

液相色谱-串联质谱法测定尿液中的内源性类固醇激素

王萌烨^{1,2}, 向 平², 严 慧^{1,2}, 沈保华², 沈 敏²

(1. 复旦大学上海医学院法医系, 上海 200032 ; 2. 司法部司法鉴定科学技术研究所, 上海 200063)

摘要 :建立了液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定尿液中的内源性类固醇激素的方法。尿样经葡萄糖醛酸甙酶水解后进行液-液提取,以甲醇-0.1% 甲酸缓冲液(含 0.02 mol/L 乙酸铵) 体积比为 68:32)为流动相,采用 Cosmosil C₁₈ 色谱柱分离,并以三重四极杆串联质谱多反应监测扫描方式对尿样中的脱氢表雄酮(DHEA)、睾酮、表睾酮、雄酮和苯胆烷醇酮等 5 种激素进行检测。方法的最低检出限为 0.01 ~ 10 ng/mL,平均回收率为 96.7% ~ 106.5%,日内和日间相对标准偏差(RSD)分别小于 7% 和 11%。应用所建立的方法测定了健康志愿者口服 DHEA 后尿液中内源性类固醇激素的变化情况,结果表明该方法样品处理简便,色谱分离完全,结果准确可靠,可替代气相色谱-质谱法用于体液中内源性类固醇激素兴奋剂的常规分析。

关键词 :液相色谱-串联质谱法 ; 内源性类固醇激素 ; 脱氢表雄酮 ; 兴奋剂 ; 尿液

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)01-0010-05 栏目类别 :研究论文

Determination of endogenous steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Mengye^{1,2}, XIANG Ping², YAN Hui^{1,2}, SHEN Baohua², SHEN Min²

(1. Department of Forensic Medicine, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China ;

2. Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, PRC, Shanghai 200063, China)

Abstract : A method was developed for the determination of endogenous steroids in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with methyltestosterone as internal standard. After enzymatic hydrolysis by β -glucuronidase and liquid-liquid extraction, the urine sample was chromatographed on a Cosmosil C₁₈ column with a mixture of methanol and ammonium acetate-formic acid (68:32, v/v) as mobile phase, then detected using MS/MS system with electrospray ionization (ESI) in multi-reaction monitoring (MRM) mode. The detection limits ranged from 0.01 ng/mL to 10 ng/mL. The recoveries ranged from 96.7% to 106.5%, and the intra- and inter-day precisions (measured as relative standard deviations) were less than 7% and 11%, respectively. With simple and fast sample preparation, the method was sensitive and specific for simultaneous determination of these 5 kinds of endogenous steroids in urine. The method has been successfully applied in pharmacokinetic study and is thus a potential alternative for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based procedures in routine analysis of endogenous steroids such as DHEA in human urine.

Key words : liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ; endogenous steroids ; dehydroepiandrosterone (DHEA) ; doping agents ; urine

自上世纪 50 年代以来,合成类固醇激素始终是一些运动员最常滥用的兴奋剂,其中内源性类固醇激素为滥用之首^[1]。因此,内源性类固醇激素的检测及判定是近年来研究的热点。

内源性类固醇是自身合成的激素,包括睾酮、表

睾酮、脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)、雄酮以及苯胆烷醇酮等。其中 DHEA 是种类固醇激素的重要前体,它在体内可通过多种途径代谢为雄酮、苯胆烷醇酮以及睾酮等不同的内源性类固醇激素^[2,3],并且在代谢为睾酮的同时并不

会升高辜酮与表辜酮的浓度比(这是判定是否服用外源性辜酮制剂的标准^[4,5])。因此,对健康成年人服用内源性类固醇激素前后的尿液进行检测,可以为确定人体内源性类固醇激素含量的正常范围提供数据支持。

类固醇激素的检测通常采用气相色谱-质谱联用法(GC/MS)^[6,7],但由于 DHEA 等内源性类固醇激素的化学结构中均有羟基或羰基,分析时必须经过衍生化处理^[8-10],因而生物样品前处理繁琐、费时。而液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)具有能够分析复杂基质中极性化合物并可靠认定的优点,可以为类固醇激素的检测提供快速、简便、有效的服务^[11,12]。

本文对尿样先用葡萄糖醛酸甙酶酶解后采用液-液提取法提取,以甲基辜酮为内标,建立了尿液中 DHEA、辜酮、雄酮、苯胆烷醇酮和表辜酮等 5 种内源性类固醇的 LC-MS/MS 分析方法,并应用该方法测定了健康受试者服用 DHEA 片剂后尿液中 DHEA 等 5 种内源性类固醇激素的含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API 4000 LC-MS/MS 三重四极杆串联质谱仪(Applied Biosystem 公司),Agilent 1100 液相色谱系统(配 Agilent 1100 自动进样器)。

辜酮、表辜酮、雄酮、苯胆烷醇酮、DHEA 和内标甲基辜酮标准品购自 Cerilliant 公司和国家麻醉品实验室;甲醇、甲酸和乙酸铵购自 Fluka 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 样品收集

健康志愿者 6 名,其中男性 3 名,女性 3 名。志愿者受试前留取空白尿液;口服 120 mg DHEA 片剂后,再收集 0~24 h 的尿液,于-20℃下保存。

1.3 样品处理

取尿液 2.0 mL 于试管中,加入 5 ng 甲基辜酮(内标)及 2.0 mL pH 6.8 的磷酸缓冲液、150 μL β-葡萄糖醛酸甙酶(3 000 U),于 80℃恒温水浴中培养 3 h,取出后冷却至室温。再加入 3.5 mL 乙醚,混旋离心,取出有机相并于 60℃水浴中挥干,残渣中加入 100 μL 流动相溶解,供 LC-MS/MS 分析。

1.4 色谱及质谱条件

液相色谱:采用 Cosmosil C₁₈ 色谱柱(150 mm×2 mm,5 μm)和 Phenomenex C₁₈ 预保护柱。流动相为甲醇-0.1% 甲酸缓冲液(含 0.02 mol/L 乙酸铵)(体积比为 68:32),流速为 200 μL/min。进样量为 5 μL。

串联质谱:采用电喷雾电离源(ESI),在多反应监测(MRM)正离子模式下扫描。碰撞气(CAD)压力为 48 263 Pa;气帘气(CUR)压力为 68 948 Pa;雾化气(GS1)压力为 241 317 Pa;辅助加热气(GS2)压力为 275 790 Pa。喷雾电压为 5 500 V,离子化温度(TEM)为 500℃。

选取各目标物的两组特征母离子/子离子对,分别优选其最佳碰撞电压(CE)和去簇电压(DP)。并采用丰度较强的一组母离子/子离子对进行定量分析。5 种内源性类固醇激素和内标物的质谱优化参数见表 1。

表 1 内源性类固醇激素的质谱分析优化参数
Table 1 Optimized parameters for analysis of endogenous steroids using MS/MS with MRM mode

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	DP/ V	CE/ eV
Testosterone (辜酮)	289.2	109.2 97.1	80	35 35
Epitestosterone (表辜酮)	289.2	109.2 97.1	80	37 34
Dehydroepiandrosterone (DHEA) (脱氢表雄酮)	289.3	271.3 253.1	70	11 17
Etiocholanolone (苯胆烷醇酮)	291.2	273.3 255.0	70	13 21
Androsterone (雄酮)	291.2	273.3 255.0	70	13 21
Methyltestosterone (IS) (甲基辜酮)	303.2	109.2 97.1	75	39 38

DP: declustering potential; CE: collision energy.

1.5 方法验证

由于正常人尿液中均存在内源性类固醇激素,以尿液为基质无法进行方法学相关指标的评价,故参照 Choi 等^[13]关于用蒸馏水代替尿液作基质其响应无显著性差异的报道,以水为基质添加目标物标准品完成标准曲线、最低检出浓度、最低定量浓度等方法的有效性验证。

标准曲线的制备:精密量取辜酮、表辜酮、DHEA、雄酮和苯胆烷醇酮标准溶液(1 mg/mL)各 10 μL,用甲醇各自定容至 1 mL,分别得到 10 μg/mL 各激素储备液。对于辜酮和表辜酮,用蒸馏水依次稀释配制成质量浓度为 0.01,0.02,0.05,0.1,0.2,0.5,1,2,5,10,20 和 50 ng/mL 的系列标准溶液;对于 DHEA、雄酮和苯胆烷醇酮,配制成质量浓度为 5,10,20,50,100,200,500,1 000,2 000 和 5 000 ng/mL 的系列标准溶液,然后按“1.3”和“1.4”节中所述方法进行处理和分析。

精密度、准确度及回收率试验:分别在 2 mL 蒸馏水中加入不同量的辜酮、表辜酮、DHEA、雄酮和

苯胆烷醇酮,其中辜酮和表辜酮的质量浓度分别为 0.25、25 和 50 ng/mL;DHEA、雄酮和苯胆烷醇酮的质量浓度分别为 200、1 000 和 5 000 ng/mL,按照“1.3”和“1.4”节中所述方法处理和分析。同时配制相应浓度的标准溶液,不经提取直接测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱分析

采用 ESI(+) 电离方式,内源性类固醇激素均可形成稳定和高丰度的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰。实验发现,对于雄性类固醇激素的分析,ESI 具有比大气压化学电离(APCI)更高的灵敏度,这与 Guan 等^[14]报道的研究结果一致。

内源性类固醇激素虽然结构近似,但在碰撞池内具有不同的裂解方式,产生的碎片离子也不同(质谱图略)。通过结构解析发现,同分异构体的辜酮和表辜酮由母体 A 环在 5 位 C 与 10 位 C 单键断裂(见图 1),分别形成丰度很强的子离子 m/z 97.1 和 m/z 109.2。DHEA、雄酮和苯胆烷醇酮均存在较强丰度的经脱水的碎片离子,其中 DHEA 经过两次脱水形成子离子 m/z 271.3 和 m/z 253.1;同分异构体的雄酮和苯胆烷醇酮的子离子均为 m/z 273.3 和 m/z 255.0。

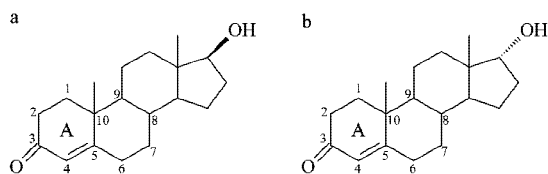


图 1 辜酮与表辜酮的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of testosterone and epitestosterone

a. testosterone; b. epitestosterone.

2.2 色谱条件的优化

液相色谱分离条件的优化是本研究的关键。辜酮与表辜酮、雄酮与苯胆烷醇酮均为同分异构体,具有相同的母离子和子离子,必须依靠色谱方法进行分离。另外,辜酮和表辜酮的确认虽然依赖所选取的其特异性的母离子/子离子对,但它们同时也存在和 DHEA 相同的母离子/子离子对 m/z 289.3/271.3,因此,同样需要有效的分离才能保证 DHEA 定性定量测定的准确性。

由于内源性类固醇激素均为同分异构体,故大部分色谱柱难以使这些目标物完全分离。本研究曾比较了 Agilent C₁₈ 和 C₈ 色谱柱、Restek IBD 色谱柱以及 Cosmosil C₁₈ 色谱柱,发现前 3 种色谱柱在所选择的各种流动相条件下均难以将这些同分异构

体完全分离,而 Cosmosil C₁₈ 柱则能提供良好分离,峰形对称。

在优化流动相时发现当甲醇-甲酸缓冲溶液的体积比为 8:2 时,辜酮与表辜酮达不到完全分离,随着甲醇比例的减少,辜酮与表辜酮保留时间延迟,分离趋于完全;当甲醇-甲酸缓冲溶液的体积比为 68:32 时,分离结果令人满意。在改变缓冲溶液中的乙酸铵浓度时发现,当乙酸铵浓度为 0.04 mol/L、甲酸含量(体积分数)为 0.1% 时,色谱峰形最差,响应值最低;当乙酸铵浓度为 0.06 mol/L、甲酸含量为 0.2% 时,响应次之;乙酸铵浓度为 0.02 mol/L、甲酸含量为 0.1% 时,峰形最好,响应值最高。在上述优化色谱条件下,样品测定可在 16 min 内完成。

在所建立的 LC-MS/MS 方法中,蒸馏水中不加内标按“1.3”节所述方法提取处理后所得到的总离子流(TIC)谱图见图 2,可看出蒸馏水无杂质干扰。健康人尿样与添加内标后的尿样按“1.3”节所述方法处理后所测得的离子对 m/z 303.2/109.2 的 MRM 色谱图见图 3,可看出空白尿样无内标杂质干扰。空白蒸馏水中添加标准样品(100 ng/mL)后按“1.3”节所述方法处理后所测得的 MRM 色谱图见

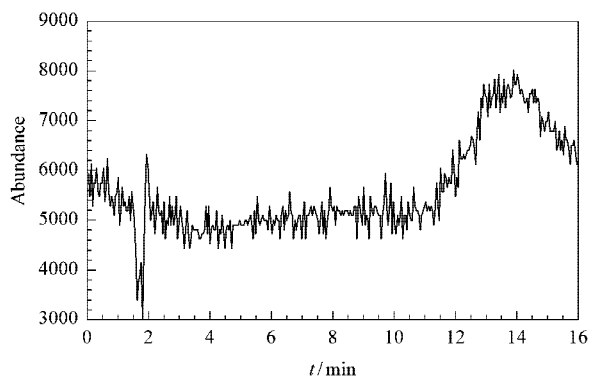


图 2 空白蒸馏水溶剂的总离子流色谱图

Fig. 2 TIC chromatogram of a blank distilled water sample

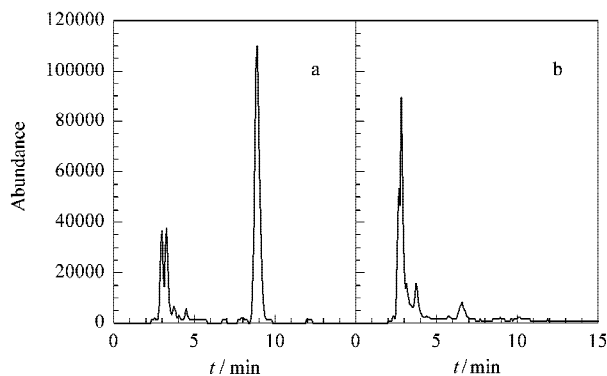


图 3 健康人尿样中离子对 m/z 303.2/109.2 的 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of m/z 303.2/109.2 in a healthy human's urine

a. blank urine with I. S.; b. blank urine.

图 4 ,可以看出辜酮(峰 1)与表辜酮(峰 2)、雄酮(峰 4)与苯胆烷醇酮(峰 5)分离完全。健康人尿样经“ 1. 3 ” 节所述方法处理后得到的 MRM 色谱图见图 5。

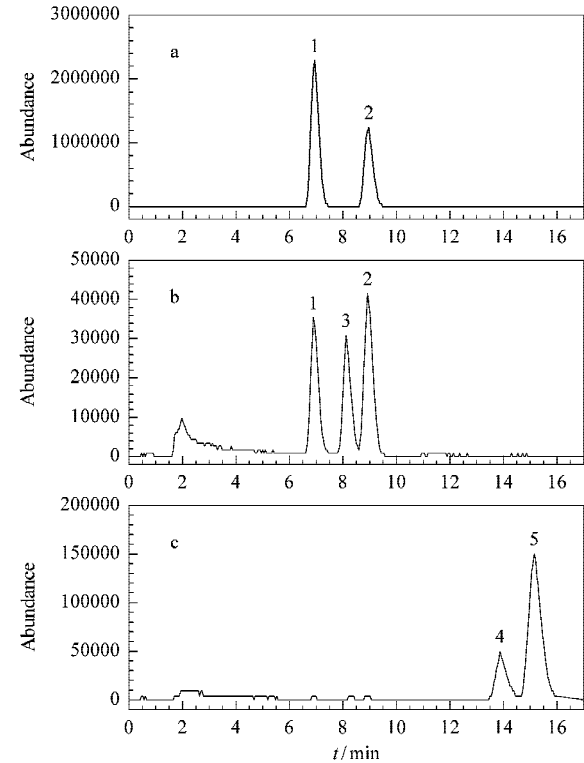


图 4 空白蒸馏水添加类固醇激素的 MRM 色谱图
Fig. 4 MRM chromatograms of a blank distilled water sample spiked with endogenous steroids
a. m/z 289. 2/109. 2 ; b. m/z 289. 3/271. 3 ; c. m/z 291. 2/273. 3.
1. testosterone ; 2. epitestosterone ; 3. DHEA ; 4. etiocholanolone ; 5. androsterone.

2.3 标准曲线和最低检出限

以待测化合物和内标的峰面积比值为纵坐标、待测化合物的标示浓度为横坐标进行线性回归分析 ,得线性回归方程、相关系数、线性范围如表 2 所示。考虑到实际应用时要求线性浓度范围较大 ,故根据LC-MS/MS软件Analyst1.4计算 ,建立了两条

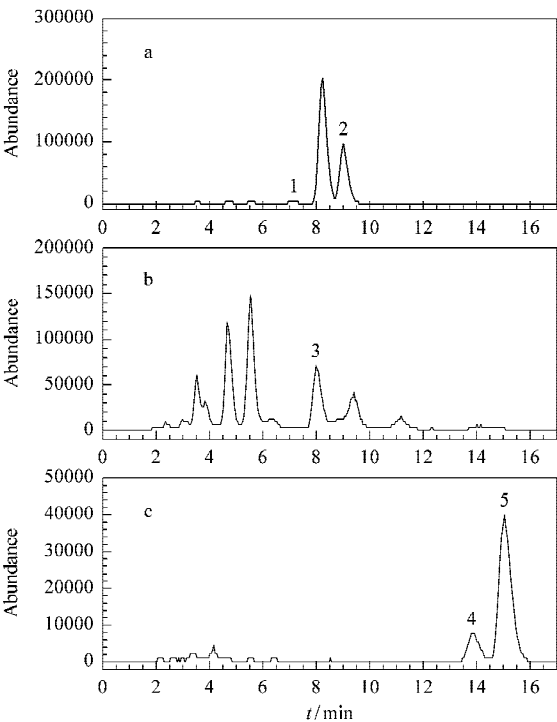


图 5 健康人尿样的 MRM 色谱图
Fig. 5 MRM chromatograms of a healthy human 's urine sample
a. m/z 289. 2/109. 2 ; b. m/z 289. 3/271. 3 ; c. m/z 291. 2/273. 3.
1. testosterone ; 2. epitestosterone ; 3. DHEA ; 4. etiocholanolone ; 5. androsterone.

首尾相互重叠的标准曲线 ,以增加定量的准确性。由表 2 可看出 ,本方法具有良好的线性关系 ,线性相关系数 r^2 值均大于 0. 992。

基质添加不同量的标准样品后按“ 1. 3 ”节所述方法处理后测定 ,以峰强度与噪声比(S/N)大于 3 确定最低检出限(LOD) ,以 S/N 大于 10 确定最低定量限(LOQ) ,结果见表 2。辜酮和表辜酮的 LOD 和 LOQ 明显优于 DHEA、雄酮和苯胆烷醇酮 ,与其有较强丰度的子离子有关。虽然本方法中 DHEA 的 LOD 为 5 ng/mL ,但已满足世界反兴奋剂机构文件的要求^[15]。

表 2 各激素的线性方程、检出限和定量限 Table 2 Statistics of the calibration curves ,LOD and LOQ for endogenous steroids					
Compound	Linear equations ¹⁾	r^2	Linear range/(ng/mL)	LOD ²⁾ /(ng/mL)	LOQ ³⁾ /(ng/mL)
Testosterone	$y = 0. 7719x + 0. 0067$	0. 9960	0. 025 - 0. 5	0. 01	0. 025
	$y = 0. 3879x + 0. 3769$	0. 9920	0. 5 - 50		
Epitestosterone	$y = 0. 3014x + 0. 0057$	0. 9969	0. 025 - 0. 5	0. 01	0. 025
	$y = 0. 2846x + 0. 014$	0. 9966	0. 5 - 50		
DHEA	$y = 0. 0054x + 0. 0746$	0. 9971	10 - 250	5	10
	$y = 0. 0042x + 0. 311$	0. 9996	250 - 5000		
Etiocholanolone	$y = 0. 003x + 0. 0342$	0. 9973	25 - 500	10	25
	$y = 0. 0027x + 0. 154$	0. 9996	500 - 5000		
Androsterone	$y = 0. 0182x + 0. 02$	0. 9973	10 - 250	5	10
	$y = 0. 014x + 1. 3$	0. 9984	250 - 5000		

1) y : peak area ratio of analyte to internal standard ; x : concentration of analyte. 2) $S/N > 3$. 3) $S/N > 10$.

2.4 精密度、准确度与回收率

每个目标物选取低、中、高 3 种浓度的样品,以 3 种浓度样品与对应标准溶液测定结果相比求得回收率,并考察方法的精密度、准确度,结果见表 3。

表 3 方法的精密度(RSD)、准确度以及回收率(n = 5)
Table 3 The precisions (RSD) , accuracies and recoveries (n = 5)

Compound	Added/(ng/mL)	RSD/%		Accuracy/%	Recovery/%
		inter-day	intra-day		
Testosterone	0. 25	0. 01	5. 3	97. 9	91. 8
	25	1. 8	4. 7	91. 8	112. 9
	50	1. 3	4. 2	112. 9	101. 3
Epitestosterone	0. 25	3. 3	9. 2	100. 2	100. 2
	25	3. 5	3. 9	98. 7	93. 2
	50	2. 4	3. 2	93. 2	96. 8
DHEA	200	4. 3	2. 8	109. 4	109. 4
	1000	5. 2	8. 8	92. 2	106. 6
	5000	4. 8	4. 2	106. 6	103. 5
Etiocholanolone	200	6. 1	5. 5	95. 3	98. 9
	1000	5. 6	11. 0	91. 8	105. 1
	5000	4. 4	3. 9	105. 1	98. 3
Androsterone	200	6. 1	7. 4	98. 9	95. 3
	1000	6. 4	7. 9	93. 2	104. 2
	5000	4. 4	8. 8	104. 2	101. 4

2.5 样品测定

应用所建立的方法测定“ 1. 2 ”节所述收集的尿样。以所有受试者尿液中目标化合物的平均浓度对尿液收集时间做代谢曲线,结果见图 6。

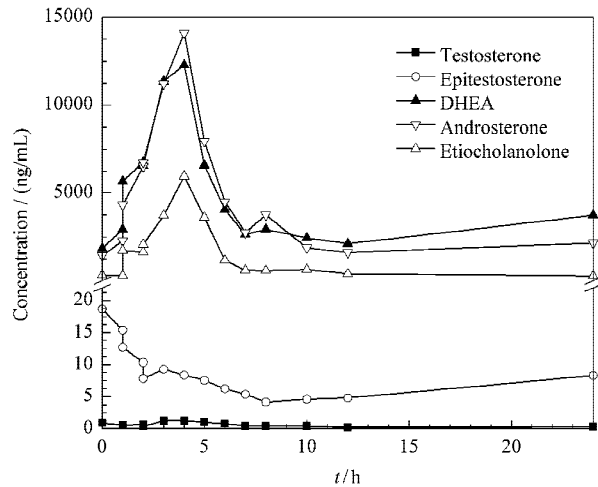


图 6 受试者服用 120 mg DHEA 后内源性类固醇激素的时间-浓度曲线
Fig. 6 Urinary excretion curves of endogenous steroids after oral administration of single dose of 120 mg DHEA

3 结论

本研究工作中所建立的 LC-MS/MS 方法可同时测定尿液中的 5 种内源性类固醇激素,样品前处理简便、省时,液相色谱分离完全,方法专属性强,最低检出限符合世界反兴奋剂机构文件的要求,灵敏度高,精密度好。本方法应用于实际样品测定,可

有效替代 GC-MS 方法应用于 DHEA 等内源性类固醇激素的日常分析工作。

参考文献：

[1] Lu C Y. Conspectus on doping in sport. Shanghai :Shanghai Scientific and Technical Literature Press (卢昌亚. 运动兴奋剂概论. 上海 :上海科学技术出版社), 1999 :101

[2] Corrigan B. Clin J Sport Med , 2002 , 12 : 236

[3] Labrie F , Luu-The V , Bélange A et al. J Endocrinol , 2005 , 87 : 169

[4] Dehennin L , Ferry M , Lafarge P , et al. Steroids 1998 , 63 : 80

[5] WADA Project Team. Reporting and evaluation guidance for testosterone , epitestosterone , T/E ratio and other endogenous steroids. [http : //www. wada-ama. org/rtecontent/ document/end_steroids_aug_04. pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end_steroids_aug_04.pdf)

[6] Daeseleire E , Vandeputte R , Van Peteghem C. Analyst , 1998 , 123 : 2 595

[7] Kintz P , Cirimele V , Sachs H et al. Forensic Sci Int , 1999 , 101 : 209

[8] Griffiths W J , Liu S , Alvelius G , et al. Rapid Commun Mass Spectrom , 2003 , 17 : 924

[9] Yvan G. J Chromatogr B , 1999 , 735 : 189

[10] Baulieu E E , Robel P. Proc Natl Acad Sci USA , 1998 , 95 : 4 089

[11] Thieme D , Sachs H. Anal Chim Acta , 2003 , 492 : 171

[12] Van Poucke C , van de Velde M , Van Peteghem C. J Mass Spectrom , 2005 , 40 : 731

[13] Choi M H , Kim K R , Chung B C , 2000 , 65 : 54

[14] Guan F , Uboh C E , Soma L R , et al. J Chromatogr B , 2005 , 829 : 56

[15] WADA Project Team. Minimum required performance limits for detection of prohibited substance. (2004-01-15). [http : //www. wada-ama. org/rtecontent/ document/perf-limits2. pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/perf-limits2.pdf)