

# 内源性甾体激素 GC/MS 分析中 酮基衍生规律的研究

李 慧<sup>1,2</sup>, 付玉娟<sup>1</sup>, 焦丽丽<sup>1</sup>, 刘淑莹<sup>1,2</sup>, 宋凤瑞<sup>2</sup>, 吴 巍<sup>1</sup>

(1. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117;

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

**摘要:**本实验以甲氧胺(MOX)和 *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA)为衍生化试剂,采用脲化-硅烷化方法对 12 种内源性甾体激素进行衍生,通过 GC/MS 解析鉴定衍生产物结构,研究甾体激素的衍生规律。结果表明,脲化-硅烷化反应可以提高甾体激素的信号,但孕酮(P)、雄烯二酮(ASD)、雌酮(E1)、睾酮(T)、皮质甾酮(B)、可的松(E)受共轭结构影响,产生多种同分异构体。 $[M-31]^+$  和  $[M-15]^+$ ,  $[M-90]^+$  和  $[M-72]^+$  可分别作为脲化和硅烷化反应的鉴定依据。在 80 °C, 加热 40 min, 酮基与 MOX 的摩尔比为 1 : 20 是脲化反应的最佳条件。采用单反应离子检测(SRM)模式,衍生后甾体激素的检测灵敏度可达 1  $\mu\text{g/L}$ , 线性范围为 1~200  $\mu\text{g/L}$ 。该方法可为相关激素类成分的分析提供检测技术支持。

**关键词:**气相色谱-质谱法(GC/MS); 甾体激素; 酮基; 衍生

中图分类号: O657. 63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2019)06-0499-11

doi: 10. 7538/zpzb. 2018. 0157

## Study on the Keto Groups Derivatization of Endogenous Steroid Hormones with GC/MS

LI Hui<sup>1,2</sup>, FU Yu-juan<sup>2</sup>, JIAO Li-li<sup>1</sup>, LIU Shu-ying<sup>1,2</sup>, SONG Feng-rui<sup>2</sup>, WU Wei<sup>1</sup>

(1. *Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;*

2. *Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China*)

**Abstract:** Steroid hormones are a kind of aliphatic hydrocarbon compounds. They are synthesized in central or peripheral nervous system which are considered as potential biomarkers. High sensitivity method was required for steroid hormones detection for their poor responses and low physiological concentrations. Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) combined with pre-column derivatization is commonly used in detection of compounds such as steroid hormones. In this work, derivation of oximation conditions were studied based on 12 steroid hormones. Oximation-silylation method was

收稿日期: 2018-12-12; 修回日期: 2019-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81873193); 吉林省科技发展计划项目(20180520062JH); 吉林省中医药科技项目(2018DZ01); 吉林省教育厅项目(JJKH20190473KJ)资助

作者简介: 李 慧(1984—), 女(汉族), 辽宁大连人, 助理研究员, 从事质谱分析技术研究。E-mail: lihuiterisa@163.com

通信作者: 吴 巍(1974—), 女(汉族), 吉林通化人, 研究员, 从事质谱分析技术研究。E-mail: weiwu\_ccucm@126.com

applied for the derivatization of dehydroepiandrosterone (DHEA), dihydrotestosterone (DHT), androsterone (ADL), epiandrosterone (Epian), pregnenolone (Preg), testosterone (T), estrone (E1), androstenedione (ASD), corticosterone (B), cortisone (E), progesterone (P) and allopregnanolone (AP). Twelve endogenous steroid hormones were processed with methoxyamine (MOX) and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilane) trifluoroacetamide (MSTFA). Oximation-silylation reactions were carried out on ketone group and hydroxyl group separately which could avoid enolate reaction of ketone group. When processed with MOX, characteristic peaks of  $[M-31]^+$  and  $[M-15]^+$  were observed in the electron bombardment (electron-impact, EI) mass spectra, mainly due to the loss of  $[-OCH_3]$  and  $[-CH_3]$  groups. Therefore peaks of  $[M-31]^+$  and  $[M-15]^+$  could be considered as the identification for ketoximation. At the same time, characteristic peaks of  $[M-73]^+$ ,  $[M-90]^+$  due to the loss of  $[-Si(CH_3)_3]$  or  $[-O-Si(CH_3)_3]$  groups from  $[M]^+$  were observed when steroid hormones were further silylated with MSTFA. Peaks of  $[M-73]^+$  and  $[M-90]^+$  could be considered as the basis for hydroxysilylation. Preg, DHEA, AP, ADL, Epian, DHT generated single derivatization with good peak shape. For the existence of conjugated groups in P, ASD and T structures, isomer products generated after derivatization. The ion peak shape was poor and noise was high. For B, and E six derivatives were observed in each derivatives after reaction. Then oximation conditions for endogenous steroid hormones were optimized. GC/MS detection method was obtained after optimization at 80 °C for 40 min with the molar ratio of ketone group to MOX 1 : 20. With selective reaction monitoring mode (SRM), the detection sensitivity level could achieve to 1  $\mu\text{g/L}$ , and the linear range was 1-200  $\mu\text{g/L}$ . When processed with oximation and silylation, the response values of steroid hormones were greatly improved. GC/MS detection with oximation-silylation is suitable for the detection of steroid hormones without conjugated groups. This study can provide a detection method for the analysis of related hormonal components.

**Key words:** gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS); steroid hormone; ketone group; derivatization

甾体激素 (steroid hormones) 又称类固醇激素, 是一类四环脂肪烃化合物, 在中枢或周围神经系统中合成, 被认为是潜在的生物标记物, 在抗炎、免疫调节、调节性功能、促进机体发育等方面具有重要作用<sup>[1-2]</sup>。甾体激素的含量极低, 检测响应值低, 直接检测难度较大, 对检测手段的灵敏度要求较高, 是医疗、环境、畜牧业等领域研究的热点和难点<sup>[3]</sup>。

甾体激素的检测常采用气相色谱-质谱法 (GC/MS), 该方法的灵敏度高, 可实现多种成分同时检测<sup>[4-7]</sup>。GC/MS 应用于甾体激素检测时常需要对酮基和羟基进行衍生来提高样品的挥发性, 而酮基不含氢原子, 是衍生反应的难点。

通常, 酮基的衍生有烯醇化和肟化两种方法, 其中烯醇化的产物稳定性较差, 应用范围有限<sup>[8-10]</sup>; 肟化反应是将酮基在一定条件下与羟胺类物质进行亲核加成反应, 生成肟类物质, 产物稳定性较好, 同时 *N*-的加成能够提高样品的信号强度。虽然肟化反应应用较早<sup>[11-12]</sup>, 但是对甾体激素酮基肟化反应的研究报道较少。甾体激素结构复杂, 同系物多, 在衍生过程中易产生异构化, 衍生条件对衍生效果有较大影响<sup>[13]</sup>。因此, 研究甾体激素的衍生过程具有重要意义。

本工作以 12 种内源性甾体激素为研究对象, 以甲氧胺 (methoxyammonium chloride, MOX) 和 *N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷) 三氟乙酰胺 (*N*-

methyl-*N*-trimethylsilyl trifluoroacetamide, MSTFA) 为衍生化试剂,研究其脲化规律。通过 GC/MS 鉴定衍生物结构,推测衍生反应过程,考察衍生反应条件,希望能够建立一种甾体激素的 GC/MS 分析方法,为内源性甾体激素的 GC/MS 分析提供理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

TRACE1310 气相色谱仪,TSQ 8000 三重四极杆质谱仪:美国 Thermo 公司产品;MTN-2800D 氮吹浓缩装置:天津奥特赛斯仪器有限公司产品;SQP 电子分析天平:北京赛多利斯科学仪器有限公司产品;H-2 BLENDER 涡旋混合器:上海精胜仪器有限公司产品;HB120-S 金属浴:上海赛伯乐仪器有限公司产品。

脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA)、双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT)、雄酮 (Androsterone, ADL) 对照品:均为上海源叶生物科技有限公司产品;表雄酮 (epiandrosterone, Epian)、孕烯醇酮 (pregnenolone, Preg) 对照品:均为北京百灵威科技有限公司产品;睾酮 (testosterone, T)、雌酮 (estrone, E1)、雄烯二酮 (androstenedione, ASD) 对照品:均为德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司产品;皮质甾酮 (corticosterone, B)、可的松 (cortisone, E) 对照品:均为梯希爱化成工业发展有限公司产品;孕酮 (progesterone, P) 对照品:由中国食品药品检定研究院提供;别孕烯醇酮 (Allopregnanolone, AP) 对照品:加拿大 TRC 公司产品。

二氯甲烷 (色谱纯):美国 J. T. Baker 公司产品;甲氧胺盐酸盐:梯希爱化成工业发展有限公司产品;*N*-甲基-*N*-三甲基硅基三氟乙酰胺:北京百灵威科技有限公司产品;甲醇 (色谱纯):美国 Tedia 公司产品。

### 1.2 实验过程

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱:Supelco SPBTM-5 (15 m×0.53 mm×0.5 μm);载气为 99.999% 高纯 N<sub>2</sub>,流速 1 mL/min;升温程序:初始柱温 50 °C,以 10 °C/min 升至 200 °C,然后以 5 °C/min 升至 245 °C,保持 5 min,再以 1.5 °C/min 升至 248 °C,保持 1 min;进样方式及进样量:全扫描模式下分流比为 20 : 1,MRM 检测模式下不分

流进样,进样量 1 μL。

**1.2.2 质谱条件** EI 离子源;MS 传输管温度 280 °C;离子源温度 280 °C。从 5 min 起检测,采用全扫描 (Full Scan) 模式鉴定衍生物结构,质量扫描范围  $m/z$  50~800,定量分析时采用单反应离子检测 (selective reaction monitoring mode, SRM) 模式。

**1.2.3 样品的衍生化方法** 采用脲化结合硅烷化处理甾体激素。精密称定各 1 mg 12 种标准对照品,用甲醇溶解后,精密量取 100 μL,加入 MOX 的甲醇溶液,置于金属浴中避光进行脲化反应,氮气吹干。在脲化反应瓶中加入 120 μL MSTFA,涡旋混合,置于 70 °C 金属浴中避光 30 min 进行硅烷化反应,再次氮气吹干,加入 1 mL 二氯甲烷涡旋复溶,过滤后待检测。

**1.2.4 衍生条件的优化** 为获得最佳的衍生条件,本实验对脲化反应过程中的衍生温度、衍生化试剂用量和衍生时间等因素进行了考察。

**衍生温度:**取 100 μL 浓度均为 1 g/L 的标准溶液,加入 50 μL 10 g/L 的 MOX 甲醇溶液,分别在 25、40、60、80、100 °C 下衍生 30 min;氮气吹干后,加入 200 μL MSTFA,于 70 °C 反应 30 min,再次氮气吹干,用 1 mL 二氯甲烷复溶,过滤,进样。

**衍生化试剂用量:**取 100 μL 浓度为 1 g/L 的标准溶液,分别加入 30、50、60、70、80 μL 浓度为 10 g/L 的 MOX 甲醇溶液,使 MOX 与酮基的比例分别为:10 : 1, 16 : 1, 20 : 1, 23 : 1 和 27 : 1,在 80 °C 下反应 30 min;氮气吹干后,加入 200 μL MSTFA,于 70 °C 下反应 30 min,用二氯甲烷复溶,过滤,进样。

**衍生时间:**取 100 μL 1 g/L 的 DHEA 溶液,加入 60 μL MOX 溶液,于 80 °C 下分别反应 30、40、50、60 min 后,氮气吹干,再加入 200 μL MSTFA,于 70 °C 反应 30 min,再次氮气吹干,用二氯甲烷复溶,过滤,进样。

## 2 结果与讨论

### 2.1 甾体激素衍生物的质谱分析方法

脲化-硅烷化可以改变羟基和羰基的极性,提高样品的挥发性。本实验通过脲化-硅烷化两步反应对甾体激素进行衍生,脲化-硅烷化反应的结构通式示于图 1。

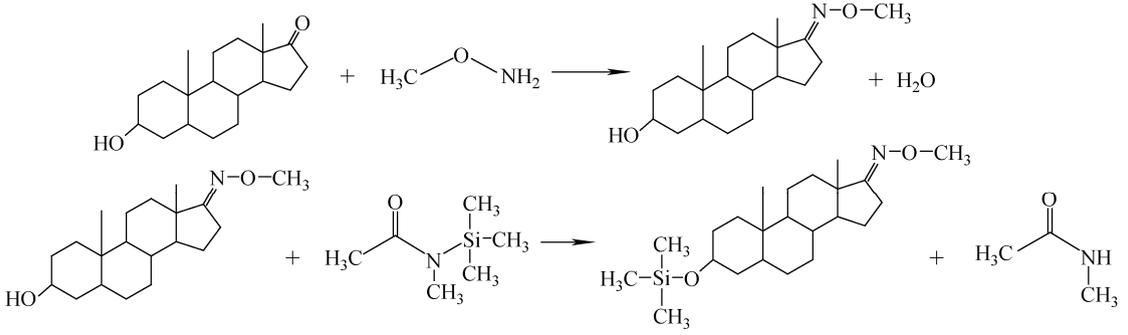


图1 甾体激素衍生反应结构通式

Fig. 1 Reaction formula of Steroids with MOX and MSTFA

结合 GC/MS 图谱中提供的碎片离子信息对衍生物的结构进行鉴定,以 Epian 为例, Epian 的分子质量为 290 u,在 C3 位和 C17 位分别存在  $-\text{OH}$  和  $=\text{O}$ ,可能发生硅烷化(TMS $-\text{O}$ )和肟化反应(MO $-\text{O}$ )。质谱图中检测到  $m/z$  391.42 质谱峰,比原分子质量增加了 101 u,当酮基和羟基发生肟化和硅烷化后,比原分子质量增加了(29+72) u。结合 Epian 结构,推测  $m/z$  391.42 可能为酮基和羟基发生衍生后的产物 MO-TMS-Epian。[M-15] $^+$ 和 [M-31] $^+$ 碎片离子为 MO-TMS-Epian 分别丢失  $-\text{CH}_3$  和  $-\text{O}-\text{CH}_3$  产生的。[M-91] $^+$ 为 MO-TMS-Epian 丢失  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  产生的碎片离子,[M-121] $^+$ 为 MO-TMS-Epian 丢失

$-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  和  $-\text{O}-\text{CH}_3$  产生的碎片离子, $m/z$  73 为丢失  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  的碎片离子。综合以上信息,可以得出 Epian 的衍生物结构为发生一分子肟化和一分子硅烷化反应后的产物 MO-TMS-Epian,其碎片离子及质谱裂解途径示于图 2。

## 2.2 甾体激素衍生物的质谱分析

采用 1.2.2 节方法对 12 种甾体激素进行衍生反应,得到甾体激素衍生产物的色谱图和质谱图,示于图 3。Preg(图 3a)、DHEA(图 3b)、AP(图 3c)、ADL(图 3d)、DHT(图 3e)和 Epian(图 3f)的总离子流色谱图中均只出现一个色谱峰,基线平整、峰形较好、待测物响应信号强,表明上述 6 种化合物经衍生后均得到一种衍生

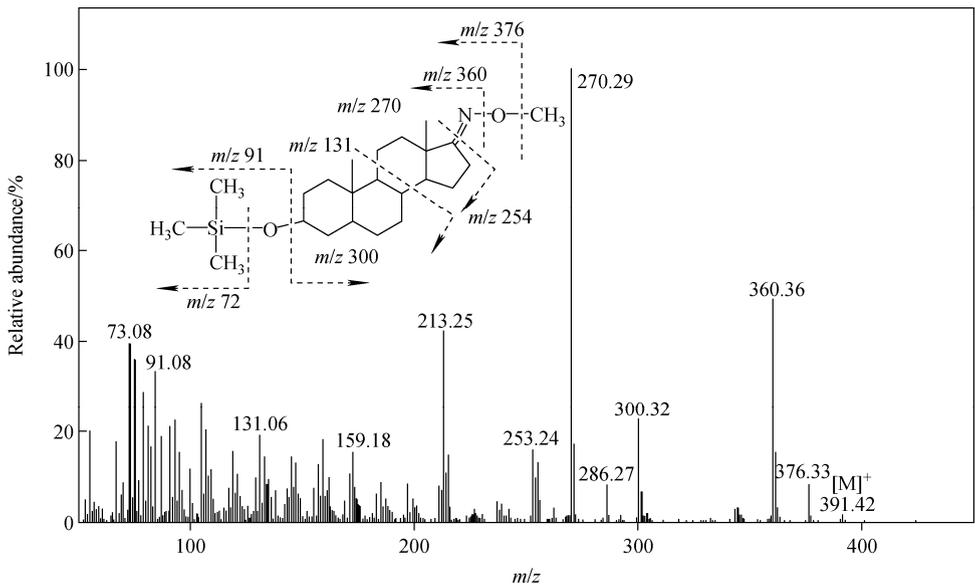
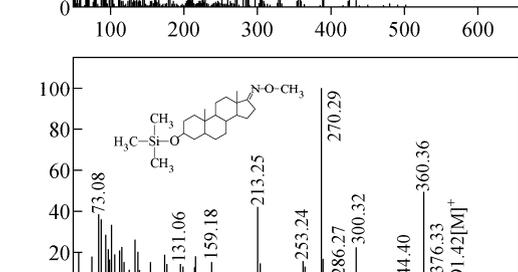
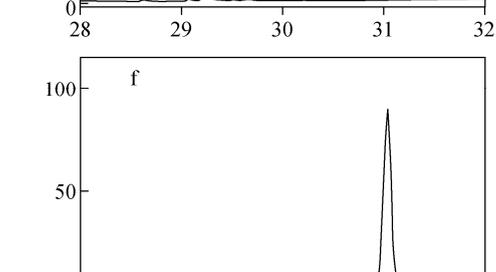
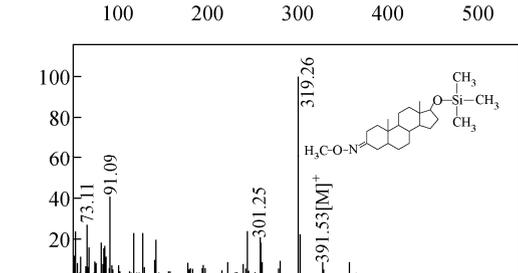
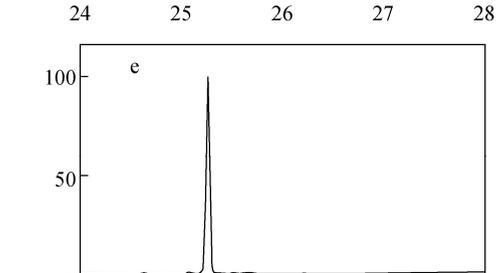
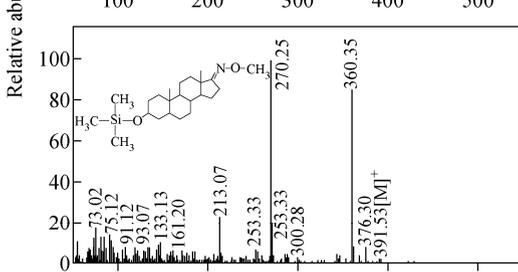
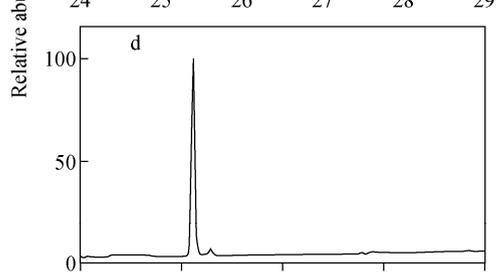
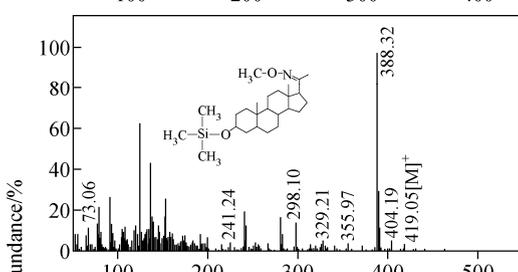
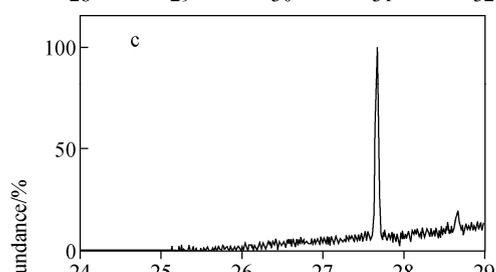
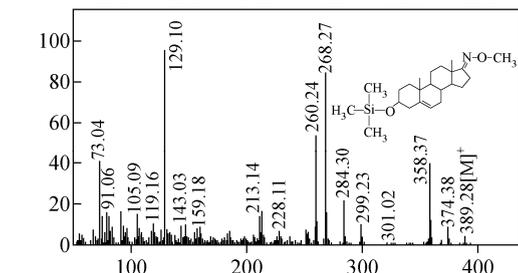
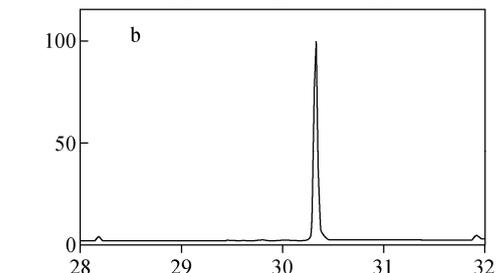
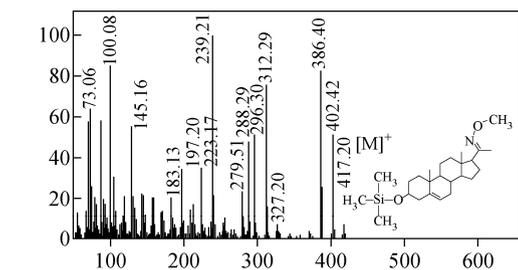
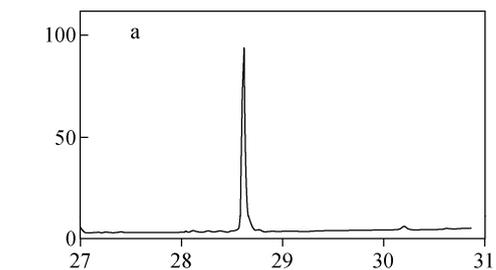
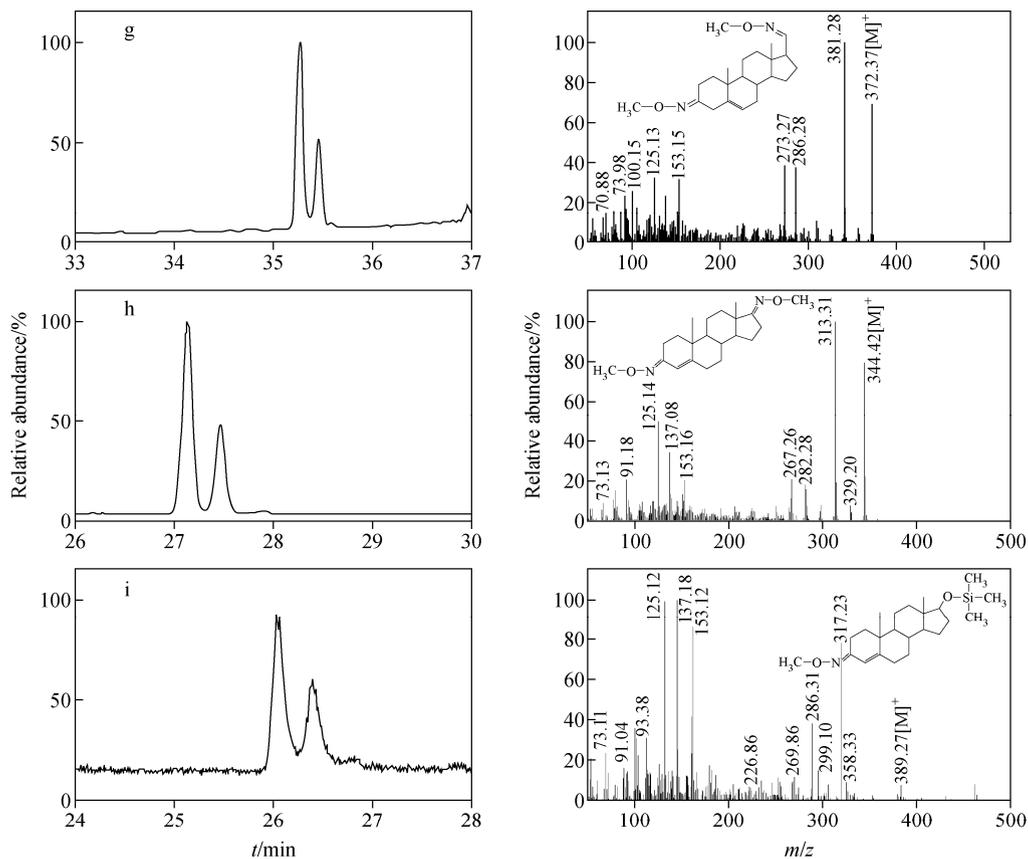


图2 Epian 衍生产物(MO-TMS-Epian)的碎片离子及质谱裂解途径

Fig. 2 Fragment ions and fragmentation pathways of derived Epian (MO-TMS-Epian)





注: a. Preg; b. DHEA; c. AP; d. ADL; e. DHT; f. Epian; g. P; h. ASD; i. T

图 3 甾体激素衍生物的总离子流图和碎片离子峰

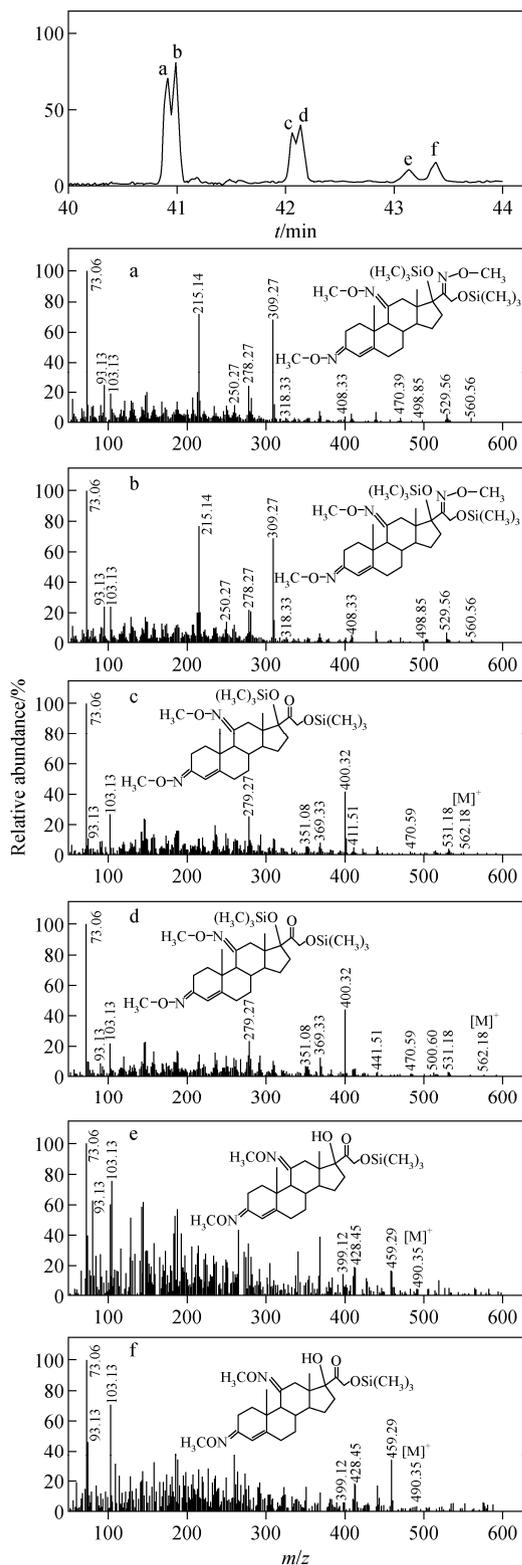
Fig. 3 Total ion chromatograms and fragment ions of steroid hormone derivatives

产物。6种甾体激素中均存在羟基和酮基结构,在质谱图中均检测到 $[M+29+72]^+$ 质谱峰,表明衍生产物为羟基和酮基分别发生脞化和硅烷化。同样,在质谱图中观测到 $[M-15]^+$ 、 $[M-31]^+$ 、 $[M-73]^+$ 、 $[M-90]^+$ 的质谱峰,分别为脞化后和硅烷化后的特征峰,进一步确定其为脞化和硅烷化的产物。因此,上述6种甾体激素的酮基和羟基均发生衍生反应,衍生效果较好。

P(图3g)、ASD(图3h)、T(图3i)甾体激素的总离子流色谱图中出现2个色谱峰。在质谱图中同样观测到 $[M-15]^+$ 、 $[M-31]^+$ 、 $[M-73]^+$ 、 $[M-90]^+$ 的碎片离子峰,表明它们也发生了脞化和硅烷化反应,分别生成 biMO-P、biMO-ASD、MO-TMS-T。三种化合物产生的衍生产物的碎片离子峰相同,它们各自的衍生产物为同分异构体。通过对比这3种甾体激素发现,其结构中均存在共轭双键,该类化合物在

与氮亲核试剂发生加成反应时,酮基中的 $\pi$ 电子被拉向氧原子,酮基中的碳是缺电子中心,亲核试剂从空间阻碍小的酮基平面上面或下面进攻碳原子,与酮基加成生成产物<sup>[5]</sup>,脱水后形成含有碳氮双键的脞化产物。氮与酮基的碳生成碳氮双键会影响几何异构的现象,形成顺反异构体,所以在总离子流色谱图中出现双峰,同时总离子流色谱图中基线噪音较大,待测物信号较弱。

除上述9种甾体激素外,还有3种甾体E、B和E1相对复杂。E结构中含有3个酮基,2个羟基,结构最复杂,理论上可以分别发生脞化和硅烷化反应,同时酮基与苯环上的双键形成共轭结构。在E衍生产物的总离子流图中检测到6种衍生产物,示于图4。色谱峰a和b的质谱峰碎片相同,为同分异构体(图4a和图4b)。图4a中检测到了连续失去碎片 $-OCH_3$ 的 $m/z$  560、529、498和 $m/z$  470、439、



注: a. triMO-biTMS-E; b. triMO-biTMS-E; c. biMO-biTMS-E; d. biMO-biTMS-E; e. biMO-TMS-E; f. biMO-TMS-E

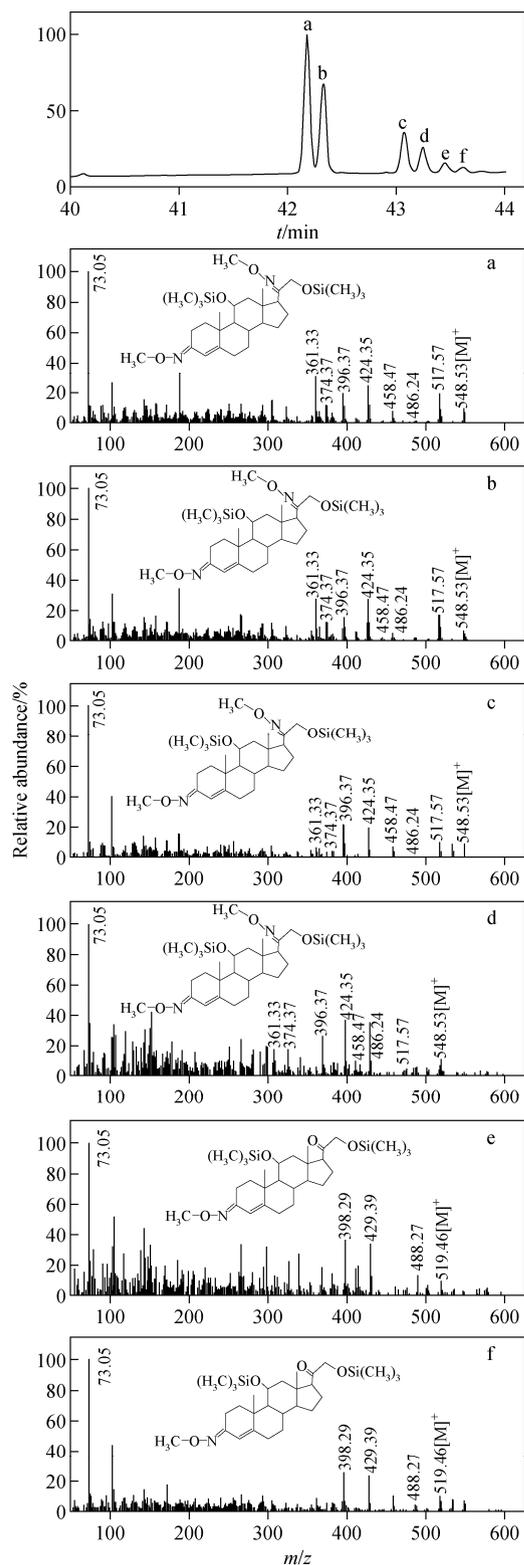
图4 甾体激素E衍生物的总离子流图和碎片离子峰

Fig. 4 Total ion chromatograms and fragment ions of steroid bormone E derivatives

408、377 碎片离子,表明衍生结构中存在 3 个脞化基团,即 3 个酮基均被衍生,即  $t_R$  为 40.92 min 的这对同分异构体是 E 中 3 个酮基和 2 个羟基完全衍生后的产物 triMO-biTMS-E。衍生后其分子质量为 591 u,但在总离子流图中并未检测到  $m/z$  591 质谱峰,表明衍生产物不稳定,发生了裂解。 $t_R$  为 42.06、42.14 min 的 2 个衍生产物具有相同的碎片离子,在质谱图中均检测到  $m/z$  562 质谱峰,表明二者是同分异构体,示于图 4c、4d。 $m/z$  531 是衍生产物失去一个  $-OCH_3$  基团产生的碎片,同时质谱图中出现  $m/z$  441、351 质谱峰,表明其中含有 2 个硅烷化基团。结合 E 的结构,推测  $t_R$  为 42.06、42.14 min 的 2 个衍生产物为 2 个酮基和 2 个羟基发生衍生后的产物 biMO-biTMS-E,而由于空间位阻的存在,推测其发生脞化反应部位为 C3 和 C11 位连接的酮基。 $t_R$  为 43.14、43.39 min 的化合物是一对同分异构体(图 4e 和图 4f),其母离子为  $m/z$  490.13,在质谱图中检测到  $m/z$  459、428、399 质谱峰,证实了衍生产物 biMO-TMS-E 是 2 个酮基和 1 个羟基分别发生脞化和硅烷化反应得到的。同样,由于受空间位阻的影响,推测衍生产物的结构式示于图 4e、4f。

B 结构中含有 2 个酮基、2 个羟基,酮基与苯环存在共轭结构,共检测到 6 种衍生产物,标记为 a~f,示于图 5。B 结构中存在共轭结构,且质谱图 5a、5b、5c、5d 中母离子均为  $m/z$  548,比原分子质量增加了 202 u,表明衍生产物均为 biTMS-biMO-B,这 4 种化合物为同分异构体( $t_R$  分别为 42.17、42.32、43.07、43.18 min)。图 5e 和图 5f 中分子离子峰为 519 u,表明  $t_R$  为 43.37、43.62 min 的化合物为 MO-biTMS-B。

E1 结构中含有 1 个酚羟基及 1 个酮基,可以分别发生脞化和硅烷化反应,在 E1 的衍生产物总离子流色谱图中出现 2 个色谱峰,示于图 6,其中图 6a 中母离子  $m/z$  371 比衍生前的分子质量增加 101 u,同时质谱图中出现  $[M-31]^+$ 、 $[M-72]^+$  峰,表明图 6a 为脞化-硅烷化 E1,即 MO-TMS-E1。图 6b 中母离子  $m/z$  299 (  $t_R$  为 26.01 min) 比衍生前的分子质量增加 29 u,同时质谱图中出现  $[M-31]^+$  峰,表明图 6b

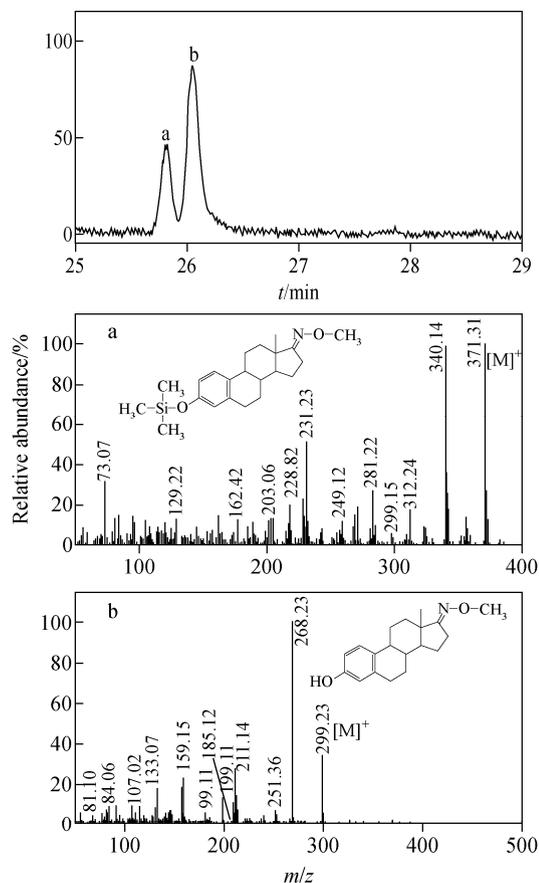


注: a. biMO-biTMS-B; b. biMO-biTMS-B; c. biMO-biTMS-B;  
d. biMO-biTMS-B; e. MO-biTMS-B; f. MO-biTMS-B

图5 甾体激素B衍生物的总离子流图和碎片离子峰

Fig. 5 Total ion chromatograms and fragment ions of steroid hormone B derivatives

为脞化产物 MO-E1,二者提取离子流峰面积比值为 0.69 : 1,表明 E1 结构中的酮基由于受到苯环的吸电子作用,不易发生硅烷化反应。



注: a. MO-TMS-E1; b. MO-E1

图6 甾体激素E1衍生物的总离子流图和碎片离子峰

Fig. 6 Total ion chromatograms and fragment ions of E1 steroid hormone derivatives

甾体激素的结构复杂,衍生反应后产物较多,衍生产物的总离子流图中均未能检测到原型化合物。通过对衍生产物的研究发现,所有硅烷化产物均生成  $m/z$  73 碎片离子,该离子是三甲基硅烷衍生化后丢失的典型碎片— $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,可以作为硅烷化衍生产物的鉴定依据,同时出现  $[\text{M}-91]^+$  峰。衍生物质谱图中产生  $[\text{M}-31]^+$  碎片离子,是丢失 1 个甲氧基产生的。在脞化-硅烷化产物中产生的  $m/z$  73 碎片离子及  $[\text{M}-31]^+$  碎片离子可以作为甾体激素脞化-硅烷化后衍生产物的鉴定依据。

### 2.3 衍生条件的考察

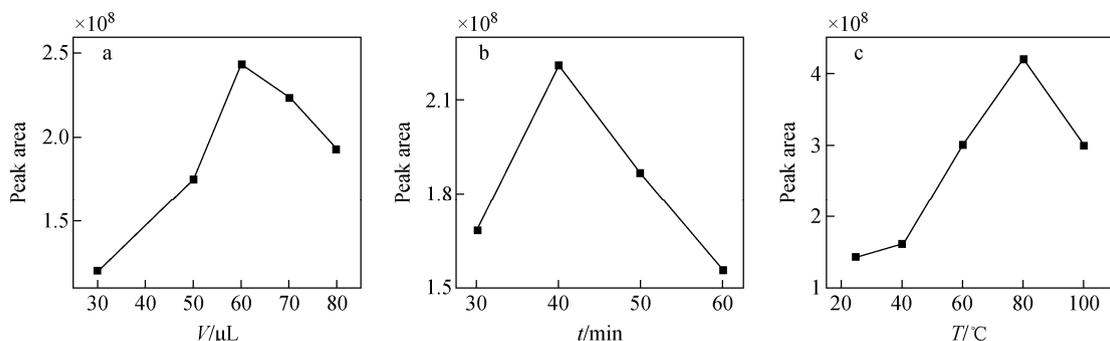
为获得最佳的衍生条件,以 DHEA 为例,对衍生过程中关键的脎化反应衍生温度、反应时间、衍生试剂用量进行了考察。以不同条件下的提取离子流峰面积为纵坐标,衍生条件为横坐标,得到的 MO-TMS-DHEA 关系曲线示于图 7。

在一定范围内,MO-TMS-DHEA 的峰面积随着 MOX 含量的增加而逐渐增加,持续增加 MOX 含量超过一定值后,会使峰面积下降,示于图 7a。表明增加 MOX 含量能够提高衍生效率,但过量的 MOX 不利于反应进行,需根据底物和衍生试剂的用量换算,即酮基与衍生试剂甲氧胺的比例在 1:20 时的衍生反应效率最高。随着衍生时间的增长,衍生产物含量会发生变化,反应时间在 40 min 时达到最大

值,进一步延长反应时间会导致衍生物降解,示于图 7b。在低温条件下,衍生效果不佳,MO-TMS-DHEA 的峰面积随着温度升高而增加,当温度达到 80 °C 时,峰面积达到最大值,继续升高温度,峰面积值下降,这可能是温度过高导致了衍生物降解,示于图 7c。因此,对于甾体激素中酮基脎化衍生反应,最佳条件为 80 °C 反应 40 min,且酮基与 MOX 的摩尔比为 1:20。

### 2.4 甾体激素的线性范围考察

在最佳衍生条件下,对 12 种标准对照品的线性关系进行初步考察。分别精密称定各 1 mg 对照品,稀释成浓度为 10、20、50、100、200、500、1 000、2 000  $\mu\text{g/L}$  的系列标准溶液。按 1.2.3 节进行衍生,采用 SRM 扫描方式,以峰面积为指标优化扫描模式,得到衍生物的扫描离子对,结果列于表 1。



注:a. 衍生试剂体积;b. 衍生时间;c. 衍生温度

图 7 衍生条件对衍生产物生成量的影响

Fig. 7 Effect of conditions on the amount of derivatives

表 1 甾体激素的质谱信息

Table 1 Mass spectrometry information of steroid hormones

序号 No.	化合物 Compounds	分子式 Molecular formula	分子量 MW	离子对 Ion pair( $m/z$ )	碰撞能量 Collision energy/eV
1	DHEA	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$	288.21	358/268	8
2	Preg	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$	316.24	386/312	8
3	AP	$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_2$	318.26	419/329	6
4	ADL	$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$	290.22	391/270	6
5	Epian	$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$	290.22	391/270	8
6	DHT	$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$	290.22	391/270	8
7	P	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$	314.22	372/286	6
8	E	$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$	360.19	441/282	10
9	T	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$	288.21	389/269	8
10	E1	$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_2$	270.16	299/268	6
11	ASD	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$	286.19	344/329	6
12	B	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$	346.21	548/361	6

以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到含有异构体的6种衍生后化合物 triMO-triTMS-E、MO-TMS-T、MO-TMS-E1、MO-TMS-ASD、MO-TMS-P、biMO-biTMS-B 的线性范围为 5~200  $\mu\text{g/L}$ ,而 MO-TMS-DHEA、MO-TMS-Preg、MO-TMS-AP、MO-TMS-DHT、MO-TMS-ADL 和 MO-TMS-Epi-an 的线性范围为 1~200  $\mu\text{g/L}$ 。表明上述 12 种衍生后甾体化合物的线性关系良好,相关系数均大于 0.99,在该反应条件下的最低检测限为 1  $\mu\text{g/L}$ 。

### 3 结论

本实验采用脲化-硅烷化方法研究了 12 种内源性甾体激素酮基衍生反应,结合 GC/MS 法分析衍生产物,系统研究了甾体激素酮基衍生规律。结果表明,脲化-硅烷化后可以显著提高待测物的灵敏度,C3 位含有羟基且 C17 (C20)位含有酮基的甾体激素(DHEA, Preg, AP, ADL, Epi-an, DHT)发生的脲化-硅烷化反应完全,生成物的质谱响应高,杂质生成量少,检测灵敏度可以达到 1  $\mu\text{g/L}$ ,这类甾体化合物采用 GC/MS 结合柱前衍生分析的效果较好。当甾体激素中存在共轭结构时易产生顺反异构体,产物复杂。通过优化脲化反应条件,发现与甾体激素反应的最佳条件是 80  $^{\circ}\text{C}$  反应 40 min,酮基与 MOX 的摩尔比为 1:20。该方法检测甾体激素的灵敏度可达 ng 级,SRM 扫描模式下的线性范围可达 1~200  $\mu\text{g/L}$ ,可为相关激素类成分的分析提供检测技术支持。

### 参考文献:

- [1] IZABELLA S, MARIUSZ K, HENRIK A, PERNILLA W, THOMAS M. LC-MS/MS profiling for detection of endogenous steroids and prostaglandins in tissue samples[J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(19): 2 650-2 658.
- [2] MARTIN H, ANDREA P, RADMILA K, MARTA V, JANA K, LYUDMILA K, KAROLÍNA A, MICHAEL M, ZDENĚK Ž, MICHAL K, HANA Š, VIKTOR K, PETR M, MILAN M, ANTONÍN P. Steroid profiling in pregnancy: a focus on the human fetus[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 139(1): 201-222.
- [3] MICHAEL P, LAURIE D W, PIETER V R, WIM V G, PETER V E. Potential of saliva steroid profiling for the detection of endogenous steroid abuse: reference thresholds for oral fluid steroid concentrations and ratios[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 999(25): 1-12.
- [4] MUELLER J W, GILLIGAN L C, IDKOWIAK J, ARLT W, FOSTER P A. The regulation of steroid action by sulfation and desulfation[J]. *Endocrine Reviews*, 2015, 36(5): 526-563.
- [5] 方锴,潘学军,黄斌,刘晶靓,王宇,高建培. 类固醇类激素 GC/MS 分析中酮基衍生化技术研究进展[J]. *分析化学*, 2010, 38(5): 743-751. FANG Kai, PAN Xuejun, HUANG Bin, LIU Jingliang, WANG Yu, GAO Jianpei. Progress on keto groups derivatization of steroid hormones in gas chromatography-mass spectrometric analysis[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(5): 743-751 (in Chinese).
- [6] 童鸿斌,童海江,卢德赵. 液相色谱-串联质谱法检测血清中 15 种甾体激素的动态变化[J]. *色谱*, 2017, 35(4): 421-426. TONG Hongbin, TONG Haijiang, LU Dezhao. Monitoring of dynamic changes of 15 steroids in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(4): 421-426 (in Chinese).
- [7] 王园园,宋晓明,温玉娟, Muhammad Adeel,杨悦锁,宋伟. 固相萃取-衍生化-气相色谱-质谱联用测定不同水体中类固醇雌激素方法研究[J]. *岩矿测试*, 2017, 36(5): 519-528. WANG Yuanyuan, SONG Xiaoming, WEN Yujuan, Muhammad Adeel, YANG Yuesuo, SONG Jia. Determination of steroid estrogens in different water samples using SPE-derivatization coupled with GC/MS[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2017, 36(5): 519-528 (in Chinese).
- [8] 黄斌,潘学军,万幸,刘晶靓,赵世民,胡平,李发荣. 固相萃取-衍生化-气相色谱/质谱测定水中类固醇类环境内分泌干扰物[J]. *分析化学*, 2011, 39(4): 449-454. HUANG Bin, PAN Xuejun, WAN Xing, LIU Jingliang, ZHAO Shimin, HU Ping, LI Farong. Simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals in water by solid phase extraction-derivatization-gas chromatography-mass

- spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(4): 449-454(in Chinese).
- [9] TEUBEL J, WÜST B, SCHIPKE C G, PETERS O, PARR M K. Methods in endogenous steroid profiling-a comparison of gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) with supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry (SFC-MS/MS)[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1 554(15): 101-116.
- [10] 罗庆,孙丽娜,杨悦锁,胡筱敏. 固相萃取-衍生化-气相色谱-质谱法测定水中类固醇类雌激素[J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51(10): 1 406-1 410.
- LUO Qing, SUN Li'na, YANG Yuesuo, HU Xiaomin. GC/MS determination of steroid estrogens in water after solid phase extraction separation and derivatization[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2015, 51(10): 1 406-1 410(in Chinese).
- [11] FEDENIUK R W, BOISON J O, MACNEIL J D. Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of pg/mL levels of 17 beta-estradiol and 17 beta-trenbolone in bovine serum[J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical And Life Sciences, 2004, 802(2): 307-315.
- [12] 项萍,汤江江. 气质联用法(GC-MS)检测环境水体中8种内分泌干扰物[J]. 河南理工大学学报:自然科学版, 2019, 38(1): 76-82.
- XIANG Ping, TANG Jiangjiang. Determination of eight endocrine disrupting chemicals in environmental water samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)[J]. Journal of Henan Polytechnic University (Natural Science), 2019, 38(1): 76-82.
- [13] MUELLER J W, GILLIGAN L C, IDKOWIA K J, ARLT W, FOSTER P A. The regulation of steroid action by sulfation and desulfation[J]. Endocrine Reviews, 2015, 36(5): 526-563.