

尿中 7-甲基异炔诺酮(Tibolone)代谢物的 气相色谱-质谱研究

张亦农, 刘欣, 吴侔天, 王静竹, 张长久

(国家体委运动医学研究所兴奋剂检测中心, 北京 100029)

摘要:应用气相色谱-质谱(GC/MS)选择离子监测(SIM)方式探讨甾体类药物 7-甲基异炔诺酮(Tibolone)的检测方法。根据 Tibolone 的代谢规律,对受试者的阳性尿和空白尿检测结果进行比较。研究发现:在阳性尿中检出 Δ^4 双键异构体、 3α 羟基和 3β 羟基等三种代谢物,6 位、16 位的羟基化代谢物没有检出。测定了 3α 羟基代谢物的浓度-时间关系曲线,表明 Tibolone 口服后吸收迅速,9 小时后即可达到峰值浓度。可为该类药物的检测提供科学依据。

关键词:质谱学;甾体药物代谢物研究;气相色谱-质谱(GC/MS);7-甲基异炔诺酮(Tibolone)

中图分类号:O657.63;R917.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2004)01-38-04

Study on Tibolone Metabolites in Human Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

ZHANG Yi-nong, LIU Xin, WU Mo-tian, WANG Jing-zhu, ZHANG Chang-jiu

(National Institute of Sports Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) with selective ion monitoring (SIM) mode was applied to study the detection method of metabolites of Tibolone in human urine. According to the rule of metabolism, the experimental data obtained from masculine urine and blank urine of the tested were compared. The results indicated Δ^4 double-bond isomeride, 3α -hydroxyl group and 3β -hydroxyl group are detected, 6- and 16-hydroxylated metabolites not detected. The excretion curve of time-concentration of 3β -hydroxylated metabolite was investigated, the study showed that Tibolone was absorbed quickly and its concentration reached to peak value after oral for 9 hours. These features can be applied to the establishment of scientific basis for the detection of this kind of doping.

Key words: mass spectrometry; study on steroids; gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS); Tibolone

7-甲基异炔诺酮(Tibolone, 产品名“利维爱”)是荷兰欧加农公司于 20 世纪 60 年代合成的一种激素替代治疗(HRT)的甾体类药物。实

验研究和临床实践证明,口服 Tibolone 后在体内代谢为 3 种不同产物: Δ^4 双键异构体、 3α 和 3β 羟基代谢物。Tibolone 有别于传统的口服 HRT

收稿日期:2003-01-28;修回日期:2003-09-09

作者简介:张亦农(1964~),男(汉族),副研究员,从事兴奋剂检测研究,E-mail:shaotang@public.bta.net.cn

药物,对骨、子宫内膜、乳腺及心血管具有组织特异性,可以阻止骨质丢失,促进骨骨骼生长,同时还具有骨量增加的作用,可增强肌肉及其强度^[1]。因此 Tibolone 是运动竞技中常滥用的药品,但此类药物的毒副作用严重威胁运动员的身体健康。目前国际奥委会医学委员会还没有将其列入禁用药物表^[2]。Tibolone 在人体尿中的代谢情况目前尚未见详细报道。气相色谱-质谱(GC/MS)法结合了毛细管色谱的高效分离能力和质谱的结构鉴定特征,采用选择离子监测(Selective ion monitoring, SIM)方式大大提高了对样品初筛和寻找代谢物的能力,已发展为较完善的分析检测甾体类药物的方法,至今仍是世界上兴奋剂检测实验室普遍采用的方法^[3]。准确、快速检测此类药物,对维护体育竞技比赛的公平竞争的原则具有重要意义。本工作拟应用 GC/MS 对受试者服用 Tibolone 的尿液进行检测研究,对受试者尿液与其空白尿液对照,依据甾体类药物在人体内代谢的规律,检测 Tibolone 的代谢产物。

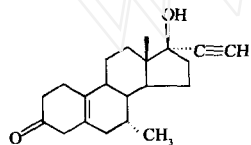


图 1 7-甲基异炔诺酮(Tibolone)结构

Fig.1 Geometric structure of 7-methyl isoacetylenestryl (Tibolone)

1 实验部分

1.1 主要仪器

HP6890 型气相色谱仪:惠普公司产品;HP5973 型选择性离子检测器(SIM):惠普公司产品。

1.2 主要药品和试剂

Tibolone:购自 Organon 公司;内标甲睾标准品:加拿大兴奋剂检测中心提供;IX-A 型 β -葡萄糖醛酸苷酶:购自 Sigma 公司;衍生化试剂 N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺(MSTFA):购自 Sigma 公司;三甲基碘硅烷(TMSI):购自 Aldrich Chemical 公司;XAD-2 树脂(100~200 目):Serva 公司产品;实验用其它试剂均为国产分析纯。

1.3 尿样收集

受试前收取空白尿。健康男性口服 2.5 mg 美保龙标准品后,收集 0~48 h 尿液,于 -20°C 下保存。

1.4 尿样的提取及衍生化

取尿样 5.0 mL 于试管中,离心后取上清尿液加入 XAD-2 小柱,同时加入内标甲睾,待尿液流过柱后,以水 5 mL 洗涤柱床,然后用甲醇 1 mL \times 2 洗脱吸附甾体,洗脱液于 50°C 旋转蒸发出甲醇,蒸干物加 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0) 1 mL,加入 β -葡萄糖醛酸苷酶 100 μL ,然后在 55°C 下恒温培养 3 h,取出后加固体缓冲剂约 100 mg,调节酶解液 pH 约 8.7,加乙醚 5 mL,振荡萃取 10 min,离心后转移出上层醚液,于 55°C 下用氮气吹干,以 50 μL 衍生化试剂 MSTFA 转移至衍生化小瓶,加盖密封,于 70°C 反应 30 min,即可进样 GC/MS 分析。

1.5 GC/MS 分析条件

色谱柱:毛细管气相色谱柱 HP-1, 17 m \times 0.2 mm \times 0.11 μm (固定相为交联甲基聚氧硅烷);载气:氦气;进样口温度 280°C ;检测接口温度 300°C ;进样方式:分流进样;分流比 1:10;柱升温程序:起始温度 180°C ,以 $3.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 231°C ,然后以 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 310°C ,停留 2 min。

2 结果与讨论

2.1 Tibolone 代谢产物测定

甾体类激素的代谢是在多种酶和辅酶催化下的复杂而又有规律的过程^[4],其代谢情况一般有三种:(1) Δ^4 双键在还原酶催化作用下加氢生成 5α (或 5β) 二氢代谢物或生成 Δ^4 双键异构体^[5];(2)在 3α (或 3β) 羟甾脱氢酶催化作用下还原生成 3α (或 3β) 羟基的代谢物^[5,6];(3)在(1)、(2)步还原的同时,还常伴有羟化酶催化下的羟基化反应,一般生成 6 位、16 位的羟化代谢物^[6]。

根据以上规律,推测出 Tibolone 的代谢方向,并对所推测的代谢物进行 GC/MS-SIM 测定。通过比较受试者阳性尿样与空白尿样,结果发现:在受试者阳性尿样中检出 Δ^4 双键异构体及还原成 3α 和 3β 羟基的三个代谢物,而没有检出 6 位和 16 位的羟化代谢物。Tibolone 代谢产物的 GC/MS-SIM 特征参数列于表 1,相应的气相色谱和全扫描质谱示于图 3~6。

表 1 Tibolone 代谢产物的保留时间及特征离子

Table 1 Retention times and characteristic ions of metabolites obtained from Tibolone

代谢物 Metabolite	t_R /min Retention time	相对保留时间 Relative retention times	特征离子 m/z Characteristic ion
代谢物 1 (Δ^4 双键异构)	14.8	0.97	456, 441
代谢物 2 (3α -OH)	15.3	1.01	458, 443, 368, 353, 278, 263
代谢物 3 (3β -OH)	15.5	1.02	458, 443, 368, 353, 278, 263

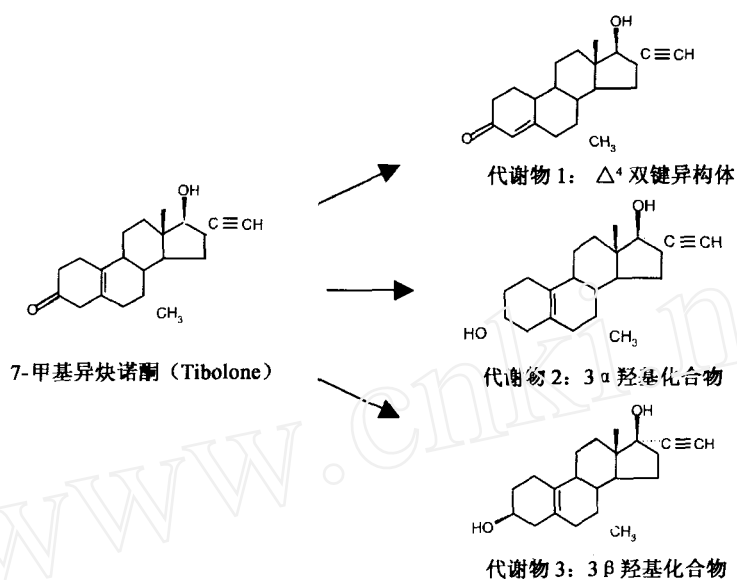
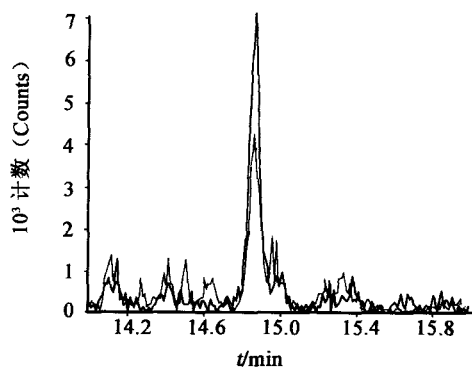


图 2 Tibolone 在人体中的代谢途径

Fig. 2 Proposed metabolite pattern of Tibolone in human body

代谢物 1 是 Tibolone Δ^4 双键异构化的产物, 它有两个可被 MSTFA 衍生化位置, 形成分子量为 456 Da 的衍生物。其质谱图示于图 4。图 4 中基峰离子 m/z 441 是分子离子峰 m/z 456 脱去一个甲基而来的。

图 3 代谢物 1 的选择离子 (m/z 456, m/z 441) 色谱图Fig. 3 Chromatography spectra of selected ions m/z 456 and m/z 441 in metabolite 1

代谢物 2 (3α 羟基的代谢物) 和代谢物 3 (3β 羟基的代谢物) 的分子离子峰是 m/z 458, 失去一个甲基后形成 m/z 443 的子离子, m/z 443 失去一个 $[\text{OH}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$ 后产生 m/z 353, 进一步丢失另一个 $[\text{OH}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$ 后形成子离子 m/z 263。可能由于位阻的原因, 代谢物 2 较代谢

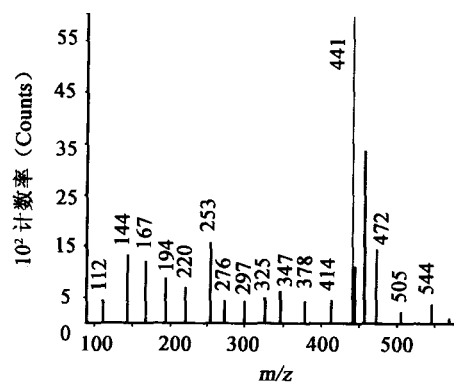


图 4 代谢物 1 的 EI 质谱图

Fig. 4 EI mass spectrum of metabolite 1

物 3 小很多, 其选择离子色谱图和质谱图分别示于图 5 和图 6。

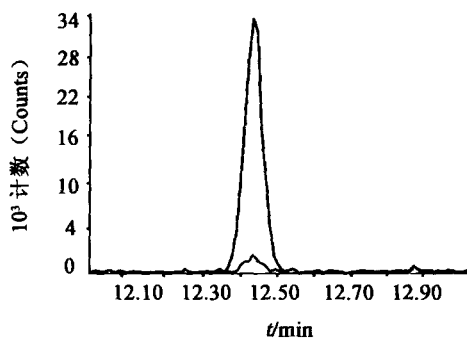


图 5 代谢物 2 和代谢物 3 的选择离子 (m/z 458 和 m/z 443) 色谱图

Fig. 5 Chromatography spectra of selective ions m/z 458 and m/z 443 in metabolite 2 and metabolite 3

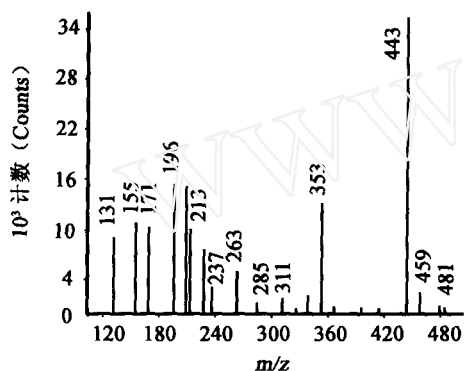


图 6 代谢物 3 的 EI 质谱图

Fig. 6 EI mass spectrum of metabolite 3

2.2 Tibolone 代谢物的时间-浓度曲线

一健康男性志愿者口服 2.5 mg Tibolone 后, 收集其 48 h 的尿样, 选择最强的代谢物(3 β 羟基的代谢物)为目标物, 计算其校正峰面积 (m/z 443)。 t 小时尿样的校正因子(F)公式(1):

$$F = A_t / A_0 \quad (1)$$

式(1)中: A_t 为 t 小时尿色谱图中内标的峰面积; A_0 为服药前空白尿色谱图中内标的峰面积。校正峰面积公式表示为式(2):

$$\text{校正峰面积} = \text{峰面积} \times F \quad (2)$$

由校正峰面积对相应的尿样收集时间作代谢曲线, 示于图 7。图 7 表明, Tibolone 口服后吸收迅速, 9 小时后即可达到峰值浓度。

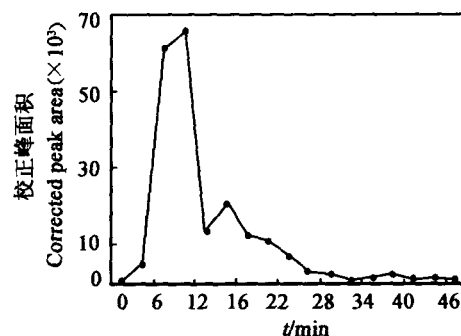


图 7 Tibolone 代谢物的时间-浓度曲线

Fig. 7 Excretion curve of time-concentration of metabolite obtained from Tibolone

参考文献:

- [1] 贞红岩, 王金凤. 7-甲基异炔诺酮的基础研究及临床应用进展[J]. 中华妇产科杂志. 2001, 36(2), 124~125.
- [2] IOC Medical Commission. List of Banned Substances and Methods of Doping [M], 2000. 3~4.
- [3] 徐锐峰, 宋凤瑞, 刘淑莹, 等. 蛋白同化激素兴奋剂质谱法检测的现状和发展[J]. 分析化学, 1997, 25(8): 966~972.
- [4] 张 霁, 刘春胜, 毕红钢, 等. 尿中多种蛋白同化激素药物的 GC/MS 分析及代谢研究[J]. 药学学报, 1991; 26(8): 598~605.
- [5] Robert M, Christiane Ayotte, Robert Dugal, et al. Studies on Anabolic Steroids V [J]. J Chromatogr, 1991, 562: 323~340.
- [6] Robert M, Christiane Ayotte, Robert Dugal, et al. Studies on Anabolic Steroids I [J]. J Chromatogr, 1989, 489: 23~50.