



УДК 543.544

## Применение хромато-масс-спектрометрии в исследовании гормонов

Соколова Л.С., Ефремов А.А.

*Сибирский федеральный университет, Красноярск*

Поступила в редакцию 4.07.2012 г.

### Аннотация

Методом хромато-масс-спектрометрии определены нижние пределы обнаружения естественных гормонов стероидной природы и их триметилсилильных (ТМС) производных. Установлено, что при использовании ТМС нижний предел их обнаружения заметно снижается. Приведены основные закономерности первичной фрагментации ТМС производных исследуемых гормонов.

**Ключевые слова:** хромато-масс-спектрометрия гормонов, метрологические характеристики, ТМС производные.

By the method of Chromato-Mass-Spectrometry lower limits of detection of natural hormones of steroid nature and their trimethylsilyl (TMS) derivatives were determined. The lower limit of detection is markedly reduced when TMS is used. The basic patterns of the primary fragmentation of TMS derivatives of the studied hormones are shown.

**Keywords:** method GC-MS of hormones, metrological characteristics, TMS analogs

### Введение

Известно, что гормоны являются специфическими регуляторами биохимических процессов в организме, обеспечивающими их протекание на относительно стабильном уровне [1]. Гормоны, имеющие клиническое значение в репродуктивной эндокринологии, содержатся в сыворотке в концентрациях, исчисляемых пг и нг/мл. Диагностика заболеваний, связанных с нарушением синтеза и метаболизма стероидных гормонов в эндокринологии, гинекологии и онкологии, немыслима сегодня без определения содержания гормонов в организме [2]. Кроме того, количественное определение натуральных гормонов необходимо в судебно-медицинской криминалистике, в объектах окружающей среды [3-6].

В настоящее время газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС) остается основным методом скрининга биологических жидкостей на содержание анаболических стероидов. После экстракции из биологической матрицы анаболические стероиды дериватизируются с образованием триметилсилильных производных, которые определяют с применением метода ГХ/МС с использованием квадрупольных масс-спектрометров в режиме селективной регистрации ионов. При использовании данного подхода предел обнаружения составляет около 2–10 нг/мл в

зависимости от соединения [7], что отражено в требованиях Всемирного Антидопингового Агентства к пределам детектирования и продемонстрировано на ряде примеров [ 8-12 ].

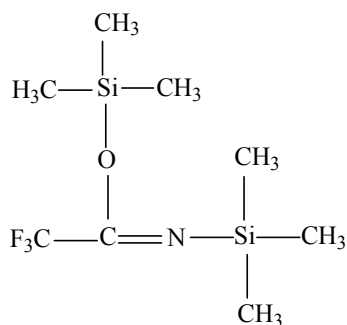
Так в [8-10] представлены хроматографические условия разделения целого ряда половых стероидов (диэтилстибестрол, дигидротестостерон, эстрон, эстрадиол, тестостерон, прегненолон, этинилэстрадиол, прогестерон, холестерол, кортикостерон) в виде производных, полученных при их обработке агентами: N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА) с 1% триметилхлорсиланом (ТМХС), N-метил-N-триметилсилил-трифторацетамид (МСТФА), N,O-бис(триметил)ацетамид (БСА) и некоторыми другими. В работе [11] приведены пути масс-фрагментации ТМС-производных некоторых гормонов: эстрадиола, эстрона, эстриола, этинилэстрадиола и местранола.

Как показал анализ литературных данных, имеющихся на сегодняшний день, пределы обнаружения для эстрадиола, тестостерона и прогестерона в виде триметилсилильных производных, полученных дериватизацией с БСА и БСТФА реагентами, методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии отсутствуют. Кроме того, пути фрагментации полученных производных с образованием основных ионов, не описаны в литературе. Ввиду выше сказанного, целью данной работы является определение женских половых гормонов, наиболее значимых в диагностике фертильности (эстрадиол, тестостерон, прогестерон), в виде триметилсилильных производных методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии, определение нижних пределов их обнаружения и основных осколочных ионов, образующихся при их фрагментации.

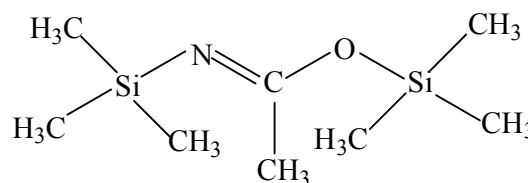
## Эксперимент

Стандартные растворы лекарственных препаратов (эстрадиол, этинилэстрадиол, гексестрол, этистерон) с разными концентрациями действующего вещества готовили растворением навесок, взятых из таблеток, в 10 мл этилового спирта, используя ультразвуковую ванну. Нерастворимые компоненты таблеток отфильтровывали через фильтр обеззоленный "Белая лента". Прогестерон использовали в виде 1% масляного раствора, а тестостерон в виде спиртового геля; экстракцию проводили согласно методикам [2,6], использовали этиловый спирт, при предварительном добавлении хлороформа, экстракт центрифугировали, затем упаривали в термостате при 50 °С и сухой остаток растворяли в 1 мл спирта. Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных растворов до концентраций 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 мкг/мл с помощью автоматических дозаторов. Полученные растворы до анализа хранили в морозильной камере при -20°С.

Для проведения реакции дериватизации использовали два реагента с разной «силильной донорной активностью» БСА и БСТФА. В виалы помещали 0,5, 1, 5, 10, 25 мкл спиртовые растворы гормонов (каждого в отдельную) с концентрацией 1 мг/мл, выпаривали досуха в токе теплого воздуха. К сухому остатку прибавляли по 50 мкл БСТФА и БСА соответственно (для каждого силилирующего агента делали свою параллель), помещали в термостат, выдерживали 30 мин при 80 °С. Далее пробы исследовали методом ГХ/МС.

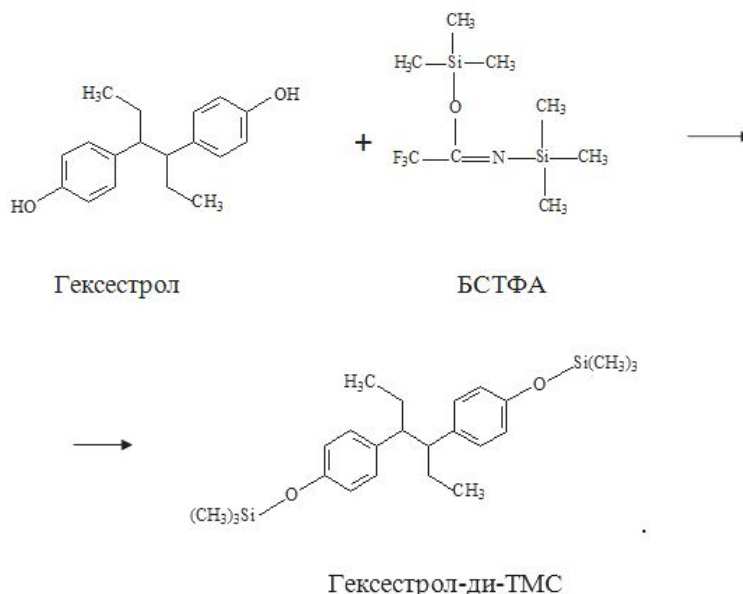


бис-(триметилсилил)-трифторацетамид  
(БСТФА)



бис-(триметилсилил)-ацетамид (БСА)

Реакция дериватизации на примере нестероидного эстрогена гексестрола:



Исследование спиртовых растворов и триметилсилильных производных (ТМС) естественных гормонов стероидной природы и их синтетических аналогов методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии осуществляли на газовом хроматографе с квадрупольным масс-спектрометром. Применяли 30 м кварцевую колонку HP-5MS (сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана) с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Газ-носитель - гелий с постоянным потоком 1мл/мин. Режим программирования температуры колонки: начальная температура термостата колонки 80 °С, выдержка при начальной температуре 1 мин, далее нагрев до температуры 200 °С со скоростью 40 °С/мин и до температуры 300 °С со скоростью 12,5 °С/мин, выдержка при конечной температуре 10 мин. Температура инжектора – 250 °С. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в режиме без деления потока (Splitless); объем пробы – 1 мкл. Ионизация электронным ударом (70 эВ). Время задержки растворителя 4,5 мин.

Управление прибором и сбор хроматографических данных осуществляли с помощью программы MSD ChemStation G 1701 EA E.01.01.335. ГХ/МС-анализ исследуемых растворов проводили в режиме сканирования (SCAN) в диапазоне масс от 50 до 600 а.е.м. и в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по характеристическим ионам анализируемого соединения (базовый ион масс-спектра и молекулярный ион). Параметры настроек двух режимов SIM (один использовали для

определения спиртовых растворов гормонов, а другой для их ТМС-производных) представлены в табл. 1.

Таблица 1. Настройка режима SIM для спиртовых растворов гормонов и их ТМС-производных

группа	спиртовые растворы		ТМС-производные	
	нач. вр., мин	m/z	нач. вр., мин	m/z
1	8.00	107. 135. 270	8.00	207. 414
2	11.00	213. 272	12.19	285. 416
3	12.20	124. 288	12.35	226. 360
4	12.40	213. 296	12.42	399. 414
5	12.55	229. 312	12.85	369. 384
6	13.30	124. 314	13.30	124. 314

Обработка полученных данных после хромато-масс-спектрометрического анализа проводилась с помощью программного обеспечения GCMS Data Analysis, которое включает библиотеки масс-спектров (Wiley, NIST). Для улучшения качества полученных спектров исследуемых веществ проводили усреднение и вычитание фона.

### Обсуждение результатов

Повышение селективности разделения и снижения пределов обнаружения изучали на модельной смеси близких по химической структуре природных гормонов (эстрадиол, тестостерон, прогестерон), синтетических стероидов (этинилэстрадиол, этистерон) и гормона нестероидной природы эстрагенного ряда (гексестрол), используемых в качестве лекарственных препаратов.

Первые полученные данные анализа спиртовых растворов всех изученных гормонов методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии представлены в табл. 2.

Таблица 2. Основные данные после ГХ/МС анализа спиртовых растворов гормонов (время удерживания и пределы обнаружения)

Гормон	M <sub>r</sub>	Время удерживания, мин	Предел обнаружения (сигнал/шум=3), мкг/мл	
			SCAN	SIM
Гексестрол	270.4	10.12	1	0,5
Эстрадиол	272.4	12.10	15	8
Тестостерон	288.4	12.27	5	1
Этинилэстрадиол	296.4	12.48	25	10
Этистерон	312.4	12.62	10	5
Прогестерон	314.5	13.42	5	1

Из таблицы видно, что предложенные условия программирования температуры колонки (80°C (1) - 40 °C / мин - 200 °C – 12,5 °C / мин - 300 °C (10)) хорошо подходят для разделения смеси из 6 компонентов гормонов различных по структуре и по природе происхождения. И время всего анализа всего лишь 22 минуты. ГХ/МС-анализ одновременно проводили в двух режимах: SCAN и SIM.

Следует отметить, что удачно подобранные параметры настройки режима селективного ионного мониторинга (SIM) по характеристическим ионам (для каждого отдельного соединения свои индивидуальные ионы), позволяет снизить предел обнаружения в среднем в 3 раза (сигнал/шум=3), по сравнению с режимом сканирования в диапазоне масс от 50 до 600 а.е.м. (см. табл. 2).

Получение производных проводили для повышения летучести и стабильности анализируемых веществ. Введение новых структурных групп в молекулы анализируемых веществ может изменить их масс-спектральные характеристики (интенсивность пиков молекулярных и характеристических осколочных ионов, направление и селективность распада, и др.), вследствие чего повышается специфичность и чувствительность анализа.

Для получения ТМС-производных исследуемых гормонов были использованы два разных реагента БСТФА и БСА. В литературе нет данных о пределах обнаружения силилпроизводных природных и синтетических стероидов, полученных с помощью БСТФА и БСА агентов. Наиболее часто используемый реагент – это БСТФА с добавлением 1% ТМСХ (триметилхлорсилан). Из определяемых гормонов один – прогестерон, не подвергается реакции дериватизации при выбранных условиях, так как в его структуре присутствуют только карбонильные группы. А для остальных гидроксилированных стероидов успешно получены ТМС-производные. В табл. 3 представлены целевые производные для каждого стероида, времена их удерживания и пределы обнаружения (в режиме SIM).

Таблица 3. Целевые ТМС-производные гормонов, их времена удерживания, пределы обнаружения (сигнал/шум=3) для БСА и БСТФА в SIM режиме

Гормон	Целевое производное	Время удерживания, мин	Предел обнаружения (сигнал/шум=3), нг/мл	
			БСА	БСТФА
Гексестрол	Ди-ТМС	10.12	0.5	7
Эстрадиол	Ди-ТМС	12.26	1	5
Тестостерон	Моно-ТМС	12.40	30	95
Этинилэстрадиол	Ди-ТМС	12.51	100	250
Этистерон	Моно-ТМС	13.10	80	230
Прогестерон	нет-ТМС	13.45	60	170

Из таблицы видно, что предел обнаружения изученных стероидов меньше, если использовать для реакции дериватизации БСА. По литературным данным БСТФА обладает большей «силильной донорной активностью». Также провели расчет масс-фрагментации исследуемых гормонов, опираясь на законы и правила масс-спектрометрии, литературные данные [13]. Для эстрадиола и этинилэстрадиола имеются данные расчета масс-фрагментации их ТМС-производных [10]. Мы же сделали эту операцию и для остальных стероидов. Ниже приведены полученные масс-спектры, масс-фрагментация изученных натуральных стероидов и их аналогов. В масс-спектрах веществ, содержащих ТМС-группу, наблюдается триплет пиков в области молекулярных ионов, обусловленных наличием у кремния изотопов  $^{29}\text{Si}$  и  $^{30}\text{Si}$  (распространенность 4,7 и 3,1 % соответственно). Кроме того, для ТМС-производных характерно отщепление частиц  $\text{CH}_3$  и  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$  (15 и 73 а.е.м. соответственно) от молекулярного иона.

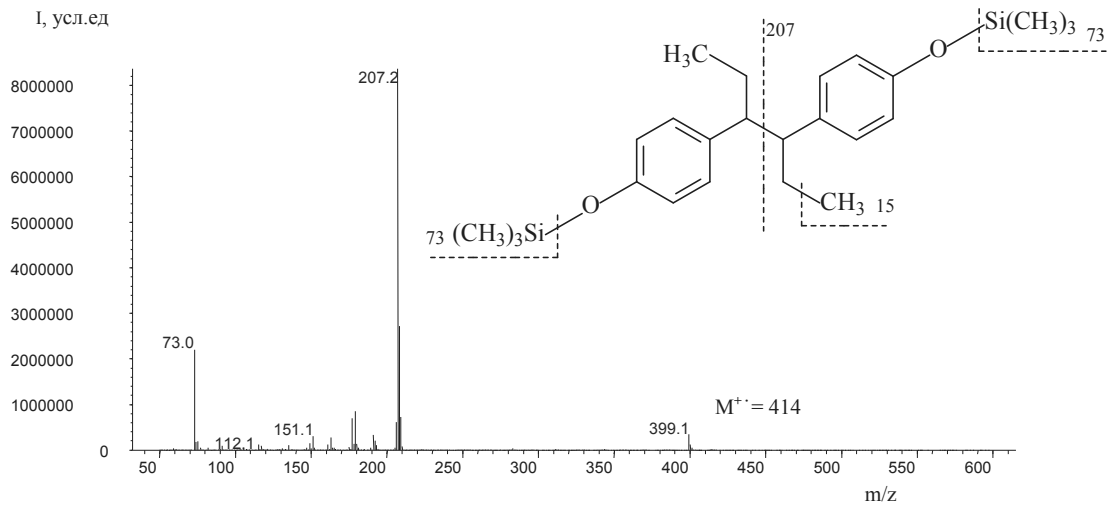


Рис. 1. Масс-спектр ди-ТМС-гексестрола и его масс-фрагментация

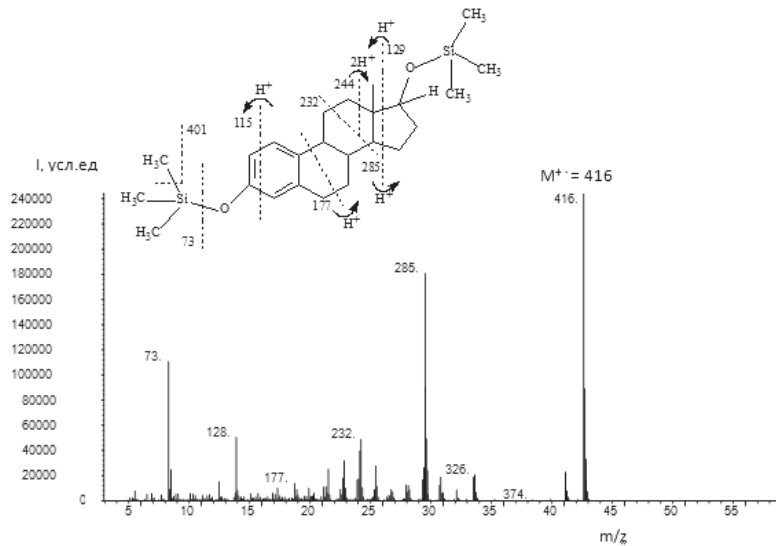


Рис. 2. Масс-спектр ди-ТМС-эстрадиола и его масс-фрагментация

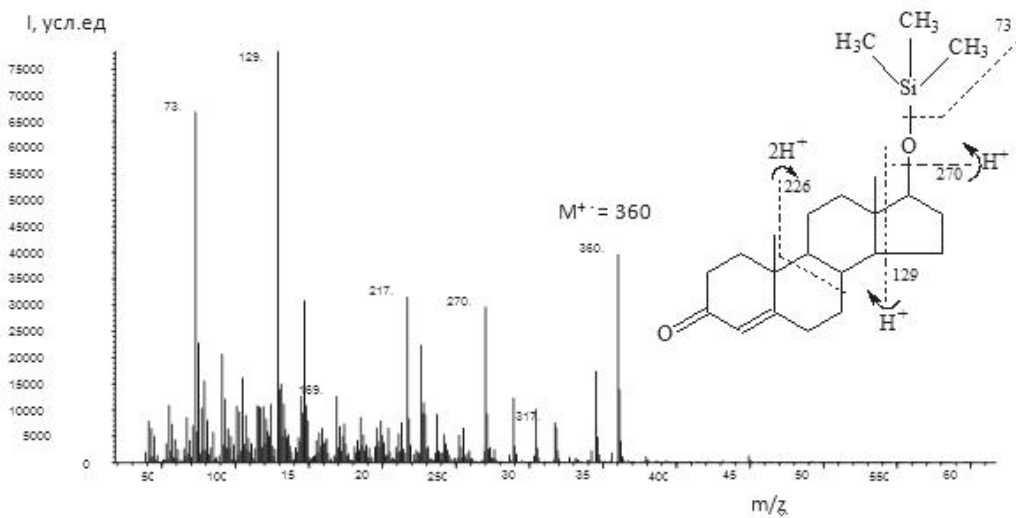


Рис. 3. Масс-спектр моно-ТМС-тестостерона и его масс-фрагментация

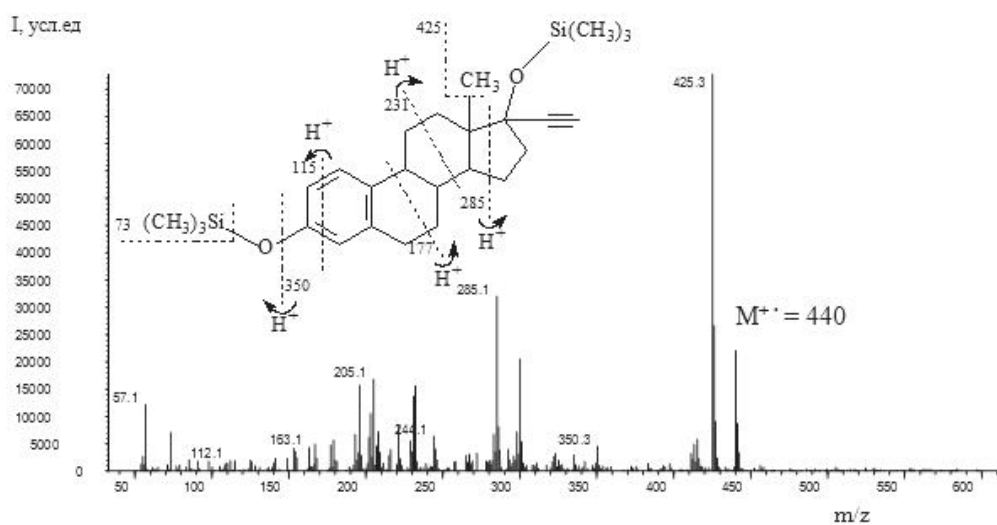


Рис. 4. Масс-спектр ди-ТМС-этинилэстрадиола и его масс-фрагментация

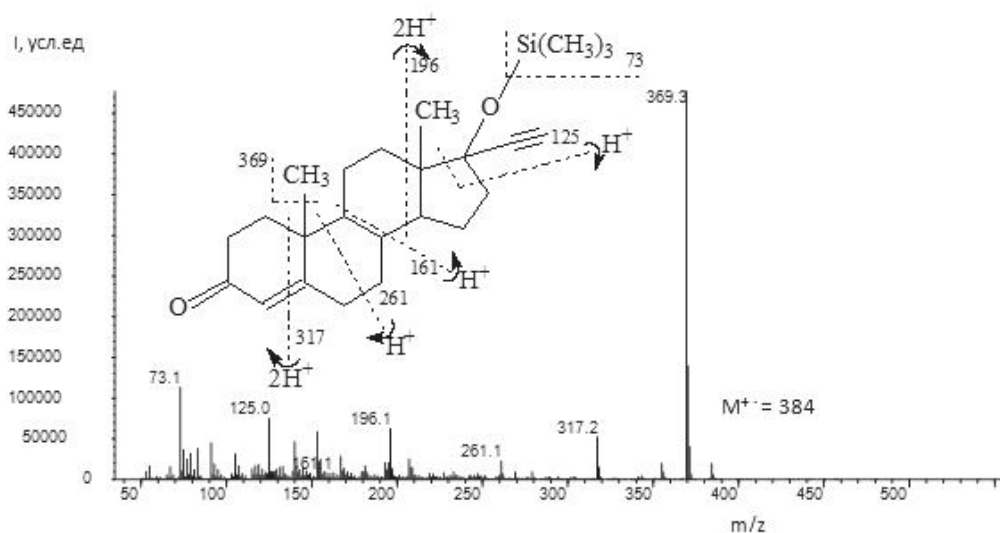


Рис. 5. Масс-спектр моно-ТМС-этистерона и его масс-фрагментация

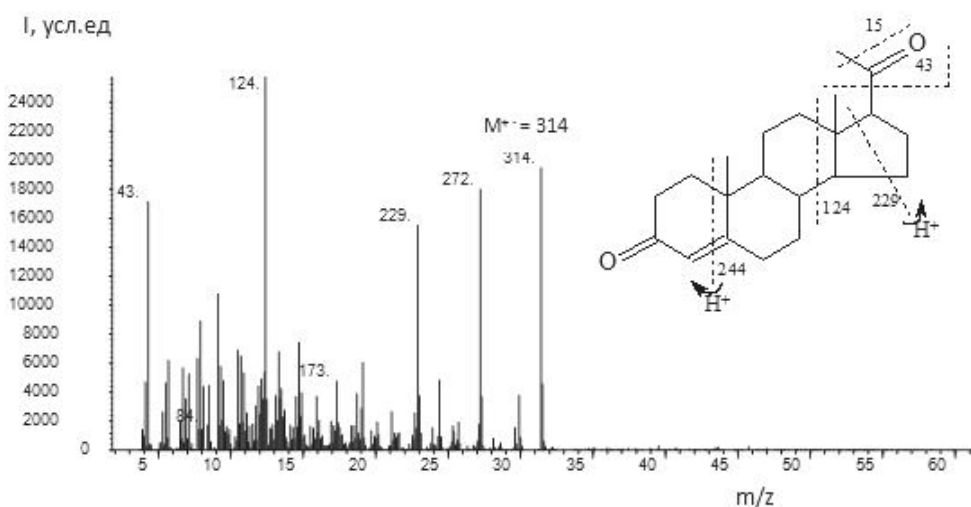


Рис. 6. Масс-спектр прогестерона и его масс-фрагментация

## Заключение

Определены условия температурного программирования хроматографической колонки для разделения шести половых гормонов, включающие как натуральные стероиды, так и их синтетические аналоги: 80°C (1) - 40 °C / мин - 200 °C – 12,5 °C / мин - 300 °C (10). Общее время анализа – 22 минуты.

Установлено, что предел обнаружения стероидных гормонов (без реакции дериватизации) в режиме SIM (гексестрол – 0,5; эстрадиол – 8, тестостерон -1, этинилэстрадиол - 10; этистерон - 5; прогестерон - 1 мкг/мл) в среднем в 3 раза меньше, чем в режиме SCAN (сканирования в диапазоне масс от 50 до 600 а.е.м.): гексестрол – 1; эстрадиол – 15, тестостерон -5, этинилэстрадиол - 25; этистерон - 10; прогестерон - 5 мкг/мл. Показано, что с помощью реакции дериватизации можно снизить предел обнаружения (сигнал/шум=3) гормонов в среднем в 400 раза (в режиме SIM): гексестрол – 0,5; эстрадиол – 1, тестостерон - 30, этинилэстрадиол - 100; этистерон - 80; прогестерон – 60 нг/мл. Приведены основные закономерности первичной фрагментации ТМС производных исследуемых гормонов.

## Список литературы

1. Количественный анализ стероидов / Ш. Герег : Пер. с англ. – М.: Мир, 1985.- 504 с.
2. Дедов, И.И. Проблема химии гормонов и клиническая эндокринология / И.И.Дедов // Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. – 2005. – Т.XLIX,№1. – С.8-10.
3. Quintana, J.B. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection / J.B. Quintana, J.Carpinteiro, I. Rodriguez // Journal of Chromatography A. – 2004. – V. 1024. – P.177–185.
4. Kelly, C. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry / C. Kelly // Journal of Chromatography A. – 2002. – V. 872. – P.309–314.
5. Streck, G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment / G. Streck // Trends in Analytical Chemistry. – 2009. - V. 28, № 6. – P.635-652.
6. Lopez de Alda, M.J. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry / M.J. Lopez de Alda, D. Barcelo // Journal of Chromatography A. – 2000. – V.892. – P. 391–406.
7. Ayotte, C. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine / C. Ayotte, D. Goudreault, A. Charlebois // J. Chromatography. – 1996. – V.687. – P. 3-25.
8. Bowden, J. Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) / J.A. Bowden, D.M. Colosi, D.C. Mora-Montero, T.J. Garrett, R.A. Yosta// Journal of Chromatography B. - 2009. - № 877. - P. 3237–3242.
9. Zhang, K. Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide / K.Zhang, Y. Zuo // Analytica Chimica Acta. – 2005. – V.554. – P. 190–196.



10. Zhou, Yi-qi. Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol with BSTFA or MSTFA followed by gas chromatography-mass spectrometry determination / Zhou Yi-qi, Wang Zi-jian, Jia Ning // Journal of Environmental Sciences. – 2007. – V.19. – P.879–884.

11. Zuo, Y. Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic–mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids / Y. Zuo, K. Zhang, Y. Lin // Journal of Chromatography A. 2007. – V.1148. – P. 211–218.

12. Соколова, Л.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение некоторых женских половых гормонов стероидного строения и их синтетических аналогов / Л.С. Соколова, Е.Г. Струкова, О.А. Дукова // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. - 2010. – V.4, № 3. – P.408-412.

13. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев. – М.:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003.-493 с.

---

**Ефремов Александр Алексеевич** – д.х.н., профессор, зав. лабораторией хроматографических методов анализа ЦКП С, Сибирский федеральный университет, Красноярск

**Efremov Alexander A.** – professor, doctor of chemistry, head of the chromatographic analysis laboratory, Krasnoyarsk, e-mail: [Aefremov@sfu-kras.ru](mailto:Aefremov@sfu-kras.ru)

**Соколова Лидия Сергеевна** – студент, Сибирский федеральный университет, Красноярск

**Sokolova lidya S.** – student, Siberian Federal University, Krasnoyarsk