

兔血中 5β -H-17-OH 雄甾烷的气相色谱-质谱测定

骆传环, 黄荣清*, 肖炳坤, 梁乾德, 梁晓东

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 建立了一种气相色谱-质谱(GC/MS)技术测定兔血中甲睾(MT)的主要代谢物 5β -H-17-OH 雄甾烷(5β MT)质量浓度的方法, 为药物动力学等研究提供技术方法和数据。6只兔口服20mg MT后按设定时间点取血, 用甲醇提取血浆1mL, 提取液用 β -葡萄糖醛酸苷酶于55℃水解3h。去氢甲睾(DHMT)为内标物进行定量计算。结果显示: 给药后每个血样中均含有 5β MT, 计算每个时间点6只兔的 5β MT平均质量浓度 ρ , 发现在3h时达到峰值 2.2mg/L 。

关键词: 5β -H-17-OH 雄甾烷; 气相色谱-质谱(GC/MS); 内标定量; 质量浓度; 兔血

中图分类号: O 657. 63; Q 579. 11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2005)01-46-04

Determination of 5β -H-17-OH-Androstane in Rabbit Blood by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LUO Chuan-huan, HUANG Rong-qing, XIAO Bing-kun, LIANG Qian-de, LIANG Xiao-dong
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: The determination of the essential metabolite 5β -H-17-OH-Androstane (5β MT) from methyl testosterone (MT) in rabbit blood by gas chromatography-mass spectrometry was performed to supply method and data for pharmacokinetics study. 2mL blood taken from six rabbits ear was collected at setting time point before and after P. O. administration 20mg MT, 1mL plasma sample was extracted with methanol, then the extractant was enzymed by β -glucuronidase. Quantitative analysis was performed with internal standard DHMT. The result showed that 5β MT was presented in each blood sample, the maximal average mass concentration of six rabbit is 2.2mg/L at 3h.

Key words: 5β -H-17-OH-androstane; gas chromatography-mass spectrometry; internal standard quantitation; mass concentration; rabbit blood

甲睾全名甲基睾丸素, 简称MT, 是人工合成的类固醇化合物, 用于治疗慢性消耗性疾病和血液病如再障等, 抗衰老、抗疲劳。为了解它在体内的动态变化过程, 在以往代谢物研究的基础

上, 对MT经羟化酶作用产生的主要代谢产物 5β -H-17-OH 雄甾烷(简称 5β MT), 拟用气相色谱-质谱(GC/MS)建立定性鉴别和定量测定的方法^[1,2], 为MT的其他研究如药物动力学研究

收稿日期: 2004-03-06; 修回日期: 2004-10-10

作者简介: 骆传环(1941~), 女(汉族), 上海市人, 研究员, 从事药物分析和新药研究工作。E-mail: xiaobk@sohu.com

*通讯作者: 黄荣清(1965~), 男(汉族), 江西南昌人, 副研究员, 从事药物分析和新药研究工作。E-mail: huangrq@tom. 163



等提供技术方法和数据。

1 实验部分

1.1 主要仪器及材料

HP5890A (GC)-5970B (MSD)-59970C (Chem Station): 美国惠普 (Hewlett-Packard) 公司产品。

MT、 5β -MT 标准品和内标物去氢甲睾 (DHMT) 由本实验室合成, 经熔点测定、元素分析、质谱鉴定后使用, 三者化学结构式示于图 1。

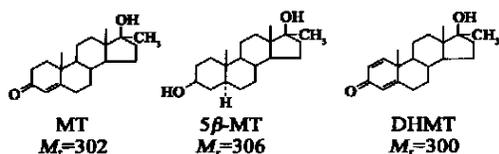


图 1 MT、 5β -MT 标准品和内标物去氢甲睾 (DHMT) 的化学结构示意图

Fig 1 Geometric structures of MT, 5β -MT and DHMT

1.2 动物及给药

日本大耳白家兔 6 只, 领自本院动物中心, 体重 1.5 kg 左右, 雌雄各半, 称取 20 mg MT, 混悬于 5 mL 的生理盐水中, 灌胃口服给药。

1.3 采血、样品预处理

药前和药后 1、3、6、9、12、24、48 h 在兔耳静脉采血 2 mL 于抗凝管中, 离心后取出 1 mL 血浆, 用甲醇振摇提取, 离心, 抽出上清甲醇提取液, 蒸去甲醇后用 β -葡萄糖醛酸苷酶于 55 °C 水解 3 h^[3], 过 Sep-pak 小柱吸附, 甲醇洗脱解吸, 溶液蒸去甲醇后置于真空干燥器中, 干燥后的样品管中定量加入精密配制的内标溶液, 待测。

另取 3 份 1 mL 空白血浆, 加入高、中、低 3 个量的 5β -MT 标准品, 混悬使溶, 按上述血样提取操作处理后加入内标溶液, 进样后, 用内标定量法计算出平均回收率为 (87.1 ± 4.2)%。

1.4 GC/MS 实验条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱: OV-1 弹性石英毛细管柱 (15 m × 0.2 mm × 0.25 μm); 升温程序: 180 °C 保持 1 min, 以 10 °C/min 升至 200 °C, 再以 5 °C/min 升至 250 °C, 保持 4 min; 载气 (He) 流速 1.1 mL/min, 压力 2.4 kPa; 进样量 2.0 μL; 分流比 10:1; 进样口温度 260 °C, 检测器温度 280 °C。

1.4.2 质谱条件 电子轰击 (EI) 离子源; 聚焦电压 4 V, 电子倍增器电压 2 200 V; 质量扫描范

围 m/z 120~350, 阈值 500; 溶剂延迟时间 5 min^[4,5]。

1.5 定性和定量分析

首先用配制的标准 5β -MT 和内标 DHMT 混合液进样, 得到 GC/MS 图, 再将制备好的血液样品进样, 得到血样的 GC/MS 图, 经色谱峰的保留时间 (t_R)、质谱峰的分子离子峰 (M^+)、基峰和主要碎片峰的解析比较作出定性鉴定, 确定血样中的 5β -MT, 阳性样品再作定量计算。

启动 59970C (Chem Station) 中的内标程序, 在标准混合液进样后建立内标校正表。在阳性血液样品进样后, 即可调出内标计算报告表, 表中列出所进样品液中 5β -MT 的质量 (ng), 再按进样量、样品稀释倍数、回收率、血浆/血液体积之比等因素, 计算兔血中 5β -MT 的质量浓度 (ρ)。

2 结果与讨论

2.1 标准混合液的 GC/MS 图

标准混合液的 GC/MS 图示于图 2。色谱图部分在 $t_R = 12$ min 和 13 min 左右有两个色谱峰 (P1、P2)。P1 的 MS 图显示它有分子离子峰 (M^+) m/z 306, 基峰 m/z 291, 以及 m/z 121、 m/z 165、 m/z 233、 m/z 255、 m/z 273 等碎片峰, 与 5β -MT 分子的化学结构裂解式吻合。因此确定 P1 是 5β -MT。同样, 根据 m/z 300 (M^+), 基峰 m/z 122, 主要碎片峰 m/z 161、 m/z 199、 m/z 227、 m/z 242、 m/z 282 等, 确定 P2 为内标物 DHMT。在定性鉴别后, 调出 Chem Station 的内标程序, 输入必要数据后建立内标校正表。

2.2 血液样品的 GC/MS 图

以 1# 兔 1 h 的血液样品为例, 进样后得到 GC/MS 图示于图 3。在 $t_R = 12$ min 左右有 1 小色谱峰, 其质谱图和图 2 中的标准 5β -MT 的质谱图完全相同, 因此确定这小色谱峰为 5β -MT, 在 $t_R = 13$ min 左右有一和图 2 相同的色谱峰, 经 MS 鉴定为内标物 DHMT。定性鉴定显示药前 6 个血样都是 5β -MT 阴性, 药后所有血液样品中均有 5β -MT, 色谱峰峰面积有所不同。

2.3 兔血中 5β -MT 的定量分析

根据每个阳性血液样品进样后的内标结果报告表, 计算获得每只兔每时间点的 5β -MT 的含量。每个时间点 6 只兔平均血药质量浓度 ρ 数据列于表 1。

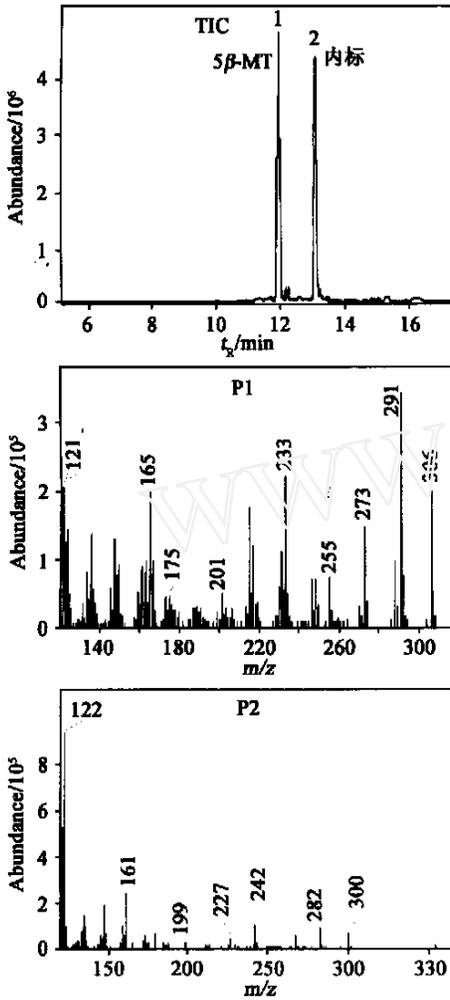


图 2 标准混合液的GC/MS 图

Fig 2 GC/MS spectra of standard mixed solution

表 1 兔血中5βMT 的质量浓度

Table 1 Mass concentration of 5βMT in rabbit blood

No.	t/h	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	SD / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	0	0	0
2	1	0.4	0.8
3	3	2.2	0.4
4	6	1.8	1.3
5	9	1.2	1.3
6	12	0.5	0.7
7	24	1.4	0.8
8	48	1.9	2.5

2.4 讨论

表 1 中数据表明MT 的主要代谢产物 5β-MT 在体内的动态变化特点, 血药质量浓度在 3 h 达峰值 2.2 mg/L, 其后缓慢下降, 但至 24 h 时又呈现上升趋势, 到 48 h 又出现第二高峰, 峰值低于第一高峰, 这与文献曾报道的MT 在机体内可能两次经过肝脏的论点相吻合。由于MT 的代

谢过程和肝脏有密切关系, 可能在肝脏会有滞留, 因此推测MT 及其代谢物会对肝脏有刺激性, 建议临床在使用MT 时注意保肝措施。由于 48 h 时血液浓度水平仍处于较高状态, 可能MT 的代谢物在体内的清除过程会较长, 连续用药需考虑累积效应^[7,8]。

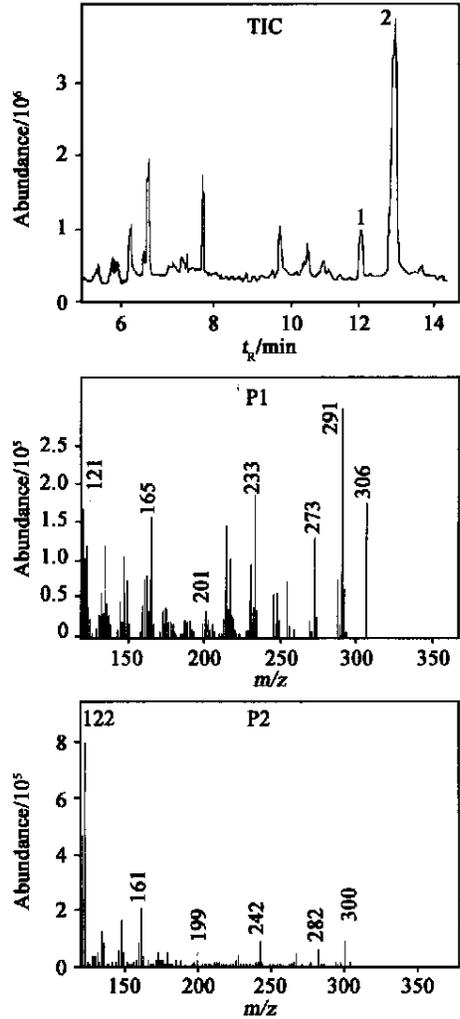


图 3 1# 兔 1 h 血样的GC/MS 图

Fig 3 GC/MS spectra of blood sample from 1# rabbit at 1h

3 结论

使用GC/MS 技术对兔口服20 mg MT 后体内主要代谢物 5βMT 进行血样的定性定量测定。由于在定性鉴定的基础上再作定量计算, 不会造成假阳性, 结果较确凿; 内标定量法能避免操作误差, 数据可靠。实验显示 6 只兔在给药后各时间点的血样中均有 5βMT, 平均质量浓度在 3 h 达到峰值 2.2 mg/L。

(下转第 21 页)

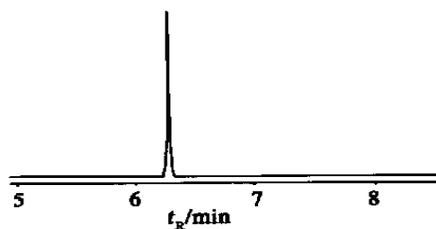


图 4 双酚A 衍生物的总离子流图

Fig 4 TIC of derivative of bisphenol A by GC/MS

3 小 结

建立了衍生化 SPM E/GC-MS 测定水中双酚A 的分析方法。以 PA 为萃取纤维,对萃取条件、衍生化条件进行了优化。该分析方法具有简便、快速、灵敏度高等特点,适用于水中痕量双酚A 的快速测定。

参考文献:

[1] 《实用精细化学品手册》编写组 实用精细化学品手册(有机卷)[M] 北京: 化学工业出版社, 1996 398

[2] 施钧慧, 黄业茹, 全 浩 水环境中内分泌扰乱化学物质检测方法研究-烷基酚、氯代酚和双酚A 的 GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 2001, 20(增刊): 159~ 160

[3] De l'Ordo M, Gonzalez-Casado A, Navas NA, et al Determination of Bisphenol A (BPA) in Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 1997, 346(1): 87~ 92

[4] 张学俊, 吴仁安 高效液相色谱法分析矿泉水中酚类化合物[J]. 色谱, 1998, 16(6): 530~ 531

[5] 李金昶, 石 晶 高效液相色谱法测定废水中双酚A 和苯酚的研究[J]. 中国环境监测, 1994, 10(4): 22~ 23

[6] Berlar di R, Paw lyszyn J. The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and Their Rapid Transfer to Capillary Columns [J]. Water Pollution Research J Canada, 1989, 24: 179.

(上接第 48 页)

参考文献:

[1] 刘 欣, 徐友宣, 张亦农, 等 GC/HRMS 在兴奋剂检测中的应用研究[J]. 质谱学报, 2001, 22(3): 66~ 70

[2] 张亦农, 刘 欣, 张长久, 等 雄烯二酮特征代谢物的质谱分析[J]. 质谱学报, 2001, 22(3): 76~ 79

[3] 崔凯荣, 张亦农, 刘 欣 人尿中Caphedone 的气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2004, 25(3): 166~ 168

[4] Lee ST, Lam TJ, Tan CH. Increased 21-hydroxylase and Shutdown of C (17, 20) Lyase Activities in Testicular Tissues of the Grouper (Epinephelus coioides) During 17 α -methyltestosterone-induced Sex Inversion[J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 126 (3): 298~ 309

[5] Kuuranne T, Vahemo M, Leinonen A, et al Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometric Behavior of Eight Anabolic Steroid Glucuronides[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2000, 11(8): 722~ 730

[6] Stanley SMR, Smith L, Rodgers JP. Bio transformation of 17-alkylsteroids in the Equine: Gas Chromatographic-Mass Spectral Identification of Ten Intermediate Metabolites of Methyltestosterone[J]. J Chromatogr B, 1997, 690 (1): 55~ 64

[7] Dumasia MC. In Vivo Bio transformation of 17 α -methyltestosterone in the Horse Revisited: Identification of 17-hydroxymethyl Metabolites in Equine by Capillary Gas Chromatographic-Mass Spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(4): 55~ 56

[8] Dumasia MC. In vivo Bio transformation of 17 α -methyltestosterone in the Horse Revisited: Identification of 17-hydroxymethyl Metabolites in Equine by Capillary Gas Chromatographic-Mass Spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(4): 55~ 56