尿中睾酮与表睾酮的三甲基硅烷化及其比值的GC－MS测定

杨悦武*　吴如金

(中国药科大学,南京210009)

提要　对睾酮及表睾酮的三甲基硅烷化进行了详细考察,找到了较好的抗氧剂巯基乙醇,确定了较好的衍生化条件,衍生化产物单一。并采用GC－MS法测定了尿中睾酮与表睾酮的比值。实验条件为:以氦为载气,SE-54熔融石英柔性毛细管柱、程序升温进行样品分离,多离子检测(MID),监测m/z 432的离子。该法专属、灵敏、快速。睾酮与表睾酮比值在1:1～10:1(睾酮为20 ng/μl)与相应峰面积比呈线性关系(r=0.998),最低检测限为1 ng,最低检测尿药浓度为8 ng/ml。

关键词　三甲基硅烷化;睾酮;表睾酮;抗氧剂;GC－MS法

睾酮与表睾酮是人体中存在的一对内源性甾体激素,互为差向异构体。前者具有强烈的生理活性,维持性特征,而后者则没有生理活性,两者在体内的含量具有一定的比例。当服用睾酮后,则比例发生改变。因此,体育竞赛中,一般测定这两者的比值(规定不大于6:1)[1],作为运动员是否违禁服用睾酮的尺度。同时,也可以通过测定体内的睾酮来诊断个体的性激素代谢水平,以确定临床是否应给予补充的依据。由于体液中存在的睾酮及表睾酮的量极低,需要高灵敏、专属性强的检测方法。它们主要在尿中排泄,因此,多采用尿样分析。文献报道[2~4]测定方法有GC法、HPLC法RIA及GC－MS法等。由于GC－MS法灵敏、快速、专属、使用尤为广泛。

睾酮与表睾酮的分子量及极性均较大,直接用GC或GC－MS分析,往往效果不佳。为了改善分离、提高检测灵敏度,一般需要衍生化后再进行分析,尤以采用硅烷化后进行分析为多。但值得注意的是睾酮或表睾酮硅烷化时,往往得不到单一的衍生物,且产物的比例随反应的条件而变。本文通过加入巯基乙醇作为抗氧剂,并对衍生化条件进行了系统的考察,确定了较好的衍生化条件,并用于尿中睾酮与表睾酮比值的测定,效果较为满意。

实验部分

药品、试剂与仪器

睾酮,上海药检所;表睾酮,Sigma公司;XAD-2树脂(100目,Fluka,Switzerland);β-葡萄糖苷酶,上海生化所提供,规格:小牛肝,EC 3.2.1.31,分子量29万,3000δ/mg;TMCS(trimethylsilylchlorosilane),上海试剂一厂;BSA[*N*,*O*-bis(trimethylsilyl)acetamide],TMSIM(trimethylsilylimidazole), BSTFA[*N*,*O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide], MSTFA(*N*-methyl-*N*-trimethyl-

本文于1991年7月29日收到。

* 第二军医大学药学院药分教研室,上海 200433。

silyl-trifluoroacetamide)，均为 Sigma 公司产品；甲醇、巯基乙醇、乙醚、碳酸钾均为 AR 级试剂；0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液，AR 级试剂配制(pH 5.1)。

Varian-3400型气相色谱仪；SP-470型积分仪；4021型 GC－MS 仪(Finnigan-MAT 公司)。

实验方法

样品制备 10 ml 尿样，经 XAD-2树脂吸附后，用5 ml 甲醇洗脱，收集甲醇液，氮气流下挥干后，残渣加入0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液1 ml 和 β-葡萄糖苷酶约10 mg，混匀于37℃保持24 h，加碳酸钾0.1 g 及乙醚5 ml 振摇提取后离心(1000 r/min) 10 min，分离醚层，氮气流下挥干，使残渣绝对无水。

三甲基硅烷化衍生物制备 样品残渣加入巯基乙醇5 μl 及吡啶5 μl，加入 MSTFA-TMCS-TMSIM(1000:5:2)混合衍生化试剂30 μl，密闭于70℃反应15 min，取1 μl 进行 GC 或 GC-MS 分析。

气相色谱 采用 SE-54键合相柔性毛细管柱(北京石油科学院，规格：28 m×0.255 mm ID)，进行色谱分析，FID 检测，以氮为载气，柱前压30 psi 进样器和检测器温度分别为280℃和300℃，尾吹气为40 ml/min。柱初始温度200℃，保持2 min，以5℃/min 的速度升至260℃，保持10 min，不分流进样(0.8 min)。

气相色谱－质谱分析 用 SE-54键合相柔性毛细管柱(Finnigan-MAT 公司，规格：30 m×0.25 mm ID)在 GC－MS 仪上采用多离子检测(MID)方式检测。进样器及离子源温度分别为280℃和250℃，电子轰击能量为70 eV，电子倍增器电压1800 V，不分流进样，氦为载气，柱前压8 psi，柱初始温度为220℃，以2℃/min 的速度升至240℃，保持2 min 后，以16℃/min 的速度升至270℃，保持10 min。监测离子 m/z 432。

结 果

衍生化试剂选择

将睾酮或表睾酮直接用不同的混合衍生化试剂衍生化，经 CGC 分析，结果如表1，表明直接衍生化效果不佳。

Tab 1 Results from the CGC of trimethylsilyl derivatives of testosterone (or epi-testosterone) with several reagents of trimethylsilylation

Reagent	Mercapto-ethanol	t℃/T(min)	Peak	t℃/T(min)	Peak	t℃/T(min)	Peak
BSA-TMCS (5:1)	no / add	50/20	d	60/20	d	70/20	d
BSTFA-TMCS (5:1)	no / add	50/20	d	60/20	d	70/20	d
TMSIM-BSA-TMCS (3:3:1)	no	50/20	d	60/20	d	70/20	d
	add		*		*		*
TMSIM-BSA-TMCS (3:3:2)	no	50/20	d	60/20	d	70/20	d
	add		*		*		*
MSTFA-TMCS-TMSIM (1000:5:2)	no	50/20	d	60/20	d	70/20	d
	add		s		s		s
MSTFA-TMSIM (1000:2)	no	50/20	d	60/20	d	70/20	d
	add		s		s		s

d. Double peak; s. Single peak; *. Precipitate

抗氧剂及其用量

在睾酮或表睾酮中加入巯基乙醇后，再用不同的混合衍生化试剂对其衍生化，经色谱分析表明，巯基乙醇的用量与衍生物的单一性有关。在巯基乙醇用量足够时，MSTFA－TMSIM(1000:2)及 MSTFA－TMCS－TMSIM(1000:5:2)两种混合衍生化试剂对睾酮及表睾酮的衍生化效果较好，色谱峰均为单峰(图1)。

反应温度及时间

在巯基乙醇存在下，采用 MSTFA-TMCS-TMSIM(1000:5:2)或 MSTFA-TMSIM(1000:2)混合衍生化试剂进行衍生化，温度及时间对衍生物产率的影响不大(表2)。

质谱多离子监测

睾酮与表睾酮的质谱见图2，分子离子峰(m/z 432)分别为基峰或次强峰。因此，分子离子作为监测离子，监测此离子得到的尿中睾酮及表睾酮比值的标准曲线在1:1～10:1(睾酮为20 ng/μl)，具有良好的线性关系(R_A=1.2819×R_W+0.0716；r=0.998；R_A 为睾酮峰面积与表睾酮峰面积比，R_W 为睾酮浓度与表睾酮浓度比)。健康男性尿样测定，睾酮与表睾酮比值在1～3，睾酮与表睾酮的最低检测限为1 ng，最低检测尿药浓度为8 ng/ml。

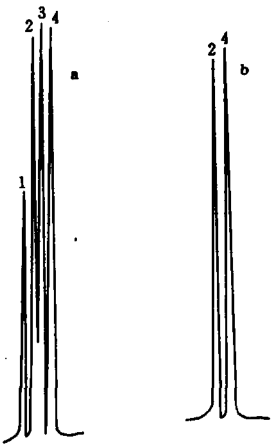

Fig 1 CGC of trimethylsilyl derivatives of mixture of testosterone and epi-testosterone by using MSTFA－TMCS－TMSIM without(a) and with(b) mercaptoethanol, 1,2. Epi-testosterone; 3,4. Testosterone.

Tab 2 The effects of temperature and time on the yield of trimethylsilyl derivatives of testosterone (or epi-testosterone)

Temperature (t℃)	60	60	60	70	70	70
Reaction time (min)	10	15	20	10	15	20
Peak	Single	Single	Single	Single	Single	Single

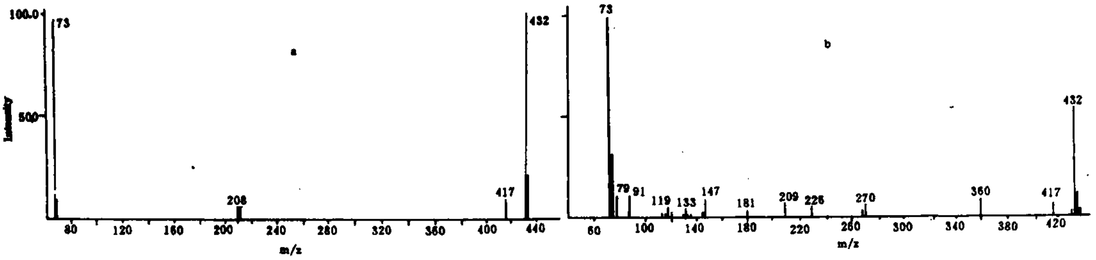

Fig 2 Mass spectra of trimethylsilyl derivatives of testosterone(a) and epi-testosterone(b).

讨 论

睾酮与表睾酮互为差向异构体，具有甾体结构，并有共轭烯酮基团，分子量大，极性较强。当直接进行 GC－MS 分析时，不仅分离不好，且易拖尾，检测灵敏度低。为提高检测灵敏度，改善分离，本文选择三甲基硅烷化试剂进行衍生化。一般来说，混合衍生化试剂衍生化效果好。但各种混合衍生化试剂对睾酮与表睾酮直接衍生化，难于得到单一的衍生物(表1)。可能是它们具有共轭烯酮结构，极易烯醇化，衍生化时生成双-TMS 衍生物，受氧的影响，产物可能为同分异构体[5]。经 GC－MS 分析，这种推测得到了证实。

为了得到单一的衍生物，本文对巯基乙醇、Vc 等进行了实验，结果巯基乙醇抗氧效果较好，衍生化后溶液不仅澄明，更主要的是睾酮及表睾酮均得到单一的衍生物。同时发现巯基乙醇的用量与得到单一的衍生物有关，而温度的影响不大。因此，按本文给定的条件衍生化，睾酮及表睾酮的衍生物均得到满意的结果。另外睾酮与表睾酮在70℃用盐酸羟胺反应30 min，待酮基肟化后，再以三甲基硅烷化，无需加入抗氧剂，其产物也得到单一的色谱峰。但该衍生物在盐酸羟胺存在下，极易引湿，稳定性差，其质谱高质量区的碎片离子丰度不高，当采用 MIS 检测方式时，不利于提高检测灵敏度和减少内源性物质的干扰，因此认为制成烯醇化的双-TMS 衍生物为好。

采用 GC－MS 分析时，一般采用多离子检测方式。而选择被测物的高质量、丰度高的离子作为检测离子，有利于提高检测的灵敏度，并消除内源性物质的干扰。睾酮与表睾酮衍生物质谱(图2)表明，其分子离子(m/z 432)为基峰或次强峰。因此，分子离子被选择为测定离子，并用于健康男性尿样测定。在本文条件下，内源性甾体化合物不干扰测定，测得尿中睾酮与表睾酮比与文献报道吻合。

参 考 文 献

1 Catlin DH, et al. Analytical chemistry at the Games of the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles, 1984. *Clin Chem* 1987;**33**:319.

2 Cochran RC, et al. Measurement of testosterone with HPLC equipped with flow-through ultraviolet spectrophotometer. *J Chromatogr* 1979;**173**:349.

3 Dotti C, et al. Simultaneous radioimmunoassay of serum testosterone and 5-α-dihydrotestosterone without chromatography. *Steroids* 1979;**33**:527.

4 Baba S, et al. Determination of plasma testosterone by mass fragmentography using [19-$^{2}H_{3}$] testosterone as internal standard comparison with radioimmunoassay. *J Chromatogr* 1979;**162**:529.

5 Karl B and Graphams K. *Handbook of Derivative for chromatography*. Bristol: JW Arrowsmith Ltd, 1978:161～2.

TRIMETHYLSILYLATION OF TESTOSTERONE, EPI-TESTOSTERONE AND DETERMINATION OF THEIR RATIO IN URINE BY GC—MS

YW Yang and RJ Wu

(*China Pharmaceutical University, Nanjing 210009*)

ABSTRACT The trimethylsilylation of testosterone and epitestosterone was discussed in detail in this reprot. Both derivative conditions under which testosterone and epi-testosrone were prepared into TMS-derivatives in the presence of mercaptoethanol as an antioxidizing agent and method for the analysis of the ratio of testosterone to epi-testosterone in urine, based on GC—MS, had been established. The conditions of detection were: carrier gas was helium, derivatives were separated with SE-54 fused silica capillary column, using temperature program and detected by using mutiple ion detection mode in which the ion of m/z 432 was the monitoring ion. The method is rapid, sensitive and specific. For the ratio of testosterone to epi-testosterone(testosterone: 20 ng/μl), there is a linearity between ratio 1:1 and 10:1 (r=0.998), the limit of detection for testosterone and epi-testosterone is 1 ng, and the minimum concentration of detection in urine is 8 ng/ml.

Key words Trimethylsilylation; Testosterone; Epi-testosterone; Antioxidizing agent; GC—MS