第 29卷 第 11期
2010年 11月

分析测试学报
FENXICESHIXUEBAO (Journal of Instrumental Analysis)

Vol. 29 No. 11
1211~ 1215

睾酮甲醇溶液标准物质的定值及不确定度评定

苏福海, 全 灿, 王海峰, 李红梅

(中国计量科学研究院 化学计量与分析科学研究所, 北京 100013)

摘 要: 针对目前食品中兴奋剂类药物检测的需求, 研制了睾酮甲醇溶液国家级标准物质。通过对经筛选的市售原料纯品进行液相色谱-质谱(LC-MS)和红外光谱(IR)定性分析后, 利用高效液相色谱法(HPLC)对睾酮蛋白同化类固醇类兴奋剂原料进行纯度定值。利用HPLC在 244 nm监测, 0.1% HAc-乙腈(50∶50, 体积比)作为流动相进行等度洗脱, 以 Inertsil ODS-SP(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行分离, 测得液相条件下睾酮固体的纯度为 99.89%。为保证纯度测量的准确性, 采用多家联合定值对睾酮的纯度进行检验。睾酮溶液标准物质经重量-重量法配制后, 进行均匀性和稳定性实验, 浓度赋值后进行不确定度评定。研制的睾酮溶液标准物质目前已被批准为国家二级标准物质并应用于实际检测。

关键词: 睾酮; 标准物质; 液相色谱法; 多家联合定值; 不确定度评定

中图分类号: O657.63; S767.33 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)11-1211-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.11.021

Certification of Testosterone Methanol Solution and Its Uncertainty Evaluation

SU Fu-hai, QUAN Can, WANG Hai-feng, LI Hong-mei

(Division of Chemical Metrology and Analytical Science, National Institute of Metrology of China, Beijing 100013, China)

Abstract To meet the requirement of doping detection in food, testosterone methanol solution certified reference material (CRM) was developed. After the qualitative analysis on commercial material by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and infrared spectroscopy (IR), the purity of testosterone was certified by HPLC. The purity certification of testosterone was performed at 244 nm with a mobile phase of 0.1% HAc-acetonitrile (50∶50, by volume), and an Inertsil ODS-SP (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for the analysis. The certified purity of testosterone was 99.89% based on the result of HPLC. To verify the result, multi-lab certification was performed. At the same time, water content and inorganic impurity were determined by thermal gravimetric analysis (TGA) and ICP-MS. Testosterone solution CRM was prepared by gravity method. After the homogeneity and stability testing, the concentration of testosterone solution CRM was certified and the uncertainty was evaluated. The CRM has been approved as a national CRM and applied in the doping detection.

Key words testosterone; certified reference material; high performance liquid chromatography (HPLC); multi-lab certification; uncertainty evaluation

兴奋剂, 原指能刺激人体中枢神经系统, 使人产生兴奋, 从而提高机能状态的药物, 后来在体育界被用来泛指可对人体机能产生影响, 有助于提高运动能力的药物。目前所称的兴奋剂为禁用药物的统称。借助服用各种非人体必需的食物或药物以求在竞技中获得优势的做法已有很久的历史[1-3]。类固醇是广泛分布于生物界的一大类环戊稠环全氢化菲衍生物的总称, 又称甾醇、甾族化合物。绝大多数类固醇类物质均具有生理活性, 尤以蛋白同化雄性类固醇的活性较为显著。2004年希腊雅典夏季奥运会上, 世界反兴奋剂机构(WADA)共查出 23例阳性尿样, 其中有 16例与蛋白同化类固醇激素有关, 类固醇类兴奋剂的滥用严重影响体育比赛的公平公正性, 且长期使用这类兴奋剂会严重干扰人体的自然激素平衡, 导致异性化现象, 还可能引起肝、肾的严重损伤, 并发肝癌、心脏病, 产生药物依赖以及出现严重的情感及精神病症[4-6]。

睾酮(Testosterone)是一种蛋白质同化激素, 具有同化作用强、雄激素样作用弱的特点, 可作为其

收稿日期: 2010-07-06; 修回日期: 2010-07-25

基金项目: 公益性行业科研专项资助项目(201010011); 国家质检总局食品安全四期资助项目(ASPAQ1009)

第一作者: 苏福海(1976-), 男, 内蒙古自治区呼伦贝尔盟人, 博士, Tel: 010-64271638, E-mail: sufh@nim.ac.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

它甾体激素的原料中间体[7]。2008年世界反兴奋剂机构公布的《禁用物质清单》中列举的蛋白同化制剂主要包括睾酮等 9种蛋白同化类固醇类兴奋剂[8-9]。

为支持动物源性食品中违禁药物的检测分析，确保兴奋剂检测结果的可靠性、可比性和溯源性[10-11]，研究睾酮甲醇溶液标准物质，可为动物源性食品中违禁药物的检测提供技术支撑。本文首次报道了睾酮溶液标准物质的研制过程，并分析了标准物质的制备及分析过程对定值结果的不确定度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

7500系列电感耦合等离子质谱系统(ICP-MS, Agilent公司)，LTQ液相色谱-质谱联用仪(Thermo Finnigan公司)，Avatar 205 FT-IR中波段红外光谱仪(Thermo Nicolet公司)，LC-20A高效液相色谱(日本岛津公司)，色谱柱 Inertsil ODS-SP(4.6 mm×250 mm×5 μm，日本 GL Science Inc)，TGA Pyris 1热失重分析仪(PerkinElmer)。

标准物质原料通过理化特性测试进行定性分析确定主体成分，经过初步定量分析筛选使之满足纯度要求。睾酮(纯度大于 99%，Fluka公司)，经真空包装密封储存在保干器并冷藏于 4 ℃冰箱中，甲醇试剂(色谱纯，Riedel-de-Haen公司)。

1.2 原料的定性分析

由睾酮原料纯品的 LC-MS谱图(图 1)可以看出，分子离子峰 $(M+H)^+$ 的质荷比 m/z 为 289.19，为睾酮的相对分子质量(288.4)加上氢原子量(1.0)，可以对睾酮定性。

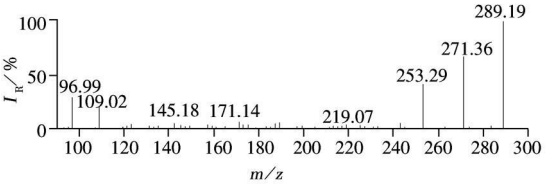

图 1 睾酮原料纯品的 LC-MS谱图

Fig 1 LC-MS spectrum of testosterone

睾酮的红外光谱结果如图 2所示。该图与其它类固醇类兴奋剂的红外光谱图相似，可以确认为结构类似物质，作为睾酮纯品原料定性分析的佐证。

1.3 标准物质的制备

溶液标准物质采用纯品原料经重量-重量法精确制备。方法如下：使用经过检定合格的分析天平(0.000 1 mg分度)准确称量经过纯度分析的标准物质原料纯品(300~500 mg)，转移溶质于准确称重过的洁净锥形瓶中。在另一分析天平(0.01 g分度)上加入一定质量的甲醇至锥形瓶中(所需的甲醇质量根据甲醇的密度 0.791 g/mL和拟配制的兴奋剂体积浓度计算得出，精确称量所加入甲醇的质量)，充分混匀，使两种兴奋剂的质量浓度均为 1.00 g/L。样品混匀后立即在低温冷冻条件下，用洁净的安瓿瓶分装、熔封、贴标签。置于冰箱冷藏，以备均匀性检验、稳定性考察、色谱定值核验等使用。

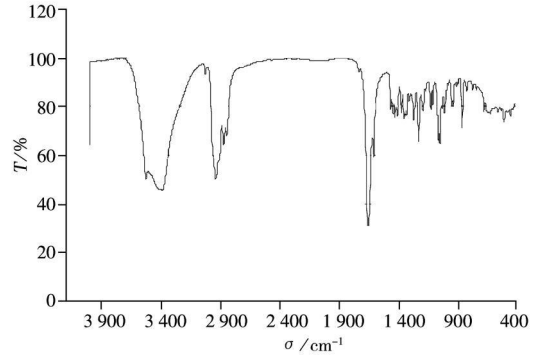

图 2 睾酮原料纯品的红外光谱图

Fig 2 IR spectrum of testosterone

1.4 纯品原料纯度的定值分析

纯品原料中主成分定值方法参照各国家计量实验室的通用方法。对样品纯度为 99%以上的化合物，通常选择高效液相色谱(HPLC)归一化法作为有机化合物纯度定值的主要方法[12-13]。

1.5 均匀性检验

根据《一级标准物质技术规范》(JJG 1006-1994)的要求对上述标准物质进行均匀性检验[14]。具体抽样检验方法为：从每种标准物质中随机抽取 7个包装，进行瓶间均匀性检验；再于任意一瓶中取 7个子样，进行瓶内均匀性检验。检验方法为 HPLC法，测量数据经 F 检验和 t 检验，证明标准物质瓶内和瓶间样品均匀一致[15]。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.6　稳定性考察

标准物质稳定性考察按先密后疏的原则，在一定时间间隔内选择定值方法即 HPLC法，检测在规定条件下保存的标准物质纯度随时间的变化情况。分别在第 1、2、3、4周进行稳定性监测。每次取 5个包装，每个包装取 1个子样，测 3次，计算平均值，将 5个包装测量结果平均值作为检测结果。结果的变动在定值结果不确定度范围内作为判定标准物质稳定的原则。

1.7　水分及无机元素杂质的分析

采用热重法(TGA法)进行水分的测定。TGA法是在程序控制温度下，观察和测量物质在加热过程中的重量变化，并从这种变化来研究物质在加热过程中所产生的具有重量变化的反应进行水分的测定。该方法的优点在其测定时所需的样品量较小，分析时间较短，获得的信息量大，数据处理更方便，不仅适用于样品中吸附水和结晶水的测定，还适用于样品中有机溶剂的去除。TGA法常用热天平称量其重量的变化，从而得出水分的量，通常称量样品量为 3~5 mg左右。

1.8　纯度的定值方法

高效液相色谱法：色谱柱：Inertsil ODS-SP，4.6 mm×250 mm，5 μm；流动相：0.1% HAc-乙腈(50∶50，体积比)，等度洗脱，流速：1 mL/min；样品为 1.00 g/L的睾酮甲醇溶液，进样量为 5 μL；检测波长：210、220、244、250、260 nm；定值波长：244 nm；样品检测时间：35 min；睾酮的保留时间：19 min；液相色谱图见图 3。

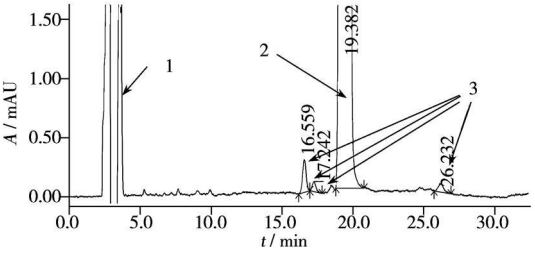

图 3　睾酮原料纯品的 HPLC定值谱图

Fig. 3　HPLC spectra of testosterone

1. methanol; 2. testosterone; 3. impurities; detection wavelength: 244 nm

2　结果与讨论

2.1　睾酮纯度多家定值分析

睾酮采用多家实验室联合 HPLC纯度定值的方法，共有 7家实验室参与，每家实验室 7瓶样品，其中 1瓶提供 7个纯度值，其余 6瓶各给出 3个纯度值。分别利用柯克伦检验和狄克逊检验对 7家实验室的数据进行检验，剔除了第 5个实验室的异常值(相对标准偏差过大)，利用其他 6家实验室的检测值进行计算，结果见表 1。由多家实验室合作定值可以确定睾酮纯品的纯度为 99.89%。

表 1　睾酮合作定值结果

Table 1　Multi-lab certification result of testosterone

Lab	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Lab. 5	Lab. 6	Lab. 7
Sample 1	99.77	99.93	99.93	99.94	99.04	99.95	99.80
Sample 2	99.78	99.93	99.94	99.95	99.41	99.96	99.79
Sample 3	99.78	99.93	99.92	99.94	99.13	99.95	99.81
Sample 4	99.79	99.93	99.93	99.94	97.58	99.93	99.80
Sample 5	99.78	99.93	99.94	99.94	97.18	99.94	99.79
Sample 6	99.76	99.93	99.93	99.94	98.07	99.94	99.79
Sample 7	99.76	99.93	99.94	99.94	99.26	99.94	99.80
Average	99.77	99.93	99.93	99.94	98.52	99.94	99.80
RSD s_r/%	0.011	0.000	0.008	0.004	0.914	0.010	0.008
C				0.999 6			
C(α, m, n)				0.434 7			
Outliers	Cochran test showed the outliers; after the elimination of data of Lab. 5, there was no outliers (柯克伦检验有异常值，舍弃标准偏差最大的第 5个实验室再进行检测，无异常值)						
r_1				0.144 1			
r_n				0.077 7			
f(α, n)				0.740 0			
Outliers	Dixon test showed the outliers; after the elimination of data of Lab. 5, there was no outliers (狄克逊检验有异常值，舍弃标准偏差最大的第 5个实验室再进行检测，无异常值)						
Average				99.89			
RSD s_r/%				0.08			

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 溶液标准物质分析

利用 HPLC作为定值分析方法，检验重量法配制的结果，溶液均匀性检验采用峰面积进行计算，见表 2。测量数据经 F 检验和 t检验，结果证明标准物质瓶内和瓶间样品均匀一致。溶液标准物质以重量法配制的结果作为最终值。利用重量法配制 1.00 g/L的睾酮甲醇溶液标准物质，用高效液相色谱法对所配制溶液进行核验，核验的 RSD为 0.21%，记为 $u_{核验}$。

表 2 睾酮甲醇溶液标准物质均匀性检验结果

Table 2 Homogeneity testing result of testosterone solution peak area/mAU

Item	Inter-vial		Intra-vial
Content	16 452	16 455	16 434
	16 380	16 445	16 407
	16 470	16 436	16 434
	16 441	16 441	16 461
	16 436		16 461
	16 444		16 456
	16 420		16 488
Average	16 438		16 449
RSD s_r/%	0.140		0.158

2.3 标准物质定值的不确定度评定

标准物质定值的不确定度来源分析如图 4。主要的不确定度来源于原料的制备、多家定值以及方法的不确定度、溶液量值的核验以及溶液均匀性与稳定性检验。其中溶液均匀性和稳定性所引起的不确定度均在千分位以上，可以忽略。因此不计入最终不确定度的计算。在此基础上最终合成了标准物质定值的不确定度。

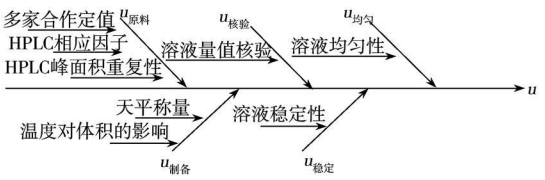

图 4 标准物质定值的不确定来源图

Fig.4 Uncertainty resource of certification of CRMs

2.3.1 纯度定值不确定度的评定 ①液相色谱法定值测量重复性引入的不确定度 $u_1 = 0.01\%$；②各组分在不同检测波长下响应差异引入的不确定度 u_2：综合考虑主成分和杂质化合物在相应检测波长下的响应，各组分引入的不确定度 u_{2-i}采用以下公式进行量化：$u_{2-i} = B_{i\,max\lambda} - B_{定值\lambda} = (A_{i\,max\lambda} - A_{定值\lambda}) / \Sigma A_{定值\lambda}$，并假设合成各组分不确定度为均匀分布，则：$u_2 = \sqrt{\Sigma u_{2-i}^2}/\sqrt{3} = 0.05\%$；③合成液相色谱分析标准不确定度：$u_{LC} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = \sqrt{0.01\%^2 + 0.05\%^2} = 0.05\%$。

表 3是液相色谱法纯品原料不确定度的各个分量的计算，包括 A 类不确定度 (合作定值所用的方法的重复性)以及 B 类不确定度即响应因子产生的不确定度等。最终合成的纯品的不确定度为：$u_{原料} = 0.11\%$。

表 3 液相色谱法合作定值结果不确定度

Table 3 Uncertainty evaluation of HPLC multi-lab certification

项目	不确定度/%
(1)将合作定值结果的平均值作为一组新的测量值，取该组测量值的相对标准偏差作为一部分来源 u_1	0.08
(2)合作定值所用的方法(HPLC法)的重复性，取各家定值结果中最大的相对标准偏差 u_2	0.011
(3)合作定值所用的方法 HPLC法的响应因子产生的不确定度 u_3	0.05
合成上述分量，即得多家定值结果的不确定度	0.11

2.3.2 溶液制备过程引入的不确定度 ①天平称量引入的不确定度来源于天平称量最大允许误差、天平称量变动性及浮力影响 (在常规状态下称重，此项可忽略)。

纯品原料称量使用 0.000 1 mg分度的分析天平，天平的变动性、检定误差等估计为 0.005 mg，称样量为 400 mg，按矩形分布相对不确定度 = $(\Delta m/m)/\sqrt{3} = (0.005\ mg/400\ mg)/\sqrt{3} = 0.000\ 7\%$。

甲醇的称量使用 0.01 g分度的分析天平，天平的变动性、检定误差等估计为 0.01 g，称样量为 300.00 g，按矩形分布相对不确定度 = $(\Delta m/m)/\sqrt{3} = (0.001\ g/300\ g)/\sqrt{3} = 0.002\%$。

②温度对体积的影响：由于本方法根据加入的甲醇质量计算溶液体积，所以需要考虑温度对甲醇体积的影响而引入的不确定度。实验温度控制在 (25 ±5) ℃，甲醇膨胀系数为 0.001 2 ℃$^{-1}$，因此产生的体积变化为 (400 mL × 5 ℃ × 0.001 2 ℃$^{-1}$) = ±2.4 mL，温度变化按照矩形分布，相对标准不确定

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度 = (2.4 mL/400 mL)/$\sqrt{3}$ = 0.35%。

因此，睾酮兴奋剂溶液标准物质的天平称量引入不确定度为：$u_{制备} = \sqrt{0.0007\%^2 + 0.002\%^2 + 0.35\%^2} = 0.35\%$。

睾酮兴奋剂溶液标准物质合成不确定度为：$u_c = \sqrt{u_{原料}^2 + u_{制备}^2 + u_{校验}^2} = \sqrt{0.11\%^2 + 0.35\%^2 + 0.21\%^2} \approx 0.43\%$。

其扩展不确定度为：$U = k \times u_c = 0.43\% \times 2 \approx 1\%$。

综上所述，睾酮溶液标准物质质量浓度为 1.00 g/L，总的扩展不确定度为 1% (k = 2)。

3 结　论

用纯度大于 99% 的睾酮市售产品经过红外光谱、质谱定性分析后，进行水分、元素杂质含量分析，利用 HPLC 面积归一化多家定值方法对睾酮原料纯度进行定值；利用重量法配制了 1.00 g/L 的睾酮甲醇溶液标准物质，并进行了均匀性、稳定性检测，并对浓度定值结果进行了不确定评估。所研制的有质量保证的系列标准物质，对于保证检测实验室测量结果的准确可靠与互认，避免在食品检测中出现“测不准”问题具有极其重要的现实意义。

参考文献：

[1] ANASTASIOU-NANA M I, NANAS J N, KARAGOUNIS L A, TSAGALOU E P, ALEXOPOULOS G E, TOUMANIDIS S, CERALIS, STAMATELOPOULOS S F, MOULOPOULOS S D. Relation of dispersion of QRS and QT in patients with advanced congestive heart failure to cardiac and sudden death mortality[J]. Am J Cardiol, 2000, 85(10): 1212-1217.

[2] BAHRKE M S, YESALIS C E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise[J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(6): 614-620.

[3] SPYRIDAKIM H, KIOUSI P, VONAPARTI A, VALAVANI P, ZONARAS V, ZAHAROU M, SIANOS E, TSOUPRAS G, GEORGAKOPOULOS C. Doping control analysis in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for the Olympic Games Athens 2004: Determination of corticosteroids and quantification of ephedrines, salbutamol and morphine[J]. Anal Chim Acta, 2006, 573/574(1): 242-249.

[4] SKOUROLIAKOU M, KANIC, KOMPOGIORGAS S, KONTOZAMANIS V. Drug consumption during the 2004 Olympics: the special Olympic Pharmacy[J]. Pharm World Sci, 2005, 27(6): 478-479.

[5] MAKIN H L J, GOWER D B, KIRK D N. Steroid analysis[M]. London: Blackie Academic and Professional, 1995.

[6] BASARIA S, WAHLSTROM J T, DOBS A S. Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(11): 5108-5117.

[7] 李端. 药理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2003.

[8] The International Olympic Committee. Anti-Doping Rules applicable to the games of the XXIX olympiad[R/OL]. Beijing, 2008, www.multimedia.olympic.org/pdf/en_report_1316.pdf.

[9] World Anti-Doping Agency[R/OL]. The 2008 prohibited list. www.wada-ama.org/rtecontent/document/2008_List_En.pdf.

[10] LEE S, PARK Y, YANG W, HAN E, CHOE S, IN S, LIM M, CHUNG H. Development of a reference material using methamphetamine abusers' hair samples for the determination of methamphetamine and amphetamine in hair[J]. J Chromatogr B, 2008, 865(1/2): 33-39.

[11] Reference materials for sports drugs, clinical analysis and forensic toxicology[N/OL]. October 2005, www.lgc.co.uk/news/25-oct-2006.aspx-12k.

[12] LELOUX M S, DOST F. Doping analysis of beta-blocking drugs using high-performance liquid chromatography[J]. Chromatographia, 1991, 32(9/10): 429-435.

[13] STKLKER A A M, BRINKMAN U A T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals——a review[J]. J Chromatogr A, 2005, 1067(1): 15-53.

[14] 国家标准物质研究中心. JJG 1006-1994. 一级标准物质技术规范[S]. 1994.

[15] FERGUSON M, WALKER D, MAST E, FIELD S H. Report of a collaborative study to assess the suitability of a reference reagent for antibodies to hepatitis E virus[J]. Biologicals, 2002, 30(1): 43-48.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net