

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



作者

Wim Van Gansbeke,
Aðalheiður Dóra
Albertsdóttir, Michaël Polet,
Peter Van Eenoo
DoCoLab, 根特大学,
比利时根特
Sofia Nieto
安捷伦科技有限公司

摘要

在兴奋剂检测领域，对高灵敏度分析方法以及能够实现所需通量并能进行回顾性分析的筛查方法的需求不断增加。除选用高灵敏度分析仪器以外，还可以通过对方法进行后续改进（包括自动固相萃取 (SPE)）来进一步降低检出限 (LOD)。本应用简报介绍了一种工作流程，使用 Agilent AssayMAP Bravo 样品前处理平台进行自动化样品前处理，并结合气相色谱/四极杆飞行时间 (GC/Q-TOF) 质谱 (MS) 以补充传统的气相色谱/三重四极杆 (GC/TQ) MS 系统。这一组合为兴奋剂检测实验室的分析人员提供了更高的效率与结果可信度，以及进行回顾性分析的可能性。

前言

为了保持世界反兴奋剂机构 (WADA) 的认证, 各兴奋剂检测实验室不断努力提高分析方法的灵敏度、选择性、重现性以及定量能力。此外, 对能够随时进行回顾性分析的可靠筛查方法的需求也在不断增加^[1]。

《WADA 禁用物质和方法清单》包括内源性和外源性物质。必须对极低 (< 1 ppb) 至极高 (> 10 ppm) 浓度范围内的内源性物质 (主要是内源性雄激素合成代谢类固醇 (EAAS)) 进行定量分析。外源性物质包括各类化合物, 例如 (外源性) 雄激素合成代谢类固醇 (AAS)、合成代谢剂、肽、生长因子、 β -2 激动剂、激素和代谢调节剂、利尿剂和其他掩蔽剂、兴奋剂、麻醉剂、大麻素和 β 受体阻滞剂等。该禁用物质清单每年都会增加新的物质, 因此应不断更新分析方法, 以便能够对更多化合物进行筛查。

对于每个化合物类别 (有时是单个物质), WADA 均设定了最低性能水平要求 (MRPL)。筛查方法或初始检测程序 (ITP) 应能够检测出浓度为 MRPL 一半的这些外源性物质, 而 MRPL 通常会逐年降低。

在兴奋剂检测领域, GC/MS 是一种重要工具, 它与 LC/MS 技术互补, 可检测尿样中需进行筛查的约 600 种化合物中的 400 多种。

对 LC/MS 技术而言, 许多 AAS 代谢物都存在离子化效率不高的问题, 并且 LC/MS 无法提供足够高的色谱分离度来分离兴奋剂的许多立体异构体。因此,

对于各种内源性类固醇的定量分析, WADA 现在完全依赖于 GC/MS, 其中 GC ITP 方法能够准确定量浓度超过 10 ppm 以及在低 ng/mL 范围内的 EAAS。气相色谱/三重四极杆系统广泛应用于兴奋剂分析应用中, 并因其出色的灵敏度和宽动态范围而备受青睐, 使其成为靶向分析和定量分析的首选仪器^[2]。然而, 即便使用现代 GC/TQ 仪器, 通过一种方法实际能够分析的化合物数量也是有限的。样品数量的增加使科学家需要开发更快速的色谱方法, 同时在能够分析的化合物数量方面也带来了挑战。此外, 许多 AAS 代谢物在 EI 离子源中发生非常强的碎裂, 因此不太适合 MS/MS。相比之下, 高分辨精确质量飞行时间 (TOF) 仪器对单次运行中监测的化合物数量没有限制, 并且能够为复杂基质样品提供高灵敏度和宽动态范围, 同时支持回顾性分析。

因此, 建议采用两种 GC ITP 方法的组合: 一种方法使用配备 PTV 进样器的 GC/TQ 进行大体积进样 (用于要求更高的 AAS 以及其他少数 MRPLs 非常低的化合物); 另一种方法采用高分辨 GC/Q-TOF, 用于具有较高 MRPLs 的更广泛的化合物 (例如兴奋剂、麻醉剂、 β -激动剂、激素调节剂和利尿剂) 以及一些具有高度片段化谱图的 AAS。

WADA 的统计数据显示, 在过去几十年中, AAS 一直是检出最多的兴奋剂之一 (约占所有检出物的 50%)。在过去几年中, 发现了几种 AAS 的“长期代谢物”。这些代谢物需要更长的时间排出体外, 并且浓度往往低于传统代谢物。

硫酸化在这些长期代谢物的形成过程中起着重要作用, 并且直到最近, LC/MS/MS 仍被认为是检测 AAS 硫酸化代谢物的唯一技术。最近, 已有研究证明, 通过在热进样器中裂解硫酸基团, 可以使用 GC/MS 检测这些硫酸化代谢物^[4,5]。与只能检测硫酸基团丢失的 LC/MS/MS 相比, GC/MS 可以提供更高的分离能力和更多的结构信息。

GC/MS 方法的挑战在于样品前处理, 可以使用乙酸乙酯液液萃取法 (LLE) 或固相萃取法 (SPE) 进行样品前处理。SPE 具有更高的萃取回收率, 并且具有相应的冲洗程序, 可以获得更洁净的提取物。此外, SPE 更适合自动化。Agilent AssayMAP Bravo 系统是用于 SPE 自动化样品前处理的强大平台。AssayMAP Bravo 是一种微量色谱系统, 可使用具有各种表面化学键合相的填充树脂床小柱平行处理 1-96 个样品。虽然 AssayMAP Bravo 系统通常用作蛋白质样品前处理平台, 但本研究表明, 与 LLE 方法相比, 该系统不仅对硫酸化代谢物具有明显更高的萃取回收率, 对于其他几乎所有极性化合物也同样如此。借助小型化流程, 减少了废弃物, 进而减少了对环境的影响。

我们提出了一种使用 GC/TQ、GC/Q-TOF 和 AssayMAP Bravo 样品前处理平台的统一方法, 帮助分析人员在兴奋剂检测应用中实现高效筛查并获得可靠结果。此外还介绍了对可作为长期标记物的类固醇非水解硫酸代谢物的检测。

实验部分

样品

样品包括使用去除类固醇的尿样配制的 6 个校准品（绘制用于分析内源性类固醇的校准曲线）、使用去除类固醇的尿样配制的 4 种不同浓度水平的 4 个质控 (QC) 样品、1 个空白水样、1 个阴性对照尿样和 84 个真实尿样。

水解

在 96 孔板中进行样品前处理。向 0.5 mL 尿样中加入氘代内标 (IS) 混合物，并与大肠杆菌 β -葡萄糖醛酸酶在 pH 7 的磷酸盐缓冲液中于 56 °C 孵育至少 1 小时。

借助 AssayMAP Bravo 样品前处理平台，使用自动化 SPE 进行样品萃取

在 AssayMAP Bravo 上使用改良版的多肽净化应用程序，通过 Agilent AssayMAP 25 μ L 反相 (RP-S) 小柱（货号 G5496-60023）进行自动化 SPE（图 1）。使用 250 μ L 甲醇，以 300 μ L/min 的流速灌注 RPS 小柱，然后用 100 μ L 20% 甲醇以 25 μ L/min 的流速进行平衡。将 1 mL 样品以 25 μ L/min 的流速上样至该小柱。然后用 250 μ L 20% 甲醇以 25 μ L/min 流速清洗该小柱。收集两份连续洗脱液（第一份用 75 μ L 甲醇以 7.5 μ L/min 的流速洗脱，第二份用 75 μ L 乙腈以 7.5 μ L/min 的流速洗脱），并将其合并。

使用乙酸乙酯液萃取法进行样品萃取

按照“水解”一节所述进行水解，但使用带螺口盖的单独玻璃管。将样品在碱性条件 (pH 9.5) 下用乙酸乙酯萃取 20 分钟，并收集有机层。

将提取物在 40 °C 下氮吹至干，使用 50 μ L MSTFA:NH₄I:乙硫醇混合物在 80 °C 下衍生化 30 分钟。

数据采集和数据处理

采用两套系统进行 GC/MS 分析，即 Agilent 7250 GC/Q-TOF 和 Agilent 7000C GC/TQ。仪器参数见表 1。

创建含有 320 种 WADA 禁止的外源性化合物及其代谢物的精确质量个人化合物数据库与谱库 (PCDL)，以便实施精确质量 GC/Q-TOF 筛查方法。使用 Agilent MassHunter 定性分析软件 (10 版) 将精确质量 EI 碎片转换为理论 m/z 值。然后使用 Agilent PCDL Manager 软件 (8.0 版) 将谱图导入精确质量 PCDL 中。采用 MassHunter 定量分析软件 (10.2 版) 进行进一步数据处理。

表 1. 数据采集参数

MS	Agilent 7250 Q-TOF	Agilent 7000C TQ
GC	Agilent 7890 GC	
进样口和衬管	SSL, 4 mm 超高惰性单锥衬管, 带玻璃毛	PTV, 多挡板 PTV 衬管
进样口温度	275 °C	120 °C 保持 0.05 min 然后以 12 °C/s 升至 360 °C
进样量	1.4 μ L	7 μ L
进样模式	不分流	溶剂放空
色谱柱	Agilent J&W HP-1 ms 超高惰性色谱柱, (2 m + 10 m) \times 0.25 mm, 0.25 μ m	Agilent J&W DB-35MS 超高惰性色谱柱, 15 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m
柱温箱升温程序	110 °C 保持 0.1 min; 然后以 70 °C/min 升至 125 °C 并保持 0.15 min, 以 35 °C/min 升至 186 °C 并保持 0.15 min, 以 2.2 °C/min 至 204 °C, 以 20 °C/min 升至 245 °C, 以 50 °C/min 升至 270 °C, 以 75 °C/min 升至 320 °C 并保持 1.1 min	110 °C 保持 0.25 min; 然后以 60 °C/min 升至 185 °C, 以 15 °C/min 升至 220 °C, 以 5 °C/min 升至 250 °C 并保持 0.25 min, 以 55 °C/min 升至 330 °C 并保持 1.4 min
运行时间	14.85 min	12.94 min
载气	氮气	氮气
色谱柱流速	色谱柱 1: 1 mL/min, 色谱柱 2: 1.2 mL/min	1 mL/min
反吹条件	2 min (后运行), 320 °C (柱温箱温度), 10 psi (辅助 EPC 压力), 2 psi (进样口压力)	-
传输线温度	310 °C	310 °C
四极杆温度	150 °C	150 °C
离子源温度	230 °C	280 °C
电离模式	EI	EI
电子能量	70 eV	70 eV
发射电流	5 μ A	35 μ A
碰撞池气体流速	氮气 1 mL/min, 氦气 4 mL/min	氮气 1.5 mL/min, 氦气 2.25 mL/min
质量数范围	50–750 m/z	dMRM

结果与讨论

在兴奋剂检测领域使用 AssayMAP Bravo 样品前处理平台的优势

与使用 AssayMAP Bravo 系统进行自动化样品前处理相比，使用乙酸乙酯进行手动样品萃取明显更耗时，且效率更低。蒸发 5 mL 乙酸乙酯需要大约 45 分钟，而对于 150 μ L MeOH:ACN，则仅需要 10 分钟。此外，LLE 涉及额外的样品转移步骤，需要 30 分钟。自动化还可以显著缩短手动操作时间，因为在样品前处理过程中分析人员可以离开 AssayMAP Bravo，而采用手动方法时几乎需要持续关注。

使用自动化样品前处理时，出错的风险也显著降低。另外，许多挥发性化合物（主要是兴奋剂）会随乙酸乙酯一起挥发，与自动化 SPE 相比，萃取回收率非常低。

此外，加入衍生化试剂后的额外的样品转移步骤会导致回收率进一步降低。

使用 GC/Q-TOF 和 GC/TQ 仪器，对 LLE 程序（使用乙酸乙酯）与 AssayMAP Bravo 固相萃取方案的检出限进行了比较，如图 2 所示。对于非极性化合物（例如类固醇），使用 AssayMAP Bravo 样品前处理平台时 LOD 的改善并不十分

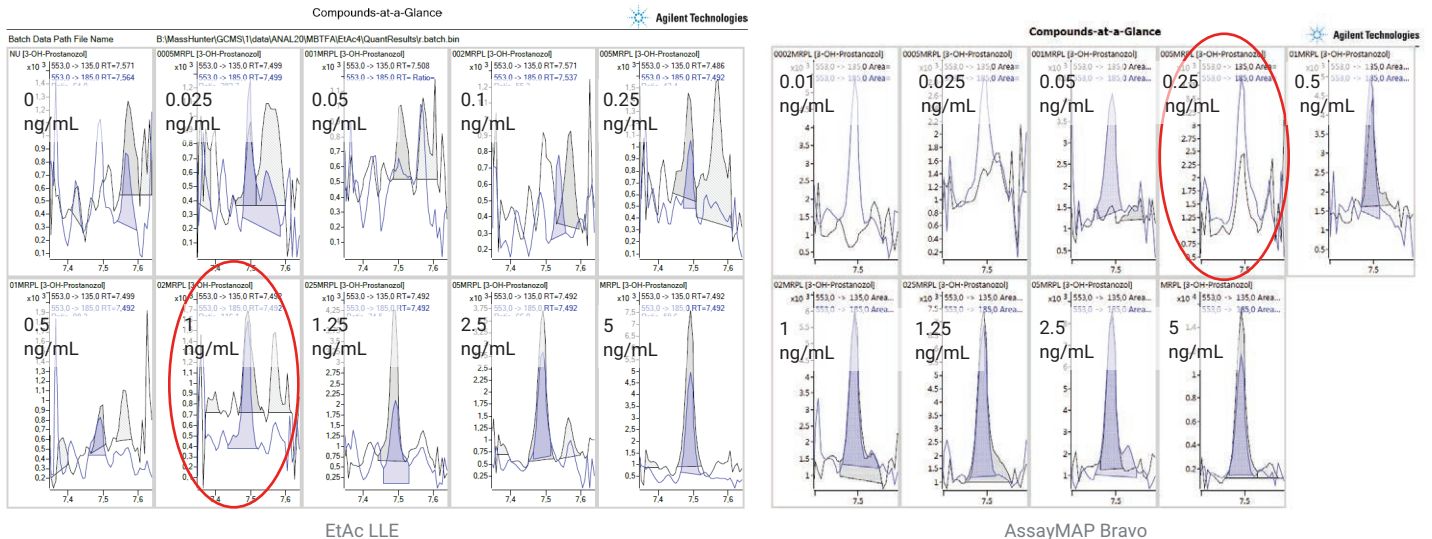
明显，从仅降低百分之几到降至原来的 1/4 不等。LOD 降至原来的 1/4 是由于 AssayMAP 萃取具有明显更低的背景。

对于极性较强的化合物（例如咪塞米，其最新 LOD 低于 0.4 ng/mL），AssayMAP Bravo 萃取方法的灵敏度是先前 LLE 萃取方法的 200 倍以上，并能在最新 WADA MRPL 下实现检测（图 3）。



图 1. AssayMAP Bravo 样品前处理平台

A 3-OH-普罗斯它诺唑：最低 LOD 1.25 ng/mL



B 异美汀: 最低 LOD 50 ng/mL

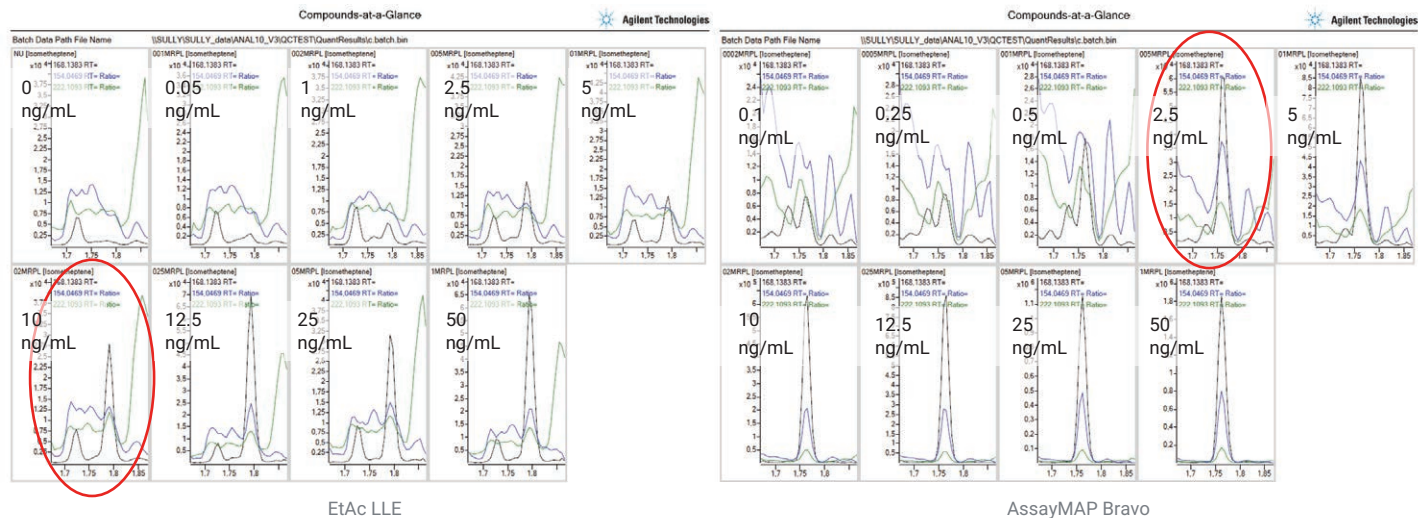


图 2. 使用乙酸乙酯 LLE (左) 和 AssayMAP Bravo (右) 萃取时的 LOD 比较: (A) 3-OH-普罗斯它诺唑, 利用 GC/TQ 进行分析; 和 (B) 异美汀, 利用 GC/Q-TOF 进行分析。每种萃取技术所对应的 LOD 用红圈标记

咪塞米: 最低 LOD 20 ng/mL

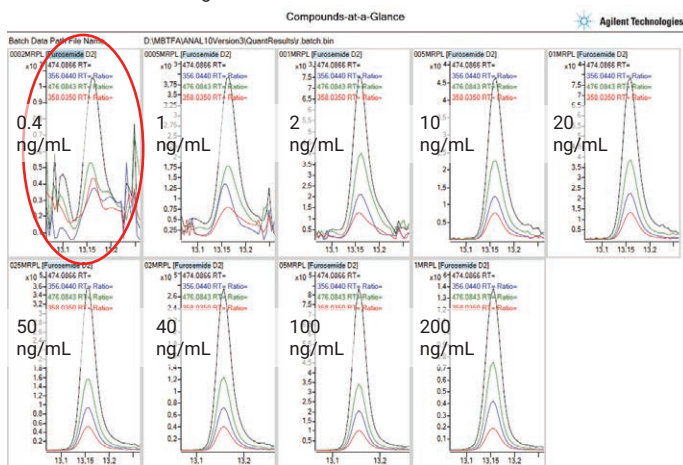


图 3. 使用 AssayMAP Bravo 进行萃取时得到的咪塞米的 GC/Q-TOF LOD。LOD 用红圈标记

用于常规反兴奋剂分析的新型半自动 GC/Q-TOF 筛查方法

大多数兴奋剂检测实验室使用三重四极杆仪器进行 GC/MS 分析。当在多反应监测 (MRM) 模式下采用最佳条件运行时, GC/TQ 系统对目标化合物具有非常出色

的灵敏度。飞行时间测量的根本性差异使基于 GC/Q-TOF 的方法的分析能力超过了 GC/TQ。由于数据是以非靶向方式采集的, 无需针对每种目标化合物都进行优化, 因此大大简化了方法开发过程。非靶向数据采集还支持回顾性数据分析, 为后

续筛查其他在样品分析时尚且未知的目标化合物打开了大门。全扫描采集还避免了 MRM 方法^[3]中可能存在的任何占空比相关问题, 即色谱图的某些部分可能会有许多化合物共流出。

为了将 GC/Q-TOF 纳入筛查方法中，首先对 GC/Q-TOF 的定量范围进行了评价，并与 GC/TQ 的定量范围进行了比较（图 4）。合成代谢类固醇因 MRPL 较低和内源性干扰，是最难分析的化合物类别之一。因此，总计对 5 批共 20 个尿样进行了评估，重点关注 WADA 要求进行定量分析的类固醇。两个系统之间的线性相关性获得了令人满意的结果。

图 5 给出了更多校准示例，显示了使用 GC/Q-TOF 实现的更广泛的类固醇定量范围。所评估的所有类固醇的校准曲线相关系数 (R^2) 均超过 0.997，结果汇总于表 2 中。

表 2. 需要定量分析的类固醇的校准曲线的相关系数

化合物	尿样中的校准浓度 (ng/mL)	相关系数 (R^2)
睾酮	1-3-10-30-100-400	0.9995
表睾酮	1-3-10-30-100-400	0.9997
雄酮	24-72-240-720-2400-9600	0.9993
本胆烷醇酮	24-72-240-720-2400-9600	0.9987
双氢睾酮	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9986
脱氢表雄酮	2-6-20-60-200-800	0.9993
4-雄烯-3,17-二酮	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9988
5 α -雄烷-3 α ,17 β -二酮	2-6-20-60-200-800	0.9997
5 β -雄烷-3 α ,17 β -二酮	2-6-20-60-200-800	0.9995
5 α -雄烯-3,17-二酮	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9987
5 β -雄烯-3,17-二酮	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9986
6 α OH-雄烯二酮	0.25-0.75-2.5-7.5-25-100	0.9988
4OH-雄烯二酮	0.25-0.75-2.5-7.5-25-100	0.9986
5 β -孕二醇	2-6-20-60-200-800	0.9971

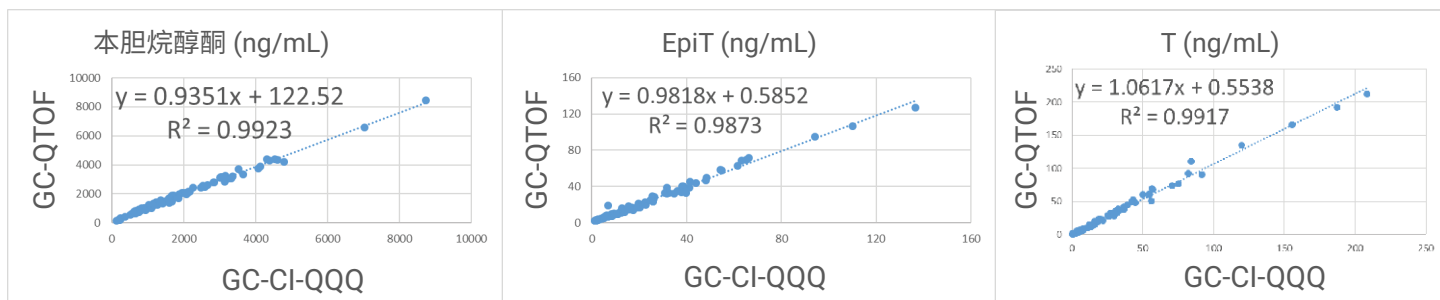


图 4. 类固醇的 GC/TQ 与 GC/Q-TOF 分析结果对比

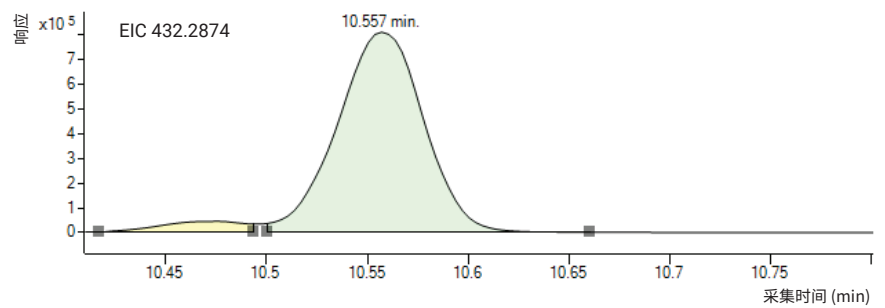
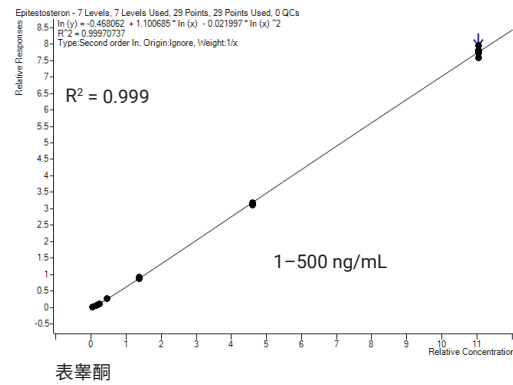
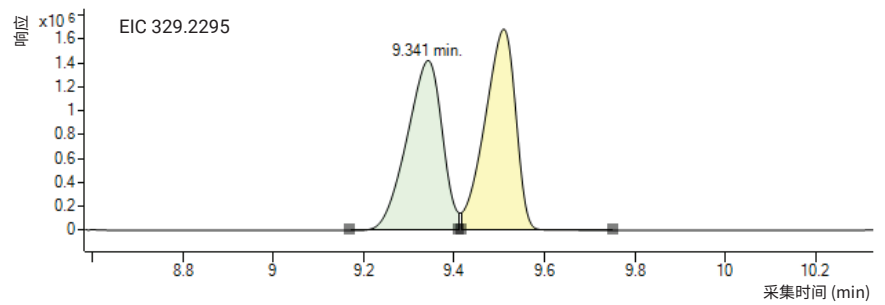
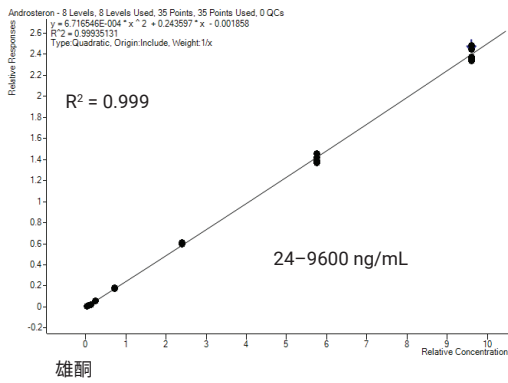
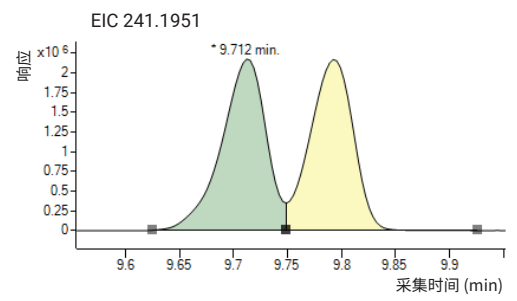
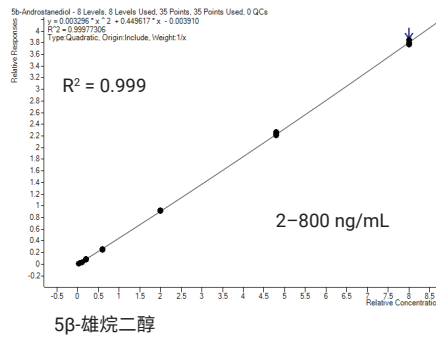
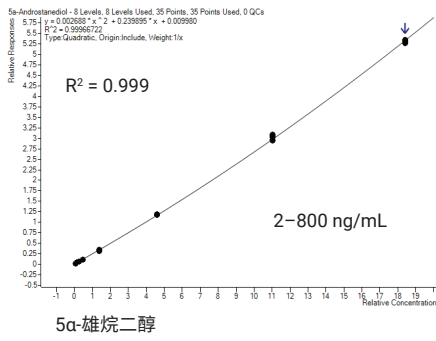


图 5. 类固醇的 GC/Q-TOF 校准曲线示例以及目标离子（在校准范围的最高浓度点）的精确质量提取离子色谱图 (EICs)

在 200 次进样过程中对 GC/Q-TOF 的质量轴稳定性进行了评估，在前 100 次进样期间（或约 24 小时内）未进行质量校准。在随后的 100 次进样中，每 5 个样品进行一次系统自动校准（在序列中启

用）(图 6)。值得一提的是，在进行自动校准时，由于是在 GC 循环的柱温箱冷却过程中进行的，因此不需要占用额外的时间。对四个目标离子的 m/z 进行监测，以检测质量轴漂移。在前 100 次进样期

间观察到较小的正偏差，这些正偏差在随后的 100 次进样期间基本得到校正。质量偏移幅度小于 ± 1.5 ppm，在不经质量校准的情况下，绝对漂移可达约 4 ppm。

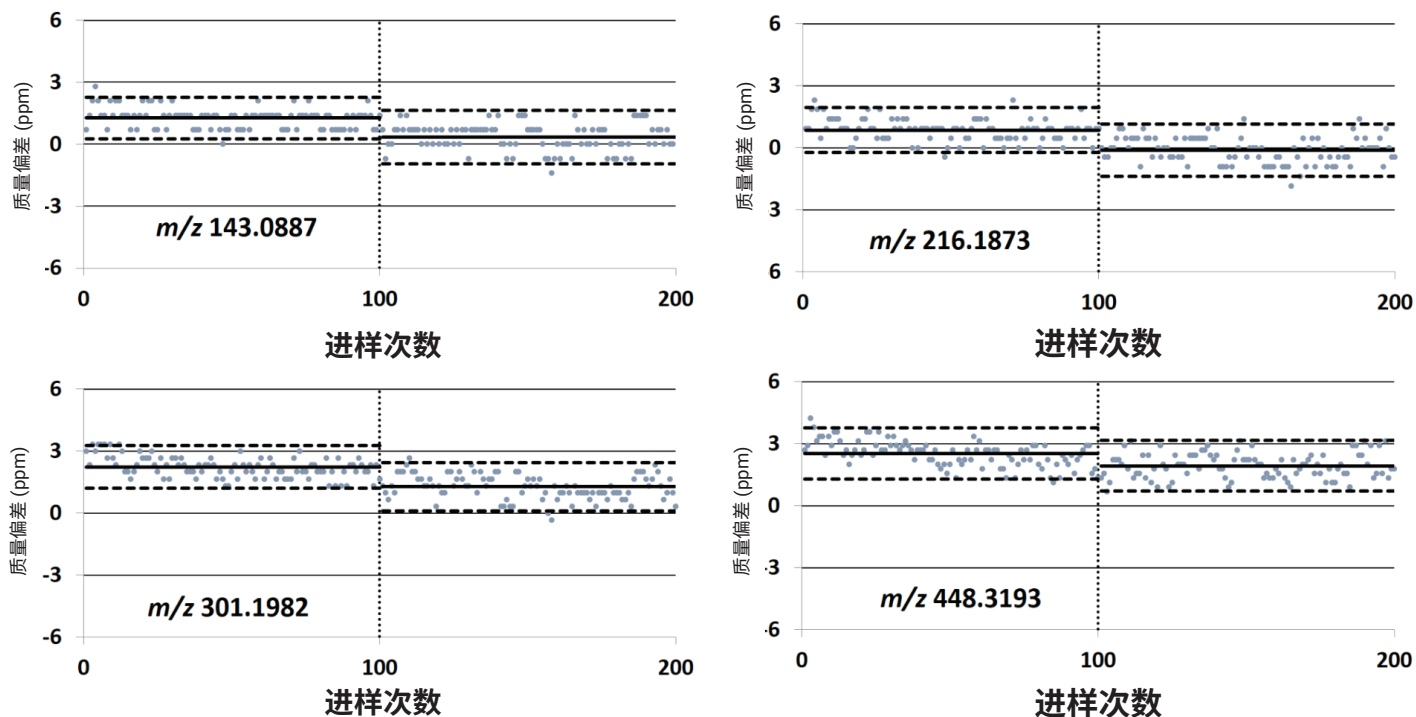


图 6. 7250 GC/Q-TOF 的质量轴稳定性。在不校准的情况下进行 0-100 次进样。对于第 100-200 次进样，每 5 次运行后自动进行一次系统校准

因此，7250 GC/Q-TOF 系统在兴奋剂检测分析所需的质量数准确度与定量能力方面均可提供高质量的数据。目前，典型的数据处理方法包括数据分析和报告生成，随后由两名科学家独立进行耗时的人工审查。以可靠的方式实现数据审查过程的自动化将带来诸多重要优势，包括提高效率、一致性和无偏性，因为对人工参与的需求大幅减少。

全新 GC/Q-TOF 疑似物筛查工作流程（也包括目标物定量）完全在 MassHunter 定量分析软件中进行，并且基于精确质量谱库。该流程已广泛应用于农药和环境污染物筛查^[6]，但原则上也适用于其他应用，例如兴奋剂检测。如图 7 所示，在根据精确质量谱库谱图自动创建筛查方法后，GC/Q-TOF 筛查程序的两阶段算法将在第

一阶段基于离群值（例如质量数准确度、信噪比等）对各定量和定性离子进行验证。在第二阶段，将决定化合物是“确认”（存在）、“排除”（不存在）还是需要进一步审查（可能存在）。在第二步中，将在化合物层面对各种标准进行评估，例如谱库匹配得分和定性离子数量。

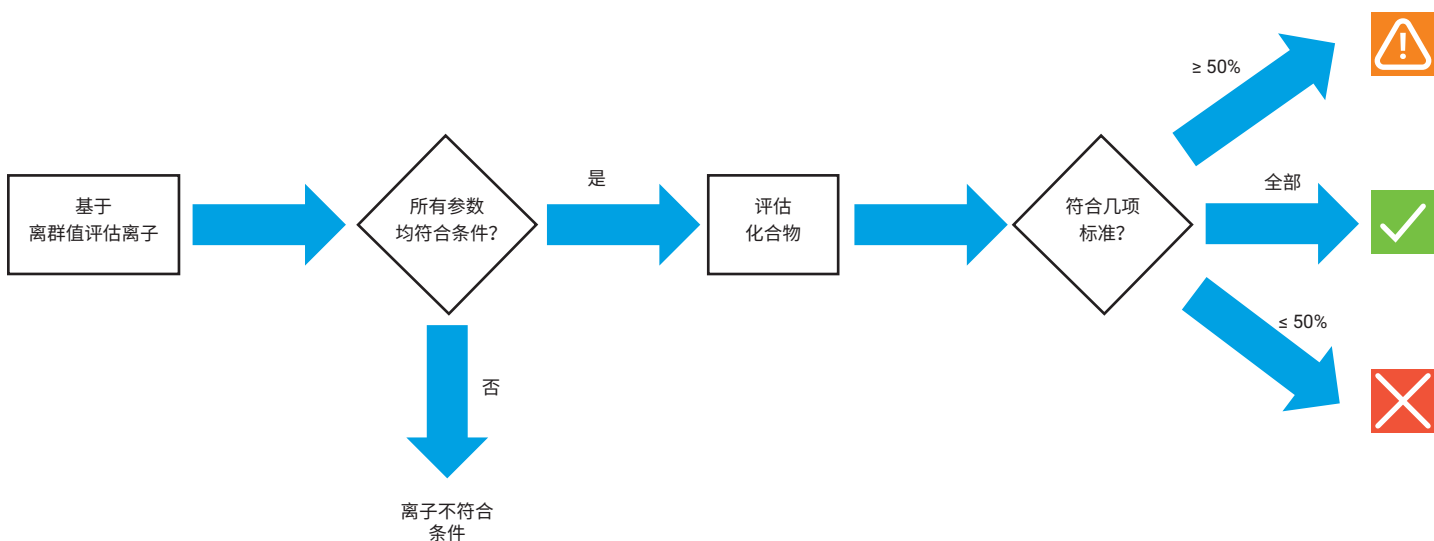


图 7. GC/Q-TOF 筛查程序中的自动化合物验证。根据未通过的具体化合物标准，化合物要么被排除，要么被初步确认

该筛查程序为用户提供了高度灵活性，可以根据需要针对各种化合物单独定制标准。该筛查程序的结果汇总窗口如图 8 所示。

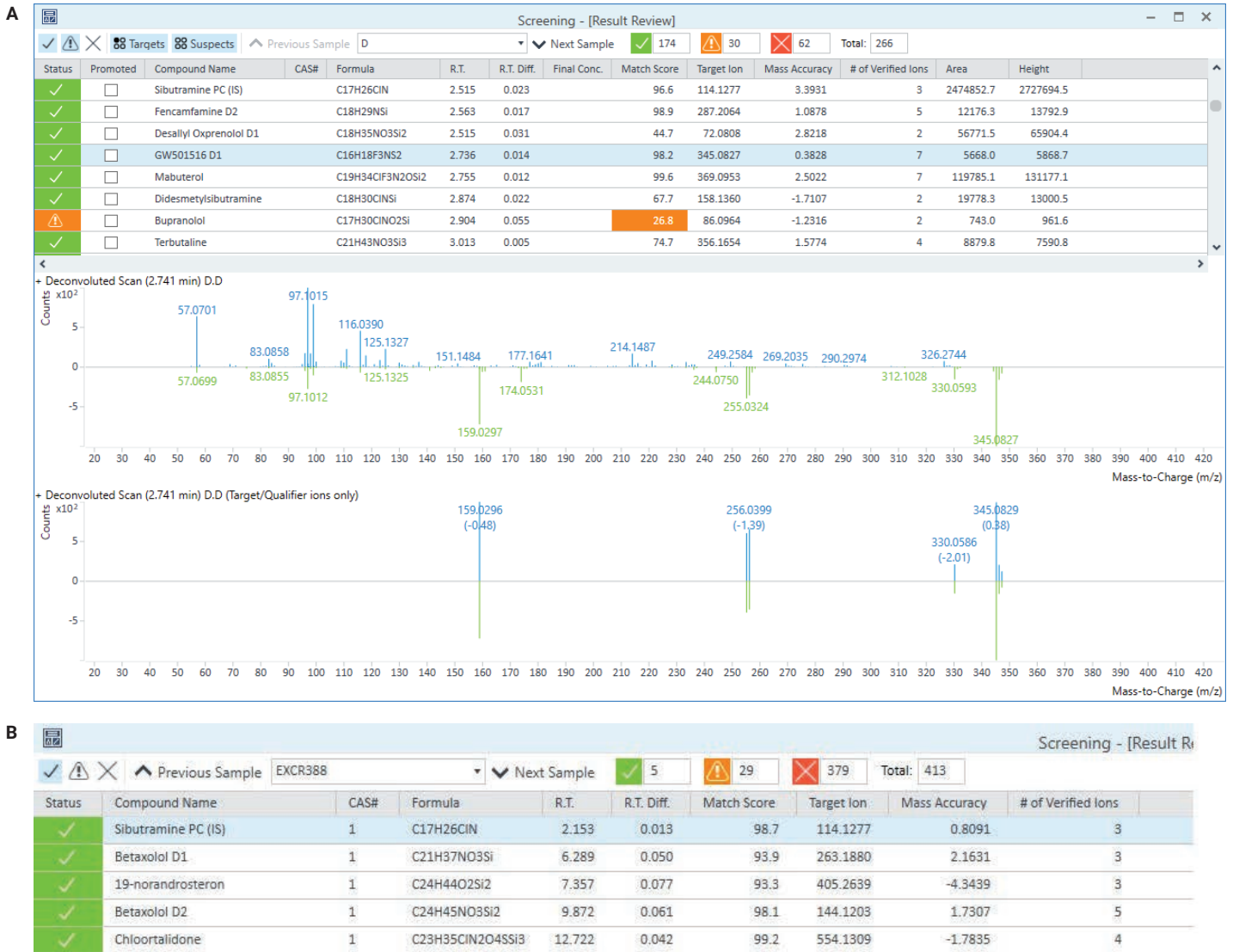


图 8. 筛查程序结果。(A) 汇总窗口使用户可以快速审查需要额外关注的存疑的匹配结果。(B) 含有倍他洛尔 (β 受体阻滞剂)、氯噻酮 (利尿剂) 和 19-去甲雄酮的 EQAS 样品的汇总报告。西布曲明为内标

类固醇的水解葡萄糖醛酸化和非水解硫酸化代谢物的检测

合成代谢雄激素类固醇 (AAS) 是运动兴奋剂检测中最常检测到的化合物^[4, 5]。在兴奋剂检测领域, 鉴定 AAS 的长期硫酸化代谢物具有重要作用, 因为这些代谢物可作为替代标记物, 并可能延长一些 AAS 的可检测时间^[7-9]。为了鉴定非水解硫酸盐, 进行了美睾酮和美替诺龙的排泄研究^[10, 11]。这些类固醇的水解葡萄糖醛酸化代谢物和硫酸化代谢物的特征离子列于表 3 中。

图 9 显示了来自同一个体的美替诺龙硫酸化代谢物 S1 (S-Met-1) 的色谱图示例。

在第 2 天, 仍然可以清楚地观察到该代谢物, 而在第 10 天时已经消失。

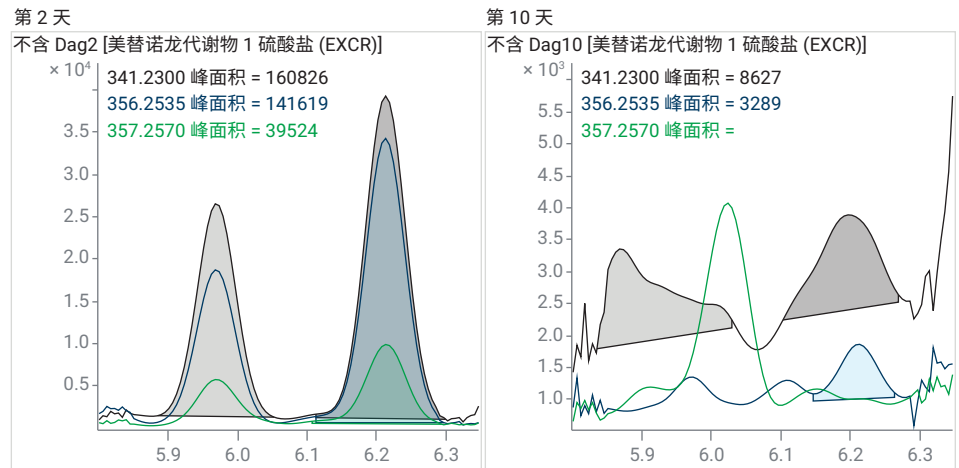


图 9. 不同尿样中的美替诺龙代谢物 S-Met-1

表 3. 美替诺龙和美睾酮硫酸化代谢物的已鉴定离子列表

标记物标签	标记物名称	GC-EI-QTOF-MS			
		RT (min)	离子 1 (m/z)	离子 2 (m/z)	离子 3 (m/z)
美替诺龙					
Met-PC	美替诺龙 (17β-羟基-1-甲基-5α-雄甾-1-烯-3-酮)	11.75	446.3031	208.1278	-
Met-1	3α-羟基-1-亚甲基-5α-雄甾-17-酮	10.19	446.3031	447.3050	-
Met-2	16ζ-羟基-1-甲基-5α-雄甾-1-烯-3,17-二酮	12.83	532.3219	517.2975	-
S-Met-PC	单硫酸美替诺龙	7.52	356.253	266.2029	-
S-Met-1	1-亚甲基-5α-雄甾-17-酮-3α-硫酸盐	6.2	356.2535	357.2571	341.2300
S-Met-2	1-甲基-5α-雄甾-1-烯-3,17-二酮-16ζ-硫酸盐	11.54	444.2874	445.2913	429.264
S-Met-3	1β-甲基-5α-雄甾-17-酮-3ζ-硫酸盐	6.68	358.2686	359.2726	-
美睾酮					
Mest-1	3α-羟基-1α-甲基-5α-雄甾-17-酮	10.34	448.3187	449.3900	-
Mest-2	3,6,16-三羟基-1α-甲基-5α-雄甾-17-酮	12.98	624.3880	610.3684	609.3650
S-Mest-4	1α-甲基-5α-雄甾-17-酮-3α-硫酸盐和 1α-甲基-5α-雄甾-17-酮-3β-硫酸盐	5.81	358.2696	359.2726	-
S-Mest-5	3β,16ζ-二羟基-1α-甲基-5α-雄甾-17-酮的单硫酸盐形式	9.64	446.3031	447.3045	-
S-Mest-6	17ζ,4ζ-二羟基-1α-甲基-5α-雄甾-3-酮的单硫酸盐形式	10.21	446.3031	447.3045	-

美睾酮的一种非水解硫酸化代谢物的精确质量 GC/Q-TOF 谱图如图 10 所示。GC/Q-TOF 在全数据采集模式下具有高灵敏度，并具有精确质量和高分辨的优势，成为筛查这些代谢物的理想工具。在单次运行中可以轻松追踪所有代谢物。

GC/Q-TOF 方法的另一个优势在于，随着不断发现新的代谢物，该方法可以进行回顾性筛查，因为所有数据都是在全谱采集模式下采集的。

美睾酮的排泄研究表明，与传统的水解标记物相比，美睾酮的非水解硫酸化代谢物 S-Mest-4 和 S-Mest-5 的可检测时间大幅延长（图 11）。这有力地证明了在常规兴奋剂检测方法（包括那些基于 GC/TOF 的方法）中添加非水解硫酸化代谢物的优势，即能够在必要时实现高灵敏度。

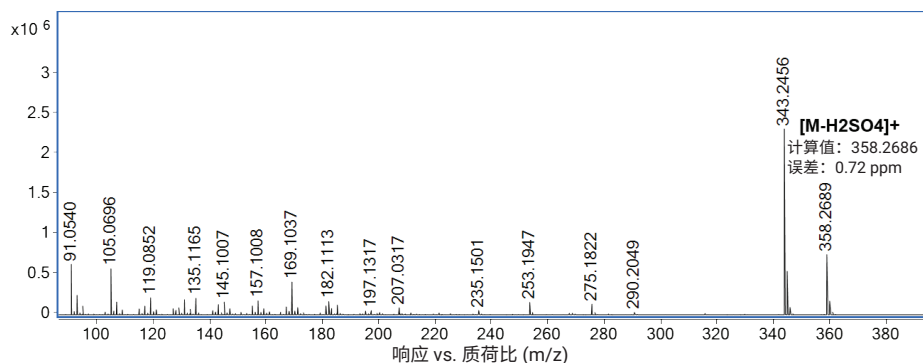


图 10. 美睾酮的非水解硫酸化代谢物 (S-Mest-4) 的精确质量高分辨谱图

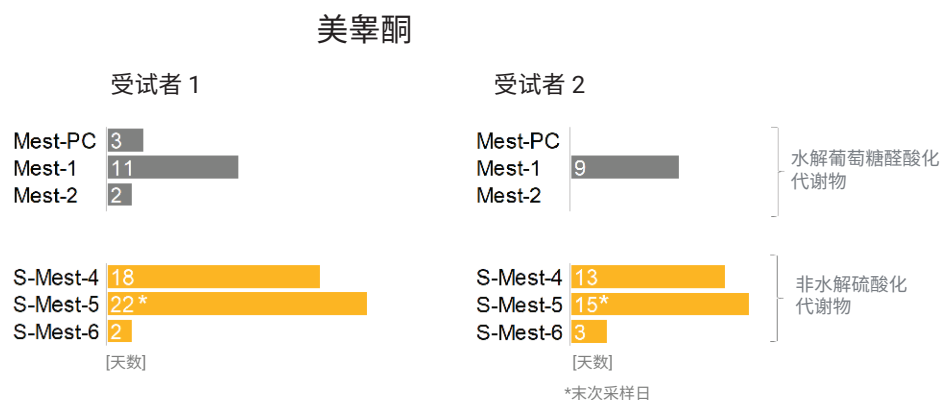


图 11. 两项使用 GC/Q-TOF 分析美睾酮的排泄研究的结果

结论

随着 WADA 禁用物质清单中的化合物不断增加以及 WADA 新规出台，兴奋剂检测领域需要采用创新的工作流程解决方案来满足最新的 WADA 要求。本应用简报介绍了一种全新的工作流程，能够将兴奋剂检测实验室的生产力和效率提升到新的水平。本文提出的完整解决方案重点关注具有回顾性分析潜力的高灵敏度定量和定性分析，并将 GC/Q-TOF 和 GC/TQ 仪器与采用 Agilent AssayMAP Bravo 系统的样品前处理相结合。该解决方案能够显著提高通量（每年可处理 20000 个样品），并且借助 Agilent MassHunter 软件的 GC 筛查功能，使耗时的数据审查过程实现了自动化。此外，本文还讨论了对合成代谢类固醇的硫酸化代谢物的鉴定，以及将此代谢物纳入常规兴奋剂筛查方法中所带来的优势。

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

用于司法鉴定。

RA45170.5273842593

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023
2023 年 9 月 12 日，中国出版
5994-6702ZHCN

参考文献

1. 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
2. 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*, 221–40. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.07.052
3. Stone, P. 等人. New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses (利用新型动态多反应监测模式改善复杂分析的数据质量和三重四极杆的定量结果), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5990-3595EN, **2009**
4. Balcells, G. et al. Detection and Characterization of Clostebol Sulfate Metabolites in Caucasian Population. *J. Chromatogr. B.* **2016**, *1022*, 54–63. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.03.028
5. Albertsdóttir, A. D. et al. Searching for New Long-Term Urinary Metabolites of Metenolone and Drostanolone Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry with a Focus on Non-Hydrolysed Sulfates. *Drug Test Anal.* **2020**, *12(8)*, 1041–1053. DOI: 10.1002/dta.2818
6. Nieto, S. 等人. 使用高分辨 GC/Q-TOF 和农药与环境污染物的扩展精确质量谱库进行污染物筛查, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-1346ZHCN, **2019**
7. World Anti-Doping Agency. **2020**. 2020 Anti-Doping Testing Figures. *World Anti-Doping Agency*. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf
8. World Anti-Doping Agency. **2019**. 2019 Anti-Doping Testing Figures. *World Anti-Doping Agency*. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf
9. World Anti-Doping Agency. **2018**. 2018 Anti-Doping Testing Figures. *World Anti-Doping Agency*. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf
10. Polet, M. et al. Identification and Characterization of Novel Long-Term Metabolites of Oxymesterone and Mesterolone in Human Urine by Application of Selected Reaction Monitoring GC-MS/MS. *Drug Test Anal.* **2017**, *9(11–12)*, 1673–1684. DOI: 10.1002/dta.2183
11. Polet, M. et al. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Non-Hydrolyzed Sulfated Steroids by Degradation Product Formation. *Drug Test Anal.* **2019**, *11(11–12)*, 1656–1665. DOI: 10.1002/dta.2606