

鼠类粪便中类固醇的荧光标记及质谱鉴定

陈万东⁴ 张海峰¹ 郭庆君⁴ 王贤峰²
 索有瑞³ 陈桂琛³ 张洪海² 尤进茂^{*1,3}

¹(曲阜师范大学化学科学学院, 曲阜 273165) ²(曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165)

³(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) ⁴(济宁师范专科学校, 济宁 272025)

摘要 利用新型荧光试剂 1, 2-苯并-3, 4-二氢吡啶-9-乙基胍基甲酸酯 (BCEC) 作柱前衍生化试剂, 在 Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱上, 采用梯度洗脱对皮质醇、皮质酮、睾酮、孕酮 4 种类固醇荧光衍生物进行了优化分离。65 °C 下在乙腈溶剂中以三氯乙酸作催化剂, 衍生反应 2 h 后获得稳定的荧光产物。激发和发射波长分别为 333 nm 和 390 nm。采用大气压化学电离源 (APCI) 正离子模式, 实现了黑线姬鼠粪便中 4 种类固醇化合物的定性及定量测定。线性回归系数均在 0.9999 以上, 检出限为 47.3 ~ 71.2 fmol。

关键词 高效液相色谱 质谱, 荧光检测, 柱前衍生, 类固醇

1 引言

类固醇化合物不仅能起到一定的生理调节作用, 而且在临床上对多种疾病有着很好的疗效。对动物的各种胁迫作用都将引起动物体内某些类固醇分泌的改变^[1~4]。因此, 对该类化合物的分离分析在生物学和临床应用上具有重要意义。目前对该类化合物的分析主要采用放射性免疫法^[2,4~6], 但该方法不能实现多种类固醇的同时精确测定。尽管采用高效液相色谱和在线的紫外检测已有报道^[7], 但相对低的检测灵敏度难以获得满意结果。以前曾采用新型荧光试剂 1, 2-苯并-3, 4-二氢吡啶-9-乙基胍基甲酸酯成功地分析了多种醛类化合物^[8]。本研究采用该试剂在三氯乙酸催化剂的存在下于乙腈溶液中实现了 4 种类固醇类化合物的同时衍生化。采用梯度洗脱获得了相应衍生物的基线分离。通过柱后在线质谱鉴定, 对老鼠粪便中的类固醇进行了快速、准确的测定, 结果满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent 公司), 配备四元梯度泵、100 位自动进样器、荧光检测器、在线真空脱气机和大气压化学电离源 (APCI); Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连依利特公司); 1, 2-苯并-3, 4-二氢吡啶-9-乙基胍基甲酸酯 (自制, 见文献 [8]); 类固醇标准样品 (Sigma 公司); 无水乙腈 (禹城化学试剂厂) 用 P₂O₅ 干燥后蒸馏处理; 三氯乙酸、三氟乙酸等均为分析纯, 纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备。类固醇: 孕酮、睾酮、皮质醇和皮质酮的结构见图 1。

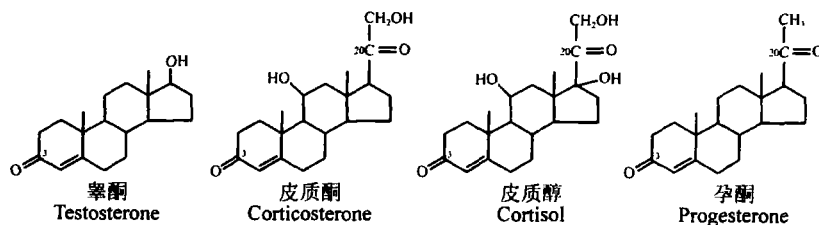


图 1 4 种类固醇化合物的结构式

Fig 1 Structural formula of four steroid compounds

2.2 标准溶液的配制

准确称取定量类固醇标准品,用乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L 的溶液,相应低浓度的标准溶液 (1.0×10^{-4} mol/L)用乙腈稀释而成。称取 16.05 mg 的 1,2-苯并-3,4-二氢咔唑-9-乙基肼基甲酸酯 (BCEC)用无水乙腈定容至 10 mL,浓度为 5.0×10^{-3} mol/L。

2.3 动物实验

黑线姬鼠于 2004 年 5 月在济南野生动物园捕捉,于实验室繁殖饲养 2 个月后用于本研究。饲养条件如下: TPX-CP-4 型透明的聚丙烯饲养笼;兔饲料辅加花生、玉米、小麦和胡萝卜等喂养,进行自由取食与饮水。光照时间 17:00 至次日 9:00,室温为 20 ± 2 。实验过程中每天使黑线姬鼠处于黄鼬肛腺环境下 6 h (带孔的黄鼬肛腺包装袋悬于饲养笼上方 10 cm 处)。选取性成熟的雌雄个体各 10 只,雄性体重为 $33.06 \text{ g} \pm 0.74 \text{ g}$, 雌性体重为 $29.89 \text{ g} \pm 0.63 \text{ g}$ 。

实验前 3 天,将黑线姬鼠放入不锈钢铁丝网笼中以消除对新环境的影响,在喂养过程中连续收集 7 d 的粪便 (间隔 24 h),放入小试管自然干燥后,于 -30 保存待用。称取干燥后的鼠粪样 100 mg 置于小试管中,依次向小试管中加入水 1 mL、二氯甲烷 2 mL。超声 5 min 后,用振荡器振荡 1 h。再以 4000 r/min 离心 30 min,取二氯甲烷层 1 mL 氮气吹干后,用 500 μL 乙腈充分溶解,直接用于衍生化处理。

2.4 衍生化过程

向安培瓶中依次加入 120 μL 衍生试剂溶液,30 μL 混合类固醇标准液 (或 100 μL 粪便提取液),30 μL 1% Cl_3CCOOH 的乙腈溶液,封口后于 65 恒温水浴下振荡反应 2 h。取出放冷冲稀 10 倍后进样分析。衍生反应及质谱裂解模式见图 2。

2.5 色谱、质谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm)。流动相 A: 30% 乙腈水溶液 (含有 30 mmol/L 的 HCOONH_4 , pH = 3.5); B: 100% 的乙腈。梯度洗脱程序:由 30% A 经 35 min 线性梯度到 100% B。每次进样前用流动相 A 平衡柱子 10 min。流速为 1.0 mL/min,柱温 30 。荧光激发和发射波长分别为: $\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$ 。

大气压化学电离源 (APCI),正离子模式,喷雾压力 0.414 MPa,干燥气流量为 5 L/min,干燥气温度 350 ,气化温度 450 ,毛细管电压 3500 V,电晕电流 4000 nA (Pos)。

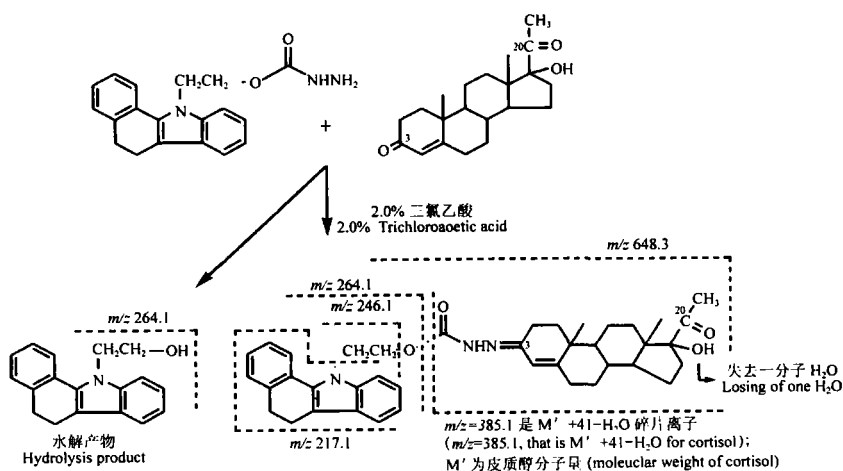


图 2 1,2-苯并-3,4-二氢咔唑-9-乙基肼基甲酸酯与类固醇衍生反应概况

Fig 2 Derivatization scheme of 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl-carbonylhydrazine with steroid compounds

3 结果与讨论

3.1 衍生条件的优化

实验结果表明,不同的溶剂、催化剂、衍生温度及衍生试剂用量将会导致衍生化产率的不同。

以二甲基亚砜 (DMSO)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、四氢呋喃 (THF)、1,4-二氧六环、甲醇、乙腈等作为衍生化溶剂,对衍生率进行了考察。结果表明:在相同的衍生条件下,乙腈具有最大的衍生化产率。催化剂的选择:以硫酸、甲酸、冰醋酸、三氯乙酸和三氟乙酸作催化剂,对衍生率进行了考察。结果表明:三氯乙酸具有最高的衍生化产率(见图 2)。对衍生化反应温度的考察表明,产率随温度升高而增加。反应速率随温度升高而加快。65 衍生反应 2 h 后,衍生产物恒定。进一步提高衍生化温度,将会引起衍生试剂的轻度分解导致产率降低。实验中选择衍生化温度为 65,衍生时间 2 h。对衍生试剂用量的考察表明,产率随试剂用量增大而提高。当试剂用量超出总摩尔类固醇 15 倍后,衍生率基本恒定,结果见图 3。

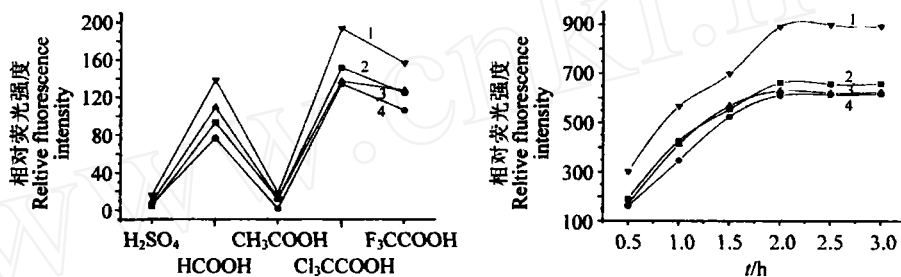


图 3 催化剂及衍生时间对类固醇衍生率的影响

Fig 3 Effects of catalyst and reaction time on derivatization yields of steroid compounds

1. 孕酮 (progesterone); 2. 睾酮 (testosterone); 3. 皮质醇 (cortisol); 4. 皮质酮 (corticosterone)。

3.2 色谱分离

按前述优化条件,所得 4 种类固醇衍生物的色谱分离见图 4。尽管衍生化产物在色谱分离中产生几个较大的杂质峰,但在本实验的条件下,各杂质峰对 4 种类固醇的衍生物均不产生干扰。理论上皮质醇和皮质酮分子中的两个羰基 (C-3 和 C-20 位) 都可能与试剂反应。然而实际标记过程中表现出的反应活性差别很大。通过对标记后各组分的质谱扫描表明:在所建立的标记条件下,试剂与类固醇分子进行反应的主要活性部位在 C-3 上。说明 BCEC 与类固醇中的 C-3 位羰基具有较高的反应活性。在通常情况下, C-20 位上的羰基与标记试剂分子表现出的反应活性很低,即使进行 6h 的衍生化反应, C-20 位上的羰基转化率也不足 C-3 位上的 1.0% (色谱峰面积比,对定量计算的影响很小)。其可能的原因是由于 C-20 位上的羰基邻位存在甲基或羟甲基基团,当与标记试剂分子作用时产生较大位阻,导致很低的反应转化率。这一位阻效应的存在不仅有利于实现对 C-3 位羰基的高转化率,同时也为产生单一标记产物而有利于色谱过程中对 4 种类固醇衍生物的定量测定。

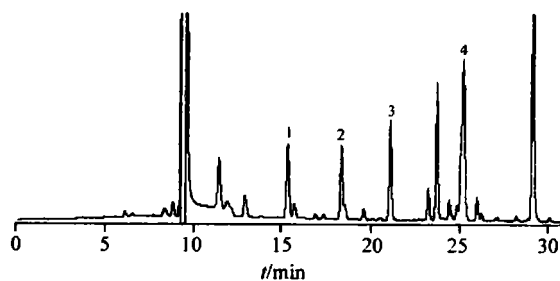


图 4 标准类固醇衍生物的色谱图 (50 pmol)

Fig 4 Chromatogram of the derivatized standard steroid derivatives (50 pmol)

色谱条件见实验部分 (chromatographic conditions as described in experimental section), 1. 皮质醇 (cortisol); 2. 皮质酮 (corticosterone); 3. 睾酮 (testosterone); 4. 孕酮 (progesterone)。

3.3 线性回归方程及检出限

配制浓度为 1.667×10^{-5} mol/L 到 1.627×10^{-8} mol/L 系列标准溶液,进样量为 10 μ L,相应注射量在 166.7 pmol ~ 162.7 fmol 范围内,依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得 4 种类固醇衍生物的回归方程、相关系数和检出限见表 1。各组分线性相关系数大于 0.9999,检出限在 47.3 ~ 71.2 fmol 之间 ($S/N = 3$)。

3.4 回收率和重现性

在相同洗脱条件下,对 81.4 pmol 的 4 种类固醇衍生物进行平行 6 次测定,保留时间和峰面积的重现性见表 2。采用标准加入法测得的回收率在 88.7% ~ 104.3% 范围内。

表 1 类固醇衍生物的线性回归方程、相关系数、检出限

Table 1 Linear regression equations, correlation coefficients, detection limits

类固醇 Steroids	$Y=A+BX$	r	检出限 Detection limit (fmol)	类固醇 Steroids	$Y=A+BX$	r	检出限 Detection limit (fmol)
皮质醇 Cortisol	$Y=13.12+43.34X$	0.9999	71.2	皮质酮 Corticosterone	$Y=12.61+44.82X$	0.9999	67.8
睾酮 Testosterone	$Y=24.40+52.51X$	0.9999	65.6	孕酮 Progesterone	$Y=71.08+122.89X$	0.9999	47.3

X. 为进样量 (injected amount, pmol); Y. 峰面积 (peak area)。实验的浓度范围 (concentration ranges of linear regression equations): $1.667 \times 10^{-5} \sim 1.627 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。

3.5 鼠类粪便中类固醇组分的质谱定性及含量测定

按实验优化条件,鼠类粪便中类固醇的实际色谱分离见图 5。由于鼠类粪便成分复杂,衍生化后的色谱分离产生较多的杂质峰。实际分离中,4种类固醇衍生物的出峰范围内在 15~25 min 之内,此范围内的各杂质峰对 4种类固醇的衍生物均不产生干扰。各组分的定性通过标准加入法和相应的柱后质谱手段进行确定。4种类固醇衍生物的质谱数据具有高度专一性,它们呈现出强烈的准分子离子 $[MH^+]$ 峰,以及失水后的碎片离子 $[MH^+ - H_2O]$ 峰。皮质醇的分子母核中由于存在两个羟基官能团,在质谱分析中显示出两个特征的失水碎片离子峰,分别为 m/z 648.3 ($MH^+ - H_2O$)和 m/z 630.0 ($MH^+ - 2H_2O$)。除此之外,所有衍生物都呈现出 $m/z: M + 41$ 的特征离子峰 (M 为类固醇的母核分子量),这一特征碎片离子的产生是来自衍生物分子结构中的酯键

CH_2O-CO 断裂,即断裂后含羰基的酰胺部分结合到类固醇分子中去所显示的特征峰 (断裂方式见图 2)。皮质醇衍生物的另一个特征碎片离子为 $M + 41 - H_2O$ (m/z 385.1),即断裂后含类固醇的母核部分继续丢失一分子水的结果。特征碎片离子 m/z 264.1 和 m/z 246.1 分别是衍生物分子中母核部分的 CH_2-O 键和 CH_2O-CO 键断裂的结果,断裂方式见图 2。所有柱后在线检测的类固醇衍生物的质谱数据见表 3。依据线性回归方程所计算的各组分的含量见表 4。

表 3 类固醇衍生物质谱数据分析

Table 3 Mass spectrometry (MS) data of four steroid derivatives

类固醇 Steroids	柱后在线的质谱数据 Online post-column MS analysis of steroid derivatives					
	分子量 Molecular weight	MH^+	$MH^+ - H_2O$	$M + 41^+$	质谱断裂模式 MS cleavage	
					CH_2O-CO	CH_2-OCO
皮质醇 Cortisol	362	666.2	648.3 ($MH^+ - H_2O$) 630.0 ($MH^+ - 2H_2O$)	385.1**	264.1	246.1
皮质酮 Corticosterone	346	650.3	632.0	387.2	264.1	246.1
睾酮 Testosterone	288	592.3	573.9	329.1	264.1	246.1
孕酮 Progesterone	314	618.3	#	355.2	264.1	246.1

* M: 类固醇化合物的分子量 (the molecular weight of steroid compounds); MH^+ : 衍生物的准分子离子 (quasi-molecular ion derivatives); ** 皮质醇衍生物的特征碎片离子 (characteristic fragment ion of cortisol derivative) $M + 41 - H_2O = 385.1$ (M: 362); # 孕酮分子结构中无羟基, 质谱分析不失水峰 (the molecular core structure of progesterone does not present hydroxyl group; MS/MS analysis does not exhibit the characteristic fragment ion peak of losing H_2O molecule)。

表 2 保留时间和峰面积的重现性 (n=6)

Table 2 Repeatability for area and retention time (n=6)

类固醇 Steroids	峰面积 Peak Area RSD (%)	保留时间 Retention time RSD (%)
皮质醇 Cortisol	1.01	0.022
皮质酮 Corticosterone	1.14	0.021
睾酮 Testosterone	1.02	0.016
孕酮 Progesterone	1.03	0.020

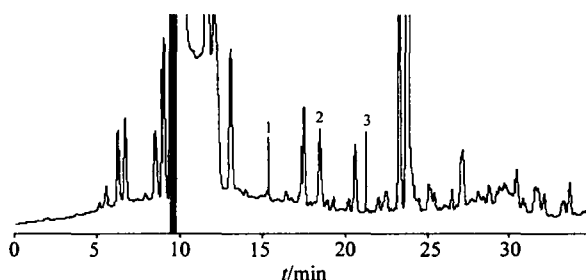


图 5 老鼠粪样中类固醇色谱分离图

Fig 5 Chromatogram of steroids from the extracted rat feces
色谱条件见图 4 (chromatographic conditions and peaks as Fig 4)。

5 结 论

利用 1,2-苯并-3,4-二氢咔唑-9-乙基肼基甲酸酯作为柱前衍生化试剂,对 4 种类固醇化合物的衍生化和色谱分离条件进行了优化选择。借助在线的柱后质谱方法进行了衍生物的定性鉴定,4 种类固醇衍生物的质谱数据显示出各自的高度专一性。利用各衍生物的荧光线性响应,对鼠类粪便中的 4 种类固醇进行了相应含量测定。所建立的方法快速、灵敏,测定结果满意。

References

- 1 John W, Tumer J, Richard N, Caroline R. *Gen Comp Endocrinol*, **2003**, 133: 341 ~ 352
- 2 Tumer J W, Tolson P, Hamad N. *J. Zoo Wildlife Med*, **2002**, 33: 214 ~ 221
- 3 Ren Baoping (任宝平), Xia Shuzhong (夏述忠), Li Qingfen (李庆芬), Liang Bing (梁冰), Qiu Junhua (邱军华), Zhang Shuyi (张树义). *Acta Zoologica Sinica (动物学报)*, **2003**, 49: 325 ~ 331
- 4 Good T, Khan M Z, Lynch J W. *Physiol Behav*, **2003**, 80: 405 ~ 411
- 5 Goymann W, Mostl E, Vant' Hof T, East M L, Hofer H. *Gen Comp Endocrinol*, **1999**, 114: 340 ~ 348
- 6 Mateo J M, Cavigelli S A. *Physia Biochem. Zoo*, **2005**, 78: 1069 ~ 1085
- 7 Tumer J R J M, Emeth R, Rogers C. *Gen Comp Endocrinol*, **2003**, 133: 341 ~ 352
- 8 You J, Zhang H, Shi Y, Zhao X, Chen X. *Talanta*, **2005**, 66: 982 ~ 992

Detem ination of Steroids from Rat Feces by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Derivatization and Identification by On-line Mass Spectrometry

Chen Wandong⁴, Zhang Haifeng¹, Guo Qingjun⁴, Wang Xianfeng², Suo Yourui³,
Chen Guichen³, Zhang Honghai², You Jinmao^{*1,3}

¹ (College of Chemical Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

² (College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

³ (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

⁴ (Jining Teachers College, Jining 272025)

Abstract A simple and sensitive method for the determination of steroid compounds extracted from rat feces using 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl-carbonylhydrazine (BCEC) as pre-column derivatization reagent by high performance liquid chromatography in combination with a gradient elution with fluorescence detection and mass spectrometric identification has been developed. Studies on derivatization conditions indicate that steroid compounds react with BCEC at 65 °C within a two-hour period in the presence of trichloroacetic acid (TCA) catalyst with acetonitrile as reaction co-solvent to give the corresponding sensitive fluorescence derivatives. The fluorescence excitation and emission wavelengths are 333 nm and 390 nm, respectively. The identification of steroid derivatives is performed under atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) source in positive-ion mode. Correlation coefficients for steroid derivatives are > 0.9999, and detection limits (at signal-to-noise ratio of 3:1) are between 47.3 to 71.2 fmol. The established method is sensitive and reproducible for the determination of steroid compounds from real samples with satisfactory results.

Keywords High performance liquid chromatography/mass spectrometry, fluorescence derivatization, pre-column derivatization, steroids

(Received 10 January 2006; accepted 17 April 2006)

表 4 粪便中类固醇的测定结果 (n = 3)

Table 4 Determination results of steroids in feces (n = 3)

类固醇 Steroids	雄性 (ng/g) Male	质谱 MS	雌性 (ng/g) Female	质谱 MS
皮质醇 Cortisol	171.6 ± 2.4	Yes	168.7 ± 2.1	Yes
皮质酮 Corticosterone	438.2 ± 2.6	Yes	403.1 ± 2.8	Yes
睾酮 Testosterone	44.5 ± 3.2	Yes	Nd*	No
孕酮 Progesterone	Nd*	No	153.9 ± 2.6	Yes

Nd*: 未检测到或在检出限以下 (not detectable or below limit of detection)