应用简报

法医学

使用氢气载气在 10 分钟内完成尿液中类固醇的 GC/MS/MS 分析

作者

Wim Van Gansbeke，
Aðalheiður Dóra Albertsdóttir，
Michaël Polet 和
Peter Van Eenoo
DoCoLab
根特大学
比利时根特

Remko van Loon 和
Anastasia Andrianova
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究开发并验证了一种 GC/MS/MS 方法，采用氢气 (H_2) 作为载气，用于定量分析尿液中的 14 种内源性合成类固醇。该方法成功将分析时间缩短至 10 分钟以内，与传统氦气 (He) 载气方法的 17 分钟分析时间相比，节省了 40% 的时间。该方法在更宽的浓度范围内表现出出色的校准性能，满足世界反兴奋剂机构 (WADA) 规定的鉴定限 (LOIs) 要求。验证结果表明，所有分析样品的 z 分数均小于 1，表明该方法具有非常高的准确度。这种稳定、高效的方法能够可靠地定量检测尿液中的内源性合成类固醇，同时为应对全球氦气短缺和成本上涨问题，提供了一种可行、环保且可持续的替代方案。

前言

合成代谢雄激素类固醇 (AAS) 是一类与睾酮密切相关的类固醇激素。睾酮是人体自然分泌的一种类固醇激素，主要以葡萄糖醛酸或硫酸盐结合物的形式排出体外。AAS 具有双重作用，即雄性化效应和合成代谢效应，前者与男性化特征及男性气质发育相关，后者与蛋白质合成和肌肉生长相关。尽管关于 AAS 的功效和潜在风险的争议不断，但在力量型运动中使用 AAS 增强肌肉质量，在耐力型运动中使用 AAS 加快身体恢复的现象十分普遍。此外，多种间接手段也能提升睾酮水平，与直接使用类固醇的效果相似，这使得兴奋剂检测和监管工作变得更加复杂。

由于 AAS 检测必须严格遵循 WADA 的各项规定，进一步增加了检测复杂性。为了维持 WADA 认证资质，反兴奋剂实验室必须确保检测方法具有出色的灵敏度、选择性和重现性，同时还要能够对内源性类固醇进行定量分析。这意味着，对于内源性类固醇，需要能在较宽的浓度范围（ng/mL 至 µg/mL）内对 AAS 进行准确定量。对于外源性类固醇，由于零容忍政策，实验室必须达到与 WADA 规定的最低性能要求限值 (MRPLs) 相当的极低检出限 (LODs)[1]。

外源性 AAS 并非天然存在于人体中。由于对外源性 AAS 实行零容忍政策，因此，只要检测到外源性 AAS 即构成兴奋剂违规，无需再进行定量分析。针对这些化合物，WADA 规定了 MRPL，即实验室在常规检测中必须能够检测到的尿液中该物质的最低浓度。LOD 应低于该浓度值的一半。

内源性 AAS 则天然存在于男性和女性的体液中。然而，在一些国家/地区，某些内源性 AAS（例如睾酮和 DHEA）也可作为药物使用或作为“食品补充剂”销售。尽管这些药物和补充剂同样被 WADA 列为禁用物质，但由于人体本身存在内源性 AAS，这些物质的违规使用检测变得更加困难。因此，WADA 通过运动员个人类固醇生物护照来长期追踪 AAS 浓度和比率变化，以此来判断是否存在可能的滥用行为。如果检测到某些数值相对于长期平均值出现明显波动，则需要对样品进行同位素比质谱 (IRMS) 分析，以明确类固醇的合成来源。此外，检测血液中的类固醇酯也可作为 IRMS 分析的替代方案。

针对外源性和内源性类固醇，反兴奋剂实验室首先采用初步检测程序 (ITPs) 筛查可疑结果，随后通过确证方法 (CP) 对可疑结果进行确认。反兴奋剂实验室的样品分析流程可概括为以下几个步骤：

1. 匿名（已编码）样品送达实验室（分为 A 样品和 B 样品）。打开 A 样品并从中取出一部分。B 样品保持密封，并立即置于冰箱中保存
2. 使用来自 A 样品的部分试样进行样品萃取。萃取完成后，将样品进样至 GC/Q-TOF 系统进行分析。更多详细信息可参阅之前的应用简报[2]。使用该系统完成内源性 AAS 的定量分析，并将结果报告给相关机构
3. 负责样品采集的机构将数据录入 WADA 数据库，将样品编码与运动员个人关联起来。接下来，将最新检测结果与该运动员之前的兴奋剂检测结果进行比较评估。如果通过 ITP 获得的结果超出预期范围，相关机构会通知实验室，要求对最初报告的结果进行确认
4. 在确认过程中，实验室会使用本应用简报中所述的方法对来自 A 样品的另一部分试样进行分析
5. 如果第二次分析的分析结果与 ITP 的结果一致，通常会对 A 样品进行 IRMS 分析，以确定所涉及的 AAS 是天然存在的还是来自药品
6. 如果运动员对 IRMS 的阳性结果有异议，可以要求重新检测未开封的 B 样品

我们之前的应用简报介绍了一种用于 ITP 的多目标物 GC/Q-TOF 方法[2]。本研究中新开发的氢气 (H_2) 方法用于 ITP 结果确认。

三重四极杆 GC/MS/MS[3] 和高分辨 GC/Q-TOF[4] 是分析领域的关键技术，尤其在 AAS 定量分析以及 LC/MS 技术通常无法实现的立体异构体的分离方面表现出色。传统上，氦气 (He) 因其优异的性能一直是 GC/MS 分析的首选载气。然而，由于全球氦气频繁短缺，促使实验室迫切需要寻找可行的替代方案，以确保检测工作的连续性和结果的可靠性。

与氦气相比，使用氢气作为 GC/MS 载气具有多种优势。首先，氢气比氦气更容易获得，价格也更便宜。其次，氢气还可以通过绿色电力电解水的方式可持续地生产，因此是一种更环保的选择。此外，氢气在使用过程中能够保持电子电离 (EI) 离子源的清洁，从而减少维护需求，延长仪器正常运行时间，提高实验室生产力。

本研究开发并验证了一种 GC/MS/MS 方法，该方法采用电子电离技术并以氢气作为载气，能够高效、可靠地检测尿液中的 14 种内源性 AAS。实验结果表明，该方法具有出色的性能，其 LOIs 与氦气载气方法相同。在 GC/MS/MS 应用中换用氢气载气为反兴奋剂实验室提供了一种可靠的替代方案，确保实验室在氦气供应短缺的情况下仍能持续获得高质量的分析结果。

实验部分

样品

使用 Biotage 自动固相萃取 (SPE) 仪器进行尿液样品前处理和萃取。使用 Biotage TurboVap 在无氧氮 (OFN) 条件下蒸发溶剂。每个分析批次包括：

- 两份待分析样品（一份经过 SPE 和水解，另一份未经过 SPE 和水解）
- 系统空白
- 校准曲线
- 质量控制和质量保证样品

样品前处理步骤如表 1 所示。在 GC/MS/MS 分析之前，使用 MSTFA/NH_4I/乙硫醇 (500:4:2) 衍生混合物对样品进行衍生化处理（表 1）。

表 1. 尿液样品前处理

步骤	描述
第 1 步：样品移液	1. 将 0.5 mL 尿液转移至试管中 2. 加入 25 µL 内标 (ISTD) 工作溶液和 1 mL 磷酸盐缓冲液
第 2 步：自动 SPE 仪器设置	1. 将带标记的试管放入自动 SPE 仪器中 2. 将带标记的空管放置在洗脱区域 3. 将 Agilent Bond Elut NEXUS 小柱（部件号 12103101T）插入仪器中 4. 检查所有溶剂瓶中的溶液量 5. 将适当的方法加载到软件中并输入样品数量 6. 启动软件，让其自动执行以下步骤： a. 用 2 mL 甲醇 (MeOH) 和 2 mL 双蒸水活化 SPE 小柱 b. 将样品上样至活化的 SPE 小柱 c. 用 2 × 1 mL MeOH 洗脱 SPE 小柱，并将洗脱液转移至大容量螺口盖试管中 d. 使用 TurboVap 在无氧氮 (OFN) 条件下蒸发洗脱液 7. 加入 1 mL 缓冲液 (pH 7.0) 并转移至大容量螺口盖试管中 8. 使用自动移液器加入 25 µL β-葡萄糖醛酸酶 9. 盖好试管盖，转动试管检查是否有泄漏 10. 在 56 ± 5 °C 下将样品孵育至少 1 小时 11. 从烘箱中取出样品，将其冷却至室温
第 3 步：萃取	1. 加入 1 mL $NaHCO_3$/K_2CO_3 缓冲液 (pH 9.5) 2. 使用分液器加入 5 mL 甲基叔丁基醚 (MTBE) 3. 盖好试管盖，并将其置于滚轴混匀器中进行 20 分钟滚动混匀 4. 将有机相（上层）转移至带标记的小容量试管中 5. 在 40 ± 5 °C 的无氧氮 (OFN) 条件下蒸发有机溶剂，直至干燥
第 4 步：衍生化	1. 向残留物中加入 50 µL MSTFA/NH_4I/乙硫醇 (500:4:2) 衍生混合物，并涡旋几秒钟 2. 将混合物转移至气相色谱样品瓶中 3. 将样品瓶置于 80 °C 烘箱中 30 分钟 4. 将样品瓶转移至 GC/TQ 自动进样器样品盘

GC/TQ 分析

使用 Agilent 7000C 三重四极杆气质联用 (GC/TQ) 系统进行分析。表 2 列出了仪器操作参数。使用 H_2 作为载气的其他注意事项和最佳实践可参阅《载气由氦气转换为氢气的用户指南》[5]。鉴于这是一种靶向分析，并且所有目标分析物均未表现出与氢气载气的离子源内反应性，因此本研究使用标准 Agilent Inert Plus EI 离子源。在分析未知物或容易与氢气相互作用的化合物时，可考虑使用 Agilent HydroInert 离子源。

之前，使用氦气作为载气的正离子化学电离 (PCI) GC/MS/MS 方法所采用的分流比为 5:1 [6]。然而，当换用氢气载气时，通常会观察到灵敏度降至 1/5–1/2。为了弥补灵敏度的降低，可以调整进样分流比或进样量。在这一新开发的氢气载气方法中，为了保持足够高的灵敏度以及与之前方法相当的性能，我们采用不分流进样。

使用 GC/MS 系统的 Agilent MassHunter 采集软件（10.2 版）和 Agilent MassHunter 定量数据分析软件（10.2 版）进行数据采集和处理。

14 种类固醇的校准曲线均包含 6 个点，并且通过将类固醇加标至去除类固醇的尿液中来制备各校准标样。具体的校准浓度见表 3。每个校准浓度重复检测三次，共得到六种浓度下共 18 个校准点。使用氘代内标 (ISTDs) 进行内标校准。所有化合物校准均采用二次拟合。校准曲线采用 1/x 作为加权因子。

表 2. 用于法医毒理学分析的 GC 和 MS 条件

参数	设定值
进样口	分流/不分流进样口
模式	不分流
分流出口吹扫流量	53 mL/min，2 min
进样量	1.5 µL
进样口温度	280 °C
进样口衬管	安捷伦 4 mm 超高惰性 (UI) 衬管，单锥，带玻璃毛 （部件号 5190-2293）
色谱柱	Agilent J&W Ultra 1, 12 m × 0.20 mm, 0.11 µm （部件号 19091A-005）
柱温程序	120 °C（保持 0.15 min） 以 75 °C/min 升至 170 °C（保持 0 min） 以 40 °C/min 升至 185 °C（保持 0 min） 以 2.5 °C/min 升至 199 °C（保持 0 min） 以 10 °C/min 升至 213 °C（保持 0 min） 以 60 °C/min 升至 300 °C（保持 0 min） 运行时间：9.64 min
载气和流速	氢气，1 mL/min，恒流模式
传输线温度	300 °C
三重四极杆质谱仪	配备 Extractor EI 离子源的 Agilent 7000E GC/TQ 系统
电子能量	70 eV
淬灭气体氦气	2.25 mL/min 注：使用氢气作为载气时，可关闭淬灭气体并封堵相关管路
碰撞气体氮气	1.5 mL/min
离子源温度	280 °C
四极杆温度	150 °C
模式	多反应监测 (MRM)
调谐	Etune：atunes.eiex.tune.xml

方法验证

为了评估外部偏差，本研究还对来自 WADA 外部质量评估计划 (EQAS) 的 18 个基质匹配尿液样品进行了分析，并计算了六种化合物的 z 分数。

结果与讨论

在本文介绍的方法中，使用氢气作为载气将分析时间缩短至 10 分钟以内，且并不影响异构体的色谱分离度。值得注意的是，使用氦气载气的原始 GC/MS/MS 方法的分析时间为 17 分钟[6]。因此，通过换用氢气载气并使用合适规格的色谱柱，分析时间可缩短 40% 以上。图 1 为使用氦气载气 (A) 或氢气载气 (B) 在多反应监测 (MRM) 模式下获得的总离子流色谱图。

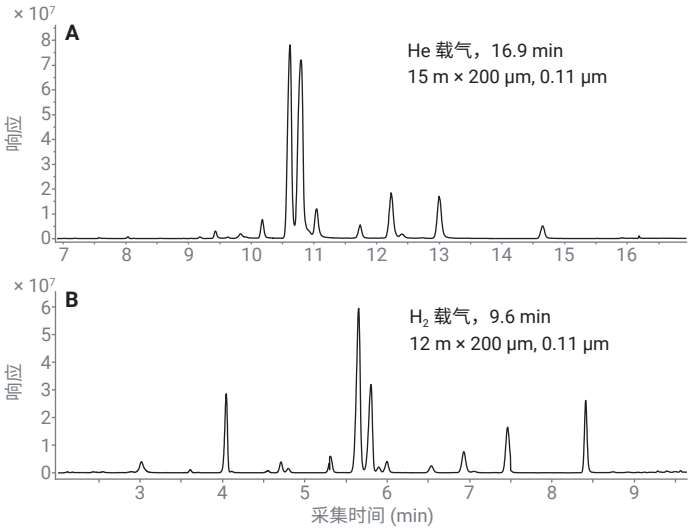

图 1. 使用 (A) 氦气和 (B) 氢气获得的 MRM 色谱图

EI 离子源和氢气载气

将 GC/MS 的载气由氦气转换为氢气时，一个重要的考虑因素是谱图保真度。某些活性化合物可能会与氢气反应，导致谱图发生变化。这不仅对扫描数据采集模式下的 GC/MS 分析至关重要，对 MRM 模式下的 GC/MS/MS 分析也同样重要，因为母离子可能会受到这些谱图变化的影响。这会导致灵敏度降低和校准问题。如果出现此类问题，可使用 HydroInert 离子源来有效解决，该离子源可大幅减少氢气与分析物之间的相互作用，保持谱图完整性并确保可靠、准确的结果[7]。不过，并非所有化合物都会与氢气发生反应，因此，即使使用标准 EI 离子源，在氢气载气下许多化合物的谱图也不会发生变化。在使用传统 EI 离子源和氢气时，为获得理想性能，也可将透镜更换为 9 mm 规格。

在本研究中，我们使用了 Inert Plus EI 离子源和标准 3 mm 提取透镜，并未观察到目标化合物与氢气的源内反应。为了确认目标分析物与氢气载气之间确实不存在不利的化学相互作用，我们使用配备 3 mm 透镜的标准 Inert Plus EI 离子源，在氦气和氢气载气条件下分别采集了谱图。图 2 为使用氦气或氢气载气采集的一种氘代内标 5b-雄烷二醇-d_5 的质谱图。其他四种氘代内标的谱图见附录图 A1 至 A4。对于评估的所有化合物，均未观察到谱图发生变化，表明可以使用配备 3 mm 提取透镜的标准 Inert Plus EI 离子源进行此项分析。

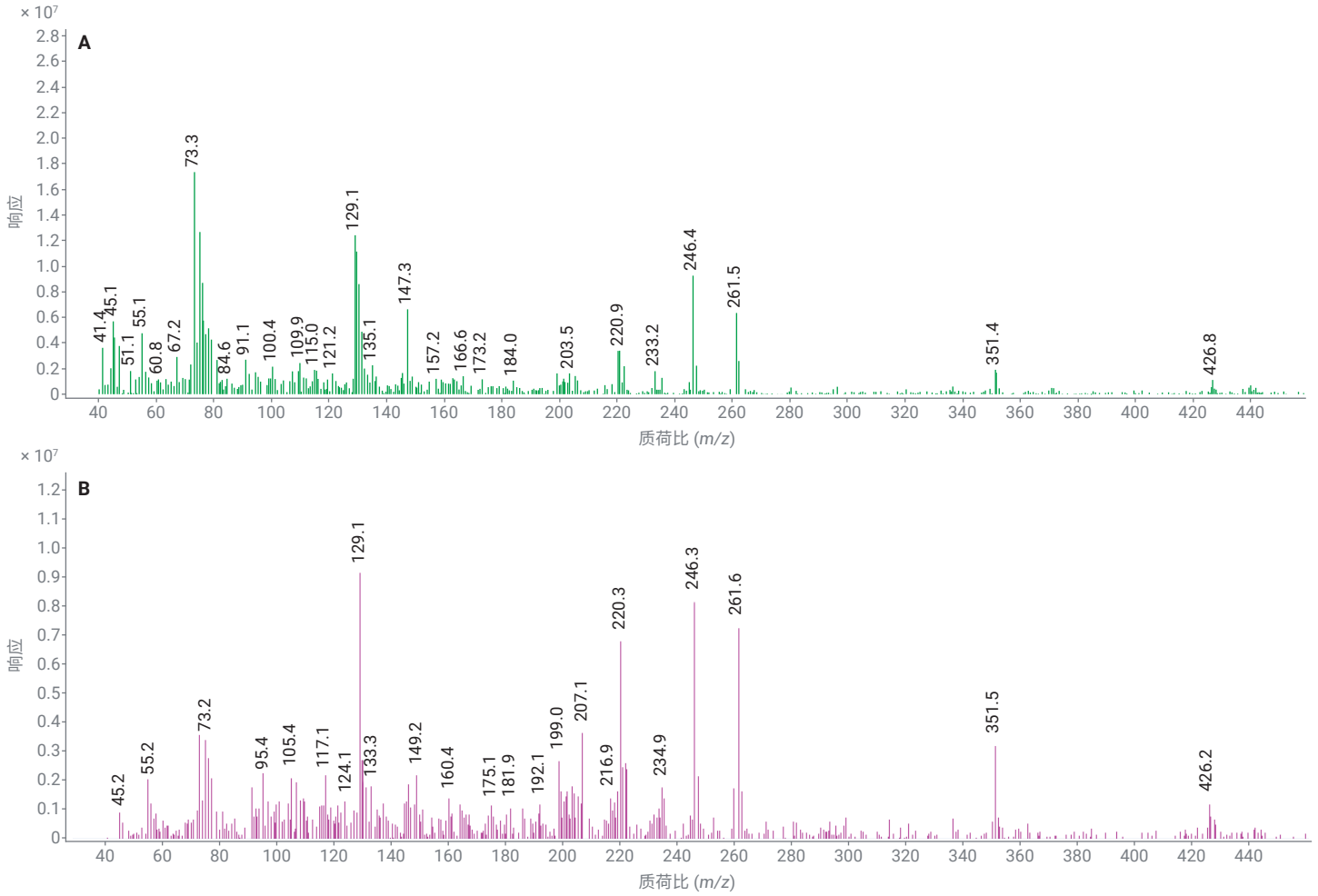

图 2. 使用 Agilent Inert Plus EI 离子源在 (A) 氦气载气或 (B) 氢气载气条件下采集的 5b-雄烷二醇-d_5（氘代衍生化内标）EI 质谱图

实验结果表明，即使使用传统 Inert Plus 离子源与氢气载气，本研究中分析的衍生化类固醇也不会出现明显的谱图变化。这可能归因于衍生化过程，因为衍生化试剂将分析物转化为更稳定的衍生物，掩蔽了原本可能与氢气载气发生相互作用的官能团，从而降低了发生分解或副反应的可能性。

尿液中 14 种类固醇的定量分析

表 3 显示了 WADA 要求进行定量分析的 14 种类固醇的校准范围和相关系数。本研究中定量分析的内源性合成类固醇是一些极具分析挑战性的化合物。一方面是由于它们的 LOIs 较低，另一方面是需要在高浓度下对它们进行准确定量。采用本方法，所有 14 种目标分析物的相关系数 (R^2) 均超过 0.997。

图 3 显示了表睾酮、睾酮、6α-羟基雄烯二酮、雄酮和本胆烷醇酮在最低校准浓度下的 MRM 色谱图。在最低校准浓度下，所有化合物的信噪比均大于 3。此外，雄酮和本胆烷醇酮在最低校准浓度下实现了完全分离。

图 3 最下方的图为雄酮和本胆烷醇酮在最高校准浓度 (9600 ng/mL) 下的色谱图，以说明由于气相色谱柱过载导致的前伸峰现象。尽管出现前伸峰，但这两种化合物的校准结果非常出色，R^2 值均为 0.999。

表 3. WADA 要求进行定量分析的 14 种类固醇的保留时间、校准浓度、R^2 值和使用的内标 (ISTDs)

化合物	保留时间 (min)	尿样中的校准浓度 (ng/mL)	相关系数 (R^2)	使用的内标
睾酮	7.507	1、3、10、30、100、400	0.9978	睾酮-d_3
表睾酮	6.98	1、3、10、30、100、400	0.9978	表睾酮-d_4
雄酮	5.702	24、72、240、720、2400、9600	0.9991	雄酮-d_4
本胆烷醇酮	5.862	24、72、240、720、2400、9600	0.9996	本胆烷醇酮-d_5
双氢睾酮	7.103	0.5、1.5、5、15、50、200	0.9993	双氢睾酮-d_3
脱氢表雄酮	6.605	2、6、20、60、200、800	0.9992	脱氢表雄酮-d_6
4-雄烯-3,17-二酮	7.295	0.5、1.5、5、15、50、200	0.9994	脱氢表雄酮-d_6
5α-雄烷-3α,17β-二醇	6.021	2、6、20、60、200、800	0.9984	5α-雄烷-3α,17β-二醇-d_5
5β-雄烷-3α,17β-二醇	6.063	2、6、20、60、200、800	0.9996	5β-雄烷-3α,17β-二醇-d_5
5α-雄烷-3,17-二酮	6.857	0.5、1.5、5、15、50、200	0.9991	脱氢表雄酮-d_6
5β-雄烷-3,17-二酮	4.882	0.5、1.5、5、15、50、200	0.9988	脱氢表雄酮-d_6
6α-羟基雄烯二酮	8.754	0.25、0.75、2.5、7.5、25、100	0.9992	脱氢表雄酮-d_6
4OH-雄烯二酮	8.848	0.25、0.75、2.5、7.5、25、100	0.9993	脱氢表雄酮-d_6
5β-孕二醇	8.591	2、6、20、60、200、800	0.9978	5β-雄烷-3α,17β-二醇-d_5

图 3. 部分合成类固醇的色谱图（左图）和校准曲线（右图）。此处给出了表睾酮、睾酮、6α-羟基雄烯二酮、雄酮和本胆烷醇酮在最低校准浓度下的 MRM 色谱图。最下方为最高校准浓度下雄酮和本胆烷醇酮的色谱图

验证研究

在 WADA EQAS 中，尿液样品经常被送往认证实验室进行分析[4]。为此，本研究对 18 个 EQAS 样品中的六种目标分析物进行了分析，并将实测结果与报告的公认参考值进行了比较。获得的所有 108 个实测结果的 z 分数均小于 1，表明本研究所采用的方法具有足够高的准确度。

结论

本研究开发了一种使用氢气载气和电子轰击电离 (EI) 的 GC/MS/MS 方法，用于分析尿液中的 14 种合成类固醇。该方法在较宽的校准范围内展现出出色的校准性能，并且覆盖最低性能要求限值 (MRPLs)。该方法的分析时间不到 10 分钟，相比原始的正离子化学电离 (PCI) GC/MS/MS 方法，节省了 40% 的时间。WADA 验证结果显示，所有分析样品的 z 分数均小于 1，表明该方法具有令人满意的准确度。

参考文献

1. World Anti-Doping Agency. TD2022MRPL: Minimum Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-Threshold Substances. https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2022mrpl
2. Van Gansbeke, V.; Albertsdóttir, A.D; Polet, M.; Van Eenoo, P.; Nieto, S. 用于反兴奋剂检测的基于 AssayMAP Bravo 样品前处理平台的半自动 GC/Q-TOF 筛查；*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-6702ZHCN，**2023**
3. Van Eenoo, P.; Van Gansbeke, W.; De Brabanter, N.; Deventer, K.; Delbeke, F. T. A Fast, Comprehensive Screening Method for Doping Agents in Urine by Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3306–3316
4. Polet, M.; Van Gansbeke, W.; Van Eenoo, P. Development and Validation of an Open Screening Method for Doping Substances in Urine by Gas Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1042*, 52–59. doi: 10.1016/j.aca.2018.08.050
5. Agilent EI GC/MS Instrument Helium to Hydrogen Carrier Gas Conversion（安捷伦 EI GC/MS 仪器载气由氦气转换为氢气）；*安捷伦科技公司用户指南*，出版号 5994-2312EN，**2022**
6. Van Gansbeke, W.; *et al*. Improved Sensitivity by Use of Gas Chromatography-Positive Chemical Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry for the Analysis of Drug Related Substances. *J. Chromatogr. B* **2015**, *1001*, 221–240. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.07.052
7. 配备 HydroInert 离子源的 Agilent Inert Plus GC/MS 系统；*安捷伦科技公司技术概述*，出版号 5994-4889ZHCN，**2022**

附录

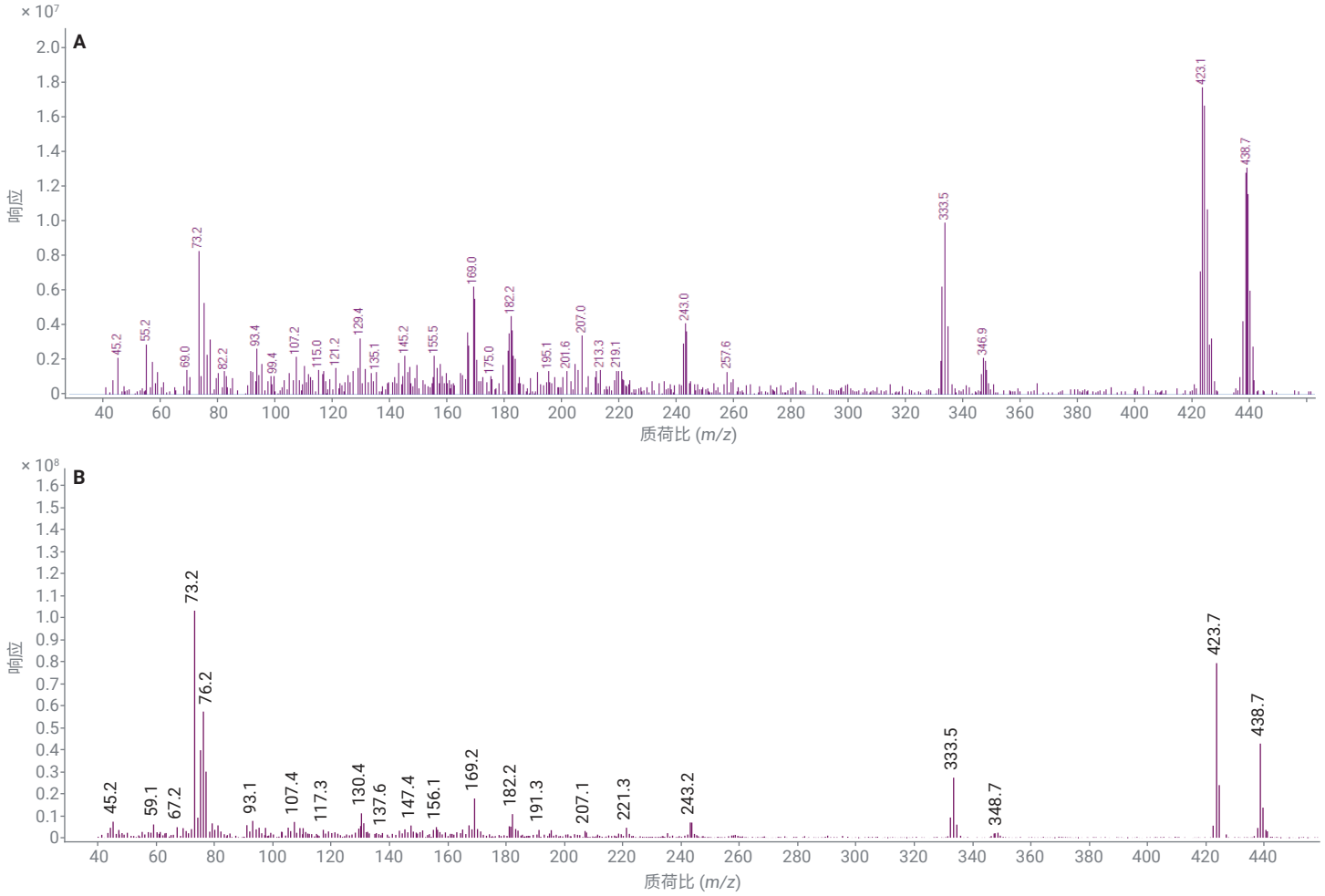

图 A1. 使用 Inert Plus EI 离子源在 (A) 氦气载气或 (B) 氢气载气条件下采集的雄酮-d_4（氘代衍生化内标）EI 质谱图

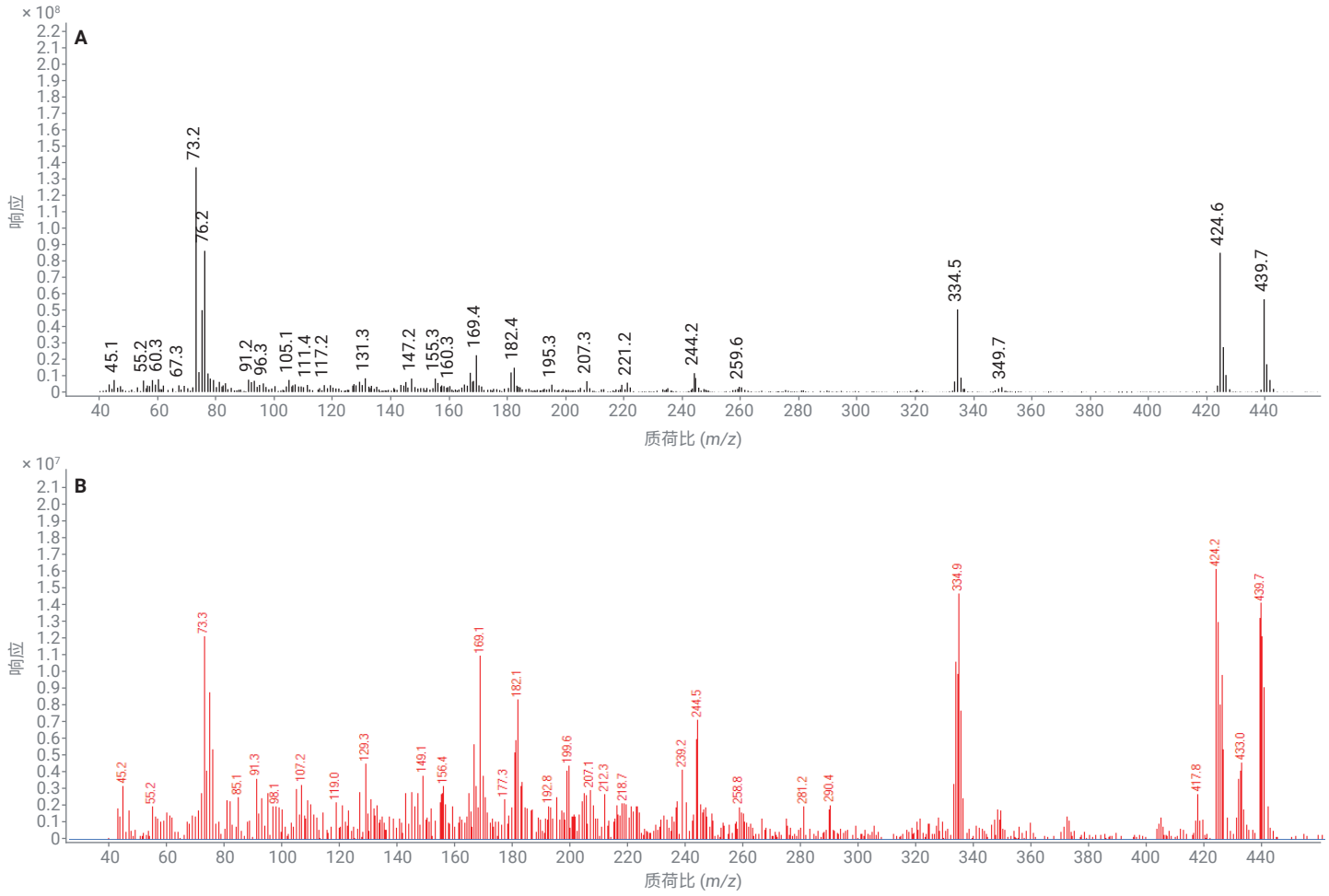

图 A2. 使用 Inert Plus EI 离子源在 (A) 氦气载气或 (B) 氢气载气条件下采集的本胆烷醇酮-d_5（氘代衍生化内标）EI 质谱图

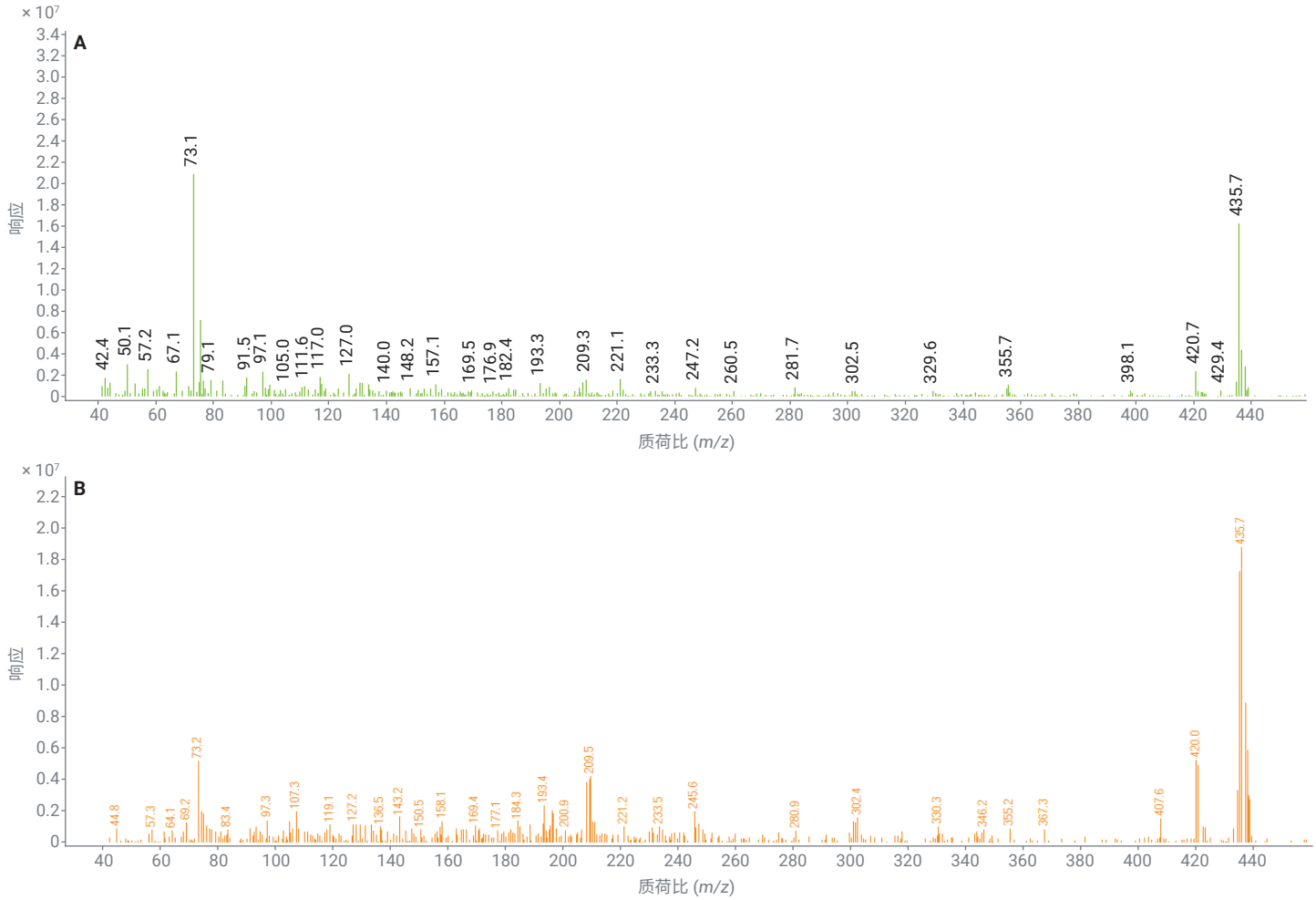

图 A3. 使用 Inert Plus EI 离子源在 (A) 氦气载气或 (B) 氢气载气条件下采集的睾酮-d_3（氘代衍生化内标）EI 质谱图

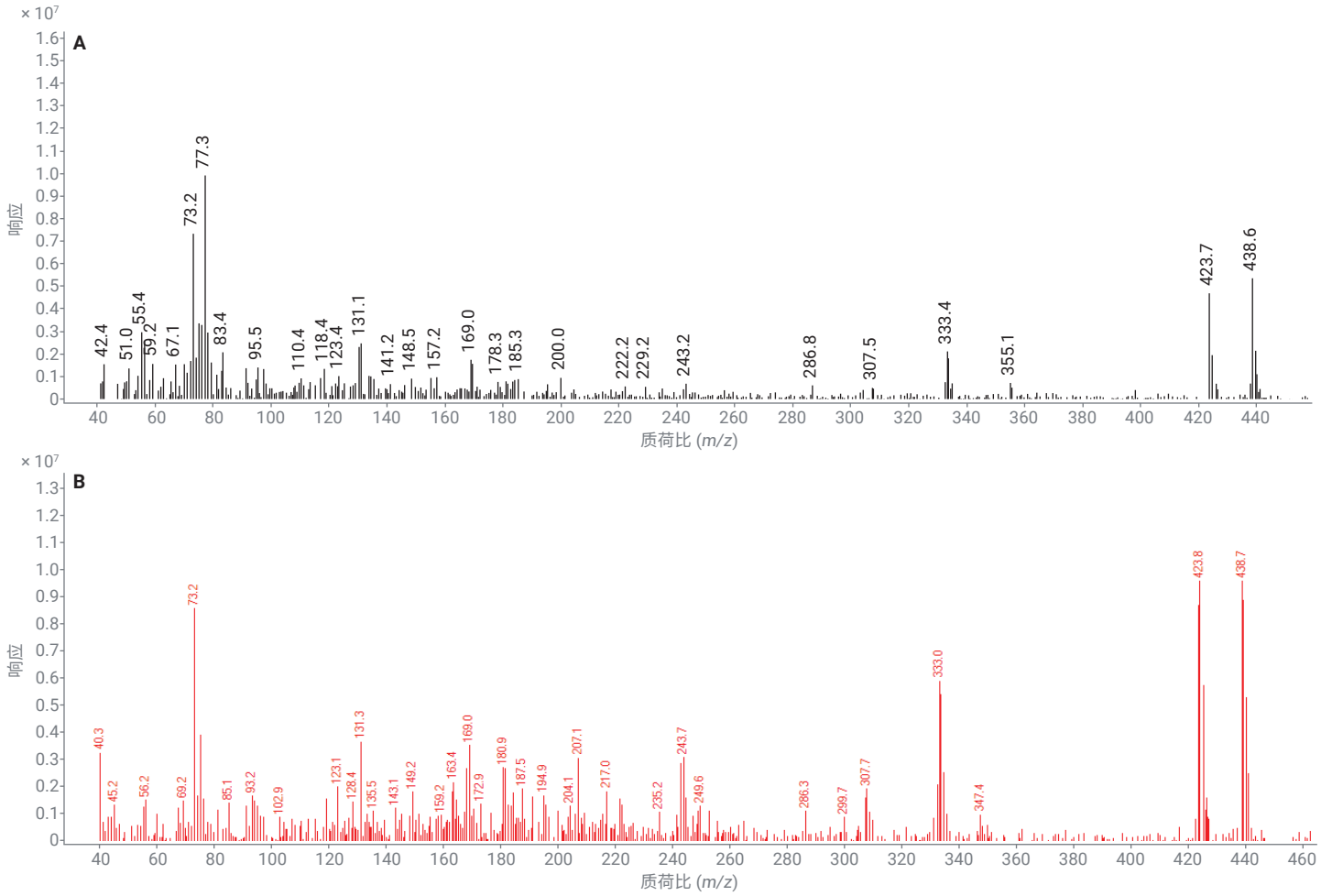

图 A4. 使用 Inert Plus EI 离子源在 (A) 氦气载气或 (B) 氢气载气条件下采集的 DHEA-d_6（氘代衍生化内标）EI 质谱图

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

RA45611.3218634259

2024 年 2 月 26 日，中国出版
5994-7970ZHCN

Agilent
Trusted Answers