

# 固相萃取-气质联用仪检测尿液中多种内源性类固醇

刘慧燕\*

(广东环境保护工程职业学院, 佛山 528116)

**摘要:** **目的** 为监控运动员食品药品安全问题, 利用气质联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)建立正常运动员尿液中多种内源性类固醇的分析方法。**方法** 尿液冷冻处理解冻后离心, 取上清液经固相萃取,  $\beta$ -葡萄糖醛酸甙酶水解后再次萃取干燥衍生化后, 采用选择离子监控 SIM 模式进行检测。**结果** 方法的最低检出限为 0.2~0.5 ng/mL, 平均提取回收率为 93.64%~116.74%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)低于 6.59%。**结论** 该方法可以用于内源性类固醇兴奋剂的检测。

**关键词:** 气相色谱-质谱联用法; 内源性类固醇; 尿液

## Solid phase extraction and determination of endogenous anabolic steroids in urine by gas chromatography-mass spectrometry

LIU Hui-Yan\*

(Guangdong Vocational College of Environmental Protection Engineering, Foshan 528116, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a method of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the simultaneous identification and quantification of endogenous anabolic steroids in urine of athletes, for assurance of their food and drug safety. **Methods** The thawed iced urine sample was centrifuged, and the liquid supernatant was extracted using reverse phase  $C_{18}$  column. The methanol eluant was collected, hydrolyzed by  $\beta$ -glucuronidase, derivatized with a derivatization reagent and detected using GC-MS in SIM mode. **Results** The limits of detection for endogenous anabolic steroids were in the range of 0.2~0.5 ng/mL, the average recoveries were 93.64%~116.74% with relative standard deviation (RSD) less than 6.59%. **Conclusion** The method can be used for the determination of endogenous anabolic steroids in urine for doping control.

**KEY WORDS:** gas chromatography-mass spectrometry; endogenous steroids; urine

## 1 引言

为了更好地监控运动员用药, 保护运动员的身体健康, 监督运动员的违禁药物使用以及保健食品中是否含有违禁药物非常有必要。外源性类固醇激素的检

测方法以检测代谢产物为主<sup>[1-3]</sup>; 内源性类固醇兴奋剂隐蔽性更强, 难以监督和控制<sup>[4-9]</sup>。内源性类固醇激素由人体自身分泌产生, 主要包括睾酮(testosterone)、表睾酮(epitestosterone)、雄酮(androsterone)、苯胆烷醇酮(etiocholanolone)和脱氢表雄酮(dehydroepiand

\*通讯作者: 刘慧燕, 运动营养助理研究员, 主要研究方向为食品营养与安全检测相关教学科研工作。E-mail: liuhuiyan78@qq.com

\*Corresponding author: LIU Hui-Yan, Associate Researcher, Guangdong Vocational College of Environmental Protection Engineering, No.98, Guidan Road, Nanhai District, Foshan 528116, China. E-mail: liuhuiyan78@163.com

rosterone, DHEA)等<sup>[10,11]</sup>。

目前, 兴奋剂检测实验室应用同位素比质谱分析方法检测内源性类固醇来源<sup>[12-14]</sup>。<sup>12</sup>C 和 <sup>13</sup>C 是碳元素在自然界中的天然同位素。有机化合物的来源不同, 其同位素比(如 <sup>13</sup>C 与 <sup>12</sup>C 的比值)也不同。人体自身分泌的类固醇与相同化学结构的类固醇制剂的同位素比不同。应用同位素标记法可以测定化合物 <sup>13</sup>C 与 <sup>12</sup>C 的比值, 确定体内类固醇来源。但是该方法对仪器要求高, 对工作人员也存在放射性风险, 样品量大的时候难以满足检测需要。

一般而言, 人体中内源性类固醇激素的浓度个体差异较大, 而一些内源性类固醇激素的浓度比值较为稳定<sup>[2]</sup>。服用内源性类固醇激素可使人尿中该种类固醇或其代谢产物浓度发生变化, 当尿中这些类固醇浓度或其比值超出正常范围时, 可初步怀疑尿样是兴奋剂阳性, 从而进一步通过同位素比质谱方法检测确认<sup>[15-17]</sup>。本研究采用日本岛津 GC-MS QP2010 建立了尿液内源性类固醇的定量检测方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

QP-2010 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司); 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI); 干热氮吹仪(天津东康 DN-12A); TDZ5-WS 离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。

N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, MSTFA); 三甲基碘硅烷(iodotrimethylsilane, TMSI); 二硫代赤藓糖醇(DITHIOER);  $\beta$ -葡萄糖醛酸甙酶; 叔丁基甲醚(methylt-butyl ether)等均来自 Sigma-aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

固相萃取填料粒径 80~100  $\mu\text{m}$ (Sunchrom, ODS-BP); 磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、碳酸钠、碳酸氢钠(广州化学试剂厂)、甲醇(天津化工厂)均为分析纯试剂。

标准品: 雄酮、本胆烷醇酮、双氢睾酮、睾酮、表睾酮、甲睾酮、 $5\alpha$ -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇、 $5\beta$ -雄烷- $3\alpha, 17\beta$ -二醇等均来自 Sigma-aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

样品: 待测尿样来自运动员正常尿样。

### 2.2 样品预处理

收集不同项目运动员的晨尿, 放置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱

保存。取解冻尿样 5 mL, 1500 r/min 离心 5 min 后, 取上清尿液待用。

固相萃取柱(solid phase extraction, SPE)为自制, 将固相萃取填料 Sunchrom ODS-BP (粒径 80~100  $\mu\text{m}$ ) 装好 SPE 柱后, 加上清尿液, 同时加入内标溶液(甲睾酮 50 ng/mL, 50  $\mu\text{L}$ ), 收集甲醇的洗脱液。洗脱液干热氮气吹干后, 加入 1 mL 0.2 mol pH=7.0 的磷酸缓冲液和 50  $\mu\text{L}$  (3000 IU) $\beta$ -葡萄糖醛酸甙酶混匀; 在 55  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中培养 3 h, 取出后加 100 mg 碳酸钠盐固体缓冲剂和 5 mL 叔丁基甲醚, 振荡萃取, 取出上层有机溶液至锥形玻璃试管中, 在 70  $^{\circ}\text{C}$  干热的情况下, 氮吹浓缩。然后转移至样品瓶内衬管中继续氮吹至无水分, 再加入 50  $\mu\text{L}$  混合衍生化试剂 MSTFA:TMSI:DITHIOER (1000:3:1), 70  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 待用。

### 2.3 气相色谱/质谱联用仪分离条件

#### 2.3.1 色谱条件

色谱柱: HP-1 毛细管色谱柱(25 m $\times$ 0.2 mm, 0.11  $\mu\text{m}$ );

柱温升温程序: 初始温度 180  $^{\circ}\text{C}$ (保持 2min)  $\xrightarrow{3.5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$  228  $^{\circ}\text{C}$   $\xrightarrow{25^{\circ}\text{C}/\text{min}}$  290  $^{\circ}\text{C}$ (保持 3 min)。

载气: 氦气, 流速 1 mL/min; 分流比: 1 比 10;

进样口温度: 220  $^{\circ}\text{C}$ ; 接口温度: 230  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### 2.3.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源; 电子能量 70 eV; 离子源温度 200  $^{\circ}\text{C}$ 。选用 SIM 模式根据保留时间和质谱图定性, 内标峰面积定量, 采用 Lab Solutions GC-MS Solution 软件分析。以甲睾酮为内标。

### 2.4 方法验证

以水为基质添加目标物标准品建立标准曲线、最低检出浓度(limits of detection, LOD)、最低定量浓度(limits of quantitation, LOQ)等方法的有效性验证<sup>[18]</sup>。

标准曲线的制备: 对于  $5\alpha$ -雄烷二醇、 $5\beta$ -雄烷二醇、表睾酮、双氢睾酮、睾酮标准溶液的质量浓度为 1、5、10、50、100、200 ng/mL, 对于雄酮和苯胆烷醇酮标准溶液的质量浓度为 10、50、100、500、1 000、2000 ng/mL, 然后按照本文 2.2 和 2.3 中所述方法进行处理和分析。

回收率试验: 选取标准曲线制备中高中低三个浓度点,  $5\alpha$ -雄烷二醇、 $5\beta$ -雄烷二醇、表睾酮、双氢睾酮、睾酮的质量浓度为 1、50、200 ng/mL; 雄酮和苯胆烷醇酮的质量浓度分别为 10、500、2 000 ng/mL,

取相应浓度的标准溶液 10  $\mu\text{L}$  直接加入样品瓶内衬管, 加入内标溶液(甲睾酮 50 ng/mL, 50  $\mu\text{L}$ ), 氮吹干燥, 再加入 50  $\mu\text{L}$  混合衍生化试剂 MSTFA:TMSI:DITHIOER (1000:3:1), 70  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 按照 2.3 的方法进行分析对比。

### 3 结果与分析

#### 3.1 实验条件的确定

##### 3.1.1 Doping-scan 图谱

内源性类固醇的结构和化学性质相似度非常高, 难以分离。采用非极性薄膜毛细管柱, 通过细致的调整升温程序和载气流速, 目的化合物得到了较好的分离, 有利于检测的定性定量, 如图 1。

因本实验以保留时间及在此保留时间处的特征离子来判定目的物质的存在, 故对保留时间稳定性的考查就显得尤为重要。对标样进行保留时间和相对

保留时间 (与内标甲睾酮相比,  $n=20$ ) 统计如下表 1:

##### 3.1.2 类固醇的线性方程、线性范围、检出限和定量限

对基质中添加不同浓度的类固醇标准品, 按照本文“2.2”和“2.3”中所述方法处理, 以标准品和内标的峰面积比值为纵坐标  $Y$ 、标准品的添加浓度为横坐标  $X$  进行线性回归分析, 得线性回归方程、相关系数、线性范围; 逐渐降低添加标准品的含量, 以信噪比( $S/N$ )大于 3 确定方法的检出限 LOD, 以信噪比( $S/N$ )大于 10 确定方法的定量限 LOQ, 详见表 2。

##### 3.1.3 提取回收率

分别对 5 mL 蒸馏水添加不同浓度的标准品按前处理方法处理后进行测定, 将测定值与相同浓度未经处理的标准溶液的测定结果比较, 得到雄酮、本胆烷醇酮、5 $\alpha$  雄烷二醇、5 $\beta$  雄烷二醇、表睾酮、双氢睾酮、睾酮的平均提取回收率为 93.64%~116.74%, 相对标准偏差低于 6.59% (表 3)。

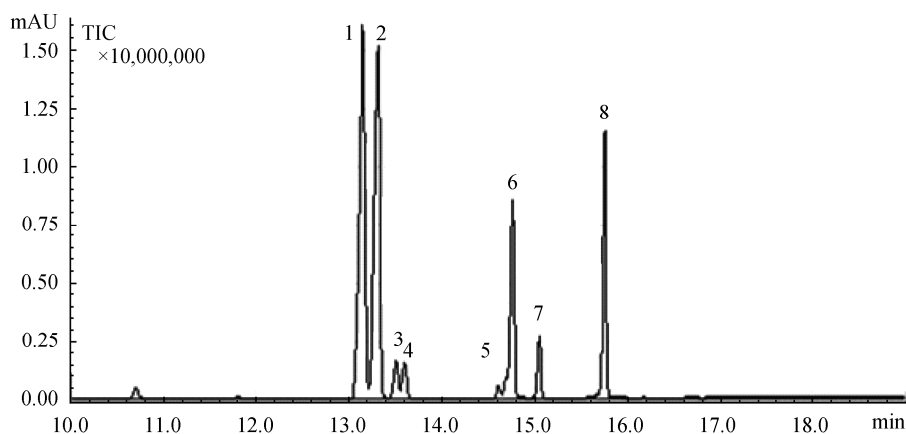


图 1 类固醇混合标准品的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow chart of steroid mixed standard

1: 雄酮; 2: 本胆烷醇酮; 3: 5 $\alpha$  雄烷二醇; 4: 5 $\beta$  雄烷二醇; 5: 表睾酮;  
6: 双氢睾酮; 7: 睾酮; 8: 甲睾酮(内标)

表 1 目标化合物的特征离子与保留时间、相对保留时间

Table 1 The characteristic ions, retention time, relative retention time of purpose compound

ID	名称	特征离子( $m/z$ )	保留时间(min)	相对保留时间
1	雄酮	434, 419	13.115 $\pm$ 0.011	0.832 $\pm$ 0.0006
2	本胆烷醇酮	434, 419	13.260 $\pm$ 0.008	0.841 $\pm$ 0.0006
3	5 $\alpha$ 雄烷二醇	241, 256	13.485 $\pm$ 0.006	0.856 $\pm$ 0.0005
4	5 $\beta$ 雄烷二醇	241, 256	13.588 $\pm$ 0.006	0.862 $\pm$ 0.0005
5	表睾酮	432, 417	14.617 $\pm$ 0.004	0.928 $\pm$ 0.0003
6	双氢睾酮	434, 432	14.767 $\pm$ 0.004	0.937 $\pm$ 0.0003
7	睾酮	432, 417	15.050 $\pm$ 0.003	0.956 $\pm$ 0.0005
8	甲睾酮(内标)	446, 301	15.756 $\pm$ 0.005	

表 2 类固醇的线性方程、线性范围、检出限和定量限  
Table 2 Linear equations, linear ranges, LOD and LOQ for the determination of steroids

类固醇	线性方程	线性系数	线性范围(ng/mL)	检出限 LOD(ng/mL)	定量限 LOQ(ng/mL)
雄酮	$Y = 0.1506X + 0.0306$	0.9975	10~2000	0.5	2.0
本胆烷醇酮	$Y = 0.1273X + 0.0583$	0.9968	10~2000	0.5	2.0
5a 雄烷二醇	$Y = 0.0578X + 0.0072$	0.9982	1~200	0.5	2.0
5b 雄烷二醇	$Y = 0.1104X + 0.0106$	0.9985	1~200	0.5	2.0
表睾酮	$Y = 0.2525X + 0.0084$	0.9958	1~200	0.3	0.5
双氢睾酮	$Y = 0.1663X + 0.0049$	0.9970	1~200	0.5	1.0
睾酮	$Y = 0.3750X + 0.0153$	0.9985	1~200	0.2	0.5

表 3 方法的提取回收率( $n=6$ )  
Table 3 Extraction recoveries of the method ( $n=6$ )

类固醇	添加浓度(ng/mL)	检测浓度(ng/mL)	平均回收率%	相对标准偏差 RSD%
雄酮	500	493.52±14.36	98.70±2.87	2.91
本胆烷醇酮	500	488.95±11.79	97.77±2.36	2.41
5a 雄烷二醇	50	47.89±1.08	95.78±1.86	4.87
5b 雄烷二醇	50	47.91±0.83	95.82±2.18	5.19
表睾酮	50	51.16±0.36	105.32±2.57	1.54
双氢睾酮	50	52.95±1.97	115.16±1.58	6.59
睾酮	50	49.92±1.10	99.84±2.20	2.20

表 4 尿样中内源性类固醇浓度及比值  
Table 4 The level and ratio of endogenous anabolic steroids in urine

类固醇	检测浓度(ng/mL)	浓度比值		
		And/Etio	5a/5b	T/ET
雄酮(And)	409.53±40.78			
本胆烷醇酮(Etio)	634.77±7.86			
5a 雄烷二醇(5a)	6.29±0.39			
5b 雄烷二醇(5b)	13.35±0.29	0.645±0.024	0.475±0.060	0.278±0.008
表睾酮(ET)	5.18±0.76			
双氢睾酮(DHT)	ND			
睾酮(T)	1.44±0.09			

### 3.2 样品测定

将正常运动员阴性尿样取平行样 10 份, 按照本文 2.2 及 2.3 的方法处理及分析, 测得样品中类固醇浓度和比值见表 4。

## 4 结 论

样品预处理对于检测结果非常重要, 尿样标本

冷冻解冻后再离心经固相萃取柱萃取, 可以去除尿液标本中硫酸盐和磷酸盐等杂质, 它们是葡萄糖醛酸苷酶的抑制剂, 影响酶活性。

由代谢途径推知, 如果没有服用类固醇制剂, 体内正常分泌时, 一些内源性类固醇激素浓度比, 如 T/ET、An/Etio、5A-diol/5B-diol 等, 比值在一定范围内<sup>[15,16]</sup>。利用 GC-MS 可以快速定量运动员尿液中目标类固醇含量, 并结合相关类固醇阈值和浓度比

值可以对样品进行初筛,适用于监控运动员食品药品安全问题。

### 参考文献

- [1] 叶荔, 张长久, 张亦中. 人尿诺龙和炔诺酮代谢物的气相色谱-质谱分析[J]. 分析化学, 1995, 23(1): 32-35.  
Ye L, Zhang CJ, Zhang YZ. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of metabolites of nandrolone and norethisterone in human urine [J]. Chin J Anal Chem, 1995, 23(1): 32-35.
- [2] 杨树民. 兴奋剂与兴奋剂检测[J]. 大学化学, 2008, 23(2): 13-21  
Yang SM. Doping and doping control [J]. Univ Chem, 2008, 23(2): 13-21
- [3] Bowers LD. Analytical advances in detection of performance-enhancing compounds [J]. Clin Chem, 1997, 43: 1299-1304.
- [4] 杨悦武, 吴如金. 尿中睾酮与表睾酮的三甲基硅烷化及其比值的GC-MS测定[J]. 药学学报, 1992, 27(10): 758-762.  
Yang YW, Wu RJ. Trimethylsilylation of testosterone, epitestosterone and determination of their ratio in urine by GC-MS [J]. Acta Pharm Sin, 1992, 27(10): 758-762.
- [5] 姜金庆, 张海棠, 王自良, 等. 19-去甲类固醇激素检测方法研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, (4): 93-98.  
Jiang JQ, Zhang HT, Wang ZL, *et al.* Detection of progress for 19-Norsteroids [J]. Biotechnol Bull, 2010, (4): 93-98.
- [6] 钱跣, 赵亮, 吕磊. 色谱-质谱联用技术测定人体内类固醇激素的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2014, 32(3): 176-180.  
Qian X, Zhao L, Lv L. Research progress in steroid hormone analysis in vivo by chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Pract, 2014, 32(3): 176-180
- [7] Taylor NF. Urinary steroid profiling [J]. Methods Mol Biol, 2006, 324: 159-175.
- [8] 丁一峰, 顾学范, 叶军, 等. 气相色谱-质谱分析新生儿尿液类固醇激素方法的建立[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(8): 74-751  
Ding YF, Gu XF, Ye J, *et al.* Establishment of gas chromatography-mass spectrometry method for analyzing urinary steroids in newborns [J]. J Clin Pediatr, 2010, 28(8): 748-751
- [9] Shareef A, Angove MJ, Wells JD. Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N, O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tertbutyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1108(1): 121-128.
- [10] 杨则宜. 药物与竞技体育[M]. 北京: 人民体育出版社, 1993.  
Yang ZY. Drug and competitive sports [M]. Beijing: Peoples Sports Publishing House, 1993.
- [11] 卢昌亚. 运动兴奋剂概论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.  
Lu CY. Overview of performance-enhancing drugs [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [12] 沈敏, 向平, 沈保华, 等. 头发中内源性类固醇激素的气相色谱-串联质谱分析[J]. 色谱, 2008, 26(7): 454-459.  
Shen M, Xiang P, Shen BH, *et al.* Determination of endogenous anabolic steroids in hair using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26(7): 454-459.
- [13] Buisson C, Hebestreit M, Weigert AP, *et al.* Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17 $\beta$ -estradiol administration to cattle [J]. J Chromatogr, 2005, 1093(1-2): 69-80.
- [14] 王静竹. 同位素质谱方法检测内源性类固醇雄烯二酮[J]. 体育科学, 2007, 27(7): 75-79.  
Wang JZ. Isotope-ratio Mass Spectrometry Analysis for Detection of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids- Androstenedione [J]. Chin Sport Sci, 2007, 27(7): 75-79.
- [15] 王静竹, 吴侔天, 张亦农, 等. 运动员尿中类固醇激素水平的研究[J]. 中国运动医学杂志, 2004, 23(2): 200-203.  
Wang JZ, Wu MT, Zhang YN, *et al.* Statistical analysis of the urine steroid profile in chinese athletes [J]. Chin J Sport Med, 2004, 23(2): 200-203.
- [16] 武露凌, 吴如金, 刘海岚, 等. 气质联用法监测尿中睾酮及其相关甾体激素[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(3): 219-224.  
Wu LL, Wu RJ, Liu HL, *et al.* Detecting and monitoring testosterone and its relevant steroids in urine with GC/MS [J]. J Chin Pharm Univ, 2004, 35(3): 219-224
- [17] WADA Project Team. Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids [EB/OL]. [2004-05-30]. [http://www.wada-ama.org/rtecontent/docuLent/end\\_steroids\\_aug\\_04.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/docuLent/end_steroids_aug_04.pdf).
- [18] 王萌焯, 向平, 严慧, 等. 液相色谱-串联质谱法测定尿液中的内源性类固醇激素[J]. 色谱, 2008, 26(1): 10-14.  
Wang MY, Xiang P, Yan H, *et al.* Determination of endogenous steroids in urine by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26 (1): 10-14

(责任编辑: 张宏梁)

### 作者简介



刘慧燕, 助理研究员, 主要研究方向为食品营养与检测教学科研工作。