

类固醇兴奋剂分析方法的研究进展

龙媛媛, 王丁众, 李克安, 刘 锋

(北京分子科学国家实验室 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要: 蛋白同化雄性类固醇是一类滥用最为普遍的兴奋剂物质, 对其进行有效的控制和检测关系到运动员的身心健康和体育比赛的公平公正。对类固醇兴奋剂分析方法的改进和发展是目前兴奋剂检测的重要任务。本文主要是对自 2002 年以来类固醇兴奋剂样品的预处理和检测手段的研究进展做一概述, 包括气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱法、免疫法、电化学方法以及质谱法等。

关键词: 类固醇; 反兴奋剂; 分析检测; 样品预处理

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2008)04-0417-07 栏目类别: 兴奋剂检测方法专栏

Research progresses of anabolic steroids analysis in doping control

LONG Yuanyuan, WANG Dingzhong, LI Ke 'an, LIU Feng

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, College of Chemistry and
Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Anabolic steroids, a kind of physiological active substance, are widely abused to improve athletic performance in human sports. They have been forbidden in sports by the International Olympic Committee since 1983. Since then, many researchers have been focusing their attentions on the establishment of reliable detection methods. In this paper, we review the research progresses of different analytical methods for anabolic steroids since 2002, such as gas chromatography-mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry, immunoassay, electrochemistry analysis and mass spectrometry. The developing prospect of anabolic steroids analysis is also discussed.

Key words: anabolic steroids; doping control; analytical detection; sample pretreatment

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。其分子骨架结构是由 3 个六碳环己烷和 1 个五碳环组成的稠合四环。天然类固醇类分子中的六碳环均呈稳定的椅式构象, 唯一的例外是雌激素分子内的一个芳香环为平面构象。类固醇类物质依据其结构性质和生理作用的不同可以分为很多类, 包括固醇(如胆固醇、羊毛固醇、谷甾醇、豆甾醇、麦角甾醇)、胆汁酸和胆汁醇、类固醇激素(如肾上腺皮质激素、雄激素、雌激素)、昆虫的蜕皮激素、强心苷(如毛地黄毒苷)、皂角苷基和蟾蜍毒等。此外还有人工合成的类固醇药物(如抗炎剂、促进蛋白质合成的药物和口服避孕药)等^[1]。

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。其蛋白同化

作用可以增加蛋白质合成, 促进肌肉发达和红细胞生成, 增强力量和耐力, 而雄性激素作用可以使男性特征更加明显。正因为如此, 早在 20 世纪 50 年代, 前苏联举重运动员开始通过服用雄性激素睾酮增加力量^[2]。到 20 世纪 60 年代, 竞技运动员使用类固醇激素的现象已非常普遍, 因而国际奥林匹克委员会(IOC)将这类物质判定为兴奋剂而明令禁止。然而时至今日, 在所有禁用物质当中, 蛋白同化雄性类固醇仍然是滥用最为普遍的物质。有报道称大约 5%~14% 的美国大学体育总会运动员服用过类固醇激素, 而健美运动员滥用类固醇激素的比例高达 30%~75%^[3]。在 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^[4]。类固醇类兴奋剂的滥用严重影响到体育比赛的公平

收稿日期: 2008-01-05

第一作者: 龙媛媛, 博士研究生. E-mail: longyuanmagic@163.com.

通讯联系人: 刘 锋, 教授, 博士生导师. E-mail: liufeng@pku.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20335010).

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,还可能引起严重的肝、肾损伤,并发肝癌、心脏病,并产生药物依赖,少数人还可能出现严重的情感及精神病症^[5]。因此,如何对类固醇激素进行有效的控制和分析检测是人们一直关注的热点问题。

蛋白同化雄性类固醇可分为两大类:一类是人体自身能分泌的,称为内源性激素;另一类是人体自身不能分泌而经人工合成的,称为外源性激素。2008年WADA列出的禁用清单中,指定包括诺龙、甲睾酮、群勃龙等在内的46种物质及其他具有相似化学结构或生物作用的物质为禁用的外源性蛋白同化雄性类固醇^[6]。判断是否使用了外源性类固醇激素比较简单,只要通过可靠的方法在体内查到该物质或其代谢物或标记物即可认定。而判断是否使用了内源性类固醇激素则复杂得多,简单的定性分析是不够的,必须区分它们的来源是自身分泌还是人为摄入,只有人为摄入才能判定其使用了兴奋剂。因此,针对不同类型的类固醇激素,其测定方法存在一定的差异。

类固醇激素在体内的代谢过程非常复杂,因此其大部分需通过其代谢物进行测定,而所检测的样品包括血样、尿样和毛发等均具有复杂的基底干扰。因此一般的分析方法都需要包含色谱分离过程。目前IOC规定的合成类固醇类物质的标准分析方法是采用气相色谱-质谱(GC-MS)方法分析尿样,而液相色谱(LC)-MS方法由于具有更高的灵敏度和特异性也得到了广泛的重视和长足的发展^[7]。此外,利用免疫法及电化学方法对类固醇物质进行定性和定量分析也取得了一定的进展。另一方面,样品预处理过程复杂、耗时长是目前限制各种分析方法发展的主要因素,对样品预处理方法的改进和发展也有很多研究报道。本文总结了2002年以来蛋白同化雄性类固醇兴奋剂样品预处理和分析方法的研究进展。

1 类固醇兴奋剂的GC-MS分析

外源性雄性类固醇种类相对较多,且在体内代谢过程复杂,因而对检测方法的灵敏度和特异性要求较高。目前IOC规定的合成类固醇检测标准主要是采用GC-MS分析尿样,选择特定的特征离子进行监测^[8]。尿样一般先经酶解除去蛋白质等生物大分子,之后经固相萃取或液-液萃取对目标物质进行初步的分离富集,将得到的被分析物进行三甲硅烷化衍生后即可进入毛细管气相色谱分析,常通过四极杆质谱监测特征离子^[9]。这类方法对绝

大多数外源性雄性类固醇能够获得比较可靠的分析结果。然而随着各种新型类固醇激素的出现和兴奋剂禁用清单的扩大,以及对分析速度和效率的要求不断提高,近年来GC-MS方法也在不断地被改进和优化^[10,11]。

Marcos等^[12]利用GC-MS/MS方法对50余种类固醇物质进行了分析,引入的外部电离的离子阱质谱在原有的一级质谱的基础上大大降低了背景干扰,提高了分辨率。选择适当的碎片离子能在提高灵敏度的基础上缩短分析时间,实现在7.4 min内将50余种被测物全部检出,检出限均低于0.5 ng/mL。使用该方法对100余个实际尿样进行测定,得到了比较满意的结果。他们^[13]还将高效液相色谱(HPLC)与GC-MS相结合,样品经过HPLC预分离之后再行衍生化,最后进行GC-MS分析,质谱检测采用全扫描模式。结果表明改进的方法可以大大降低干扰物质的影响,在2 ng/mL的极低浓度下能够得到所有被分析物的全扫描图谱。Huenerbein等^[14]对司坦唑醇等几种类固醇兴奋剂及其代谢物的GC测定条件进行了优化。司坦唑醇本身结构稳定,硅烷衍生化较为困难^[15],因而测定时初始炉温一般较高,为180℃左右,然而在此温度下与其共存的氧雄龙等物质会发生分解^[16]。作者以司坦唑醇被全部衍生化和氧雄龙、克伦特罗等物质的测定灵敏度不受影响为检测原则,考察了初始炉温对测定结果的影响,结果表明初始炉温设定为140℃最为理想。

新型类固醇激素的出现对分析方法的改进和发展提出了进一步要求。一方面需要对其在体内的代谢过程进行深入的了解,以寻找适当的分析标记物^[17,18];另一方面要根据其结构和性质选择适当的分析手段。Catlin等^[19]对新近出现的四氢孕三烯酮(THG)的合成和检测方法进行了研究,分别用LC-MS和GC-MS方法对未衍生化及经硅烷衍生的目标物进行了测定,并通过动物实验证明该物质主要是通过尿样排泄,因此尿样分析可作为可靠的监测手段。Sekera等^[20]考察了脱氧甲基睾酮的发现、制备过程及其尿样分析方法。脱氧甲基睾酮是2007年被列入兴奋剂禁用清单的类固醇激素物质,实验表明通过甲基硅烷化衍生后进行GC-MS分析可以得到较好的测定结果。在类固醇激素分析过程中,一般需要在样品中加入内标物质,以对方法的可靠性进行验证。内标物一般为被分析物的氘代结构类似物。为了满足不同目标物质的测定要求,目前对氘代雄性类固醇物质的合成与表征也有较多研究^[21]。Gärtner等在这一领域做了较多工作。他们

分别合成了五氘代雄甾酮葡萄糖苷^[22]、五氘代司坦唑醇^[23]及氘代雄甾酮^[24],并将其用作 GC-MS 分析尿样时的内标物质,均得到了满意的测定结果。

毛发样品分析在司法鉴定中已经占据了相当的地位,但是目前还未被世界反兴奋剂机构所采用。由于绝大多数药物均可随着血液循环在角蛋白中累积,且与尿样和血样相比,毛发样品更为稳定,可以反映长期服药效果,因此目前对于毛发样品中类固醇类兴奋剂物质的分析也有较多报道。分析方法一般是采用强酸或强碱溶解毛发样品,之后经固相萃取或液-液萃取,萃取产物经过三甲基硅烷化衍生后通过 GC-MS/MS 分析^[25]。然而,研究表明不同人种的毛发对药物的结合能力有较大的差异,同时,使用化妆品、染发等因素亦会对分析结果产生影响,因此毛发分析只能作为尿样分析的补充,而不能完全代替尿样或血样分析^[26]。一般对于长期服用类固醇激素的情况,如一些健美运动员,通过对毛发样品的分析可以更准确地反映其对类固醇兴奋剂反复多次的摄入情况,获得尿样和血样分析无法提供的信息^[27]。

对外源性类固醇激素的分析目前已经较为成熟,兴奋剂使用也转入了更隐蔽、更难以检测的内源性兴奋剂的阶段。对外源性兴奋剂,在体内一经查出即可判定为阳性。而内源性兴奋剂则需要“通过可靠的分析方法表明检测到的禁用物质属于外源性来源”^[6]。目前一般利用同位素比质谱的方法对人体自身生成与外源引入的物质加以区分。同一来源的物质其¹³C与¹²C同位素比值(¹³C/¹²C)是相同的,类固醇激素商业产品通常单一来源于大豆等植物中提取的植物甾醇,其¹³C/¹²C值较低。而人体自身产生的类固醇激素的¹³C含量则反映了食用的动物和植物分子¹³C同位素的累积及在人体内的代谢,其¹³C/¹²C值较高。因而通过同位素比质谱法测定人体内类固醇激素的¹³C/¹²C,即可确定其来源^[3,28]。

2 类固醇兴奋剂的 LC-MS 分析

与 GC 相比,HPLC 一般在室温条件下工作,能分离沸点高、热稳定性差、摩尔质量大的物质,比较适合分析生物和医药学上的大分子物质,如蛋白质、核酸等。对于类固醇兴奋剂的分析检测,由于经常采用尿液、血液等含有复杂基质的物质,因此用 HPLC 法进行分离是定量检测的前提。由于 HPLC 分离能力强而定性和定量检测能力有限,一般串联定性、定量和结构分析能力更强的 MS 检测器。LC-MS 已成为类固醇兴奋剂分析的重要手段,它很好地弥补了常用的 GC-MS 方法的不足,可用于检测

一些浓度低、代谢快的类固醇,如司坦唑醇^[15],甚至可作为评价其他分析方法优劣的标准^[29]。但兴奋剂滥用日趋严重,因而对目前检测方法的改进和对新的分析方法的发展仍然是研究的热点。

兴奋剂种类繁多,根据世界反兴奋剂条例 2008 年禁用清单,大体上可分为蛋白同化制剂、肽类激素和相关物质、 β_2 -激动剂、荷尔蒙拮抗剂以及调节剂等几类。不同兴奋剂之间都有或多或少的异同,因此同时测定多种兴奋剂非常困难。目前,科学工作者正在努力对某一类^[28]或几类^[30]具有共同基团的兴奋剂进行测定研究。Mazzarino 等^[31]研究了同时检测糖皮质激素、 β_2 -激动剂(福莫特罗、莫达非尼、美索卡)、抗雌激素(非那雄胺、依西美坦、阿那曲唑、来曲唑、福美坦)、蛋白同化雄性类固醇(司坦唑醇、孕三烯酮、四氢孕三烯酮)的方法。这些兴奋剂可以经 β -葡萄糖苷酸酶分解后在碱性环境下用液-液萃取预处理,然后用 LC-MS/MS 在阳离子模式的电喷雾离子化和多重反应监测模式下进行分析,结果显示糖皮质激素、抗雌激素和类固醇的检出限可以达到 1 ~ 30 ng/mL,激动剂的检出限可以达到 100 ~ 200 ng/mL,且所有的被分析化合物的保留时间和相对丰度都有良好的重现性。该方法的突出优点是分析时间短,LC-MS/MS 过程只需 7 min,费用也比传统的 LC-MS/MS 方法低,较适用于常规兴奋剂的检测。

对于某些常见兴奋剂分析方法的改进和发展也是研究的重点。例如 WADA 在 2004 年的统计中指出:已检测出的兴奋剂中 36% 是与代谢相关的制剂,其中 24% 是诺龙。因此研究特定兴奋剂的快速、高灵敏度的分析方法也是非常必要的。Tai 等^[32]用同位素稀释液相色谱-串联质谱检测人尿液中的 19-去甲雄酮(19-NA)。19-NA 是诺龙的主要代谢物,分别以葡萄糖苷酸复合物、硫酸盐和单体等形式存在于人尿液中,其中以第一种为主。他们将 19-NA 葡萄糖苷酸复合物用酶处理后加入氘代 19-NA 作为内标,经液-液萃取后用反相 LC-MS/MS 测定,分析结果显示该方法具有良好的抗干扰能力、精确度和重现性,测得的 19-NA 葡萄糖苷酸复合物水解为 19-NA 的产率也与理论计算值相近。对单一兴奋剂的检测方法研究也为同时检测多种兴奋剂提供了技术支持。Friedrich 等^[33]研究出一种用皮质酮为内标分析人体肝细胞中 6 β -羟基睾酮的反相高效液相色谱(RP-HPLC)方法。该方法首先用预处理柱进行在线样品富集,依次用甲醇、四氢呋喃和水反向冲洗进行梯度分离,然后经常压化学电离(APCI)进入串联质谱,采用选择反应监测模式得到检

测结果。该方法通过更改在线分离富集条件即可用于定量分析一系列生物活性物质,包括血浆、尿液和组织中的外源性类固醇兴奋剂。

液相色谱-质谱联用能够迅速发展的关键是软离子化技术的实现。常用的有电喷雾离子化(ESI)^[30,31,34-41]、APCI^[33,39,42]、常压光致电离(APPI)、基质辅助激光解吸离子化(MALDI)等。Leinonen等^[43]分别对ESI、APCI和APPI这3种离子化技术用于LC-MS/MS分析尿样中代谢类固醇的实验条件进行了优化,并从特异性和检出限两方面进行了比较。结果显示这3种离子化技术均满足常规分析要求,其中LC/ESI-MS/MS在最优条件下检出限可达0.4~4 ng/mL,低于用APCI和APPI得到的7 ng/mL,适用性最佳。

应用LC-MS分析的样品多数是尿样,其易于获取且含有大部分人体代谢产物、液体形态易于保存和预处理。然而尿液本身成分复杂,分析结果受内源性物质和结构类似物质干扰较大,因此目前也有对血液^[44]、粪便^[39]、毛发等其他样品的分析研究。Nielen等^[38]研究了分析牛毛中未遭破坏的17 β -睾酮和17 β -勃地酮十一碳烯酸酯的方法。该方法只需200 mg粉碎的牛毛样品,用三(2-羰基乙基)膦酸盐(TCEP)在温和条件下消化,取样注射进入LC-MS/MS分析系统,用同位素稀释法得到该方法的检出限为2~5 ng/g,精确度为97%~105%。在此基础上他们对LC-MS/MS方法进行了改进,利用串联四极杆质谱的多重反应监测功能同时分析多种类固醇化合物,每种被分析物至少经历了两次MS/MS转换,而无需二次注射,这种分离检测模式具有高灵敏度、高选择性和稳定性强等特点。

由于利益驱使,人工合成的新型兴奋剂不断出现,用以逃避常规的兴奋剂筛查,这给体育比赛公平竞争带来了很大的挑战。因此,预测未知兴奋剂的存在并发展相应的分析方法,已成为目前兴奋剂分析检测研究的重要任务。传统的方法是找到其制备过程,测定生物活性,同时用核磁(NMR)和质谱确定结构,再发展出分析方法。这个过程耗时较长,并不实用。鉴于此,Nielen等^[41]发展了通过同时研究激素生物活性和鉴定质谱结构来分析尿液中微量类固醇的方法:样品通过酶解和固相萃取,经梯度液相色谱分别进入两个同样的96-阱碎片收集器;一部分样品直接进行生物活性测定,另一部分根据测定的结果来确定下一步的工作。在测定结果中若有生物活性,则将其注入高分辨的反相LC,用精确的电喷雾四极杆飞行时间质谱进行分析,确定化合物结构。这种方法有效地补充了目前已有的含已知目标

代谢物尿样的分析方法,能够提高未知的人工合成类固醇兴奋剂的检出率。

用LC-MS/MS方法分析尿样可以简化繁琐的衍生化步骤,一定程度上避免了直接测定成对的代谢类固醇,但具有类似结构的内源性化合物会干扰测定,降低结果的可靠性。Pozo等^[40]研究了用MS/MS转换来消除这些干扰。他们通过选择特殊的前驱离子以彻底消除干扰,如采用[M+H+MeOH]⁺为前驱离子可以有效地提高检测1-睾酮、5 β -雄-1-烯-17 β -醇-3-酮以及氧雄龙的选择性。他们还发展了一种利用前驱离子谱鉴别内源性干扰中是否含有类固醇或皮质类固醇结构的方法,有可能用于预测样品中是否存在未知人工合成类固醇。

LC-MS技术,尤其是近年来广泛应用的LC-MS/MS技术,综合了LC强大的分离能力和质谱强大的定性定量分析能力,以其高灵敏度、高特异性、高通量以及预处理简单等优越性在兴奋剂分析检测中占有重要地位。LC-MS的广泛应用使得许多无法或很难用GC-MS分析的兴奋剂得到了很好的检测。目前LC-MS的发展集中体现在缩短分析时间、提高液相色谱分辨率、提高信噪比、达到更低的检出限和更高的检测通量^[45]。新发展的LC-MS方法要成为WADA认定的兴奋剂检测方法,关键在于制定合适的测定标准,而目前只有小分子质量的兴奋剂具有比较成熟的测定标准,因此建立统一的LC-MS方法测定标准具有重要的意义。

3 类固醇兴奋剂的其他分析方法

GC-MS和LC-MS是目前类固醇兴奋剂分析的主流方法,但这些方法由于涉及色谱分离过程而相对耗时较长,且对样品的预处理有较高的要求。目前也有许多采用其他方法(如免疫法、电化学方法以及质谱法等)分析类固醇物质的文献报道。这些方法的发展为实现类固醇兴奋剂快速、高灵敏度和高特异性的测定提供了可能。

考虑到实际需要,检测类固醇类兴奋剂的方法要具备快速、简单、检测费用低,以及能够满足生物样品用量较少等测定要求。免疫法由于利用抗原与抗体的特异性免疫反应,能够达到较高的灵敏度和特异性。目前该法应用于类固醇类兴奋剂分析已有一些报道。

免疫法中最常见的是酶联免疫吸附法(ELISA),相对于GC-MS和LC-MS,ELISA方法的研究还处于起步阶段,目前集中于对睾酮及其代谢产物的分析^[46]。睾酮是最常见的一种内源性兴奋剂,其代谢产物主要有脱氢睾酮和甲基脱氢睾酮等,

对这些化合物分析方法的研究有助于确立通用的研究思路,建立普适的分析方法。Kramer等^[47]将脱氢勃地酮半抗原和甲基脱氢勃地酮半抗原与匙孔虫凝血蛋白(KLH)偶联,通过腹部注射免疫小鼠和兔子,产生相应的单克隆和多克隆抗体。利用ELISA方法测定 17β -脱氢勃地酮和甲基脱氢勃地酮,检出限分别达到0.13 mg/L和0.54 mg/L,能够满足加标尿样的测定要求。Salvador等^[48]制备了THG的多克隆抗体,与牛血清白蛋白(BSA)偶联后建立了对THG的竞争性ELISA方法,在缓冲溶液中检出限可以达到 $(0.045 \pm 0.015) \mu\text{g/L}$,对经过简单预处理的实际尿样检出限可达到 $(0.25 \pm 0.14) \mu\text{g/L}$ 。该方法的样品预处理简单,无需萃取和水解,盲样分析结果表明具有较好的精确度。Hungerford等^[49]发展了一种通用的ELISA方法用于分析尿样中 17α -烷基合成类固醇的代谢物,并对摄入司坦唑醇的马进行尿样分析,测定结果与用标准LC-MS方法一致,可以用于对已知兴奋剂进行初步筛查。

除了ELISA方法,各种免疫传感器也陆续得到应用。Lu等^[50]研制出一种检测尿样中的勃地酮和甲基勃地酮的电化学免疫传感器。免疫传感器以计时安培分析法为基础,将勃地酮-BSA固定于电极表面,根据游离的被分析物和固定于电极表面的分子与相应抗体的竞争性结合进行检测。尿样经简单的稀释后无需萃取和水解即可直接测定。由于勃地酮与其抗体之间具有高的交叉反应性,因此该方法能有效地同时测定勃地酮及其主要代谢物。用免疫方法检测其他兴奋剂或兴奋剂代谢物的研究也有一些报道,如Kreuzer等^[51]报道了一种基于定量生物传感器原理检测类固醇残余物(以司坦唑醇为例)的局部表面等离子(localised surface plasmons, LSPs)方法。该方法免于标记,具有较高的特异性,且与原理类似的表面等离子体共振(SPR)方法相比较,具有仪器结构简单、花费低等优势。

电化学方法因其不需要复杂的样品预处理和衍生过程而在环境、医药监测等方面发挥重要的作用,但由于其检测通量不高,因而目前在兴奋剂检测领域还没有得到广泛的应用,只是针对一些特定的具有电活性的物质发展出相应的电化学分析方法^[52]。Goyal等^[53,54]利用循环伏安法、示差脉冲伏安法和方波伏安法构建了对诺龙的电化学分析方法。他们使用金纳米颗粒修饰的镉锡氧化物电极^[54],在示差脉冲伏安法下得到的线性范围为 $50 \text{ nmol/L} \sim 1.5 \mu\text{mol/L}$,检出限为 $1.36 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$;使用富勒烯修饰电极研究了诺龙的电化学行为^[53],结果表明修

饰电极与裸玻碳电极相比,对诺龙表现出更好的催化活性,利用方波伏安法得到的线性范围为 $0.1 \text{ nmol/L} \sim 50 \mu\text{mol/L}$,检出限为 0.42 nmol/L 。上述两种方法均用于对人血清中和尿液中诺龙的测定,与GC-MS测定结果有很好的 consistency。

质谱方法是目前类固醇兴奋剂检测中通用的结构鉴定及定量测定手段。通常GC或LC与MS联用,由于涉及色谱分离过程而需要耗费大量的分析时间,因此单纯利用MS本身的分离能力进行测定具有诱人的发展前景。Kosanam等^[55]验证了真空基质辅助激光解吸离子化(vacuum matrix-assisted laser desorption ionization, vMALDI)结合线性离子阱质谱可以作为一种快速、高通量筛查兴奋剂的手段。他们考察了3种基质溶液,最终选择了在较低的质量范围($m/z 100 \sim 700$)内没有干扰峰的四(五氟苯基)吡啶(F20TPP)作为基质溶液,对加标尿样中5种雄性类固醇激素进行定性和定量测定,检出限和线性范围分别为 0.03 ng/mL 和 $0.1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ 。这种方法不采用色谱分离即可得到比较好的检出限和线性范围,因而可作为一种快速有效的粗筛方法。

4 类固醇兴奋剂的样品预处理方法

具有复杂基底的人血清样品、尿样及毛发样品在进行GC-MS或LC-MS分析之前均需要进行预处理,以除去蛋白质、无机盐等干扰物质,同时对被分析物进行富集浓缩。目前一般的预处理方式是首先酶解除去蛋白质等生物大分子,之后通过固相萃取(SPE)或液-液萃取对目标物进行富集,特别是对于GC-MS分析方法还需要在进入气相色谱前对目标物进行衍生化。这一样品预处理过程对于绝大多数类固醇兴奋剂均能获得较好的分析结果,但耗时较长,过程复杂,已成为限制快速高通量的兴奋剂分析方法发展的因素之一。因此对于样品预处理过程的改进有较多的文献报道。

基于低成本的多孔性聚丙烯纤维而进行的液相微萃取(LPME)是一种较新的样品预处理方法,目前多应用于药物分析与环境监测方面,能够与多种分析测试技术如毛细管电泳(CE)、GC、LC、GC-MS以及LC-MS联用^[56]。与传统的萃取方法相比较,液相微萃取方法具有富集倍数高、杂质干扰小、操作简单、成本低、使用有机溶剂的量少及方法适用范围广等特点,适用于复杂基底样品中类固醇兴奋剂的分离富集。Kuuranne和Rasmussen等^[57]发展了一种快速、直接的LPME方法,用于分离富集尿样中葡萄糖苷化的类固醇,并与LC-MS/MS方法结合

进行类固醇兴奋剂的定量测定。Leinonen 等^[58]利用两相 LPME 萃取尿液中游离态的合成代谢类固醇,考察了不同的有机溶剂、萃取时间、盐析程度及温度对萃取过程的影响,发展出在纤维上同时对类固醇进行萃取和衍生化的预处理方法。样品经处理可直接进行 GC-MS 分析,与常规液-液萃取方法所得结果一致。

我们课题组在内源性类固醇兴奋剂睾酮的样品预处理方面做了一些工作。采用分子印迹技术制备了一系列对睾酮具有特异性识别作用的硅胶或聚合物材料。以离子液为溶剂和致孔剂,采用纳米浇铸和牺牲空间印迹技术制备了新型的具有介孔结构的睾酮印迹硅胶^[59]。通过在硅胶微球表面共价接枝偶氮类引发剂^[60],再利用紫外光引发聚合得到睾酮印迹的接枝型分子印迹聚合物薄膜。对上述材料性能的研究表明,合成的分子印迹材料对睾酮表现出较高的特异性识别能力,且具有结合位点易接近、传质速度快等优点,有望用作固相萃取填料、液相色谱固定相或传感器的敏感材料。

我们还利用双水相体系发展了对尿样中的睾酮和表睾酮分离富集的新方法。双水相萃取体系与传统的固相萃取或液-液萃取体系相比,具有操作简便、条件温和、高效、环保等优点,可作为一种简便、高效、环保的样品预处理手段。我们分别将离子液[C₄mim]Cl-盐-水^[61](其中[C₄mim]代表 1-(正)丁基-3-甲基咪唑正一价离子)和异丙醇-盐-水这两种双水相^[62]体系用于内源性类固醇类兴奋剂的富集分离,研究了双水相体系的分相机理,探讨了睾酮、表睾酮和甲睾酮在双水相体系中的分配行为及其影响因素。研究表明,双水相体系可作为实际尿样中睾酮、表睾酮预富集分离的手段,克服了现有方法步骤较多和使用有害有机溶剂等缺点,具有简便、快速、萃取率高和环保等优点,与 RP-HPLC 方法结合,能用于实际尿液中睾酮和表睾酮的同时测定。

5 总结与展望

综上所述,雄性类固醇激素作为滥用最为广泛的一类兴奋剂,目前对其进行分析和测定的方法多种多样,但从满足快速、高通量的实用性角度来看,GC-MS 和 LC-MS 仍然是最普遍和通用的方法。两种方法均能够得到较高的测量精度,易于实现标准化,但均需要复杂耗时的样品预处理过程,测定灵敏度也受限于配套的检测器,因此对仪器设备要求较高。其中 GC-MS 能够在一次测定中得到几十种类固醇物质的信息,并且 GC 的分辨率优于 LC,因此 GC-MS 方法应用得更多。而 LC-MS 方法不需要对

样品进行衍生化,且测定灵敏度高,适合于分析一些浓度低、代谢快的物质。因此两种方法互为补充,在兴奋剂检测领域均发挥着重要作用,也是目前人们研究的热点。

同时,为了简化分析步骤,提高测定灵敏度和特异性,人们提出和发展了很多其他方法,包括免疫法、电化学方法以及质谱法等,这些方法的共同特点是样品不需要经过复杂的预处理过程,缩短了分析时间。但方法的样品通量还不能满足大量测定的需要,因此未能获得广泛应用。在实际测定中可将其与 GC-MS 或 LC-MS 方法相结合,实现从粗筛到定量的快速、准确测定。

随着兴奋剂检测方法的不断改进和发展,某些运动员使用兴奋剂的手段也更加隐蔽和复杂,从而给准确、快速的筛查带来一定困难。为了满足兴奋剂检测的要求,发展在线样品预处理、高通量、高灵敏度的分析方法是未来几年的必然趋势。而对现有复杂、繁琐、耗时长的样品预处理方法的改进以及新型的快速、高效、环保的样品预处理体系的发展也具有重要的实际意义。

参考文献:

- [1] Makin H L J, Gower D B, Kirk D N. Steroid analysis. London: Blackie Academic and Professional, 1995
- [2] Todd T. J Sport Hist, 1987, 14: 87
- [3] Wa C L, Wu M T, Zhang C J. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (哇春玲, 吴俸天, 张长久. 质谱学报), 2000, 21: 73
- [4] Tsivou M, Kioukia-fougia N, Lyris E, et al. Anal Chim Acta, 2006, 555: 1
- [5] Wang S, Chang W B. University Chemistry (王杉, 常文保. 大学化学), 2003, 18: 35
- [6] World Anti-Doping Agency. The 2008 prohibited list. (2007-09-22). http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2008_List_En.pdf
- [7] Shimada K, Mitamura K, Higashi T. J Chromatogr A, 2001, 935: 141
- [8] World Anti-Doping Agency. International standard for testing. (2003-06). http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/testing_v3_a.pdf
- [9] Maurer H H. Ther Drug Monit, 2002, 24: 247
- [10] Marques M A, Pereira H M, Neto F R. J Brazil Chem Soc, 2006, 17: 382
- [11] Van Thuyne W, Van Eenoo P, Mikulčíková P, et al. Biomed Chromatogr, 2005, 19: 689
- [12] Marcos J, Pascual J A, Torre X, et al. J Mass Spectrom, 2002, 37: 1 059
- [13] Marcos J, Torre X, Gonzalez J C, et al. Anal Chim Acta, 2004, 522: 79
- [14] Huenerbein A, Marques M A, Pereira A D, et al. J Chromatogr A, 2003, 985: 375
- [15] Poelmans S, de Wasch K, de Brabander H F, et al. Anal Chim Acta, 2002, 473: 39

- [16] Mateus-avois L , Mangin P , Saugy M . *J Chromatogr B* , 2005 , 816 : 193
- [17] Ho E N M , Leung D K K , Leung G N W , et al . *Anal Chim Acta* , 2007 , 596 : 149
- [18] Levesque J F , Gaudreault M , Aubin Y , et al . *Steroids* , 2005 , 70 : 305
- [19] Catlin D H , Sekera M H , Ahrens B D , et al . *Rapid Commun Mass Sp* , 2004 , 18 : 1 245
- [20] Sekera M H , Ahrens B D , Chang Y C , et al . *Rapid Commun Mass Sp* , 2005 , 19 : 781
- [21] Parr M K , Zapp J , Becker M , et al . *Steroids* , 2007 , 72 : 545
- [22] Gärtner P , Novak C , Einzinger C , et al . *Steroids* , 2003 , 68 : 85
- [23] Felzmann W , Gmeiner G , Gärtner P . *Steroids* , 2005 , 70 : 103
- [24] Gaertner P , Bica K , Felzmann W , et al . *Steroids* , 2007 , 72 : 429
- [25] Gambelungho C , Rossi R , Ferranti C , et al . *J Appl Toxicol* , 2005 , 25 : 205
- [26] Gambelungho C , Somnavilla M , Ferranti C , et al . *Biomed Chromatogr* , 2007 , 21 : 369
- [27] Dumestre-Toulet V , Cirimele V , Ludes B , et al . *J Forensic Sci* , 2002 , 47 : 211
- [28] Rivier L . *Chimia* , 2002 , 56 : 84
- [29] Liu L Q , Peng C F , Jin Z Y , et al . *Biomed Chromatogr* , 2007 , 21 : 861
- [30] Ho E N M , Leung D K K , Wan T S M , et al . *J Chromatogr A* , 2006 , 1 120 : 38
- [31] Mazzarino M , Botrè F . *Rapid Commun Mass Sp* , 2006 , 20 : 3 465
- [32] Tai S S , Xu B , Sniegowski L T , et al . *Anal Chem* , 2006 , 78 : 3 393
- [33] Friedrich G , Rose T , Rissler K . *J Chromatogr B* , 2003 , 784 : 49
- [34] Deventer K , Van Eenoo P , Delbeke F T . *Biomed Chromatogr* , 2006 , 20 : 429
- [35] Pu F , Mckinney A R , Stenhouse A M , et al . *J Chromatogr B* , 2004 , 813 : 241
- [36] Mckinney A R , Suann C J , Dunstan A J , et al . *J Chromatogr B* , 2004 , 811 : 75
- [37] Chang Y C , Li C M , Li L A , et al . *Analyst* , 2003 , 128 : 363
- [38] Nielen M W , Lasaroms J J , Mulder P P , et al . *J Chromatogr B* , 2006 , 830 : 126
- [39] Sangiorgi E , Polignano V , Gardini S . *Anal Chim Acta* , 2005 , 529 : 239
- [40] Pozo O J , Deventer K , Van Eenoo P , et al . *Rapid Commun Mass Sp* , 2007 , 21 : 2 785
- [41] Nielen M W F , Bovee T F H , van Engelen M M , et al . *Anal Chem* , 2006 , 78 : 424
- [42] Draisci R , Palleschi L , Ferretti E , et al . *J Chromatogr B* , 2003 , 789 : 219
- [43] Leinonen A , Kuuranne T , Kostiaainen R . *J Mass Spectrom* , 2002 , 37 : 693
- [44] Soma L R , Uboh C E , Guan F , et al . *J Vet Pharmacol Ther* , 2007 , 30 : 101
- [45] Thevis M , Schänzer W . *Anal Bioanal Chem* , 2007 , 388 : 1 351
- [46] Lu H H , Conneely G , Crowe M A , et al . *Anal Chim Acta* , 2006 , 570 : 116
- [47] Kramer K , Hubauer A , Lausterer R , et al . *Anal Lett* , 2007 , 40 : 1 461
- [48] Salvador J P , Sanchez-Baeza F , Marco M P . *Anal Chem* , 2007 , 79 : 3 734
- [49] Hungerford N L , Sortais B , Smart C G , et al . *J Steroid Biochem* , 2005 , 96 : 317
- [50] Lu H H , Conneely G , Pravda M , et al . *Steroids* , 2006 , 71 : 760
- [51] Kreuzer M P , Quidant R , Badenes G , et al . *Biosens Bioelectron* , 2006 , 21 : 1 345
- [52] Al-Omar M , Al-Majed A , Sultan M , et al . *J Pharm Biomed Anal* , 2005 , 37 : 199
- [53] Goyal R N , Gupta V K , Bachheti N . *Anal Chim Acta* , 2007 , 597 : 82
- [54] Goyal R N , Oyama M , Tyagi A , et al . *Talanta* , 2007 , 72 : 140
- [55] Kosanam H , Sai Prakash P K , Yates C R , et al . *Anal Chem* , 2007 , 79 : 6 020
- [56] Rasmussen K E , Pedersen-Bjergaard S , Krogh M , et al . *J Chromatogr A* , 2000 , 873 : 3
- [57] Kuuranne T , Kotiaho T , Pedersen-Bjergaard S , et al . *J Mass Spectrom* , 2003 , 38 : 16
- [58] Leinonen A , Vuorensola K , Lepola L M , et al . *Anal Chim Acta* , 2006 , 559 : 166
- [59] He C Y , Long Y Y , Pan J L , et al . *Talanta* , 2008 , 74 : 1 126
- [60] He C Y , Liu F , Li K A , et al . *Anal Lett* , 2006 , 39 : 275
- [61] He C Y , Li S H , Liu H W , et al . *J Chromatogr A* , 2005 , 1 082 : 143
- [62] Liu H L , He C Y , Wen D W , et al . *Anal Chim Acta* , 2006 , 557 : 329