

应用质量碎片法 测定人体十一酸睾酮的血药浓度(一)

庞新文 谷月玲 郑江
(浙江大学中心实验室) (浙江医科大学药学系)

[摘要]本文主要讨论在测定人体十一酸睾酮血药浓度前,对仪器的灵敏度、最小检测量、检测线性范围和碎片离子的选择,以及用于内标衍生物的稳定性等问题。借助于质谱仪的多离子检测法(MID),通过反复探索实验条件,采用不同的进样方式,以确保人体十一酸睾酮的血药浓度的准确测定。

近年来,随着有机质谱技术的发展,特别是有机质谱的多种进样方式及多离子检测的特殊功能^[1-3],使有机质谱在生物、药物、临床医学等的应用上日益增新,但未见用直接进样法获得较好定量分析数据的报道。本文讨论用直接进样方法或经简单的衍生化处理能用气相色谱进样,这两种方法可同时得到较满意的结果。用稳定性同位素标记的十一酸睾酮及其衍生物十一酸睾酮七氟丁酯作为内标进行定量,以测定十一酸睾酮在血液中的浓度,研究此药在体内的吸收速度与生理状态的关系。

实验、结果和讨论

仪器

FINNIGAN-4510 质谱计。在用同位素的相对丰度定量时,仪器参数的调整是极其重要的,特别是用做校正样品的高质量碎片(即接近于被检测样品的特征离子),同位素的丰度比必须一定的范围。

仪器的质量标记、灵敏度、分辨率调整

此仪器是低分辨率质谱计,虽具有较高的质量稳定性($\pm 0.05\text{MU}/8\text{hr}$),单位质量分辨率($R=2.5M$)和较高的灵敏度(10^{-9}),但必须调整质量参数,以获取较好的状态。本工作采用全氟三丁胺(FC-43)作标准样品,进行质量标记,其主要特征碎片是 69、131、219、414、502 和 614,对于我们所做的雄激素衍生物样品要求 FC-43 的校正表达到下列指标:

1. 基峰 69 碎片离子强度 >1000 ;

1988年9月29日收

2. 219 碎片的相对丰度为基峰的 50~70%;

3. 69、131、219、414、502 碎片都要有明显的 M+1 同位素峰,特别是 502 峰的 M+1 同位素尤为重要,其相对丰度 502 碎片离子为基峰的 2~4%,而 503 碎片离子强度为基峰的 0.2~0.4%,对于高质量碎片离子 614 峰的相对丰度为基峰的 0.4~0.7%,并且有明显的 615(M+1)和 616(M+2)可观察。

达到上述校正表指标后,就可满足质量标定、灵敏度与分辨率的要求。在每天测试样品前,必须先做一次 FC-43 校正表,不符合时重新调整。

样品

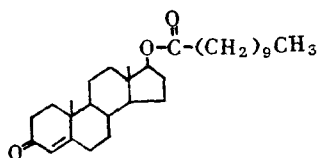
1. 十一酸睾酮及其衍生物(实验室制备);
2. 将样品 1、2 位脱氢后再氘标(自制)。

在保证仪器的正常操作参数前提下,当非常微量的样品被检测时存在着一个突出的问题是仪器的灵敏度是否足够,对此我们采取的方法是尽量避开仪器本底的干扰,选用质荷比较大的碎片离子进行多离子检测,这样将大大提高碎片离子的强度。但选用那些碎片,这些碎片在不同的进样方式下又有什么行为,在这方面做了大量的工作。

(一)直接进样

在直接进样过程中,我们研究的样品是十一酸睾酮和十一酸酮七氟丁酯,现分别加以讨论。

1. 十一酸睾酮



此样品不易气化,其质谱图见图 1。

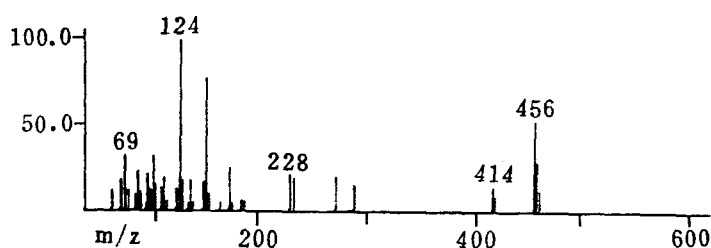


图 1 十一酸睾酮的质谱图

离子源温度 100℃(指示刻度),扫描范围 60~550,电子倍增器电压 1100V,电子能量 70eV,程序升温(初温 100℃、终温 320℃、速率 60°/分),灯丝发射电流 0.23 毫安,扫描时间 2 秒,电离方式电子轰击源(EI),出峰温度 230℃~250℃。

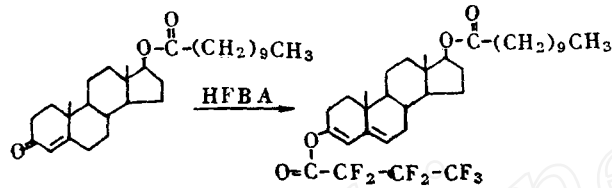
从图 1 中可看出该化合物在 EI 源中具有较强的分子离子峰(m/z 456),并具有明显的 M+1 与 M+2 同位素峰,但随着进样量的差异,发现此样品在一定的进样量范围内随进样量的增加同位素丰度比有增大之势,见表 1。

表 1 不同进样量实验数据

进 样 量 μg	实 验 次 数	丰 度		相对丰度	相对偏差
		M(456)	M+1(457)	$\frac{M+1}{M+M+1}$	%
0.2	1	301	80	0.208	3.452
	2	285	72	0.2	0.439
	3	355	85	0.194	3.482
0.5	1	471	131	0.216	2.703
	2	911	271	0.230	3.6
	3	710	199	0.218	1.802
1	1	1312	412	0.239	0.844
	2	1054	320	0.233	1.688
	3	1220	383	0.240	1.266
5	1	3848	1312	0.249	1.190
	2	1332	1118	0.251	0.397
	3	1556	1216	0.255	1.190
10	1	3448	1146	0.250	1.161
	2	3056	1040	0.254	0.392
	3	3140	1112	0.262	1.745

从表 1 看出,当进样量较小时,由于所得到的同位素丰度随之减小,所以实验相对偏差增大,故在测定血液中药含量本底丰度时,为了尽可能的减少仪器本底的干扰以及降低随着进样量的差异所引起的相对丰度变化,本底丰度不应取常数,需在每次测定血样中的药物之前,先做一次非标记药物的本底丰度,作为计算血样中药物的基础。从图 1 还可看出,由于该化合物的分子离子峰仅为基峰的 60%左右,为了提高分子离子峰的强度,降低实验误差,所以我们又研究了下一种样品。

2. 十一酸睾酮七氟丁酯:



此样品是十一酸睾酮和七氟丁酯(HFBA)的衍生物。其质谱图见图 2,3。

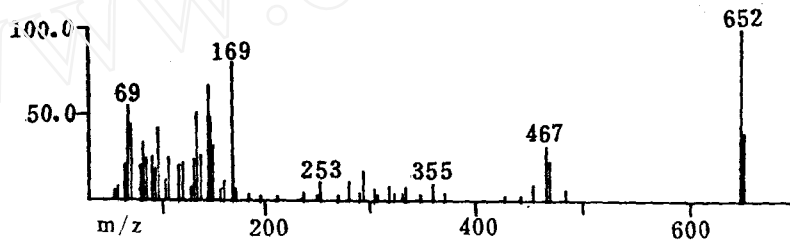


图 2 十一酸睾酮七氟丁酯质谱图

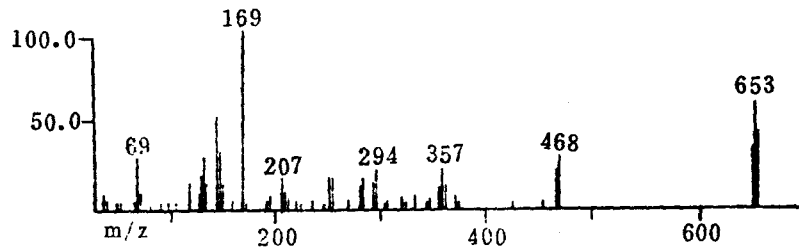


图 3 氘标的十一酸睾酮七氟丁酯质谱图

电离方式电子轰击源(EI),离子源温度 100℃(指示刻度),扫描范围 60~700,扫描时间 2 秒,电子能量 70eV,灯丝发射电流 0.23 毫安,程序升温(初温 60℃,终温 300℃,速率 60℃/分),电子倍增器电压 1100V,出峰温度 190~220℃。

表 2 MID 测得的实验数据

样品	实验	丰度		相对丰度	相对偏差
		M(652)	M+1(653)	$\frac{M+1}{M+M+1}$	
未标	1	31988	10098	0.240	2.028
	2	29879	9063	0.233	0.851
	3	30412	9153	0.232	1.277
氘标	1	5688	17920	0.759	1.42
	2	4608	14944	0.764	2.09
	3	4950	12876	0.722	3.48

从图 2 可看出该化合物的分子离子峰为基峰,而氘标后的分子离子峰也具有较大的强度,这就有利于用同位素丰度比定量。表 2 是当进样量为 0.01 μg 时,用多离子检测(MID)法测得该化合物的未标记和用氘标实验数据。

由于未标记的十一酸七氟丁酯的分子离子峰为基峰,所以由表 2 的数据可看出它的同位素丰度比的相对偏差略小于用氘标的同位素丰度比。

为了探索样品分离情况,我们还采用了第二种进样方式。

(二)气相色谱(GC)进样

色谱条件:注射器温度 260 $^{\circ}\text{C}$,分离器温度 270 $^{\circ}\text{C}$,色谱柱 SE-54 弹性毛细管柱,柱长 30 米。

质谱条件:同前。

对于此种进样方式必须将样品制成易挥发的衍生物,所以选用的样品是十一酸鞣七氟丁酯,当进样量分别为 0.001,0.01 和 0.02 μg 时采用 MID 测得的标记化合物数据见表 3。

表 3 MID 法测得标记化合物数据

进样量 μg	实 验 次 数	丰 度		相对丰度	相对偏差 %
		M 653	M+1 654	$\frac{M+1}{M+M+1}$	
0.001	1	624	802	0.562	1.45
	2	752	880	0.539	2.71
	3	762	918	0.546	0.99
	4	553	629	0.532	4.00
	5	662	778	0.540	2.57
0.01	1	7640	8768	0.534	2.61
	2	6136	8089	0.568	3.59
	3	7672	9280	0.547	0.24
	4	6504	7672	0.541	1.37
	5	5464	6392	0.539	1.75
0.02	1	13216	15904	0.546	0.42
	2	15376	18912	0.552	0.53
	3	14096	18560	0.568	3.57
	4	11168	12976	0.537	2.06
	5	10304	12720	0.553	0.69

由上可见,二种进样方法其相对偏差都能达到较为满意的结果。但由于 GC 进样受到各种条件的限制,尤其是密封垫在高温下老化剧烈增加,从而造成仪器严重漏气,无法工作,须经常更换。另一方面由于衍生物十一酸鞣七氟丁酯具有烯醇式结构,所以样品稳

定性较差,若将样品暴露在空气中一段时间(约 1.5 小时)后,实验数据重复性较差。在实验过程中数据处理采用质量色谱图(图 4)。

从以上的实验数据(表 1、3)可看出最小检测量和相对偏差分别为 $0.1\sim 1\mu$ 及 $0.4\sim 4\%$ 。这就为测定人体血液中雄激素的研究提供了可靠的依据,并能直接展现随时间的变化人体对睾酮的吸收情况。

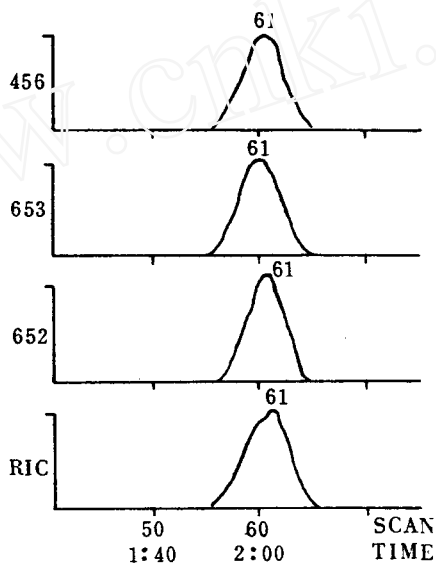


图 4 十一酸睾酮的质量碎片图

参 考 文 献

- [1] Breuer, H. and Siekmann, L., J. Steroid Biochem. 6, 685(1975)
- [2] Nieschlay, E., Mauss, J., Coert, A. and Kicovic, P., Acta Endocrinol., 79, 366(1975)
- [3] J. R. Chapman and E. Bailey, J. Chromatopr., Vol. 89, 215~224(1974)

Application of Mass Fragmentography to Assay Testosterone Undecanoate in Human Serum (1)

Pang Xinwen Gu Yueling

(Central Laboratory, Zhejiang University)

Zheng Jiang

(Department of Pharmacy, Zhejiang Medical University)

Received 29, Sep. 1988

Abstract

This paper deals with the necessary conditions—the minimum detectable quantity, the detectable linear range, the choice of fragmentary ions and the stability of derivatives for internal standards before the determination of Testosterone Undecanoate (T. U) in serum. The different conditions of mass spectra for multiple ion detection (MID) were established by direct injection and GC sampling. The both methods of sampling have got satisfactory results.