖醛酸甙酶 100  $\mu$ l (相当于 10000 Fishman units), 在 55  $^{\circ}$ C 培养 3 h, 然后向酶解液加入固体缓冲剂 ( $K_2CO_3$ :  $KHCO_3$ =1:4) 调 pH 值约 8.7, 加入乙醚 5 ml, 振荡萃取 10 min。取出醚层, 加无水  $Na_2SO_4$  1 g 脱水, 将醚液转移至另一干净无水试管中,  $N_2$  气流下吹干。残余物用 120  $\mu$ l 甲醇溶解, 转移至衍生化小瓶, 同时加约 0.1 mg 抗氧化剂 (二硫代赤藓糖醇), 需要时加入定量内标,  $N_2$  气流下吹干甲醇, 加盖密封。

### 衍生化反应

内装有提取物的衍生化小瓶注入 MSTFA 49  $\mu$ l, TMSI 溶液 1  $\mu$ l, 在 70  $^{\circ}$ C 反应 30 min, 然后取 1  $\mu$ l 反应液进行 GC-MSD 分析。

### 脱氢辜酮与内标相关曲线

配制不同浓度的脱氢辜酮标准品溶液, 分别定量加入衍生化小瓶, 衍生化后, 各瓶中脱氢辜酮浓度分别为 1, 5, 40, 80, 140 和 200 ng/ $\mu$ l, 同时各瓶中加浓度为 10 ng/ $\mu$ l 的大力补为内标。反应液 1  $\mu$ l 进样, 以选择离子检测方法分析, 检测离子  $m/z$  206。进样量 1~20 ng, 可获得线性相关曲线:  $C_o = 0.752 A_r + 0.0747$  ( $r = 0.999$ ), 其中  $C_o$ ,  $A_r$ ,  $r$  分别是脱氢辜酮与内标的浓度比、色谱峰面积比及线性相关系数。

### 阳性尿收集

志原者在服用药物前 10 和 5 h 分别收集两份空白尿, 然后服用脱氢辜酮 20 mg, 每间隔 5~10 h 收尿样一份, 次日开始, 每天收尿样两份, 直至药物排尽 (一般 10~15 d), 收集的尿样置于 -20  $^{\circ}$ C 冰柜中冷冻保存。

## 结果与讨论

### 脱氢辜酮的尿中代谢物

服用脱氢辜酮后 2 h, 其原型可在尿样中检出, 9 h 后尿中浓度达高峰, 直到 34 h 均可检出, 根据相关曲线求得尿中浓度变化见图 1。同时, 有一主要代谢物 (Met 3) 在 9 h 后的尿中被检测到 (图 2), 直到 83 h 仍可检出。此外, 还有 5 个次要代谢物 (Met 1, 2, 4, 5, 6) 亦在 9 h 后的尿中被检出 (图 3), 它们的浓度均低于脱氢辜酮原型和 Met 3。

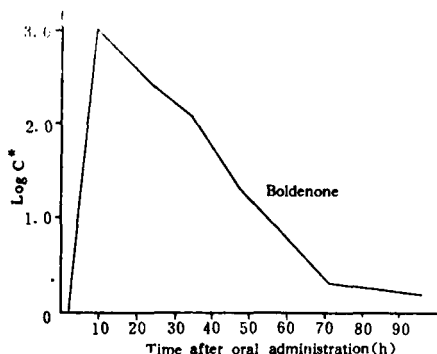


Fig 1. Concentration of boldenone in urine at different time after administration of the drug

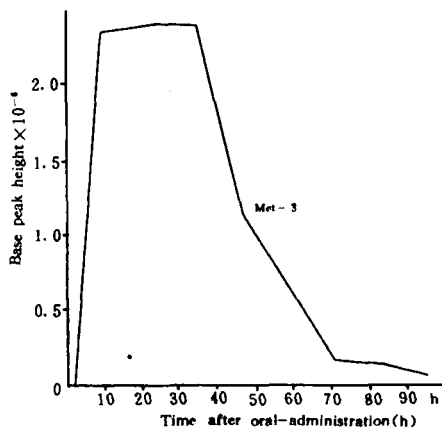


Fig 2. The GC peak height of urinary Met-3 at different times.

### 代谢物的GC/MS鉴定

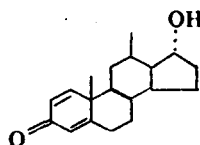
按上述游离、结合甾体共同提取方法,在脱氢睾酮阳性尿中,用GC/MS分析到脱氢睾酮原型和几个代谢物,但用游离甾体提取法处理样品,则未检测到脱氢睾酮及其代谢物,说明脱氢睾酮及其代谢物主要与葡萄糖醛酸形成结合物排泄。测检到的脱氢睾酮原型、代谢物及其GC/MS性质见表1。

Tab 1. GC/MS properties of boldenone and its metabolites

Compound	RT (min)	RRT	M	Base ion
Boldenone	20.0	1.42	430	206
Met 1	19.1	1.35	430	206
Met 2	16.1	1.14	430	415
Met 3	16.4	1.16	432	194
Met 4	18.2	1.29	518	518
Met 5	18.7	1.33	518	428
Met 6	19.5	1.38	518	503

RT:GC retention times; RRT: Relative retention times compared with 5-androstan-17-one.

脱氢睾酮TMS-Enol-Ether衍生物质谱见图4A,  $M^+$  (430)和  $(M-15)^+$  (415)离子具有相当高的丰度。由于脱氢睾酮A环具有三个不饱和键形成稳定的共轭体系,所以其在B环C7~C8键,C9~C10键断裂是质谱裂分的主要途径,产生基峰碎片离子  $m/z$  206。Met 1的质谱与脱氢睾酮很相近(图4B),  $M^+$ ,  $(M-15)^+$ 和基峰离子分别是  $m/z$  430, 415, 206,其丰度比也与脱氢睾酮相近,说明Met 1是脱氢睾酮在体内代谢中发生差向异构产生的,故脱氢睾酮Met 1的可能结构为表脱氢睾酮。结构式为:



Met 2和Met 3的TMS衍生物质谱见图5。

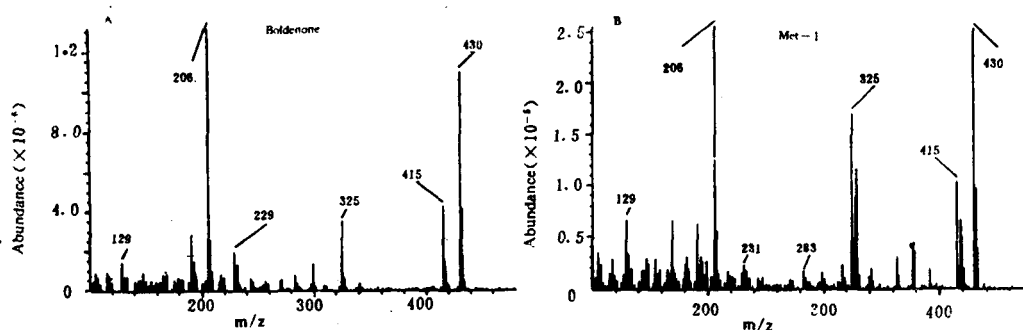


Fig 4. The mass spectra of boldenone (A) and Met-1 (B).

其中Met 3分子离子峰  $m/z$  432,可推测在代谢中脱氢睾酮A环-双键发生还原加氢产生Met 3;由于裂分总是趋向产生稳定碎片正离子,故可推测Met 3的基峰碎片来自C6~C7键、C9~C10键断裂,产生一个双键共轭的稳定正离子,如下式所示:

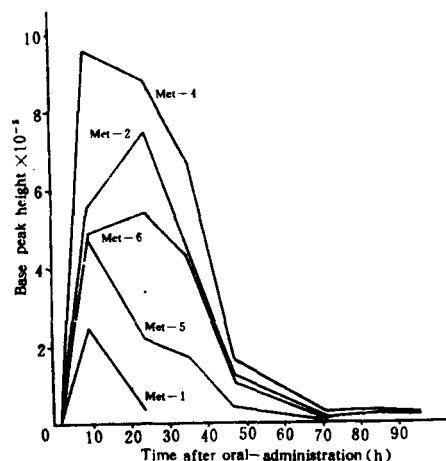


Fig 3. The GC peak height of urinary metabolites at different times.

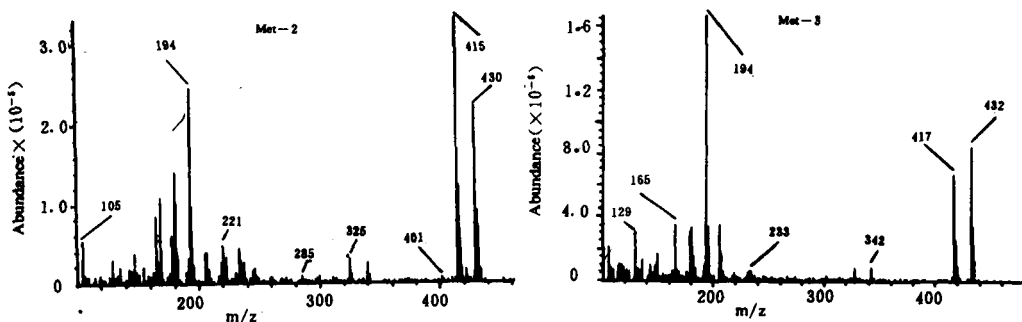
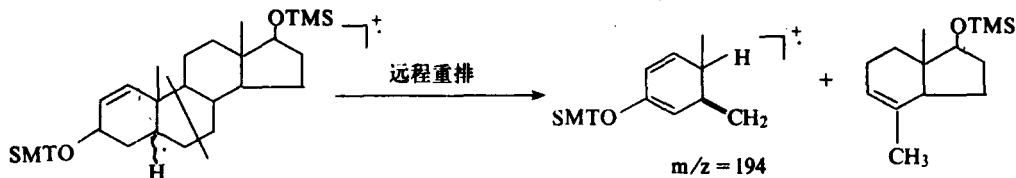
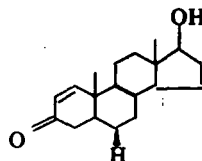
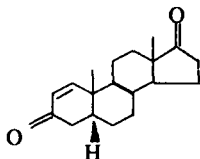


Fig 5 . The mass spectra of Met 2 and Met 3 .

$m/z$  129 来自 D 环裂分。故 Met 3 的可能结构为



Met 2 亦有丰度很高的碎片离子  $m/z$  194，与 Met 3 相同，可推测也是 C6 ~ C7 键、C9 ~ C10 键断裂产生，故 Met 2 与 Met 3 具有相似的 A 环结构，因为 Met 2 分子离子为  $m/z$  430，说明它没有发生还原加氢，而是 C3 位上羰基变构到 C17 位，故 Met 2 可能具有如下结构：



通过 GC/MS 分析，还检测到其它三个代谢物 Met 4 ~ 6，它们的分子离子均为  $m/z$  518 (表 1)，说明它们在代谢中发生了羟基化反应，但每个代谢物的羟基化位点尚有待进一步研究。

方法回收率与检测限

取三份空白尿样 (每份 5 ml)，定量加脱氢睾酮标准品，然后预提取，衍生化前定量加入大力补作为内标。以选择离子检测方法分析，检测离子  $m/z$  206。根据前面得到的脱氢睾酮/内标相关曲线，计算提取后样品中脱氢睾酮浓度，从而计算预提取方法回收率 (表 2)。

Tab 2 . Recovery of boldenone in extraction procedure

Sample No .	1	2	3	
Conc .of boldenone in sample (ng/ml)	500	500	500	
Recovery	First inj . (%)	75 .6	78 .1	72 .3
	Second inj . (%)	77 .1	80 .3	72 .3
Main recovery (%)	76			

在回收率实验中，开始用  $5\alpha$ -雄烷-17-酮 ( $5\alpha$ -androstan-17-one) 作为内标，选择  $m/z$  331 ( $M-15$ )<sup>+</sup> 作为其检测离子，对脱氢睾酮则检测  $m/z$  206。但实验得相关曲线线性不好，数据重复性差，相关系数为 0.890。经分析，这可能是由于 MSD 在不同时刻状态有所不同，在高、低质量数检测相对丰度变化所致。改用大力补为内标，其质谱基峰亦为

$m/z$  206, 与脱氢睾酮相同, 用选择离子检测  $m/z$  206, 实验得相关曲线, 数据重复, 线性很好。可见在用 MSD 准确定量分析中, 所选用内标应尽量与待测物质具有相同的检测离子, 且它们的化学结构和色谱行为应尽量相似。

空白尿样提取物数份, 分别加入定量脱氢睾酮, 衍生化后进样分析。在脱氢睾酮进样量 100 pg 时, 选择检测离子  $m/z$  430, 415, 206 响应值约为噪音 3 位, 以此为脱氢睾酮最低检测限, 换算成尿中浓度得到: 脱氢睾酮最低检测限为尿中 1 ng/ml。

### 参 考 文 献

1. Catlin DH .et al .Analytical chemistry at the games of the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles , 1984 .*Clin Chem* 1987 ; 33 ;2 .
2. Masse R .et al .Studies on anabolic steroids I .*J Chromatogr* 1989 .489 :23 .
3. Masse R .et al .Studies on anabolic steroids II .*Biomed Environ Mass Spectrom* 1989 ; 18 :429 .
4. Donike M .Doping analysis . In : *Proceedings World Symposium on Doping in Sports* . Florence : International Athletic Foundation ,1987 :53 .
5. Chan SC .*Accreditation report* .Calgary :Foothills Hospital Medical Control Laboratory .1987 .
6. Park JS .*Accreditation for antidoping analysis test report* .Seoul :Doping Control Center ,Korea Advanced Institute of Science and Technology .1987 .
7. Houghton H .et al .Some applications of chromatography to steroid in analysis in the horse .*Analyst* 1988 ;113 :8 .

## GAS CHROMATOGRAPHIC/MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF BOLDENONE URINARY METABOLITES IN MAN

J Zhang ,CS Liu and TH Zhou

(*Department of Analytical Chemistry ,Institute of Materia Medica ,Chinese Academy of Medical Sciences ,Beijing 100050*)

**ABSTRACT** The metabolism of boldenone ( $17\beta$ -hydroxy-1,4-androsterone-3-one) in man has been investigated by gas chromatography/mass spectrometry .After oral administration of a 20 mg dose to man , six metabolites were detected in the conjugated fraction of the urinary samples . Boldenone , the major compound excreted in urine , was detected within 34 h after administration . In addition , several metabolites , resulting from the hydroxylation of boldenone and the reduction of the unsaturated carbon bonds of boldenone , were detected in the urine samples varying from 9 to 83 h . Extraction and fractionation of these metabolites were achieved by using XAD-2 column and gas chromatography . The recovery of the whole procedure was studied . Furthermore , the mass spectra of the metabolites are presented and major fragment pathways are discussed .

**Key words** Boldenone ; Urine analysis ,GC/MS