

# 高效液相色谱与质谱联用法分离与鉴定 己烯雌酚合成抗原的研究

朱东辉<sup>1</sup>, 胥传来<sup>2</sup>

(1.南通职业大学,江苏 南通

226007; 2.江南大学食品学院,江苏 无锡

214036)

**摘 要:** 采用 Lichrospher C-18 柱, 用甲醇和水为流动相, 流速 0.3ml/min, 甲醇从 60%~100% 梯度洗脱 25min, 液质联用, 电喷雾(ESI), 对己烯雌酚及其衍生物己烯雌酚-单(双)-丁酸乙酯基-醚进行了分离和结构鉴定。以混合酸酐法将 DES-MCPE 与载体蛋白偶联形成完全抗原, 并以紫外扫描分析了完全抗原的偶联比率。结果表明: 在极性溶剂中, 己烯雌酚和其衍生物存在着顺反异构转化现象, 极性有机溶剂的溶剂化作用促使顺反异构体的转化。计算 DES-MCPE-BSA 偶联比率为 10。

**关键词:** 液质联用; 分离; 己烯雌酚; 完全抗原

## Separation and Identification of Synthetic Antigen of Diethylstilbestrol by Using HPLC-MS

ZHU Dong-Hui<sup>1</sup>, XU Chuan-lai<sup>2</sup>

(1.Nantong Vocational College, Nantong 226007, China 2.School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Using liquid chromatography /spectrometry (ESI), phase B (methyl alcohol), phase A (water), 0.3ml/min of flow rate, a linear gradient from 60% to 100% of phase B and eluate for 25 minutes on a Lichrospher C-18 column, diethylstilbestrol and its derivatives cis (trans)-diethylstilbestrol-mono-ether-butyrates-ethyl (DES-MEBE), diethylstilbestrol-di-ether-butyrates-ethyl (DES-DEBE) were separated and identified. The conjugates of DES-MCPE with proteins as complete antigens were prepared by the mixed anhydride method and the conjugation rate of them were analyzed by UV scanning. The results demonstrated that the isomerization was present in cis and trans of DES and its derivatives, which was effected obviously by polar solvents. And through calculation the conjugation rate was 10.

**Key words:** HPLC/MS separation; diethylstilbestrol; synthetic antigen

中图分类号: R122.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0199-03

己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)为人工合成的二苯乙烯类雌激素药, 曾经作为促生长剂广泛应用于畜牧业, 而食用残留 DES 的畜产品会给人类健康造成严重危害。世界上绝大多数国家已禁止在食品动物中使用 DES, 2002 年我国农业部规定 DES 及其盐、酯制剂禁用于所有食品动物的所有用途。在 DES 残留监控中, 目前最佳方法是商品化酶免疫检测(ELISA)试剂盒。目前用于 DES 检测的试剂盒完全依赖进口, 因此, 开发具有自主知识产权的 DES 检测试剂盒具有非常重要的现实意义<sup>[1~3]</sup>。

DES 完全抗原的合成, 是建立 ELISA 检测技术的制约性环节, 需要在 DES 上连接上活性基团, 并在与蛋白质相连时有一合适的空间臂, 以利于免疫时产生对半

抗原特异的抗体。目前主要有两种方法, 连接上甲基羧基或丙基羧基<sup>[4~7]</sup>。考虑到 4 位碳的连接臂更有利于半抗原在空间上的充分伸展, 本研究选用合成后者; 然后以混合酸酐法合成 DES 完全抗原, 以紫外扫描分析载体蛋白质的谱图变化。但在 DES 连接上丙基羧基的过程中, 产生了一系列结构相似的衍生物, 采用 LC/MS 对其进行了分离与鉴定, 研究了己烯雌酚-单-丁酸乙酯基-醚的顺反异构变化, 本文这些工作对 DES 完全抗原的合成, 和后期抗体的制备、试剂盒的开发, 均具重要参考意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

收稿日期: 2005-01-12

作者简介: 朱东辉(1968-), 男, 讲师, 研究方向为食品科学。

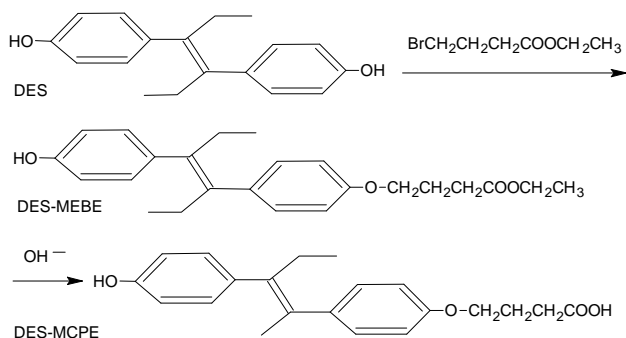
DES Sigma 公司和广州市汉普医药公司产品; 牛血清白蛋白(BSA) 上海伯奥公司进口分装(电泳纯); 4-溴丁酸乙酯 常州市玉宇化工进口分装; 薄层层析硅胶 GF254 青岛海洋化工有限公司产品 甲醇汉邦科技 色谱纯; 三正丁胺, 羧甲基纤维素钠 中国医药集团上海化学试剂公司产品; 氯甲酸异丁酯 上海飞祥化工厂产品; 其它常规试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器

立式层析缸、自涂板(10cm × 20cm); ZF-90 暗箱式紫外透射仪 上海顾村电光仪器厂; WATERS Platform ZMD 4000 型高效液-质联用仪 美国沃特斯公司; AB104-N 型电子分析天平 上海 Mettler Toledo 集团; PHS-3TC 精密酸度计 上海天达仪器有限公司; UV-2100 紫外扫描仪 北京瑞利公司。

## 1.3 DES 间隔臂的连接<sup>[8,9]</sup>

DES 间隔臂的连接的原理示意如下:



其中: DES-MEBE 为己烯雌酚-单-丁酸乙酯基-醚, DES-MCPE 为己烯雌酚-单-羧基丙基-醚。

### 1.3.1 DES-MEBE 的制备

将 1.1g DES 溶于 25ml 经无水处理的丙酮中, N<sub>2</sub> 保护下加入 3.8g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 负载试剂、0.3ml 4-溴丁酸乙酯, 65℃ 避光回流反应 10h。过滤除去催化剂, 浓缩, 以 m(氯仿): m(甲醇)=98.5:1.5 为展开剂, 薄层层析(TLC) 分离 DES 反应混合物, 刮取 DES-MEBE (R<sub>f</sub> = 0.3) 的条带, 甲醇提取, 过滤, 旋转蒸发浓缩, 真空干燥得 DES-MEBE<sup>[10,11]</sup>。

### 1.3.2 DES-MCPE 的制备

将 DES-MEBE 和 HES-MEBE 皂化水解得 DES-MCPE 和 HES-MCPE。对 DES-MCPE 结晶物, 再反复酸碱处理<sup>[10,11]</sup>。

## 1.4 完全抗原的合成和紫外分析

以混合酸酐法合成完全抗原 DES-MCPE-BSA, 紫外扫描完全抗原, 判断其偶联状况, 并计算偶联比率<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DES 及其衍生物的分析

#### 2.1.1 色谱质谱条件的选择

色谱条件: 采用 Lichrospher C-18 2.1 × 250mm 柱, 用甲醇和水为流动相, 流速 0.3ml/min, 甲醇从 60%~

100% 梯度洗脱 25min, 能使反应液各组分完全分离。质谱条件: 采用 m/z 范围 200~800, EIS- 和 EIS+ 毛细管电压分别为 3.88kV 和 3.87kV, 脱溶剂气温度 300℃, 以不同的电势孔压进行多通道正负离子同时检测, 发现 EIS- 和 EIS+ 分别为 30V 和 24V 效果最好, 能得到丰度较高的准分子离子峰。

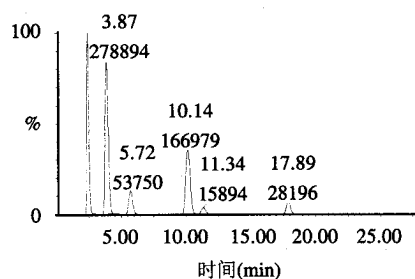
### 2.1.2 DES-MEBE 的合成与分离

#### 2.1.2.1 反应混合物 LC-MS 分析结果

DES 及其衍生物特征离子峰归属分析见表 1、图 1、图 2、图 3。

表 1 DES 及其衍生物特征离子峰归属  
Table 1 Presentation of DES and its derivatives

DES 及其衍生物	对应 HPLC 峰(min)	特征离子 (m/z)
trans-DES	3.87	267.6[M-H] <sup>-</sup>
cis-DES	5.72	
trans-DES-MEBE	10.14	381.8[M-H] <sup>-</sup> 295.7[M-(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> 405.8[M+Na] <sup>+</sup>
cis-DES-MEBE	11.34	337.7[M-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>
DES-DEBE(双醚)	17.89	519.9[M+Na] <sup>+</sup> 405.9[M+Na-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> +H] <sup>+</sup>



注: 2.49min: 溶剂峰; 3.87min、5.72min 分别为 trans-DES、cis-DES 峰; 10.14min、11.34min 分别为 trans-DES-MEBE、cis-DES-MEBE; 17.89min 为双醚(DES-DEBE)。

图 1 DES 反应结束时反应液的 HPLC 图

Fig.1 HPLC of the mixture at the end point of reaction to DES

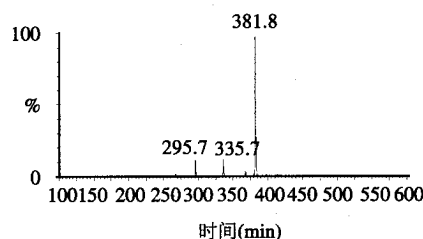


图 2 trans-DES-MEBE 质谱图

Fig.2 The mass spectrum of trans-DES-MEBE

图 1 中, 3.87min 和 5.72min 为异构体, 3.87min 为 DES 标准保留时间, 可知 3.87、5.72min 分别为 trans-DES(反式)、cis-DES(顺式) 峰; 10.14min 和 11.34min 两峰为顺反异构体, 由于反式体相对顺式体极性要弱, 在甲醇/水的梯度洗脱下, 极性越强, 出峰越早; 另外, 从二极管阵列检测器的紫外图谱得到, 10.14min 和 11.34min 的最大吸收峰分别为 248nm 和 244nm, 由于反式体中发色基团之间有较好的共平面性, 共轭作用较为完全, 其吸收波长一般较顺式体的高, 因此, 10.14、11.34min

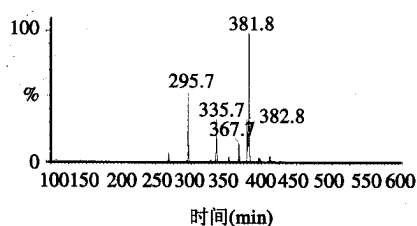


图3 cis-DES-MEBE 质谱图

Fig.3 The mass spectrum of cis-DES-MEBE

分别为 trans-DES-MEBE、cis-DES-MEBE。

由 HPLC 可见, DES 的单醚转化率达到 34%; 但 cis-DES 明显增加, 原料中摩尔百分数仅有 0.5%, 顺反摩尔比为 1:199, 而反应结束, 顺反 DES 之摩尔比增大到 1:5, 可见 DES 在丙酮中回流产生了顺反异构转变。

### 2.1.2.2 DES-MEBE 的 TLC 分离

反应液中顺反 DES-MEBE 的摩尔比为 1:10, 在 TLC 分离, 甲醇提取后, 顺反比例增加, 顺式体摩尔比为 25%~28%, 反式体摩尔比为 72%~75% (见图 4)。这可能是反应混合液经 TLC 分离时, 在极性溶剂氯仿或甲醇的溶剂化作用下, DES-MEBE 得到足够的能量, 结构开始翻转。

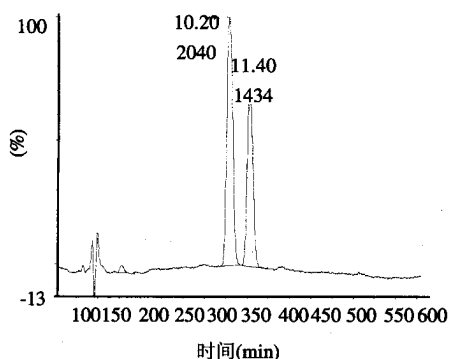


图4 甲醇提取后液相色谱图

Fig.4 HPLC of the mixture by methyl alcohol extraction

## 2.2 DES-MCPE 的制备及分析

DES-MCPE 经 TLC 分析, 对应 DES-MEBE 的点已消失, HPLC 分析其质量分数为 95.0%。

## 2.3 DES-MCPE-BSA 的紫外扫描分析

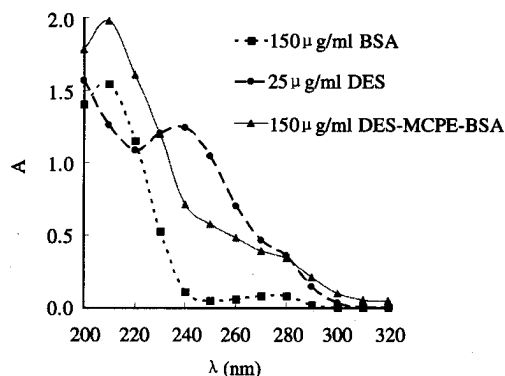


图5 DES-MCPE-BSA 合成前后的紫外扫描图

Fig.5 UV-scans of DES-MCPE-BSA before and after synthesized

免疫原 DES-MCPE-BSA 紫外扫描图谱见图 5, 图谱中 DES-MCPE-BSA 的蛋白浓度与 BSA 的浓度相同, 而 DES-MCPE-BSA 谱线从总体上都明显高于 BSA, 这是 DES-MCPE 连接上 BSA 后, 其紫外吸收在一些区域与 BSA 叠加的结果, 且两谱线在 240nm (DES 的  $\lambda_m$ ) 左右差别特别明显, 说明 DES 的这一紫外吸收带与 BSA 的紫外吸收叠加效果明显。

由以上分析, 可以认为 DES 与 BSA 偶联成功。

计算偶联比率, 得 DES-MCPE-BSA 偶联比率为 10, 偶联反应受诸多因素影响, 如反应所采用的缓冲液的 pH、溶液中蛋白质的浓度、半抗原与蛋白质的比例等因素的调整都很重要。

## 参考文献:

- [1] 谢孟峡, 刘媛, 蒋敏. 固相萃取-气相色谱-质谱分析肉样中盐酸克伦特罗的残留量[J]. 分析化学, 2002, 30(11): 1308-1311.
- [2] Le Boulair S, Bauduret J-C, André F. Veterinary drug residues survey in meat: an HPLC method with a matrix solid phase dispersion extraction [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 2134-2142.
- [3] Valenzuela A I, Lorenzini R, Redondo M J, et al. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruits [J]. J Chromatogr A, 1999, 839: 101-107.
- [4] Bagnati R, Castelli M G, Airolidi L, et al. Analysis of diethylstilbestrol, dienestrol and hexestrol in biological samples by immunoaffinity extraction and gas chromatography - negative ion chemical ionization mass spectrometry [J]. J Chrom, 1990, 527: 267-278.
- [5] 黄世乐, 陈祖义. 混合酸酐法合成己烯雌酚免疫原[J]. 核农学报, 1990, 11(4): 183-184.
- [6] 杨利国, 胡少旭, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [7] Degand G, Schmitz P, Maghuin-roger G. Enzyme immunoassays screening procedure for the synthetic anabolic steroids and androgens diethylstilbestrol, nortestosterone, methyl testosterone and trenbolone in bovine urine [J]. Journal of Chromatography, 1989, 489: 235-243.
- [8] 张智勇, 陆婉芳, 施耀曾, 等. 对苯二酚在  $K_2CO_3-Al_2O_3$  负载型碱试剂作用下的单醚化反应[J]. 应用化学, 1994, 11(5): 14-17.
- [9] Winkler V W, Nyman M A, Egan R S. Diethylstilbestrol cis-trans isomerization and estrogen activity of diethylstilbestrol isomers [J]. Steroids, 1971, 22(4): 197-207.
- [10] Colbron T, Vom Saal FS, A M. Developmental effects of endocrine disruptive chemicals on wildlife and humans [J]. Environ Health Prospect, 1993, 101(5): 378-385.
- [11] Oosterkamp AJ, Villaverde Herraiz M T, Irth H, et al. Reversed-phase liquid chromatography coupled on-line to receptor affinity detection based on the human estrogen receptor [J]. J Anal Chem, 1996, 68: 1201-1206.