

GC/C/IRMS 法在内源性蛋白同化激素检测中的应用^{*}

(文献综述)

哇春玲 吴侔天 张长久

(国家体育总局运动医学研究所兴奋剂检测中心 北京 100029)

[摘要] GC/C/IRMS 在兴奋剂检测中应用的时间不长, 但由于其在内源性蛋白同化激素检测中显示出独特的优越性, 使其发展很迅速。本文简要介绍了 GC/C/IRMS 的基本原理, 并综述了其在几种主要的内源性蛋白同化激素(睾酮、双氢睾酮、脱氢表雄酮)检测中的应用。

关键词: GC/C/IRMS 内源性蛋白同化激素 应用

自 1976 年国际奥委会禁止运动员使用蛋白同化激素药以来, 研究人员发展了许多检测此类药物的方法, 有 RIA 法^[1], HPLC 法^[2, 3], GC 法^[4, 5], GC/MS^[6, 7]法。在这些方法中, GC/MS 法集中了毛细管色谱的高分辨率及质谱的结构鉴定特征两大优点, 另外质谱检测部分采用选择离子检测方法(SM)进行分析, 大大提高了检测灵敏度和专属性。因此, 到目前为止, GC/MS 已发展成为蛋白同化激素的常规检测方法。

用 GC/MS 检测外源性蛋白同化激素的方法已经较为成熟。但现在, 有些运动员为了逃避兴奋剂的检查而越来越多地使用内源性蛋白同化激素。内源性蛋白同化激素代谢的复杂性及个体差异性使 GC/MS 法是一种有效但并非万无一失的方法。就睾酮的检测而言, 一方面, 睾酮与睾的浓度比(T/E)个体差异较大, 且受很多病理生理因素的影响, 给正确检测带来一定的困难。例如: 自身睾酮浓度偏低或偏高; 自身表睾浓度偏低等。另一方面, 一些人为因素给检测工作带来的困难。例如一些运动员为了逃避检查, 或服用表睾降低 T/E 比; 或使用速睾使代谢加快; 或使引入的外源性睾酮在比赛期间处于代谢晚期。

从根本上讲, GC/MS 法并未真正区分内、外源性蛋白同化激素, 因此国际奥委会医学委员会(DCM S)要求各兴奋剂检测实验室发展其他的检测内源性同化激素的分析方法。目前, 此类方法有两种发展方向: 第一, 测定血清中以酯形式存在的目标物质^[8, 9]。由于大部分甾体的商品形式是酯结合形式, 而自身分泌的雄性激素在血液中不是以酯结合形式存在的, 因此如果血样中存在任何酯结合形式的雄性激素, 那么此样品就可被判定为阳性。这个方法有两个不足: 一是血样还未被作为常规检测样品, 二是方法的灵敏度有限。第二, 用

* 2000-02-24 收

GC/C/IRMS 区分尿中的内、外源性蛋白同化激素。由于内、外源性蛋白同化激素的 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值不同, 因此用 GC/C/IRMS 测定尿中各蛋白同化激素 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值, 就可判定是否引入了外源性的蛋白同化激素。

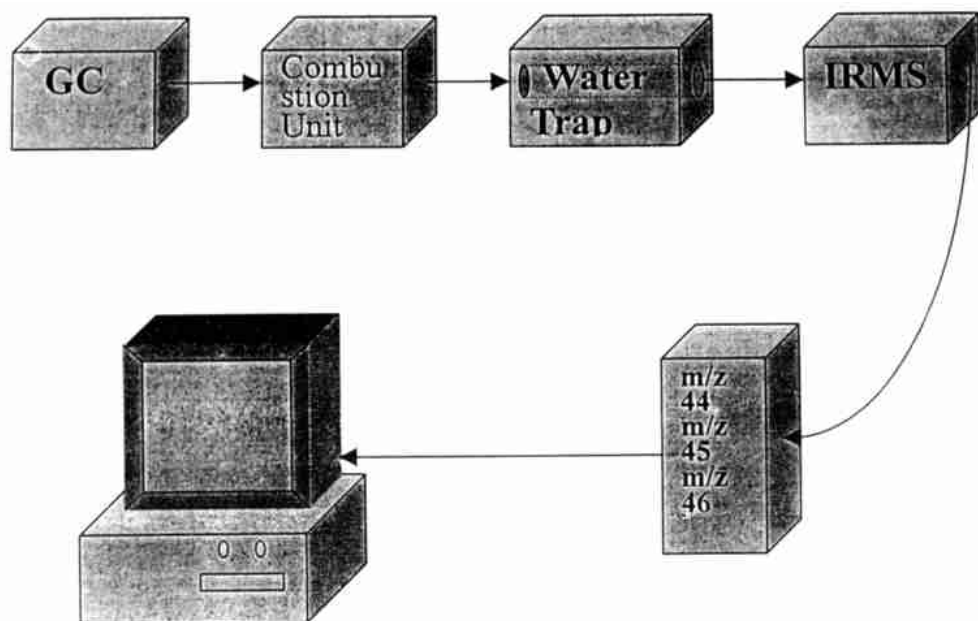
1 同位素比值质谱法简介

GC/C/IRMS 仪器的基本示意图见图一。

首先 GC 将相关的化合物从其他化合物中分开, 然后经燃烧炉与氧化剂作用生成 CO_2 和水。水被分离后, CO_2 气体进入质谱仪, 分析 $M/Z = 44, 45, 46$ 的离子丰度, $M/Z = 44$ 是 $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ 的质荷比, $M/Z = 45$ 是 $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ 的质荷比, $M/Z = 46$ 是 $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O} + ^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ 的质荷比, 经过校正后, $M/Z = 44, 45$ 的峰即分别代表 ^{13}C 与 ^{12}C 的相对含量。GC/C/IRMS 分析的结果以 δ 表示, 它反映了样品和碳元素的国际标准物质之间同位素比的相对差异:

$$\delta = \frac{R_{\text{SPL}} - R_{\text{STD}}}{R_{\text{STD}}} \times 10^3$$

其中 R 代表同位素比, SPL 与 STD 分别代表“样品”和“标准物质”; δ 值用千分数表示 (%), 碳元素的国际标准物质是来源于 PDB (Pee Dee Belemnite) 的碳酸钙, 它的 ^{13}C 含量较丰富, 其 $R_{\text{PDB}} = 0.0112372$ 。



同一来源的化合物 ^{13}C 与 ^{12}C 两种同位素的比值是相同的, 蛋白同化激素类的商业产品通常单一来源于从大豆等植物中提取出的植物甾醇, 其 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值较低; 而在人体中, 内源性蛋白同化激素的 ^{13}C 含量反映了人体所食用的各种动物和植物分子中 ^{13}C 含量的累积和生理综合加工作用, 其 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比值较高¹⁰。当人体引入外源性蛋白同化激素后, ^{13}C 与 ^{12}C 的比值将会降低。故使用同位素比值质谱法测定人体中蛋白同化激素的 ^{13}C 与 ^{12}C 值, 就可判定是否使用了外源性蛋白同化激素。

2 同位素比值质谱在睾酮(T)检测中的应用

1994年, Michel Becchi 与 Rodrigo Aguilar 等人^[11]对12份尿样进行了分析。他们将尿液碱化后用乙醚进行萃取, 其中有机相通过硅胶柱纯化后得到睾酮的前体胆固醇, 水相过C18柱分离后再用 β -葡萄糖醛酸酐酶(β -glucuronidase)酶解。酶解产物先经硅胶柱纯化, 然后用半制备的LC分离, 收集到两份不同体积范围的馏分: 一份为睾酮及其他化合物, 另一份为睾酮的前体脱氢表雄酮及睾酮的代谢产物5 β -雄烷-3 α , 17 β -二醇。两种馏分和胆固醇经乙酰化后进入GC/C/IRMS进行分析。结果表明: 不论是口服还是肌注的方式, 外源性睾酮的引入并未改变睾酮的前体脱氢表雄酮与胆固醇的 $\delta\text{‰}$ 值($\delta\text{‰} < -27\text{‰}$), 但睾酮及其代谢产物5 β -雄烷-3 α , 17 β -二醇的 $\delta\text{‰}$ 值发生显著性变化($\delta\text{‰} > -27\text{‰}$)。聚类分析将全部尿样聚为两类: 空白尿样和引入外源性睾酮的尿样。

1996年, Michel Becchi 与 Rodrigo Aguilar 等人^[12]改进了他们的前处理方法, 并对服用睾酮前、中、后的25份尿样进行了分析。他们的改进之处是: 1) 在用半制备的液相色谱分离之前先进行乙酰化, 结果表明这一改进提高了睾酮的纯度和产率, 但同时也改变了分离产物: 睾酮的前体脱氢表雄酮在液相与气相色谱中不能再与雄酮与本体胆固醇分离; 睾酮的另一前体5-雄烯-3- β , 17- β 二醇得以分离和分析; 睾酮的代谢产物5 α -雄烷-3 α , 17 β -二醇与5 β -雄烷-3 α , 17 β -二醇不能分离, 故测定的是两者的混合物。2) 胆固醇不需碱化尿液后提取, 而是从C18柱上用50:50氯仿和丙酮洗脱下来。分析结果显示, 在引入外源性睾酮后, 睾酮及其代谢物的 $\delta\text{‰}$ 值显著下降, 睾酮的前体胆固醇及5-雄烯-3 β , 17 β -二醇却无显著性变化。

1996年, Michel Becchi 等人^[13]还首次报道了用酶联免疫亲和色谱代替半制备液相色谱提取然后测定睾酮的方法。为了选择高亲和性和低交叉反应的抗体, 他们对两种不同抗原制备而成的抗体分离效果进行了比较。一种是由17 β -HG-T-BSA抗原制成的抗体, 这种抗原中甾体部分是通过D环与牛血清清蛋白(BSA)相连的, 因此制成的抗体特异性指向A环与B环; 另一种是由3 β -HG-T-BSA抗原制成的抗体, 这种抗原中的甾体是通过A环与牛血清清蛋白BSA相连的, 故生成抗体的特异性指向D环。交叉反应的结果表明17 β -HG-T-BSA抗体的特异性较大, 因而所受的可能干扰较小。理论上也可证明此点: 睾酮分子与双氢睾酮、脱氢表雄酮、雄酮、本体胆固醇、雄烷二醇等分子的区别就在于睾酮分子A环上特有的4-烯-3-酮结构, 因此针对A环的17 β -HG-T-BSA对睾酮的选择性高; 双氢睾酮、5 α (β)-雄烷-3 α , 17 β -二醇等与睾酮具有相同的D环结构, 故就特异性针对D环的3 β -HG-T-BSA抗体而言, 存在交叉反应。GC/MS的结果也表明: 若用3 β -HG-T-BSA, 则与睾酮D环相同的5-雄烯-3 α , 17 β -二醇与睾酮的分离度极小, 而5-雄烯-3 α , 17 β -二醇又是睾酮的前体, 无法混合测定。考虑以上因素后, 作者最终选用了18 β -HG-T-BSA抗体, 成功分离并测定了睾酮。

Michel Becchi 认为^[13]: 无论采用半制备的液相色谱还是酶联免疫亲和色谱来分离甾体混合物, 睾酮的纯度和 $\delta\text{‰}$ 值没有显著性差异, 都是有效的GC/C/IRMS前处理手段。与酶联免疫亲和色谱相比, 液相色谱在几个方面具有优势: 样品纯化时间短且简便; 柱寿命长; 可同时分离测定其它蛋白同化激素, 例如脱氢表雄酮、雄烷二醇等。但酶联免疫亲和色谱也有其优势: 在实验中对于空白尿和睾酮浓度相对较低的尿样, 用酶联免疫亲和色谱分离回收率

要比用液相色谱分离高 15- 20%, 另外在酶联免疫亲和色谱柱中是利用抗体和抗原的作用分离睾酮, 不易引起同位素分级分离效应。

同年, S Horning 等人^[14]也用免疫亲和色谱柱对口服 40mg 睾酮后每两个小时收集的尿样进行前处理, 然后用 GC/C/IRMS 分析。他们根据睾酮的性质, 以最终进样浓度为 10ng/mL 为标准, 取用 2- 20mL 尿液进行分析。S Horning 等选用睾酮-3-羧诺-甲肝-牛血清白蛋白抗原制成相应抗体, 由于抗原中睾酮与牛血清清蛋白 BSA 是以 A 环耦合的, 故抗体的选择性指向 D 环的 $17\beta\text{OH}$, 因此与其它含有 $17\beta\text{OH}$ 的甾体均具有交叉反应, 例 5α (β -雄烷- 3α , 17β 二醇等, 所以 HPLC 分离后可分别采集到睾酮, 5α -雄烷- 3α , 17β 二醇, 5β -雄烷- 3α , 17β 二醇。结果表明: 引入外源性睾酮后, 睾酮, 5α -雄烷- 3α , 17β 二醇, 5β -雄烷- 3α , 17β 二醇的 $\delta\text{‰}$ 值均显著性下降, 但 5α -雄烷- α , 17β 二醇, 5β -雄烷- 3α , 17β 二醇的回升速率慢得多, 因此 S Horning 等人认为它们是比睾酮原型更灵敏的指标。

S Horning 在用 GC/C/IRMS 分析的同时还用 GC/MS 作了代谢情况的对照研究, 他们发现用 $T/E > 6$ 作为引入外源性睾酮的判据, 仅可将服用睾酮后 2 与 4 小时的尿样定为阳性; 而用 $\delta\text{‰}$ 值作为判据, 在 10 小时时, 其值仍与初始的 $\delta\text{‰}$ 值有显著性差异。

S Horning 等未采用衍生化进样, 而是直接进样。他们认为衍生化增加了碳原子数因而会改变分子的同位素比值, 而且衍生化很可能会导致同位素的分级分离, 例如: 乙酸酐具有两个活性中心, 故若一个活性中心含有 ^{13}C 原子, 那么反应速度就会产生差异。

1996 年, Shackleton 等人^[10]对五人服用 250mg 睾酮前后的尿样进行了同位素比值质谱的分析。他们方法的特点是利用 Girard T 试剂和凝胶柱分离纯化样品, 即先用 Girard T 试剂去除含酮基的甾体, 这样就去除了 75% 的干扰甾体, 但此步并未去掉 11 位上有羧基的甾体, 因为存在位阻效应的限制, 再用 Sephadex LH- 20 凝胶柱纯化(将含有 2- 3 个官能团的甾体分离出来)。气相色谱图上可分离得到本胆烷醇酮, 孕烷二醇, 孕烷三醇, 5α -雄烷- 3α , 17β 二醇, 5β -雄烷- 3α , 17β 二醇, 结果表明: 在引入外源性睾酮后, 5α (β -雄烷- 3α , 17β 二醇的 $\delta\text{‰}$ 值从 - 26~ - 28 降至 - 29~ - 30, 而“内标”孕烷二醇的 $\delta\text{‰}$ 值无显著性变化。作者建议: 以孕烷二醇为参比, 则雄烷二醇与孕烷二醇的比值 $\text{dole} : \text{preg} > 1.1$ 可作为睾酮阳性的判据。Shackleton 选用尿中浓度较大的二醇作指标, 使所需尿液体积减小, 25mL 原尿经前处理后可进 5 次样; 他们不采用 HPLC, 因此适合于批样分析。

1997 年, S Horning 等^[15]为了在一次测定中测定多个物质, 进一步改进了测定方法, 他们取消了酶解免疫亲和色谱柱, 直接萃取酶解产物后进入 HPLC 分离。在不同的时间范围内收集胆固醇, 孕烷二醇, 睾酮, 雄酮, 本胆烷醇酮, 5α -雄烷- 3α , 17β 二醇, 5β -雄烷- 3α , 17β 二醇, 双氢睾酮, 再分别进入 GC/C/IRMS 进行分析。这样可同时判断是否引入了外源性的睾酮或双氢睾酮。

1999 年, Rodrigo Auguelia 等人^[16]提出了一种简单省时的测定睾酮的前处理方法。这一方法基于三次 C18 柱的固液萃取, 即: 1) 提取结合形式的甾体物质; 2) 提取 $\beta\beta$ 葡萄糖醛酸甾酶(来自大肠杆菌) 酶解后的游离甾体; 3) 纯化乙酰化的甾体并用不同配比的乙腈和水分别洗脱下来雄烷二醇和孕烷二醇。他们也通过测定睾酮的代谢物来判断是否引入了外源性睾酮。结论表明: 人体中引入外源性的睾酮后, 5β -雄烷- 3α , 17β 二醇的二乙酰化衍生物和 5α -雄烷- 3α , 17β 二醇的二乙酰化衍生物物的 $\delta\text{‰}$ 值分别从 - 26.2% 降至 - 30.8%, - 25.2%

降至-29.9%,而 5β 孕烷二醇- $3\alpha, 20\alpha$ -二醇的二乙酰化衍生物的 $\delta\%$ 值未发生显著性变化,若用比值法判定,则雄烷二醇与孕烷二醇的 $\delta\%$ 值比值显著性增加(0.981-1.047升至1.167-1.312)。

3 同位素比值质谱在双氢睾酮(DHT)检测中的应用

1997年, S Horning 等人^[15]对一舌下含服25毫克双氢睾酮的男性志愿者的尿样进行了GC/C/IRMS分析。前处理步骤与测定睾酮时的前处理相同。实验证明:引入外源性双氢睾酮后,本胆烷醇酮、睾酮、孕烷二醇、孕烷三醇、 5β 雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇的 $\delta\%$ 值没有显著性变化,而双氢睾酮、雄酮与 5α -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇的 $\delta\%$ 值显著性下降。由于双氢睾酮在尿中的浓度较小,它的 $\delta\%$ 值只能在6-16小时检测出来,而 5β 雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇与 5α -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇的浓度较大,其 $\delta\%$ 值在服用70小时后仍能检测出来。S Horning 等人认为,与 5β 雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇和内源性参比指标相比,若 5α -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇的 $\delta\%$ 值显著性较低,就可认为引入了外源性双氢睾酮。S Horning 等还对这些尿样同时作了GC/MS分析,结果表明:若用 5β 雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇与 5α -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇的浓度比值 $5\alpha\text{AD}/5\beta\text{AD} > 1.5$ 作为阳性判据,则24小时后 $5\alpha\text{AD}/5\beta\text{AD}$ 已落入正常范围。

1997年, Shackleton 等人^[17]也以二醇类物质作为检测对象,研究了双氢睾酮的GC/C/IRMS检测方法,他们在测定睾酮时所用的前处理方法基础上作了一定的改进:1)在用Girard T试剂之前先用Sep-Pak柱分离酶解产物;2)取消Sodium Bismuthate氧化。Shackleton 等人发现口服双氢睾酮后, 5α -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇与 5α -雄烷- $3\alpha, 17\alpha$ -二醇的 $\delta\%$ 值显著性下降,而 5β 雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇的 $\delta\%$ 值没有显著性的变化,这些变化可作为口服方式引入外源性双氢睾酮的证据。

4 同位素比值质谱在脱氢表雄酮(DHEA)检测中的应用

1997年, S Horning 等^[15]对口服40mg游离型DHEA后的男性志愿者的尿样进行了分析,酶解采用来自Helix pomatia生物的 β -葡萄糖醛酸酐酶,然后经HPLC纯化后进入GC/C/IRMS分析。引入外源性DHEA后, $5\alpha(\beta)$ -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇的 $\delta\%$ 显著性下降,但区别于外源性睾酮的引入,引入脱氢表雄酮后, 5α -雄烯- $3\beta, 17\beta$ -二醇的 $\delta\%$ 值也显著性下降。因此上述三个指标 $5\alpha(\beta)$ -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇、 5α -雄烯- $3\beta, 17\beta$ -二醇可作为引入外源性脱氢表雄酮的证据。同年, Shackleton 等人^[17]选用 5α -雄烯- $3\beta, 17\beta$ -二醇作为指标来判断是否引入了外源性DHEA。

以上两种方法均属于间接测定DHEA的方法。1999年, Makoto Ueki 等人^[18]提出了直接测定DHEA的方法:用特制的三乙胺羟丙基Sephadex LH-20(TEAP Sephadex LH-20)柱分离得到硫酸酯结合形式的甾体混合物;用来自Ampullaria(壶螺属)生物的arylsulfatase来酶解硫酸酯结合形式的甾体;酶解产物分离后,经酯化进入GC/C/IRMS分析。1999年9月, Makoto Ueki 等人^[19]报告通过TEAP Sephadex LH-20柱分离了硫酸酯形式和葡萄糖醛酸形式的甾体,将它们分别用glufatase和 β -glucuronidase酶解,再纯化、酯化后进入GC/C/IRMS分析。这样在硫酸酯部分中可以测定DHEA,在葡萄糖醛酸部分可以测定 $5\alpha(\beta)$ -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇与孕烷二醇。当引入外源性DHEA后,DHEA、 $5\alpha(\beta)$ -雄烷- $3\alpha,$

17β 二醇的 $\delta\text{‰}$ 值显著性下降, 孕烷二醇的 $\delta\text{‰}$ 值无显著性改变。M akoto U eki 等人认为: DHEA、 $5\alpha(\beta)$ -雄烷- 3α , 17β 二醇、孕烷二醇的 $\delta\text{‰}$ 值变化可作为外源性 DHEA 引入的证据。

5 总结与展望

从方法学上讲, 在 GC/C/IRM S 检测内源性蛋白同化激素的研究中, 方法的差异主要在于前处理手段的不同。前处理手段的选择关系到检测指标的选择、目标物的回收率、背景干扰的大小及恒定程度、目标物与干扰峰的分离程度及是否存在同位素分级分离等问题。在这些问题中, 色谱峰的分离度是正确测定同位素比值的关键, 重合或分离度差将会直接影响结果的可靠性。因此, 各国兴奋剂检测研究人员正致力于建立一套简单、省时、回收率高的 GC/C/IRM S 分析的前处理方法。

GC/C/IRM S 在其他领域中的应用很广, 而在兴奋剂检测中的应用时间却不长, 但由于其在内源性蛋白同化激素检测中显示出独特的优越性, 使它的发展非常迅速。目前, 其应用范围仅限于睾酮、双氢睾酮、脱氢表雄酮及表睾的测定, 此方法发展后, 将可用于去氢睾酮、 19- 去甲睾酮等的测定^[15]。

尽管 GC/C/IRM S 法在内源性蛋白同化激素的检测中弥补了 GC/M S 法的不足, 但 GC/C/IRM S 法不可能替代 GC/M S 法进行常规检测, 因为在 GC/C/IRM S 法中, 燃烧炉将所有物质均氧化为二氧化碳和水, 失去了结构鉴定功能, 因此 GC/C/IRM S 法只能作为一种确证手段。

目前, 蛋白同化激素的商业产品通常单一来源于从大豆等植物中提取出的植物甾醇, 但从动物(牛或马)体内分离蛋白同化激素的研究正在进展, 这对于 GC/C/IRM S 法检测内源性蛋白同化激素而言, 将是一个新的挑战。

参考文献

- 1 Brook RV *et al* Detection of Anabolic Steroids by Radioimmunoassay, Brit J Sports Med 1975, 9: 89
- 2 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
- 3 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
- 4 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
- 5 R Adatia *et al* An Important Method for Steroid Profile Analysis Using Capillary gas Chromatography, Chromatographia 1988, 25: 598
- 6 Robert M *et al* Studies on Anabolic Steroids II, Biomed Environ Mass Spec 1989 18: 429
- 7 Catlin DH *et al* Analytical Chemistry at the XXIIIrd Olympic Games in Los Angeles, 1984, Clin Chem 1987, 33: 319
- 8 Kuoppasalmi K *et al* Improved Detection of Exogenous Testosterone in Doping Analysis, In: Proceeding of the 3rd World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, No 348, Stockholm 1986
- 9 dt al Torre X *et al* Detection of Testosterone Esters in Human Plasma, J Mass Spectrom 1995 30: 1393
- 10 Cedrie H L Shackleton *et al* Confirming Testosterone Administration by Isotope Ratio Mass Spectrometric Analysis of Urinary Androstenediol, Steroids 1997, 62: 379
- 11 Becchi M *et al* Gas Chromatography/Combustion/Isotope-Ratio Mass Spectrometry Analysis of Urinary Steroids to Detect Misuse of Testosterone in Sport, Rapid Communications in Mass Spectrometry 1994, 8: 304
- 12 Aguilera R *et al* Improved Method of Detection of Testosterone Abuse by Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry Analysis of Urinary Steroids, J Mass Spectrom 1996, 31: 169
- 13 Aguilera R *et al* Detection of Testosterone Misuse: Comparison of Two Chromatographic Sample Preparation Methods for Gas Chromatographic/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometric Analysis, J Chromatogr B 1996, 687: 43
- 14 S Horning *et al* Detection of Exogenous Testosterone by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Analysis In: Proceedings of the 14th Cologne Workshop on Doping Analysis, 17th to 22nd March 1996, W Schaezner *et al* eds, Sport und Buch Strausse Edition Sport, Koeln 1997, 275
- 15 S Horning *et al* Detection of Exogenous Steroids by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Analysis In: Proceedings of the 15th Cologne Workshop on Doping Analysis, 23th to 28th February 1997, W Schaezner *et al* eds, Sport und Buch Strausse Edition Sport, Koeln 1998, 135
- 16 Aguilera R *et al* Screening Urine for Exogenous Testosterone by Isotope Ratio Mass Spectrometric Analysis of One Pregnanediol and Two Androstenediols, J Chromatogr B 1999, 727: 95
- 17 Cedrie H L Shackleton *et al* Androstenediol and 5-Androstenediol Profiling for Detecting Exogenously Administered Dihydrotestosterone, Epitestosterone, and Dehydroepiandrosterone: Potential Use in Gas Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry, Steroids 1997, 62: 665
- 18 Makoto Ueki *et al* Doping With Naturally Occurring Steroids, J Toxicol- Toxin Reviews 1999, 18(2): 177
- 19 Makoto Ueki *et al* Analysis of Exogenous Dehydroepiandrosterone Excretion in Urine by Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry 1999, 13: 2237

Recent Development on the Application of Gas Chromatography/Combustion/Isotopic Ratio Mass Spectrometry to Detecting Endogenous Anabolic Androgenic Steroids

W a Chunling, W u M ou tian, Zhang Changjiu
(China Doping Control Centre, Beijing 100029, China)

Received 2000-02-24

Abstract

Gas Chromatography/Combustion/Isotopic Ratio Mass spectrometry has played an important part in detecting endogenous anabolic androgenic steroids. The principle of Gas Chromatography/Combustion/Isotopic Ratio Mass spectrometry and a review on recent development on the application of it to detecting endogenous anabolic androgenic steroids are presented.

Key Words: GC/C/IRMS, endogenous anabolic androgenic steroids, application