柱前衍生化法检测类性激素化合物替勃龙及其代谢物

Determination of the compouds that similar to sex hormones Tibolone and its metabolites by Precolumn Derivatization

谢亚平，司丹丹，龙志敏

Yaping Xie, Dandan Si, Zhimin Long

SCIEX 应用支持中心，中国

Key words: Sex hormone, Tibolone and its metabolites, Precolumn Derivatization

引言

替勃龙是一种类雌激素化合物，口服替勃龙后迅速代谢成3α-OH-替勃龙（3α-OH-Tibolone）、3β -OH-替勃龙（3β-OH-Tibolone）和替勃龙异构体（△4-Tibolone），其中3α-OH-Tibolone和3β-OH-Tibolone具有雌激素活性， △4-Tibolone及母体化合物具有孕激素和雄激素活性。替勃龙口服后吸收后，代谢迅速，原型及△4-Tibolone血浆水平极低，3α-OH-Tibolone和3β-OH-Tibolone血浆峰值高但不会蓄积，因此该项目对灵敏度要求较高。性激素在生物体内含量极低，由于其化学结构中缺少可离子化的官能团，液相色谱-质谱联用分析时检测灵敏度不高，因此采用柱前衍生的方法进行结构修饰是提高质谱响应的有效手段。雌激素结构中所含的(酚) 羟基及雄激素结构中含有的酮基和羟基为发生衍生化反应的主要位点。

本文建立了两种柱前衍生LC-MS/MS法进行替勃龙及其代谢物的检测。采用对甲基苯磺酰异氰酸酯（PTSI）对3α-OH Tibolone和3β-OH Tibolone进行衍生化处理，采用盐酸羟胺（hydroxylamine hydrochloride）对Tibolone及△4-Tibolone进行衍生化处理，替勃龙及其代谢物经过衍生化处理后极大地提高了其灵敏度，可达到生物样品中的检测分析要求。同时该方法具有选择性高，适合痕量分析等优点，能对生物样品中的替勃龙及其代谢物进行精确快速的定量分析。

衍生化原理

如图1所示，衍生化试剂PTSI主要 与3α-OH Tibolone和3β-OH

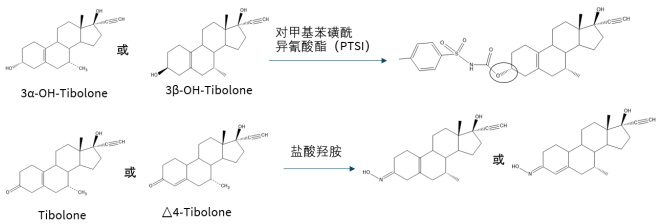

图1. 衍生化反应原理

Tibolone的羟基发生反应，衍生化试剂盐酸羟胺主要与Tibolone及△4-Tibolone的酮基发生反应，从而提高替勃龙及其代谢物的离子化效率，提高质谱检测的灵敏度。

仪器设备

SCIEX ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 6500系统

图2 . ExionLC™ AD系统和SCIEX Triple Quad™ 6500系统

衍生化前处理

3α-OH Tibolone和3β-OH Tibolone的衍生化处理

衍生化试剂PTSI纯乙腈配置成2.5%浓度，取不同浓度标准溶液100 µl加入衍生化试剂50 µl（2.5%PTSI），涡旋混匀2 min，加入水50 µl，涡旋混匀30 s，终止衍生化反应。

Tibolone与△4-Tibolone的衍生化处理

衍生化试剂盐酸羟胺使用纯水配置成1%浓度，取不同浓度标准溶液200 µl加入衍生化试剂200 µl（1%盐酸羟胺溶液），涡旋混匀1 min，加入终止试剂200 µl（含0.1%甲酸的甲醇溶液），涡旋混匀30 s，终止衍生化反应。

对照品溶液制备

3α-OH Tibolone和3β-OH Tibolone对照品溶液的制备

分别取3α-OH-Tibolone、3β-OH-Tibolon对照品适量，精密称定，加乙腈配制成每1 ml含1 mg的储备溶液，然后用乙腈稀释制成每1 ml含0.01 ng、0.02 ng、0.05 ng、0.10 ng、0.50 ng、5.00 ng、10.0 ng、20.0 ng、50.0 ng、100 ng的标准溶液。

Tibolone与△4-Tibolone对照品溶液的制备

分别取Tibolone、△4-Tibolone对照品适量，精密称定，加乙腈配制成每1ml含1mg的储备溶液，然后用乙腈稀释制成每1 ml含0.01 ng、0.02 ng、0.05 ng、0.10 ng、0.50 ng、1.00 ng、5.00 ng、10.0 ng、50.0 ng的标准溶液。

液相条件

3α-OH Tibolone和3β-OH Tibolone液相条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD系统

色谱柱：Waters ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm, 100×2.1 mm

流动相：A: 水（2mM乙酸铵） B: 甲醇

流速：0.35 mL/min

柱温：40 ℃

液相梯度：

时间(min)	A(%)	B(%)
0	30	70
5	30	70

Tibolone与△4-Tibolone液相条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD系统

色谱柱：Waters XSelect HSS T3 2.5 µm ,2.1×150 mm

流动相：A:： 水（0.1% FA）B: 乙腈

流速：0.30 mL/min

柱温：40 ℃

液相梯度：

时间(min)	A(%)	B(%)
0	80	20
1	80	20
7	5	95
9	5	95
9.1	80	20
10	80	20

质谱条件

3α-OH Tibolone和3β-OH Tibolone质谱条件

离子源：ESI，负离子模式

扫描方式：MRM多反应监测

气帘气CUR: 25psi　　源温度 Tem：600℃

雾化气Gas1：60psi　　加热气Gas2：60psi

碰撞气 CAD: 10　　离子化电压：-4500V

MRM参数：如表1

表1. 3α-OH-Tibolone与3β-OH-Tibolone的质谱参数

化合物名称（Name）	Q1	Q3	DP	CE
3α-OH-Tibolone	510.0	170.0	-100	-40
3β-OH-Tibolone	510.0	170.0	-100	-40

Tibolone与△4-Tibolone液相条件

离子源：ESI，正离子模式

扫描方式：MRM多反应监测

气帘气CUR: 20 psi　　源温度 Tem：600℃

雾化气Gas1：60 psi　　加热气Gas2：50 psi

碰撞气 CAD: 10　　离子化电压：4000 V

MRM参数：如表2

表2. Tibolone与△4-Tibolone的质谱参数

化合物名称（Name）	Q1	Q3	DP	CE
Tibolone	328.2	295.2	80	24
△4-Tibolone	328.2	124.1	110	41

实验结果

重现性：替勃龙及其代谢物最低定量限为标准溶液0.01 ng/ml（相当于3α-OH Tibolone和3β-OH Tibolone进样浓度为0.005 ng/ml，Tibolone与△4-Tibolone进样浓度为0.0033 ng/ml）典型色谱图见图3；最低定量限连续进样6针，替勃龙及其代谢物RSD值分别为3.63%、3.97%、9.14%、11.57%，具体数据见表3。

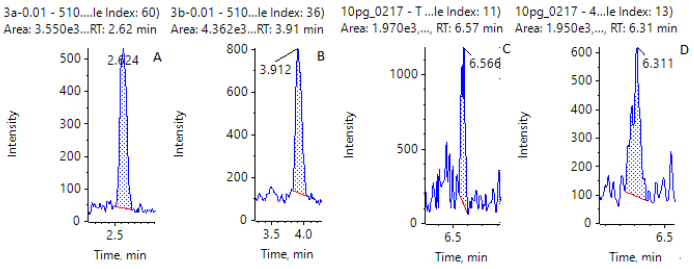

图3. 替勃龙及其代谢物最低定量限提取离子流图
（A代表3α-OH Tibolone，B代表 3β-OH Tibolone，C代表Tibolone，D代表△4-Tibolone）

表3. 替勃龙及其代谢物最低定量限重现性

化合物名称（Name）	3α-OH Tibolone	3β-OH Tibolone	Tibolone	△4-Tibolone
RSD（%）	3.63	3.97	9.14	11.57

3α-OH Tibolone和 3β-OH Tibolone线性范围：分别进样分析每1ml含0.01ng、0.02ng、0.05ng、0.10ng、0.50ng、5.00ng、10.0ng、20.0ng、50.0ng、100ng的3α-OH Tibolone和 3β-OH Tibolone标准溶液。以峰面积对浓度做标准曲线，标准曲线在线性范围内线性关系良好，3α-OH Tibolone相关系数r=0.99847，标曲各点准确度在90.04%-107.02%之间，3β-OH Tibolone相关系数r=0.99906，标曲各点准确度在95.81%-109.40%之间，标准曲线见图4和图5。

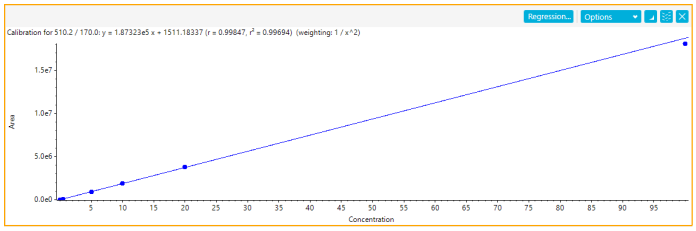

图4. 3α-OH Tibolone标准曲线

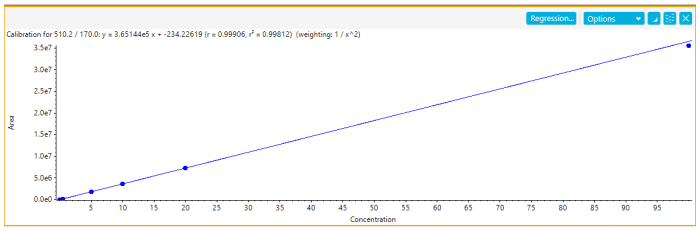

图5. 3β-OH Tibolone标准曲线

Tibolone 和△4-Tibolone线性范围：分别进样分析每1 ml含0.01 ng、0.02 ng、0.05 ng、0.10 ng、0.50 ng、1 ng、5.00 ng、10.0 ng、50.0 ng的Tibolone 和△4-Tibolone的混合标准溶液。以峰面积对浓度做标准曲线，标准曲线在线性范围内线性关系良好，Tibolone相关系数r=0.99948，标曲各点准确度在95%-103.1%之间，△4-Tibolone相关系数r=0.99906，标曲各点准确度在93.52%-104.32%之间，标准曲线见图6。

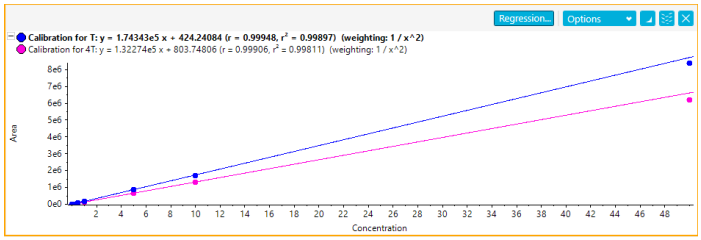

图6. Tibolone和△4-Tibolone标准曲线

总结

本文使用SCIEX Triple Quad™ 6500系统建立了类性激素化合物替勃龙及其代谢物的柱前衍生LC-MS/MS方法。该方法特异性好无干扰，线性关系良好。方法的灵敏度、重现性以均满足分析要求。此方法可用于生物基质中替勃龙及其代谢物的定量分析研究。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅https://sciex.com.cn/diagnostics。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14547-ZH-A

SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897
官网：sciex.com.cn
官方微信：SCIEX-China