

## 尿中双氢睾酮代谢物的质谱研究

张长久<sup>\*</sup>·张亦中 刘欣 叶荔 王小兵 王学智

(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 GC/MS 联用技术检测双氢睾酮阳性尿,利用选择离子方式并与空白尿对照,发现一个代谢物,经质谱推测为 16-羟基双氢睾酮,此代谢物于用药后 24 小时内可被检测到。通过检测这个代谢物,可以有效地控制兴奋剂双氢睾酮的滥用。

**关键词:**兴奋剂 双氢睾酮 药物代谢 气相色谱质谱联用 选择离子

雄性蛋白同化激素(ANDROGENIC ANABOLIC STEROIDS)是具有甾体结构的药物,是当今体育比赛中最常见的兴奋剂。1992 年国际奥委会规定禁用的这类药物有 16 种。双氢睾酮具有雄性蛋白同化激素作用,属于国际奥委会规定禁用相关药物。为防止运动员滥用药物,有必要对它进行检测方法的研究。

目前检测这类激素最好的手段是 GC/MS 法<sup>[1-3]</sup>。自 1972 年开始对运动员尿中甾体类药物监测以来,检测手段不断提高。RIA 法<sup>[4]</sup>是最早用于检测同化激素的方法,其灵敏度高,但专属性较差。而 HPLC 和 GC 方法难以进行结构的确证。GC/MS 法利用毛细管色谱的高效分离能力和质谱对结构确证的特性,为同化激素的检测提供了有力的手段。

采用选择离子检测(SIM)方式大大提高了样品初筛和寻找代谢物的能力<sup>[4]</sup>。

本文用 GC/MS 联用技术,采用 SIM 方式,检测到双氢睾酮的一个代谢物 16-羟基双氢睾酮。选择若干特征离子,设定筛检窗口,用于兴奋剂检查粗筛,取得满意效果。

### 实验部分

#### 1. 仪器和色谱条件

HP5890A 型气相色谱仪,HP5970B 型质量选择检测器(MSD);HP3000 计算机;毛细管色谱柱:HP-5(以上均为美国惠普公司产品)。无分流进样;柱温  $100^{\circ}\text{C} \xrightarrow{16^{\circ}\text{C}/\text{min}} 220^{\circ}\text{C} \xrightarrow{3.8^{\circ}\text{C}/\text{min}} 299^{\circ}\text{C}$ (5min),注射口  $250^{\circ}\text{C}$ ;离子源接口温度  $290^{\circ}\text{C}$ ;载气为氦气,0.9ml/min。

#### 2. 试剂和药品

1992 年 9 月 2 日收

· 联系人

MSTFA(N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺, Regis Chemical Co.); TMSI(三甲基碘硅烷, Aldrich Chemical Co.); 二硫代赤鲜糖醇(Aldrich Chemical Co.);  $\beta$ -葡萄糖醛酸酐酶(IX型购自 E. Coli, Sigma); XAD-2树脂(Serva, 德国), 其余试剂为国产分析纯。

### 3. 尿样收集

健康男性服用30mg双氢睾酮, 给药前先收集一份空白尿样, 然后分别收集服药后3、5、12、24、48小时的尿样。

### 4. 尿样前处理

取5ml尿样, 离心, 取上清尿液过XAD-2小柱, 以5ml蒸馏水洗涤柱床, 用2ml重蒸甲醇洗脱, 用旋转蒸发器于45℃蒸除甲醇溶剂至干。于残渣中加入0.2mol/L醋酸缓冲液(pH5.2)1ml,  $\beta$ -葡萄糖醛酸酐酶溶液100 $\mu$ l(相当于10000 fishman单位), 55℃恒温酶解1.5小时, 酶解完毕后加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : $\text{NaHCO}_3=1:9$ 约100mg调节酶解液至pH9-10, 然后加入乙醚5ml, 振荡萃取, 分取醚层, 用约100mg无水硫酸钠脱水, 干燥后的乙醚用氮气吹除, 残渣以200 $\mu$ l甲醇溶解移入预先加有约1mg二硫代赤鲜糖醇的衍生化小瓶中, 用氮气吹干。

### 5. 衍生化反应

于上述残渣中加入49 $\mu$ l MSTFA及1 $\mu$ l TMSI溶液, 70℃反应半小时供GC/MS分析用。

## 结果与讨论

### 1. 选择离子检测(SIM)寻找代谢物

利用GC/MSD萃取离子方式可以从十分复杂的全扫描(scan)质谱图中很容易地找出推测的代谢物<sup>[4]</sup>。依据甾体类药物在体内代谢的规律<sup>[5,6]</sup>, 同化激素的代谢物主要是以单羟基和多羟基化物排出体外。6位、12位、16位是易于羟化的位点。据此推测去氢睾酮在身体内可能的代谢产物(图1), 选择它们的三甲基硅烷(TMS)衍生物的特征离子并与空白尿对照进行SIM方式检测, 找到一个代谢物, 经质谱推测为16-羟基双氢睾酮(图2、3)。在兴奋剂检测中, 采用SIM方式, 检测16-羟基双氢睾酮, 设定其窗口, 选择522、507、147等特征离子可快速、可靠地得到粗筛结果。

### 2. 质谱解析

蛋白同化激素及其代谢物TMS衍生物质谱是有规律的, 易产生离子离子峰, 易失去19位角甲基而得到(M-15)<sup>+</sup>碎片, 易顺序失去一个或多个三甲基硅醇(HOTMS)而得到(M-90)<sup>+</sup>和(M-90n)<sup>+</sup>碎片, m/z 147是16位羟化的特征。

16-羟基双氢睾酮的质谱解析如下: M<sup>+</sup>(分子离子)522、m/z 507(M-CH<sub>3</sub>)、m/z 432(M-HOTMS)、m/z 417(M-CH<sub>3</sub>-HOTMS)、m/z 327(M-2HOTMS)、m/z 237(M-CH<sub>3</sub>-3HOTMS)、m/z 147(16-羟基化代谢物的TMS衍生物质谱裂解重排产物:  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}=\overset{+}{\text{O}}\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ )

### 3. 药物在体内存留时间

通过选择上述代谢物的分子离子峰M<sup>+</sup>522, 对不同时间收集的尿样进行选择离子扫

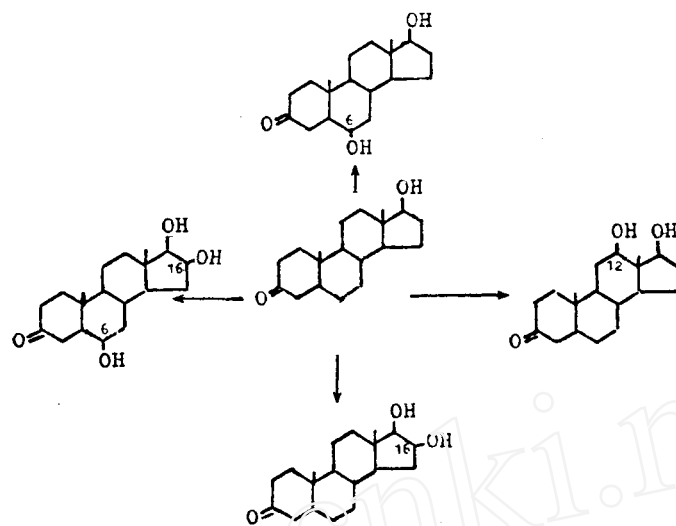


图 1 双氢睾酮在人体内可能产生的羟化代谢产物

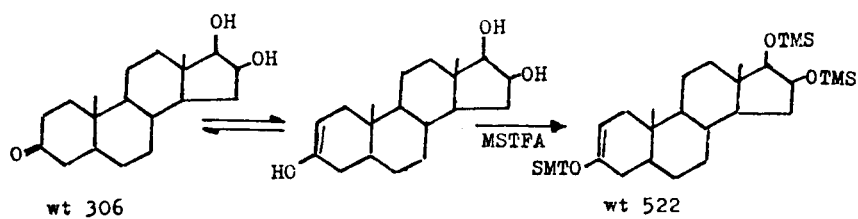


图 2 16-羟基双氢睾酮硅烷基化的产物

描,并与空白尿对照,得到 16-羟基双氢睾酮在人体尿中浓度变化曲线(图 4)。此代谢物于服药后 24 小时内可被检测。

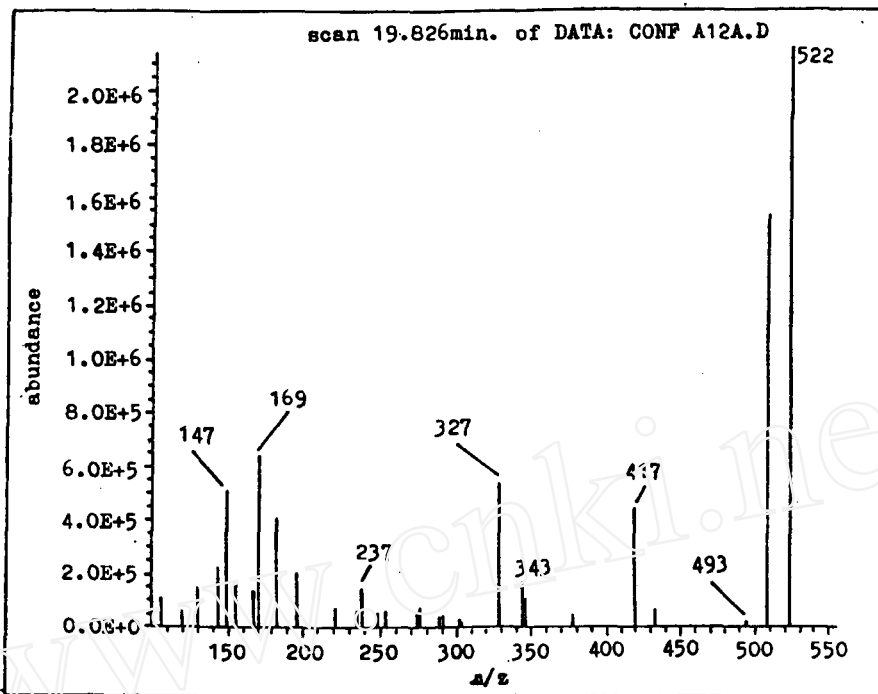


图 3 双氢睾酮代谢的质谱图

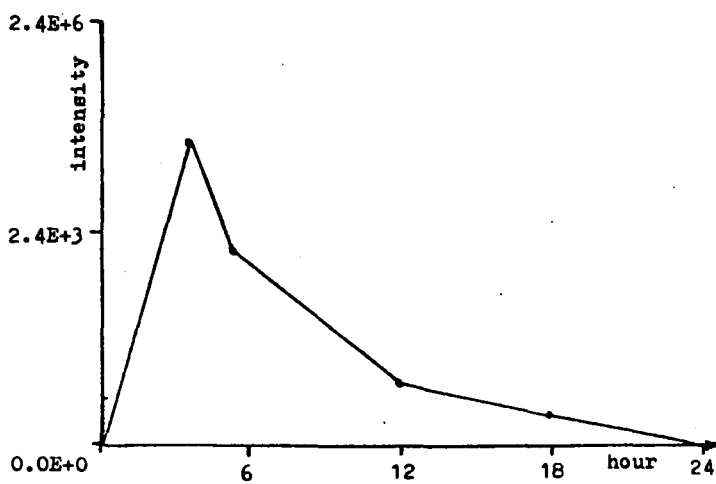


图 4 双氢睾酮代谢物 16-羟基双氢睾酮在人尿中浓度的变化

## 参 考 文 献

- 1 Brooks RV et al. Detection of anabolic steroids by radioimmunoassay. *Brit J Sports Med*, 1975; 9: 89
- 2 Darney Jr KJ et al. Simultaneous measurement of four testicular-3-ketosteroids by isocratic high performance liquid chromatography with on-line ultraviolet absorbance detection. *Brit J Sports Med*, 1983; 257:81
- 3 Robert M et al. Studies on anabolic steroids I. *Biomed Environ Mass Spec*, 1989; 18:429
- 4 张长久等. 色质联用选择离子检测法在兴奋剂检测中的应用. *质谱学报*, 1992, 13(3):33
- 5 Robert M et al. Studies on anabolic steroids I. *J Chromatogr*, 1989; 489:23
- 6 Donike M. Doping Analysis. In: *Proceedings of World Symposium on Doping in Sports*, International Athletic Foundation, 1987; Florence, 53—80

## Study on Metabolite of Dihydrotestosteron by GC/MSD

Zhang Changjiu, Zhang Yizhong, Liu Xin,

Ye Li, Wang Xiaobin, Wang Xuezhi

(National Research Institute of Sports Medicine,

State Physical Culture and Sports Commission, Beijing 100029, PRC)

Received 1992 09 02

### Abstract

A Metabolite of dihydrotestosterone was found in its volunteer urine by GC/MSD. According to the main metabolic pathways of anabolic steroids drugs and the mass spectrum data obtained from urinary extract, the structure of the metabolite was deducted 16-hydroxy dihydrotestosterone. This metabolite can be detected in the urine within 24 hours after the drug administered. The detection of 16-hydroxy dihydrotestosterone can be used in doping testing to control the abuse of dihydrotestosterone.

Keywords: doping, dihydrotestosterone, metabolite, GC/MSD, SID