

蛋白同化激素的质谱研究

张亦中 刘欣 叶荔 张长久 朱绍棠 杨则宜

(国家体委运动医学研究所 北京 100029)

张霖 周同惠

(中国医学科学院药物研究所 北京 100050)

〔摘要〕本文使用 GC/MS 对多种蛋白同化激素进行了分析研究,并对其质谱裂解规律进行较详细的探讨。

关键词:蛋白同化激素 质谱 开裂

蛋白同化激素(Androgenic-Anabolic Steroids,简称 AA)是一类含有环戊烷多氢菲母核结构的化合物。睾酮(testosterone)是这类药物的典型结构(图 1)。AA 在临床上常用于治疗再生障碍性贫血或手术后恢复。体育上有人用这类药物提高比赛成绩^[1],因对人体的严重伤害^[2-6]和维护体育比赛公平竞争原则,国际奥委会(IOC)于 1964 年开始正式禁用这类药物^[7]。目前世界上兴奋剂实验室均采用 GC/MS 方法来分析 AA^[8-11]。本文使用 GC/MS 分析了大部分 IOC 兴奋剂禁用表中列出的化合物并研究了它们的质谱裂解规律。

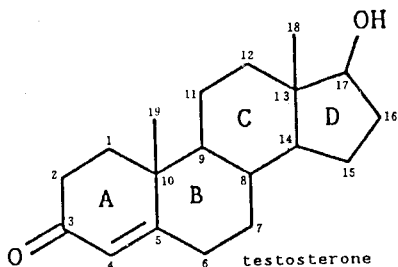


图 1 蛋白同化激素的典型结构(睾酮)

1 实验部分

1.1 标准品:实验中所用的 AA 标准品(见图 2)均由加拿大兴奋剂实验室提供。

1.2 试剂:N-甲基-N-三甲硅基三氟乙酰胺(MSTFA)、三甲硅基咪唑(TMSIM),美国 Sigma 公司产;三甲基碘硅烷(TMSI)、三甲基氯硅烷(TMSCI)、二硫代赤藓糖醇,美国 Aldrich 公司产;吡啶(AR)、三乙胺(AR),北京化工厂产。

1.3 仪器:美国惠普公司产气相色谱/质谱联用仪 HP58902/HP5970B。

1.4 GC/MS 条件:离子源温度 200℃,EI 电离能 70eV,气相色谱条件同文献^[17]。

1.5 醚式及烯醇 TMS-O 衍生化反应:取适量 AA 标准品储备液(1mg/mL 甲醇溶液),移到 200 μ L 衍生化小瓶中,干燥氮气流吹干。以文献^[12]提供的方法进行衍生化反应。色谱进样量 1 μ L,含 AA 标准品 100ng。

1993 年 10 月 4 日收

2 结果与讨论

实验中得到的四极质谱数据表明,AA 经烯醇式 TMS-O 衍生化后,其质谱基峰大致来自:(1) M^+ 或 $M-15$; (2)D 环开裂;(3)B 环开裂。图 2a、2b、2c 为常见 AA 的质谱基峰来源。

实验中发现,AA 的非基峰质谱碎片除了主要由上面三个途径得到外,还包括 A 环开裂的碎片及 $M-90$ (失去 TMSOH)、 $M-15-90$ (失去甲基及 TMSOH)、 $M-90-90$ 、 $M-15-90-90$ 等一系列简单断裂碎片。

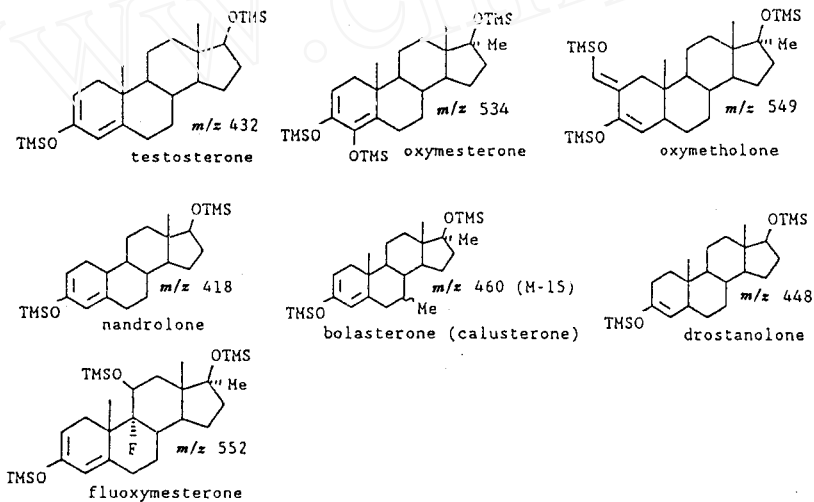


图 2a 质谱基峰来自 M^+ 或 $M-15$ 的 AA 药物

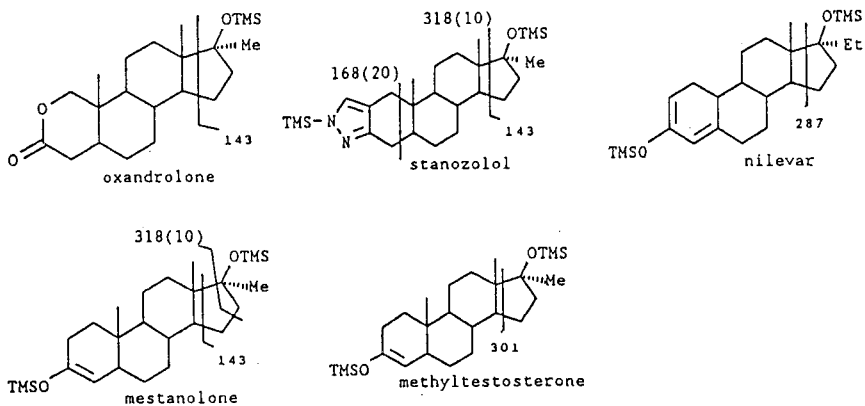


图 2b 质谱基峰来自 D 环开裂的 AA 药物

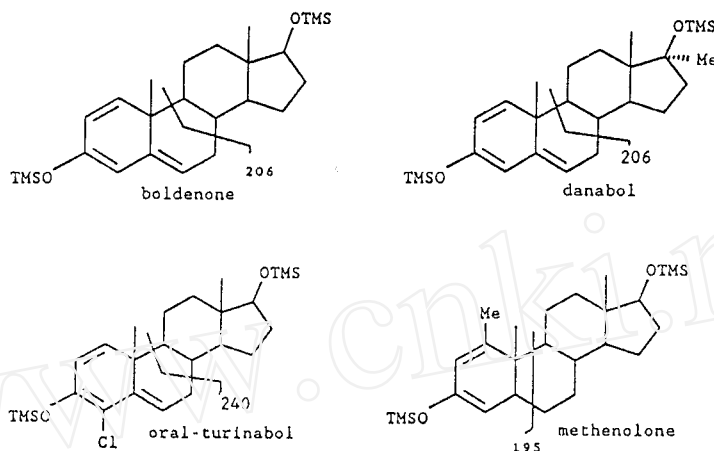


图 2c 质谱基峰来自 B 环开裂的 AA 药物

2.1 D 环开裂

D 环开裂碎片在 AA 的质谱中是规律性最强的,常能给出关键的结构信息(图 3、表 1)。

对于含 17 α -甲基的 AA 药物(表 1 中 A 和 C),D 环的开裂相对容易。因此 143、130 和 231、218 两对离子丰度一般较高,如四氢甲基睾酮(图 4)和 16-OH-康力龙(图 5)。在做 AA 药物代谢情况的 GC/MS 分析时,以这两对离子作为特征离子进行选择离子监测(SIM),往往能很容易地从复杂的色谱图中找到代谢物峰^[12]。

表 1 不同取代的 D 环碎片离子

碎片峰 <i>m/z</i>	取代基		
	A	B	C
开裂方式	R ₁ =Me, R ₂ =H	R ₁ =R ₂ =H	R ₁ =CH ₃ , R ₂ =OTMS
D ₁	143	129	231
D ₂	130	116	218

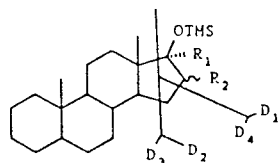


图 3 AA 药物的 D 环开裂

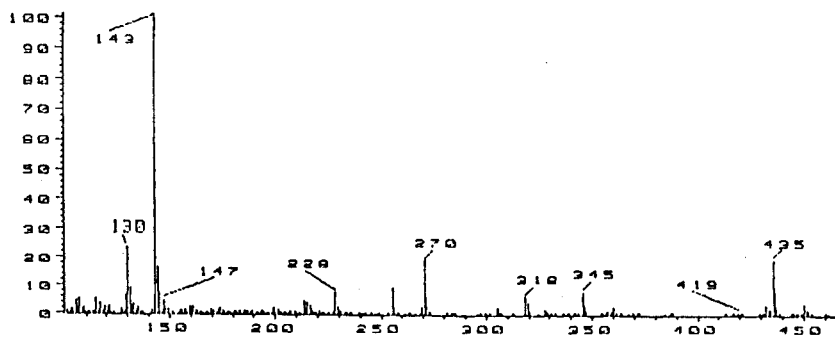


图 4 四氢甲基睾酮质谱图(2-TMS 衍生物)

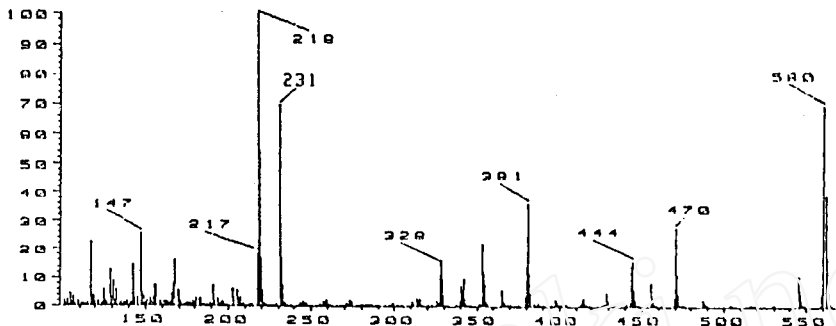


图5 15-OH-康力龙质谱图(3-TMS 衍生物)

无 17 α -甲基取代时(表 1 中 E), 129、116 碎片峰常较弱。如在睾酮的质谱中, 这两个离子的丰度均小于 10%(图 6)。

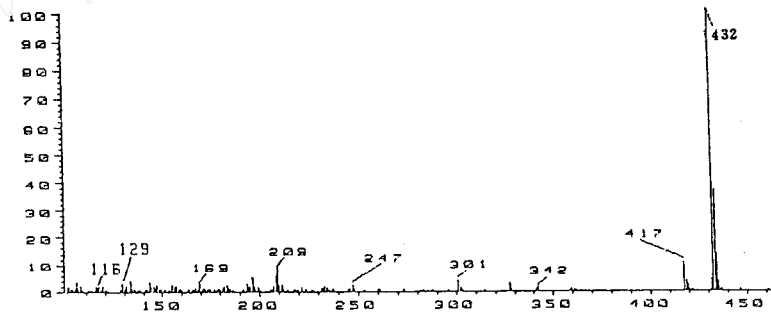


图6 睾酮质谱图(2-TMS 衍生物)

D 环开裂后, 除 D₁、D₂ 两个碎片外, 还同时产生由 ABC 环组成的碎片离子 D₃、D₄(图 3)。表 2 列出了一些 AA 在 D 环开裂后的 D₃、D₄ 离子。

表 1 中的 C 类化合物, 其质谱中常可见 117、147 碎片。据 Hagedorn 分析, 117 是 C₁₆-C₁₇ 和 C₁₄-C₁₅ 两根键断裂形成的^[13]。对于有空间位置相临羟基的 AA, 如 6 β -OH-大力补和 16-OH-康力龙等, 非常特征的 147 离子来源于复杂的断裂^[14,15]。117 和 147 的离子丰度一般不高(图 5), 但由于少有干扰, 也可作为判断 16 位羟基的佐证。

在醚式 TMS-O 衍生化时, 质谱中常见 17 位羟基上的 TMS 远程重排到 3-羰基后的 D 环开裂。其开裂位置大致同图 3。图 7 显示了大力补代谢物醚式衍生化产物的 TMS 远程重排和 D 环开裂情况。

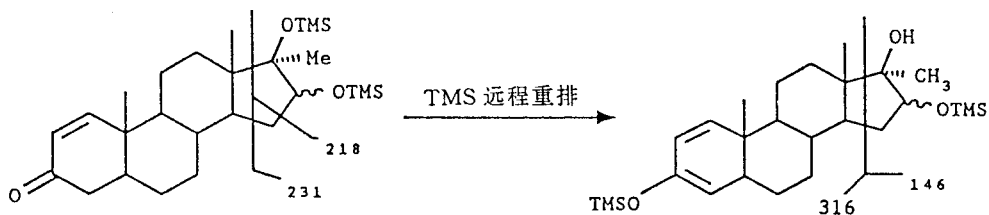


图7 大力补代谢物(2-TMS 衍生物)的 TMS 远程重排

表2 AA 药物D环开裂后的ABC环碎片离子

AA 药物	D ₃ 碎片(丰度)	D ₄ 碎片(丰度)
stanozolol	330(10)	242(20)
nilevar	287(100)	300(20)
mestaholone		318(10)
boldenone	299(15)	
danabol	229(20)	
oral-turinabol	333(25)	
oxymesterone	389(30)	
bolasterone	315(95)	
nandrolone	287(10)	
oxymetholone	405(30)	
fluoxymesterone	437(60)	

2.2 分子离子峰 M⁺和 M-15、M-90、M-15-90

AA 药物 TMS 衍生化后,常可见 M⁺和 M-15、M-90、M-15-90 等一系列简单开裂碎片。实验结果显示,烯醇式 TMS-O 衍生化后,其质谱的 M⁺或 M-15 碎片丰度常比醚式高。很多情况下甚至是基峰(图 2)。而醚式的质谱常能给出更多的结构信息^[12],但由于分子被打得太碎,在做 GC/MS 分析时,质谱的检出灵敏度略低。考虑到这个因素,各国兴奋剂实验室一般都对那些能得到高分子离子峰或 M-15 峰的 AA 药物进行烯醇式衍生化^[8-11]。

M-15 峰所丢失的甲基可能有 3 种来源。除 TMS 上的甲基容易丢失外^[15],17 位甲基和角甲基(C₁₈或 C₁₉)也可能是来源之一。对此有两个证据:(1)无衍生化睾酮的质谱图中发现 M-15 碎片(*m/z* 273, 10%)。这说明“-15”可能是 C₁₈或 C₁₉甲基断裂产生的;(2)乙诺龙(Nilevar)的烯醇式 TMS-O 衍生化质谱有失 29(17 α -乙基)的 417(10%)碎片。既然 17 位乙基可以脱去,不难推断 17 位甲基也是可失的。另外很容易看出,一系列“-90”峰是脱去 TMSOH 产生的。

2.3 B 环开裂

B 环是甾环质谱开裂的常见部位(图 8)。大力补等 AA 药物 TMS 烯醇式质谱的基峰均由此而来(图 2)。分析这些化合物发现它们在结构上有一特点,即 A-B 环存在几个共轭的双键,这使碎片离子的稳定性提高。

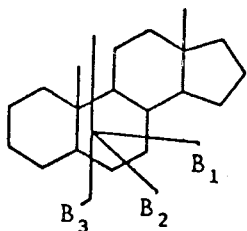


图8 AA 药物的 B 环开裂方式

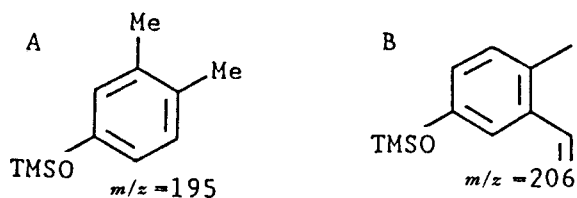


图9 AA 药物 B 环开裂产生的稳定共轭碎片

A. methenolone 质谱基峰碎片

B. danabol 质谱基峰碎片

B 环开裂的 AA 中,美替诺龙(methenolone)和康复龙(oxymetholone)比较特殊。它们没有明显的 B1 断裂碎片,而很容易在 B3 处 开裂。methenolone 的质谱基峰即由 B1 断裂产生。

显而易见,B 环断裂的位置与之后形成碎片离子的稳定性密切相关(图 9)。简言之,只有共轭的结构才是最稳定的碎片。

与 D 环开裂一样,同样位置的 B 环开裂在醚式衍生化时会产生两个碎片离子(图 10)。这也来源于 TMS 的远程重排^[16,17]。

2.4 A 环开裂

A 环开裂(图 11)的情况不多。图 2 中列出的药物仅 3 种有明显的 A 环开裂(表 3)。

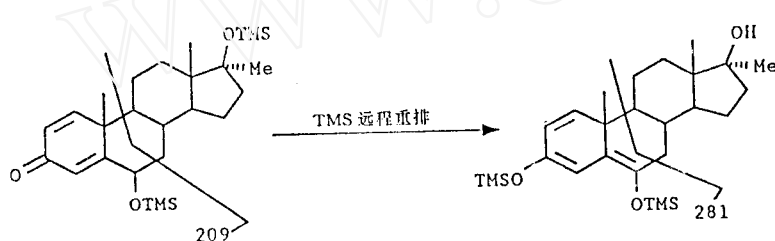


图 10 6-OH-大力补的 B 环开裂(2-TMS 衍生物)

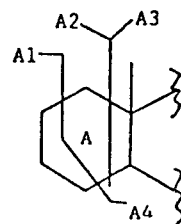


图 11 AA 药物的 A 环开裂

表 3 AA 药物的 A 环开裂碎片

碎片峰 (丰度) 药物	开裂方式	A1	A2	A3	A4
oxandrolone				308(30)	321(10)
stanozolol			168(20)		
drostanolone		141(90)	157(50)		

3 结论

AA 药物的质谱裂解较有规律。在使用 GC/MS 对这类化合物做代谢分析时,了解这一规律可能对代谢物的结构推断提供很大帮助。

参 考 文 献

- 1 Wade N. Science, 1972, 1399: 176
- 2 Capezzuto A. American J Cardiology, 1989, 1539: 63
- 3 Miles J W. Clinical J Sport Medicine, 1993, 60: 3
- 4 Scott M J *et al.* JAMA, 1989, 207: 262
- 5 Mckillop G *et al.* J cardiovascular Technogy, 1988, 23: 8
- 6 Hays L R *et al.* American J Psychiatry, 1990, 122: 147
- 7 Report of the International Olympic Committee Medical Commission, Innsbruck, 1974

- 8 中国兴奋剂实验室 1993 年 1 月 IOC 资格复审报告
- 9 Report for the Jan. 1993 IOC Reaccreditation Test, DCC in Great Britain
- 10 Report for the Jan. 1993 IOC Reaccreditation Test, DCC in Germany
- 11 Report for the Jan. 1993 IOC Reaccreditation Test, DCC in Barcelona, Spain
- 12 Masse R *et al.* J Chromatogra, Biom Appl, 1992, 23: 489
- 13 Hagedorn H W *et al.* J Chromatogra Biom Appl, 1992, 195: 577
- 14 Sloan S *et al.* Org Mass Spectrum, 1971, 789: 5
- 15 Poole C F *et al.* Contemporary Practice of Chromatogra, 1984, 82
- 16 F. W. 麦克拉弗蒂著. 王光辉等译. 质谱解析, 第三版, 北京: 化工出版社, 1990
- 17 张霁等. 药学学报, 1991, 598: 26

Studies on Mass Spectra of Androgenic-Anabolic Steroids

Zhang Yizhong, Liu Xin, Yie Li, Zhang Changjiu, Zhu Shaotang, Yang Zeyi

(National Research Institute of Sports Medicine, 1 Anding
Road, Beijing 100029, China)

Zhang Ji, Zhou Tonghui

(Chinese Academy of Material Medica, 1 Xian Nong
Tan Road, Beijing 100050, China)

Received 1993-10-04

Abstract

More than 16 standards of androgenic-anabolic steroid were derivatized with MST-FA/TMSI and analysed with GC/MS. The fragmental mechanism was discussed.

Key Words: androgenic-anabolic steroid, mass spectrum, fragment