

评述与进展

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00743

类固醇类激素 GC-MS 分析中酮基衍生化技术研究进展

方 锴 潘学军* 黄 斌 刘晶靓 王 宇 高建培

(昆明理工大学环境科学与工程学院, 昆明 650093)

摘 要 类固醇类激素以其独特的生理生化效应而备受关注,气相色谱-质谱联用技术已经成为类固醇类激素分析检测的重要手段。由于类固醇类激素含有羟基、酮基等极性官能团,GC-MS 分析时检测灵敏度不高,色谱分离峰形差,需通过衍生化技术将其转化成极性较低、易挥发、热稳定性高的化合物,以改善色谱分离峰形、提高检测灵敏度,使之适用于 GC-MS 痕量分析。目前,类固醇类激素羟基等含有活性氢原子官能团的衍生化技术发展较为成熟,但酮基衍生化仍缺乏系统研究。本文对类固醇类激素酮基衍生化技术研究进展进行了综述,主要介绍了烯醇化、硅烷化、肟化、硅烷化等酮基衍生化技术的反应原理、应用现状,并对目前存在的问题及进一步的研究方向进行了讨论和展望,为类固醇类激素酮基衍生化技术的研究提供参考。

关键词 类固醇类激素;酮基;衍生化;气相色谱-质谱联用

1 引 言

类固醇类激素是由胆固醇合成的具有生物活性、脂溶性、低分子质量并且具备激素功能的类固醇物质^[1,2]。类固醇类激素以其独特的生理生化作用合法的应用于人类和动物医学领域,是治疗或检测人类与动物某些疾病的重要依据^[3]。但由于类固醇类激素能够极大促进动物生长,自 20 世纪 80 年代起应用于畜牧业^[4,5]。同时,有些类固醇类激素作为兴奋剂类药物在体育领域非法使用^[6]。大量研究表明,多数类固醇类激素都具有潜在的致癌效应,长期摄入会导致机体内分泌紊乱,发育异常^[7]。有相当一部分类固醇类激素属于环境内分泌干扰物范畴,化学性质稳定,难以分解,易于在生物体内富集。相对其它环境内分泌干扰物,有更强的内分泌干扰作用,与人工合成的化学物质相比,生态环境效应尤其显著^[8],即使环境浓度在 0.1 ng/L 也会对生物体造成危害^[9,10]。所以,类固醇类激素的研究已成为分析化学领域的热点课题之一,主要涉及分析方法、代谢产物测定、生物危害以及环境污染特征等。

目前,随着固相萃取、固相微萃取等样品前处理技术和色谱、质谱、光谱以及色谱-质谱、色谱-光谱联用等现代化分析技术的应用,类固醇类激素的研究得到了极大的发展。其中,色谱技术的应用最为广泛,但配备常规检测器的气相色谱法(GC)和液相色谱法(LC)很难达到类固醇类激素痕量分析的要求。目前使用的主要方法是气相色谱-质谱(GC-MS)法和液相色谱-质谱(LC-MS)法^[7],检出限从 $\mu\text{g/L}$ 至 ng/L 级。气相色谱-质谱联用法以其良好的检测灵敏度,避免过多的溶剂浪费,相对快速的分析速度和较低的运行成本而受到痕量分析工作者的青睐^[11]。但是由于类固醇类激素本身具有弱挥发性和热不稳定性,加之含有羟基、酮基等官能团,极性较大,直接用 GC-MS 分析,在色谱柱内容易产生吸附,导致测量值偏低,灵敏度下降,不利于痕量分析。GC-MS 分析通常需通过衍生化技术,将其转化成极性较低,更易挥发且热稳定性好的衍生化产物,以提高检测灵敏度和改善色谱峰形,达到痕量分析的要求。

在衍生化技术研究中,羟基等含有活性氢原子官能团的类固醇类激素衍生化技术已经取得一定成果,研究较为全面,通过硅烷化、酯化、酰化等衍生化技术,基本满足应用要求。相比之下,由于类固醇类激素的酮基不含活性氢原子,衍生化难度较高。目前,类固醇类激素酮基衍生化技术还不完善,反应条

2009-09-29 收稿; 2009-12-14 接受

本文系国家自然科学基金(Na. 20767002),国家环保公益性行业科研专项基金(Na. 200809136),教育部留学回国人员科研启动基金(Na. 教外司留[2008]890号),云南省科技计划项目(2007B035M)资助

* E-mail: xjpan@knust.edu.cn

件差别很大,应用试剂种类繁多,有待于深入研究。本文旨在介绍目前类固醇类激素酮基衍生化技术取得的研究成果、应用现状及存在的问题,以便为类固醇类激素酮基衍生化技术的进一步研究提供参考。

2 类固醇类激素的化学结构

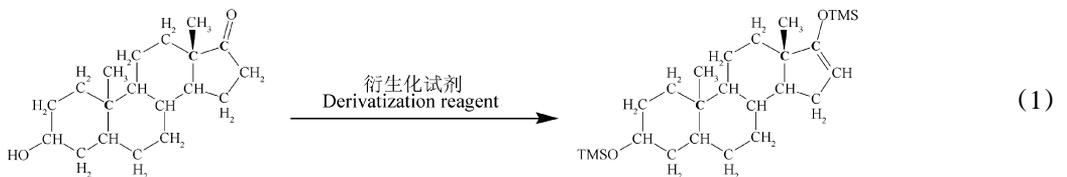
类固醇类激素分子量较小,在结构上通常含有一个类固醇类环,大多数类固醇类激素是在雌烷、雄烷、孕烷环结构的基础上通过在特殊碳原子取代基团种类和空间化学结构的不同而得到的^[12]。绝大多数类固醇类激素的取代基出现在 C-3, C-5, C-17, C-18, C-20, C-21 等位置^[13],取代基团的种类主要是羟基和酮基。对于类固醇类激素结构上普遍含有的羟基官能团,采用三甲基硅烷衍生化技术(Trimethylsilyl, TMS),可以达到较好的分析效果^[14,15]。所以,酮基衍生化就成为 GC-MS 分析此类物质的关键问题。

3 酮基衍生化

衍生化技术(Derivatization)是通过化学反应将样品中难于分析检测的目标化合物定量的转化成另一种易于分析检测的化合物。通过衍生化,可以降低待测物极性,提高挥发性,增加热稳定性,从而提高检测灵敏度和改善色谱峰形^[16,17]。含酮基类固醇类激素具有多种化学性能,但对于类固醇类激素的酮基来说,化学性质主要取决于含有的碳氧双键(羰基),其影响可归纳为两点:(1)增强羰基相邻的碳原子上氢原子的酸性;(2)提供进行亲核加成的部位,使亲核试剂对羰基进行加成。总之,羰基氧容纳一个负电荷的能力是造成以上两点的根本原因^[18,19]。类固醇类激素酮基衍生化就是利用以上两种性质,采取一定的技术手段以改变类固醇类激素的分子结构,达到衍生化的目的。

3.1 烯醇化 硅烷化(Enolisation-Silylation)

烯醇化 硅烷化是将类固醇类激素的酮基在一定条件下进行烯醇化反应,并在生成烯醇产物的同时将烯醇产物与硅烷化衍生化试剂反应,使烯醇产物上生成的和原有的羟基硅烷化,最终形成稳定的烯醇化 硅烷化衍生产物(Enol-silyl-derivatives)。如式(1)^[6]所示,将雄酮(Androsterone)衍生化为相应的烯醇化 三甲基硅烷化产物(Enol-TMS-derivatives)。



3.1.1 反应原理 烯醇化是反应的关键步骤。烯醇化反应是基于类固醇类激素酮基的碳氧双键能够增强相邻碳原子上氢原子的酸性,使类固醇类物质中碳原子上的氢原子迁移,并使羰基的氧原子得到氢原子,形成羟基和碳碳双键^[18,19],反应如式(2)^[18]。烯醇化反应可在酸性或碱性条件下发生。在酸性条件下,烯醇化是通过羰基的质子化后失去碳原子上的一个质子而生成烯醇;在碱性条件下,首先是由碱夺去碳原子上的氢形成烯醇负离子,随后从带质子的溶剂分子上取得质子形成烯醇^[18]。



在烯醇化反应中存在着酮基化合物与烯醇化产物的平衡^[17~19]。在应用烯醇化反应中,经常将烯醇化与硅烷化反应结合起来,最常用的方法是在生成烯醇产物的同时将羟基等官能团进行三甲基硅烷化处理,最终形成稳定的烯醇化 三甲基硅烷化衍生物,这样既可以使反应平衡向着烯醇化的方向进行,又可将原有和生成的羟基硅烷化,以达到理想的分析效果。

3.1.2 衍生化试剂 类固醇类激素酮基烯醇化 硅烷化反应通常是在硅烷化衍生化试剂与催化剂存在的条件下进行的。最常用的硅烷化试剂为 *N*-甲基-*N*-三甲基硅基三氟乙酰胺(*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, MSTFA),常用催化剂为三甲基碘硅烷(Trimethyliodosilane, TMIS),碘化铵(Ammonium iodide, NH₄I)等。除了硅烷化试剂与催化剂,在衍生化过程中常常还需要加入还原剂,如:二硫赤藓糖醇(Dithioerythritol, DTE),乙硫醇(Ethanthiol),1丙硫醇(1-propanethiol)和2巯基乙醇(2-merap-

toethanol)。还原剂的使用是为了稳定衍生化试剂,起到抗氧化,防止分解的作用。

目前,其它硅烷化试剂,如:*N, O*-双三甲硅基乙酰胺 (*N, O*-bis-trimethylsilyl-acetamide BSA)也有应用。还原剂以 DTE与乙硫醇为主。衍生化试剂各组份常用的比例范围为:1000 2~20 (2~5)(硅烷化试剂/催化剂/还原剂, $V/V(w)/w$)。

3.1.3 应用状况 当今类固醇类激素酮基烯醇化硅烷化衍生化技术主要应用于食品安全,兴奋剂检测与临床医学领域。如:Fuh等^[20]采用 MSTFA/TMIS/DTE对 17-羟基孕酮(17-Hydroxypregesteme)等类固醇类激素进行衍生化,通过 GC-ITMS分析,检出限达到 0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,酮基在 TMIS存在的条件下很容易转化为相应的烯醇结构。Hartman等^[5]在检测肉类中雄激素、雌激素、孕激素及其代谢产物时,采用 MSTFA/TMIS/DTE(1000 2 2, $V/V(w)$)为衍生化试剂,GC-MS检测的灵敏度比单纯的羟基硅烷化方法提高了约 10倍,并指出此衍生化试剂可以衍生化所有含氧的官能团。表 1列出了烯醇化硅烷化衍生化技术的应用状况。

表 1 烯醇化硅烷化衍生化技术应用状况

Table 1 Application of enolisation-silylation derivatization technology

待测物 Analytes	样品 Matrixs	衍生试剂 Derivatization reagents	催化剂 Catalysts	还原剂 Reducing agents	反应条件 Reaction conditions	检测方法 Detection methods	检出限 LOD	参考文献 Ref
去甲雄酮 Norandrostosterone	尿液 Urine	MSTFA	NH_4I	1-Propanethiol	60 15 min	GC-MS-MS	5 ng/L	[21]
盐皮质激素 Corticoids	血清, 尿液 Serum, Urine	MSTFA	NH_4I	DTE	60 15 min	GC-MS	1-3 $\mu\text{g}/\text{L}$	[22]
类固醇类激素 Steroid hormones	肉类 Meat	MSTFA	NH_4I or TMIS	DTE	60 30 min	GC-MS	-	[23]
17-羟基孕酮等 17-Hydroxypregesteme, etc	肉类 Meat	MSTFA	TMIS	DTE	60 30 min	GC-ITMS	0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	[20]
雄性激素类 Androgens	尿液 Urine	MSTFA	NH_4I	Ethanehtiol	-	GC-MS	-	[24]
类固醇类激素 Steroid hormones	肉类 Meat	MSTFA	TMIS	DTE	60 15 min	GC-MS	0.02~0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	[5]
类固醇类激素 Steroid hormones	毛发 Hair	MSTFA	TMIS	DTE	60 30 min	GC-MS	40~200 ng/g	[25]
美睾酮 Mesterolone	尿液 Urine	MSTFA	NH_4I	DTE	60 15 min	GC-MS	-	[26]
雄酮 Androstosterone	尿液 Urine	MSTFA	NH_4I	Ethanehtiol	80 30 min	GC-MS	-	[6]
类固醇类激素 Steroid hormones	血清 Serum	MSTFA	TMIS	DTE	80 35 min	GC-MS	< 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$	[27]
类固醇类激素 Steroid hormones	肉类 Meat	MSTFA	TMIS	DTE	60 40 min	GC-MS	5-100 ng/kg	[28]
孕三烯酮,去甲雄三烯醇 酮等 Gestrinone, Trenbolone, etc	-	MSTFA	NH_4I	2-Merapt- oethanol	60 30 min	GC-MS	3 $\mu\text{g}/\text{L}$	[29]
雄性激素类固醇 Andro- genic steroids	肉类 Meat	MSTFA	NH_4I	Ethanehtiol	65 30 min	GC-MS	0.08~5.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$	[30]
类固醇类激素 Steroid hormones	-	MSTFA	TMIS	DTE	-	GC-MS	-	[1]
类固醇类激素 Steroid hormones	血浆 Plasma	MSTFA	TMIS	DTE	60 30 min	GC-MS-MS	-	[31]
类固醇类激素 Steroid hormones	毛发 Hair	MSTFA	TMIS	DTE	60 30 min	GC-MS-MS	0.1~0.2 pg/mg	[32]
睾酮等 Testosterone, etc	肉类 Meat	MSTFA	NH_4I	DTE	80 20 min	GC-MS	0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	[4]
17-甲基睾酮等 17-Methyltestosterone, etc	尿液 Urine	MSTFA	NH_4I	DTE	60 15 min	GC-MS	-	[33]

MSTFA: *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide; TMIS: trimethyliodosilane; DTE: dithioerythritol

3.1.4 存在的问题 很多研究者在应用酮基烯醇化-硅烷化衍生化技术时都发现了异构现象的存在。Bowers等^[21]在研究表睾酮等类固醇类激素酮基烯醇化-硅烷化时发现,因为烯醇反应生成双键位置的不同而导致同分异构体的存在。文献[4,5]同样指出,孕激素通过烯醇化-硅烷化衍生化后,会因为C-17上支链的异构而产生同分异构现象。这些异构现象主要是因为烯醇化而产生双键位置不同引起的。因为一般的类固醇类激素的酮基有2个含氢的碳原子,在烯醇化反应过程中,任意碳原子都可以与酮基上的碳原子生成双键。如果目标物质含有 α,β -不饱和酮基,该酮基在烯醇化生成双键时,必然导致 α,β -不饱和键的断裂,从而导致类固醇类激素的结构改变,并且很容易在环结构中生成双键。图1显示了去甲雄三烯醇酮在烯醇化过程中因双键位置不同产生的异构现象。但需要指出的是,并不是所有烯醇化反应都会有双键异构现象,双键异构现象还取决于类固醇类激素自身的结构对酮基的影响。

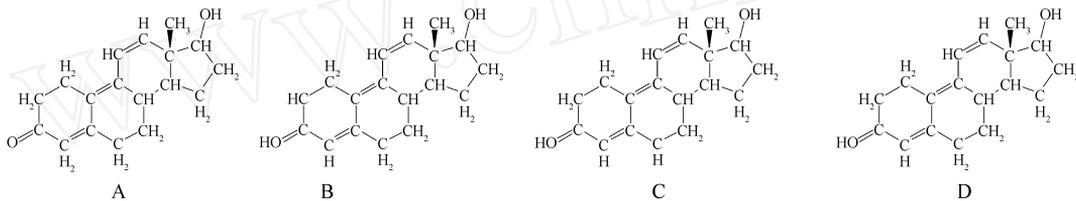
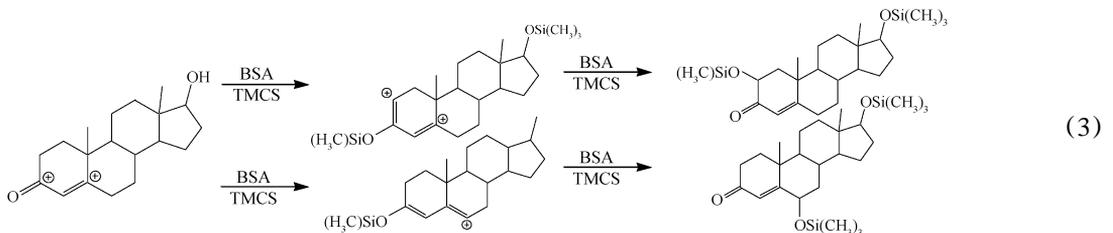


图 1 去甲雄三烯醇酮及其烯醇化异构体^[28]

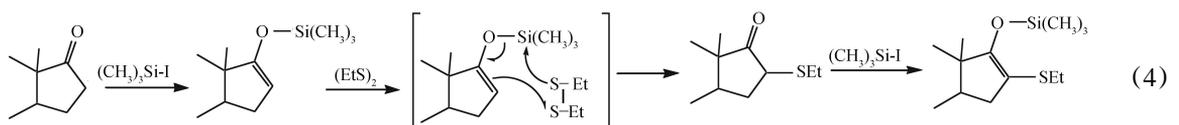
Fig 1 Trenbolone and its enolisation isomers^[28]

A. 去甲雄三烯醇酮 (Trenbolone); B, C, D. 烯醇化异构体 (Enolisation isomers)。

除了异构现象的存在,在衍生化试剂中存在的亲核试剂也能够导致副产物的产生。Meunier-Solère等^[23]发现,以MSTFA/TMIS/DTE或MSTFA/NH₄I/DTE为衍生化试剂时会有副产物产生。其原因是含有 α,β -不饱和酮基的类固醇类激素通过烯醇化反应,使得一些碳原子上的电子对产生偏离现象,从而得到很多亲电子位点。衍生化试剂中的亲核试剂可以进攻这些亲电子位点,生成副产物。式(3)展示了应用BSA与TMCS衍生化睾酮时,由于亲核试剂的存在而导致副产物的生成的过程^[23]。式(3)中, α,β -不饱和酮基表示具有很高的亲电子性。



另一方面,由于MSTFA与NH₄I可生成TMIS, TMIS易于分解,其分解产生的碘单质可以与类固醇类激素反应,为了避免这种反应,常常加入还原剂乙硫醇,利用其与碘单质生成碘化氢和二乙基二硫(Diethyl disulfide, (EtS)₂)以减少碘单质的生成。但是Gomes等^[24]发现,在用MSTFA/NH₄I/Ethanthiol为衍生化试剂时会有含乙基硫(SET)的副产物生成。Kerkhof等^[6]在用MSTFA/NH₄I/Ethanthiol研究雄酮等物质时也发现副产物的生成,并提出了副产物形成机理的假设。假设的主要原因是由于二乙基二硫的产生,生成的烯醇化-三甲基硅烷化衍生物的三甲基硅在二乙基二硫的亲核攻击下丢失。同时,乙基硫基团与相邻不饱和碳原子结合,而丢失三甲基硅基的氧原子又被重新烯醇化-三甲基硅烷化,生成带有乙基硫的副产物,如式(4)所示^[6]。

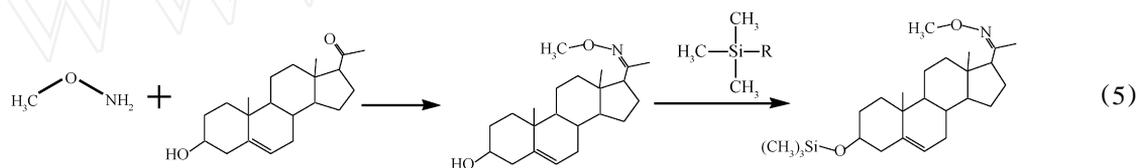


尽管存在着产生多种异构与副产物现象,烯醇化-硅烷化仍然是使用最为广泛的酮基衍生化技术。主要原因是所用衍生化试剂具有强大的衍生化能力,能同步衍生化酮基、羟基等含有活性氢原子的官能团,既简化了实验过程,又适用于含有不同基团物质的多组分分析。同时,酮基经反应后引入的TMS基

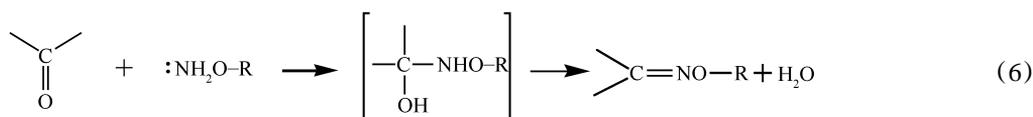
团与其它衍生化技术相比较, TMS基团质量较大, 能够更好地降低极性与沸点, 取得了良好的检测效果, 基本适用于痕量分析。另外, 衍生化试剂本身就是进样溶剂, 可简化操作步骤, 减少物质流失。所以, 酮基烯醇化-硅烷化技术已经成为酮基衍生化领域中最重要的手段之一, 但是其反应条件还需系统优化, 异构与副产物现象有待深入研究。

3.2 脎化-硅烷化 (Oximation-Silylation)

脎 (Oxime) 是含有羰基的醛、酮类化合物与羟胺类物质作用生成的一类化合物。脎化-硅烷化技术是根据类固醇类激素的酮基可提供进行亲核加成部位的性质, 以羟胺类物质为衍生化试剂, 将类固醇类激素的酮基在一定条件下与羟胺类物质进行亲核加成反应, 生成脎类物质^[17-19]。但是, 类固醇类激素一般都会带有羟基等含有活性氢原子的官能团, 在多组分分析时, 为了使这些类固醇类激素得到较好的分析效果, 需将生成的脎类物质在一定条件下与硅烷化衍生化试剂进行反应, 将类固醇类激素的羟基等官能团硅烷化, 得到稳定产物, 含有酮基与羟基的类固醇类激素的脎化-硅烷化反应过程如式 (5) 所示^[34]。



3.2.1 反应原理 脎化-硅烷化实际上是对类固醇类激素的酮基与含活性氢原子的羟基等官能团进行分步处理, 反应的关键是脎化。脎化反应是基于醛酮类物质与氮亲和试剂的加成反应^[17-19], 因为酮基中的 π 电子被强烈地拉向氧原子, 故酮基中的碳是缺电子中心, 氧是富电子中心。所以, 亲核试剂易于从空间阻碍小的酮基平面的上面或下面进攻酮基的碳原子。碱性的胺类衍生物, 特别是羟胺类物质作为亲核试剂向酮基进攻, 并与酮基加成生成产物, 该产物进一步反应, 脱去一分子水而生成含有碳氮双键的脎化产物^[17, 18], 如式 (6) 所示。



这个加成反应是碱性含氮化合物向酮基的碳原子做亲核攻击。因此, 对于含酮基类固醇类激素, 高度酸化对加成有利。但在高酸度下, 羟胺类物质也能质子化而形成离子, 使之缺乏共享电子, 因而不能再成为亲核试剂。因此对于羟胺类衍生化试剂来说, 低的酸度对加成有利。但是溶液又需要一定的酸性, 使相当一部分酮基质子化。所以, 生成脎的速度在一定的 pH 范围内达到最大值, 其具体条件取决于类固醇类激素的结构和衍生化试剂的碱性^[17-19]。

3.2.2 衍生化试剂 脎化-硅烷化反应是由两步反应组成, 其中脎化衍生化试剂为羟胺类物质。因羟胺类物质的盐不易被空气氧化, 因此常常以盐的形式保存^[19]。常用的脎化衍生试剂有盐酸羟胺 (Hydroxylamine hydrochloride) 和甲氧胺盐酸盐 (Methoxyamine hydrochloride, MOX) 等。使用时, 通常加入吡啶, 使试剂从其盐中释放出来。常用的硅烷化衍生试剂主要是 *N, O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺 (*N, O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA)、MSTFA 和 BSA 等。在硅烷化时常常加入三甲基硅咪唑 (Trimethylsilyl-imidazole, TMSI)、叔丁基二甲基氯硅烷 (Tert-butyl dimethylsilyl-chlorosilane, TBCS) 和 1-异丁基二甲基硅咪唑 (Tert-butyl dimethylsilyl-imidazole, TBSI) 等催化剂。

3.2.3 应用状况 类固醇类物质酮基的脎化-硅烷化衍生技术应用比较广泛, 最常采用的是以甲氧胺盐酸盐 (MOX) 为脎化试剂, 并与三甲基硅烷化试剂结合使用, 生成甲基脎-三甲基硅烷 (MO-TMS) 衍生物的方法。如 Suzuki 等^[35] 在分析人体尿液中的肾上腺皮质激素类物质时, 用 MOX 在 60 °C 反应 30 min, 样品吹干后使用 BSA 在 100 °C 条件下反应 120 min, 成功地将反应物衍生化为相应的 MO-TMS 衍生物。Mass 等^[36] 在研究睾酮与 17-羟基孕酮的 MO-TMS 衍生化时指出, MO-TMS 衍生化的优点主要是产物稳定, 防止酮基烯醇化。另外, 在应用 MO-TMS 法衍生化酮基时, 很多学者发现在电子轰击 (Electron-impact, EI) 质谱图中会有 $[M - 31]^+$ 特征峰的出现, 主要原因是由分子离子 $[M]^+$ 丢失了一个

[OCH₃]基团所导致^[35]。所以, [M - 31]⁺特征峰也被普遍认为是酮基被 MOX 脎化的依据。

脎化 硅烷化衍生技术也可以利用其它脎化试剂完成。如: 盐酸羟胺和邻-(2, 3, 4, 5, 6-全氟苯基) 羟基氨 (O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl) hydroxylamines PFBHA)。Sebök 等^[37]应用盐酸羟胺脎化胆酸类物质 (Cholic acids), 再加入六甲基二硅胺烷 (Hexamethyldisilazane, HMDS) 与三氟醋酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 进行硅烷化反应, 生成相应的脎化—三甲基硅烷化衍生物。Nambara 等^[38]首次使用 PFBHA 衍生化含酮基类固醇类激素, PFBHA 衍生化后的产物含有多个卤素原子, 非常适合电子捕获检测器 (Electron Capture Detector, ECD)。但是, 现今 PFBHA 酮基衍生化技术常常应用中低分子量含羰基化合物的检测中^[39, 40], 如丙酮、甲醛的检测。

除了脎化试剂的不同, 也可以采用不同的硅烷化衍生试剂。如 Matsuzaki 等^[41]在研究脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 的过程中, 比较了 MOX 与 3 种硅烷化试剂的组合。结果表明, MOX 与三甲基硅咪唑 (TMSI) 生成的 MO-TMS 衍生物在几天后会发生分解, 而 MOX 与二甲基乙基硅咪唑 (Dimethylethylsilylimidazole, DMESI) 生成的 MO-DMESI 衍生物和 MOX 与二甲基异丙基硅咪唑 (Dimethylisopropylsilylimidazole, DMIPSI) 生成的 MO-DMIPSI 衍生物能够稳定 1 个月。表 2 列举了脎化 硅烷化衍生技术的应用现状。

表 2 脎化 硅烷化衍生化技术应用状况

Table 2 Application of oximation-silylation derivatization technology

待测物 Analytes	脎化试剂 Oximation reagents	反应条件 Reaction conditions	三甲基硅烷化试剂 Trisilylation derivatization reagents	催化剂 Catalysts	反应条件 Reaction conditions	检测方法 Detection methods	检出限 LOD	参考文献 Ref
皮质类固醇等 Corticosteroid, etc	MOX	60 ~ 70 30 min	BSA	-	60 120 min	GC-MS	25 ~ 250 pg/μL	[35] [42]
孕三烯酮, 去甲雄三烯醇酮等 Gestri- none, Trenbolone, etc	MOX	60 60 min	MSTFA	TMSI	60 30 min	GC-MS	3 ~ 400 ng/g	[25] [29]
类固醇类激素 Steroid hormones	MOX	28 ~ 37 120 min	MSTFA	-	37 30 min	GC-MS	-	[43]
睾酮等 Testosterone, etc	MOX	室温 ~ 80 0.5 ~ 8 h	-	TMSI	60 ~ 100 30 ~ 180 min	GC-MS	2.4 μg/L	[36] [44]
脱氢表雄酮等 Dehydroepiandroste- rone, etc	MOX	60 60 min	-	TMSI or DMESI or DMIPSI	60 30 min	GC-MS	1 ~ 2 pg/mL	[41]
胆酸类 Cholic acids	Hydroxylamine hydrochloride	70 60 min	HMDS	TFA	70 90 min	GC-MS	-	[37]

MOX: Methoxyamine hydrochloride; HMDS: Hexamethyldisilazane; TMSI: Trimethylsilylimidazole; DMESI: Demethylethylsilylimidazole; DMIPSI: Dimethylisopropylsilylimidazole; TFA: Trifluoroacetic acid

3.2.4 存在的问题 在应用酮基脎化 硅烷化衍生化技术时, 常常发现异构现象^[22, 29, 35, 42]。原因是在脎形成的过程中, 氮与酮基的碳生成的碳氮双键会产生几何异构的现象, 形成顺、反 (syn, anti) 异构体。脎类物质的顺反异构现象如式 (7) 所示^[18]。

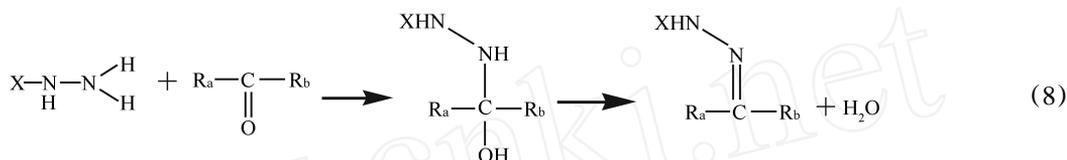


另一方面, Choi 等^[22]提到, 应用 MO-TMS 衍生化法时, 需要去除过量的试剂。很多实验也都在硅烷化之后增加了纯化的过程。如: Suzuki^[35]和 Furuta^[42]等将脎化 硅烷化的产物吹干后, 以正己烷为溶剂, 通过 Sep-Pak 硅胶柱进行纯化; Matsuzaki 等^[41]为了去除过量的硅烷化试剂, 将经过脎化 硅烷化的样品通过 Sephadex H-20 柱进行纯化。但是, 相当多的实验没有通过纯化过程仍然取得了良好的效果。所以, 纯化过程的必要性还有待于系统研究。

总之, 脎化 硅烷化技术应用较为广泛, 也取得了较为满意的效果。通过不同脎化试剂的选择, 能够满足不同检测器 (MS, ECD) 的要求。但是, 此项技术因涉及两步反应, 所以实验过程相对繁琐, 可能导致样品流失过多。同时, 其异构现象、反应条件和衍生化产物的纯化也有待于深入探讨。

3.3 其它衍生化方法

同肟化反应一样,利用醛酮类物质与氮亲核试剂的加成反应生成腙 (Hydrazone)类物质的方法也可以衍生化类固醇类激素的酮基。腙是由醛或酮分子中的羰基与肼 (Hydrazine)反应生成的化合物。酮基的腙化反应是基于肼类物质的亲核攻击,使得肼类物质的氨基与酮基反应,生成稳定的碳氮双键^[17-19]。如式 (8)所示^[45]:



在腙化反应中,常用的衍生化试剂有 2,4-二硝基苯肼 (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH),五氟苯肼 (Pentafluorophenylhydrazine, PFPH)。其中 DNPH 通过衍生化反应,在化合物的分子中引入有强紫外吸收的基团,所以常应用于液相色谱紫外检测中。目前 DNPH 常用于中低分子量物质的酮基衍生化。Stashenko 等^[46]也曾提到 PFPH 可以衍生化类固醇类激素的酮基。但是,由于氮的存在,腙化反应也会有顺、反异构的出现;同时腙化反应要求强的酸性条件等。应用肼类物质衍生化类固醇类激素酮基的方法研究较少。

Weissenberg 等^[47]指出,可以利用氢化铝锂 (LiAlH_4)将类固醇类激素的酮基衍生化。其主要原理是:因为氢化铝锂是强的还原剂,其分子中的氢可作为负氢离子,通过加负氢离子将酮基还原为相应的醇^[18]。Alonso 等^[48]也以纳米镍微粒 (Nickel(0) nanoparticles)为催化剂,异丙醇为供氢体,成功将雌酮,雄酮等类固醇类激素还原为相应的醇。

以上提及的这几种方法应用较少,特别是针对于多组分的分析,其稳定性和精确性还有待系统研究,但这些衍生化方法为类固醇类激素的酮基衍生化研究拓宽了思路。

4 展 望

类固醇类激素的分析检测方法已成为国际分析化学领域的前沿和热点课题。在类固醇类激素的酮基衍生化研究中,利用酮基的基本化学性质而采用具有针对性的衍生化试剂是普遍采用的方法。但国际上类固醇类激素酮基衍生化技术还很不完善,反应条件差别很大,应用试剂种类繁多。本文介绍的烯醇化、硅烷化和肟化、硅烷化酮基衍生化技术,反应条件(时间、温度、试剂用量、催化剂选择等)缺乏系统探讨,不同衍生化试剂的衍生化效果(产率、色谱峰形、检出限、相对响应因子等)缺少相应的比较,所以,这就需要分析工作者对衍生化过程中的各个控制因素进行系统研究,优化衍生化条件。另外,通过催化剂的选择或控制反应条件使产物定向转化,解决异构体或副产物或其量控制在允许误差范围之内,是当前类固醇类激素酮基衍生化技术所面临的主要科学问题。所以,针对以上问题,需要对类固醇类激素的酮基衍生化进行系统研究,有待于确立一套切实可行、操作方便、分析快速、干扰较少的类固醇类激素酮基衍生化技术。

References

- 1 Noppe H, Bizce B L, Verheyden K, Brabander H F D. *Anal Chim. Acta*, **2008**, 611(1): 1~16
- 2 Noppe H, Verheyden K, Gillis W, Courtheyn D, Vanthemsche P, Brabander H F D. *Anal Chim. Acta*, **2007**, 586(1/2): 22~29
- 3 Wolthers B G, Kraan G P B. *J. Chromatogr A*, **1999**, 843(1/2): 247~274
- 4 Seo J, Kim H Y, Chung B C, Hong J. *J. Chromatogr A*, **2005**, 1067(1/2): 303~309
- 5 Hartmann S, Steinhart H. *J. Chromatogr B*, **1997**, 704(1/2): 105~117
- 6 Kerkhof D H v d, Ooijen R D v, Boer D d, Fokkens R H, Nibbering N M M, Zwicker J W, Thijssen J H H, Maes R A A. *J. Chromatogr A*, **2002**, 954(1/2): 199~206

- 7 XU Jin-Zhong(徐锦忠), ZHANG Xiao-Yan(张晓燕), DING Tao(丁涛), WU Bin(吴斌), SHEN Cong-Yu(沈崇钰), JIANG Yuan(蒋原), LU Fei(刘飞). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(3): 341~346
- 8 Manzoori J L, Nezhad G K. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 484(2): 155~161
- 9 Liu R, Zhou J L, Wilding A. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1022(1/2): 179~189
- 10 Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. *Environmental Science & Technology*, **2000**, 34(24): 5059~5066
- 11 Lehmpuhl D W, Birks J W. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 740(1/2): 71~81
- 12 Shimada K, Mitamura K, Higashi T. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 935(1/2): 141~172
- 13 Appelblad P, Irgum K. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 955(2): 151~182
- 14 HUANG Bin(黄斌), PAN Xue-Jun(潘学军), LU Jing-Liang(刘晶靓), FANG Kai(方锴), WANG Yu(王宇), GAO Jian-Pei(高建培). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(11): 1651~1656
- 15 Huang B, Pan X J, Liu J L, Fang K, Wang Y, Gao J P. *Chromatographia*, **2009**, Published online: 05 November
- 16 WANG Zheng-Fan(汪正范). *Chromatograph Hyphenated Techniques* (色谱联用技术). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **2007**: 1~23
- 17 WANG Li(王立). *Chromatographic Analysis and Sample Treatment* (色谱分析样品处理). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **2006**: 1~6
- 18 HE Jiu-Ling(何九龄). *Advanced Organic Chemistry* (高等有机化学). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **1987**: 225~296
- 19 Morrison R T, Boyd R N. *Organic Chemistry*. 3rd ed, Allyn and Bacon, **1973**: 193
- 20 Fuh M R, Huang S Y, Lin T Y. *Talanta*, **2004**, 64(2): 408~414
- 21 Bowers L D, Borts D J. *J. Chromatogr. B*, **1996**, 687(1): 69~78
- 22 Choi M H, Hahn J R, Jung B H, Chung B C. *Clinica Chimica Acta*, **2002**, 320(1/2): 95~99
- 23 Meunier-Solère V, Maume D, André F C, Bizet B L. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 816(1/2): 281~288
- 24 Gomes R L, Meredith W, Snape C E, Sephton M A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2009**, 49(5): 27
- 25 Hernández-Carrasquilla M. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 434(1): 59~66
- 26 Ho E N M, Leung D K K, Leung G N W, Wan T S M, Wong H N C, Xu X h, Yeung J H K. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 596(1): 149~155
- 27 Magnisali P, Dracopoulou M, Mataragas M, Dacou-Voutetakis A, Moutsatsou P. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1206(2): 166~177
- 28 Marchand P, Bizet B L, Gade C, Monteau F, André F. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 867(1/2): 219~233
- 29 Marques M A S, Pereira H M G, Padilha M C, Neto F R d A. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1150(1/2): 215~225
- 30 Ahmadkhaniha R, Shafiee A, Rastkari N, Kobarfard F. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 631(1): 80~86
- 31 Tripp K M, Dubois M, Delahaut P, Verstegen J P. *Theriogenology*, **2009**, 72(3): 365~371
- 32 Shen M, Xiang P, Shen B, Bu J, Wang M. *Forensic Science International*, **2009**, 184(1/3): 32~36
- 33 Shinohara Y, Isurugi K, Hashimoto T. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 741(2): 271~278
- 34 Appelblad P, Irgum K. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 955(2): 151~182
- 35 Suzuki A, Shibasaki H, Kasuya Y, Furuta T. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 794(2): 373~380
- 36 Mass é R, Wright L A. *Clinical Biochemistry*, **1996**, 29(4): 321~331
- 37 Sebök Á, Sezer K, Vasánits-Zsigrai A, Helenk á A, Z áray G, Moln á-Perl I. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1121(1/2): 104~112
- 38 Nambara T, Kigasawa K, Lwata T, Ibuki M. *Journal of Chromatography*, **1975**, 114(1): 81~86
- 39 Gabrio T, Bertsch A. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1046(1/2): 293~296
- 40 Wang Q, O'Reilly J, Pawliszyn J. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1071(1/2): 147~154
- 41 Matsuzaki Y, Yoshida S, Honda A, Miyazaki T, Tanaka N, Takagiwa A, Fujimoto Y, Miyazaki H. *Steroids*, **2004**, 69(13/14): 817~824
- 42 Furuta T, Matsuzawa M, Shibasaki H, Kasuya Y. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 738(2): 367~376
- 43 Pasikanti K K, Ho P C, Chan E C Y. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 871(2): 202~211
- 44 Shakerdi L A, Connell J M C, Fraser R, Wallace A M. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 784(2): 367~373

- 45 Dong J Z, Serban C, Moldoveanu J. *Chromatogr A*, **2004**, 1027 (1/2): 25 ~ 35
- 46 Stashenko E E, Ferrexa M C, Sequeda L G, Mart íez J R, Wong J W. *J. Chromatogr A*, **1997**, 799 (1/2): 360 ~ 369
- 47 Weissenberg M, Levisalles J. *Tetrahedron*, **1995**, 51 (20): 5711 ~ 5742
- 48 Alonso F, Riente P, Yus M. *Tetrahedron*, **2008**, 64 (8): 1847 ~ 1852

Progress on Keto Groups Derivatization of Steroid Hormones in Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis

FANG Kai, PAN Xue-Jun*, HUANG Bin, LIU Jing-Liang, WANG Yu, GAO Jian-Pei

(Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093)

Abstract Steroid hormones have poor detection sensitivity and chromatography peaks because of their polar functional groups such as keto groups and hydroxyl groups. So these groups need to transform into derivatives which have lower polar, more volatile and higher thermal stability to suitable for the trace GC-MS analysis. The derivatization technology of hydroxyl groups and other functions which containing active hydrogen atom has been greatly developed, but it is still necessary to do systematic research on the keto group derivatization. In this article, keto groups derivatization of steroid hormones were reviewed, including reaction principle, application status of enolisation-silylation, oximation-silylation derivatization technology etc. The problems and research direction were also discussed.

Keywords Steroid hormones; Keto groups; Derivatization; Gas chromatography-mass spectrometry; Review

(Received 29 September 2009; accepted 14 December 2009)

《气相色谱方法及应用》(第二版)

该书重点介绍了气相色谱的分析方法、常用技术和应用。内容涉及了气相色谱的基本原理、仪器的结构和操作方法及气相色谱的新发展和新技术。该书是《色谱技术丛书》之分册,在第一版基础上作了修改和充实,力求实用性、新颖性和典型性。例如,第四章集中介绍了气相色谱的各种进样技术,第五章介绍了毛细管-气相色谱的应用实例;第六章和第七章分别介绍了顶空气相色谱和裂解气相色谱的新发展和应用;第八章讨论了近年来气相色谱的保留时间锁定、微型气相色谱、高温气相色谱、多维气相色谱等新技术;第九章介绍了超临界流体色谱。

该书可供从事色谱分析的人员及大专院校分析化学相关专业师生学习参考。该书由北京大学刘虎威编著,化学工业出版社出版,定价 35.00 元。