

胶束电动毛细管色谱法分析性激素 Determination of Sex Hormones by Capillary Micellar Electrokinetic Chromatography

李晓静¹, 陈桂鸾¹, 徐远金^{1,2}

LI Xiao-jing¹, CHEN Gui-luan¹, XU Yuan-jin^{1,2}

(1. 广西大学糖业工程技术研究中心, 广西南宁 530004; 2. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西南宁 530004)

(1. Engineering Center for Sugar Cane and Cane Sugar, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:用胶束电动毛细管色谱法分离和测定雌三醇、炔诺酮、睾酮、雌酮、雌二醇、炔雌醇、黄体酮性激素, 考察各种操作参数及有机添加剂对分离的影响。各组分在 7min 内得到很好的分离, 检出限 1.0~4.5 mg/L, 样品的加标回收率 91.5~106.3 mg/L, 相对标准偏差 4.7%~5.3%。该方法简便、快速, 已成功用于炔诺酮片和鹿鞭提取液中性激素的同时分析。

关键词:胶束电动毛细管色谱法 性激素 炔诺酮片 鹿鞭

中图分类号: O657.8 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2006)S0-0463-03

Abstract: A micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) separation of seven sex hormones, estriol, norethisterone, testosterone, estrone, β -estradiol, ethynylestradiol and progesterone, was developed with a micellar solution consisting of 30 mmol/L sodium dodecyl sulphate (SDS), 20 mmol/L H_3BO_3 , 15 mmol/L Na_2HPO_4 and 15% (v/v) isopropyl alcohol (pH was adjusted to 9.0 with NaOH). Results showed that satisfactory separation was achieved within 7 minutes. The detection limits, average recoveries and relative standard deviations are 1.0~4.5 mg/L, 91.5~106.3 mg/L and 4.7%~5.3%, respectively. The method is simple, rapid and suitable for the simultaneous determination of the seven sex hormones in norethisterone tablets and Penis et Testis Cervi.

Key words: micellar electrokinetic chromatography, sex hormones, norethisterone tablets, penis et testis cervi

胶束电动毛细管色谱法(MEKC)是毛细管电泳的一种,它基于不同的中性溶质在胶束和分离缓冲液之间分配系数的差异而进行分离。MEKC在分离脂溶性药物方面,既能使中性化合物由于分配系数的差异而得到分离,又能增加溶质的溶解性,使毛细管区带电泳无法分离的样品实现分离。与传统的高效液相色谱法、气相色谱法相比较,MEKC具有分离效率高、前处理简单和分析成本低等特点,已被广

泛应用于药品、食品及环境等领域^[1]。

性激素具有环戊烷多氢菲母核结构,由于其结构极为相似,给它们之间的分离带来了一定的难度。目前已有文献报道 MEKC 分离性激素的方法,这些方法多在分离介质中加入胆酸盐表面活性剂或环糊精(CD)有机改性剂^[2~4],这是因为性激素均有一个相同的甾体母核,和胆酸的结构中的主要部分有着惊人的相似^[5],或者因为 CD 具有不同的环状分子空间直径和疏水性有利于大部分药物分子的分离^[6]。本文作者在实验中发现,在十二烷基硫酸钠(SDS)表面活性剂中简单地加入异丙醇做为有机改

性剂就可以使雌二醇、雌三醇、炔雌醇、炔诺酮、黄体酮、睾酮、雌酮 7 种性激素得到很好的分离,据此建立一种同时分析这 7 种性激素的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: Agilent HP3DCE 毛细管电泳仪(德国); 未涂层弹性石英毛细管(河北永年锐沣) $50\ \mu\text{m} \times 33.5\ \text{cm}$ (有效分离长度 $25\ \text{cm}$); Orion 868 型 pH/ISE 测试仪(美国); Sartrouisu 215S 电子天平(德国); Labconco Waters Pro Plus 超纯水仪(美国); Organomation Associates N-EvapTM 112 氮吹仪(美国); Kendro D-37520 Osterode 离心机(德国); FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司出品); BRANSON B3500S-MT 超声仪(必能信超声有限公司出品); VXH-3 微型漩涡混合器(上海跃进医疗器械厂生产)。

试剂: SDS (Sigma 公司出品, 分析纯), 甲醇、乙腈、异丙醇(Fisher 公司出品, 色谱纯), 雌二醇、雌三醇、炔雌醇、炔诺酮(东京化成工业株式会社出品, 优级纯), 黄体酮、睾酮、雌酮(百灵威, 分析纯), 磷酸氢二钠(广东台山化工厂生产, 分析纯), 硼酸、氢氧化钠(广东汕头市西陇化工厂生产, 优级纯), 炔诺酮片(广州康和药业有限公司出品, 批号: 060102), 所用的水均为超纯水。鹿鞭片购自广西南宁市国人大药房。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取标准品各 $10.0\ \text{mg}$, 用甲醇溶解并分别定容在 $10\ \text{ml}$ 容量瓶中, 配制成 $1\ \text{mg/ml}$ 的标准储备液。标准储备液置于 $4\ \text{C}$ 冰箱中保存, 实验时用甲醇: 水(1: 5)溶液稀释至所需浓度。

1.2.2 样品溶液的制备

取炔诺酮片剂 20 片称量后, 研细混匀, 精密称取细粉适量(约相当于 1 片炔诺酮片剂重量), 置具塞试管中, 精密加甲醇 $3.5\ \text{ml}$, 超声使其崩散, 静置分层后, 吸取上层清液, 精密量取 $60\ \mu\text{l}$, 精确加 $0.3\ \text{ml}$ 水稀释摇匀, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后待分析。

鹿鞭用万能粉碎机粉碎后, 分别称取 4 份 $0.3\ \text{g}$ 粉末样品, 用甲醇溶液 $1\ \text{ml}$ 震荡提取 $5\ \text{min}$, 再用超声波处理 $15\ \text{min}$ 。经 $12000\ \text{rpm}$ 离心 $15\ \text{min}$, 吸取上清液。将沉淀部分再按上述步骤提取 3 次。合并 4 次的提取液, 以上溶液用氮气仪吹干。精确加入 $0.2\ \text{ml}\ 1/5$ 甲醇水溶液溶解, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后待

分析。

1.2.3 电泳条件

以 $30\ \text{mmol/L}$ SDS, $20\ \text{mmol/L}$ H_3BO_3 , $15\ \text{mmol/L}$ Na_2HPO_4 , 15% (V/V) 异丙醇(用氢氧化钠调节 pH 值至 9.0) 为电泳介质; 未涂层弹性石英毛细管为分离通道, 压力进样 ($50\ \text{mbar} \times 4\ \text{s}$), 分离电压为 $20\ \text{kV}$, 分离温度为 $25\ \text{C}$, 检测波长为 $214\ \text{nm}$ 。实验前缓冲溶液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。毛细管在使用前, 用 $0.1\ \text{mol/L}$ 氢氧化钠冲洗 $20\ \text{min}$, 然后用水和缓冲溶液各冲洗 $10\ \text{min}$, 每两次运行之间用缓冲溶液冲洗 $3\ \text{min}$ 。更换缓冲溶液时先用超纯水和新的缓冲溶液各冲洗 $5\ \text{min}$, 同一缓冲溶液运行 $3\sim 4$ 次后更换。

2 结果与分析

2.1 电泳条件的优化

2.1.1 SDS 浓度对分离的影响

其他条件不变, 调整 SDS 浓度从 $10\ \text{mmol/L}$ 到 $40\ \text{mmol/L}$, 发现 SDS 浓度对分离的选择性和峰型有较大影响, SDS 浓度太低时各物质难以达到有效分离, 浓度太高时, 分离时间太长, 且电流较高易产生热效应。当 SDS 浓度为 $30\ \text{mmol/L}$ 时, 分离效果最佳。

2.1.2 pH 值对分离的影响

其他条件不变, 改变 pH 值大小的实验发现, 随着 pH 值的增加分离时间缩短, 这是因为缓冲溶液的 pH 值越大, 毛细管壁的硅羟基电离出来的氢离子越多, 毛细管壁的 Zeta 电位越大, 从而加速了电渗流, 也使得溶质的保留值变小。在 pH 值 9.0 时, 分离度好, 分离时间较短。

2.1.3 缓冲溶液浓度对迁移时间的影响

硼酸浓度在 $10\sim 30\ \text{mmol/L}$ 范围内改变时, 各物质的出峰时间和峰高变化不大, 但电流增加, 在 $20\ \text{mmol/L}$ 时峰形较好。在 $5\sim 25\ \text{mmol/L}$ 范围内改变磷酸氢二钠浓度, 对电流和峰高影响不大, 但在浓度为 $15\ \text{mmol/L}$ 时分离度最好。

2.1.4 有机改性剂对分离的影响

甾体化合物具有强疏水性, 与胶束作用很强, 不能用简单的 MECC 进行分离。加入有机试剂, 可减弱或阻止它们之间的强相互作用而实现分离。本实验在胶束中分别加入 15% 甲醇、异丙醇、乙腈, 发现异丙醇能够显著地改善分离效果。本方法采用异丙醇做为有机改性剂相比文献[2~4]常用的环糊精更加经济实用。

2.1.5 电压、温度和进样时间对分离的影响

分别在 15~25 kV, 15~35 °C, 2~8 s 范围内考察分离电压、温度和进样时间对分离的影响。结果在 20 kV, 25 °C 条件下分离最好, 进样时间为 4 s。

2.2 线性关系和检出限

在优化的实验条件下进行测定, 以峰面积外标法定量, 得到雌三醇、炔诺酮等 7 种激素回归方程及相关系数和检出限, 详见表 1。

表 1 7 种激素的线性关系和检出限(S/N=3)

激素	线性回归方程	线性范围 (mg/L)	相关系数	检出限 (mg/L)
雌三醇	$Y = 0.6279X + 2.1461$	3.0~70.0	0.9999	1.0
炔诺酮	$Y = 0.2825X + 2.8900$	12.0~117.0	0.9985	4.0
睾酮	$Y = 0.4682X + 7.8608$	4.5~190.0	0.9999	1.5
雌酮	$Y = 0.8283X + 5.8734$	4.5~94.0	0.9980	1.5
雌二醇	$Y = 0.9167X + 5.6554$	3.0~105.0	0.9959	1.0
炔雌醇	$Y = 2.5323X - 8.7563$	4.5~59.0	0.9996	1.5
黄体酮	$Y = 0.2155X + 10.544$	15.0~187.0	0.9991	4.5

2.3 精密度实验

平行测定 6 个标准溶液, 计算雌三醇、炔诺酮、睾酮、雌酮、雌二醇、炔雌醇、黄体酮的峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别为: 2.0%, 3.6%, 4.2%, 5.0%, 3.8%, 4.9%, 4.9%。

2.4 样品分析

按“样品溶液的制备”的方法处理样品, 用所建立的方法分别对炔诺酮片剂中的炔诺酮含量和鹿鞭提取液中的性激素进行测定, 据保留时间定性, 峰面积定量, 每片炔诺酮片剂中炔诺酮含量为 0.676 mg, 与药品瓶标示的浓度 0.625 mg 基本相符, 加标回收率为 106.3%, 6 次平行测定相对标准偏差为 4.7%。在鹿鞭样品中测出睾酮 5.1 mg/L, 雌二醇 3.0 mg/L, 换算成实际样品的含量分别为 0.85 μg/g, 0.50 μg/g, 加标回收率分别为 92.0%, 91.5%, 6 次平行测定相对标准偏差分别为 5.3%, 4.9%。图 1 分别为混合标准品、炔诺酮片和鹿鞭提取液样品的电泳图。

3 结论

采用异丙醇为有机改性剂, 建立 SDS 胶束电动色谱同时分析 7 种性激素的方法。该方法简单、快速, 对炔诺酮片剂中的炔诺酮含量和鹿鞭提取液中的性激素进行测定的结果令人满意。用 SDS 表面活性剂和异丙醇有机改性剂, 比文献[2~4]中常使用

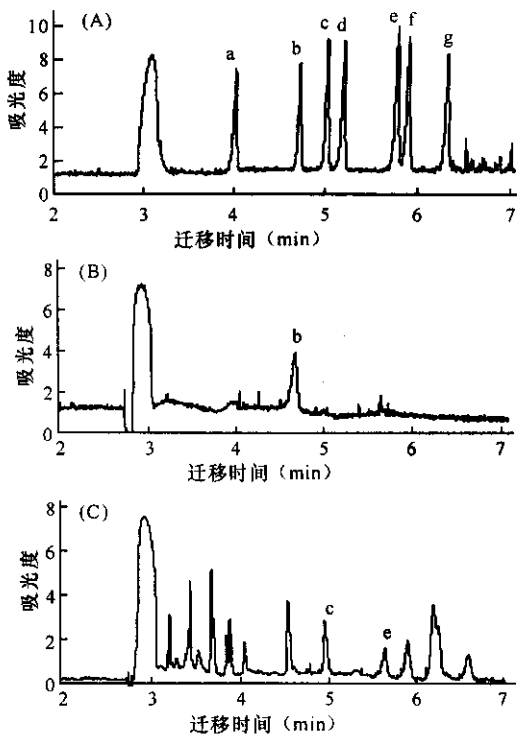


图 1 标准品(A), 样品炔诺酮(B)和鹿鞭(C)的毛细管电泳结果

a. 雌三醇; b. 炔诺酮; c. 睾酮; d. 雌酮; e. 雌二醇; f. 炔雌醇; g. 黄体酮。

的胆酸和环糊精, 更加经济实用。

参考文献:

[1] 杜克久, 徐晓白. 环境雌激素研究进展[J]. 科学通报, 2000, 45(21): 2241.

[2] CHAN K C, MUSCHIK G M, ISSAQ H J, et al. Separation of estrogens by micellar electrokinetic chromatography [J]. J Chromatogr A, 1995, (690): 149.

[3] POOLE S K, POOLE C F. Separation of pharmaceutically important estrogens by micellar electrokinetic chromatography [J]. J Chromatogr A, 1996, (749): 247.

[4] 徐其进, 张英, 顾忠伟, 等. 胶束电动毛细管色谱法分离左旋十八甲基炔诺酮、睾酮和孕酮[J]. 色谱, 1999, 17(2): 187.

[5] 田勇, 内仓和雄. 胶束电动毛细管色谱法分离 12 种肾上腺皮质激素类药物的研究[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(增刊): 6.

[6] 徐其进, 顾忠伟, 陈先丽, 等. 疏水条件下甾体化合物的分离及环糊精的作用[J]. 分析化学, 1999, 27(21): 193.