

# 讲 座

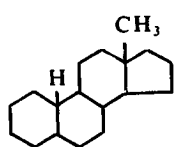
## 高效液相色谱在生物医药研究中的应用

### 第五讲 高效液相色谱法分析甾体激素

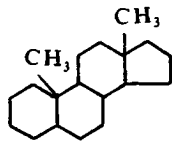
谢 福 明

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

甾体激素是具有环戊烷多氢菲母核结构的化合物, 通常按环的顺序列为 A、B、C、D 环, 根



雌烷 (C<sub>18</sub>)



雄烷 (C<sub>19</sub>)

其它的甾体激素还有胆甾醇, 含  $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和和五员或六员内酯环的强心甙, 含 E、F 环的甾体皂式以及含氮的甾体生物碱等等。

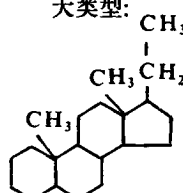
因为甾体激素广泛存在于动、植物及人体内, 在生命科学中起着重大的作用。近年来, 高效液相色谱法 (HPLC) 在这方面的应用日趋广泛。这里以性激素、肾上腺皮质激素和胆汁酸为例, 略加介绍。

#### § 5-1 性激素

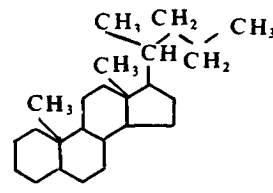
性激素包括雌激素、孕激素和雄激素, 支配了生物和人的性机能和性特征。

雌激素的典型代表为雌酮、雌二醇和雌三醇, 此外还有 16-或 17-表雌三醇、2-或 4-羟基雌激素及 16 $\alpha$ -羟基雌酮等等。表 5-1 为 HPLC 分析雌激素的一些实例, 从积累的经验来看, 在结构-保留关系方面主要有以下几个特点: (1) 羟基的数目和位置是影响保留值的重要因素; (2) 增加酮基明显增加在反相色谱中的极性, 但在正相色谱中不甚明显; (3) 正相和反相色谱的出峰顺序并不完全颠倒; (4) C-16 和 C-17 位上的羟基对极性影响的顺序为: 17 $\alpha$  < 17 $\beta$  < 16 $\alpha$  < 16 $\beta$ ; (5) 在正相色谱中 6-酮基雌二醇极性大于 16-酮基雌二醇, 而在反相色谱中则相反; (6) 分离多羟基雌激素反相优于正相色谱, 而分离立体异构体正相有

据 10 位有无甲基和 17 位有无侧链而分为以下四大类型:



娠烷 (C<sub>21</sub>)



胆烷 (C<sub>24</sub>)

时优于反相色谱<sup>(1,2)</sup>。

由于雌激素在体液中主要以葡萄糖醛酸或硫酸结合物存在, 先经酸或酶水解, 再提取游离雌激素进行 HPLC 分析, 不但使样品前处理复杂化, 还可能产生一些未知的副产物影响分析结果, 而且会失去结合位置及结合物类型等重要信息, 因此近年来用 HPLC 分析雌激素结合物的研究也日趋广泛。

从分离方法来看, 主要有阴离子交换和反相 HPLC 两种。前者的分析柱填料通常为化学修饰的纤维素或硅胶季铵盐键合剂, 雌激素结合物在其上的出峰顺序为 A 环结合物先于对应的 D 环结合物, 葡萄糖醛酸酯先于对应的硫酸酯。而激素母体的出峰顺序在纤维素柱上为雌三醇、雌酮和雌二醇; 在硅胶季铵盐键合柱上则为雌三醇、雌二醇和雌酮, 且 D 环葡萄糖醛酸酯先于对应的 A 环结合物。在反相 HPLC 中, A 环结合物先于对应的 D 环结合物, 葡萄糖醛酸酯先于对应的硫酸酯, 而雌激素的出峰顺序为雌三醇、雌二醇和雌酮。在流动相中加入溴化四乙胺等配对离子物质可以缩短分离时间, 提高分离效果。而用含  $\beta$ -环糊精的流动相, 能更有效地分离各对立体异构的结合物<sup>(3,4)</sup>。

雌激素 A 环为苯环, 在 254nm 和 280nm 均

有紫外吸收, 因此在 HPLC 检测中广为应用。但是, 当 A 环酚羟基游离时, 荧光和电化学检测的灵敏度更高, 特别是检测儿茶酚性雌激素及其结合物。通过分析柱后串联  $\beta$ -葡糖醛酸酯酶反应柱, 使 A 环结合物游离, 电化学和荧光检测成功地用于雌激素 A 环结合物的分析<sup>(5,6)</sup>。

孕激素是  $C_{21}$  的一类化合物, 由于反相 HPLC 法更能获得尖锐和对称的峰形, 而且生物

样品中的极性杂质易在溶剂前沿流出, 因此广为应用。但是, 四个不同结构的二酮好 4-和 5-孕烯二酮及  $5\alpha$ -和  $5\beta$ -孕烷二酮在正相条件下却能够更好地分离。反相 HPLC 测定人体组织中孕激素、雄激素和各种皮质激素的含量能直接为临床诊断卵巢肿瘤或肾上腺癌提供科学依据, 因此研究颇多。

表 5-1 HPLC 分析雌激素

化合物	样品	前处理	分析柱	流动相	检测器
雌激素	胎盘提取物	Biorad AG1-X2 柱	Lichrosorb RP-18	$CH_3OH-H_2O$	UV222nm
雌激素结合物	体液	石墨碳黑柱	$C_{18}(5\mu m)$	$CH_3CN-CH_3OH(6:4)$	UV 和荧光
雌激素	尿	乙醚提取	Lichrosorb RP-18 或 Diol( $10\mu m$ )	23%至 77% $CH_3CN$ 在水中或 10%至 30%异丙醇在正己烷中	UV280nm
雌激素结合物	尿	Celite 柱	Lichrosorb $C_{18}$	$CH_3CN-H_2O$ 线性梯度	收集相应成分后免疫测定
雌激素结合物	尿, 血清 羊水液	—	$C_{18}(5\mu m)$	$CH_3CN$ -磷酸盐缓冲液 (36:64)含鲸蜡三甲胺或溴化四丙胺	天然荧光
雌激素、雄激素、孕激素	血清	—	Bondapak $C_{18}$	$CH_3CN-H_2O(4:6)$	UV206nm 和 254nm
雌激素	血清	柱前衍生化	$C_{18}(10\mu m)$	$CH_3OH-H_2O$ 梯度	荧光
4-羟基雌三醇结合物	胆汁, 尿液	Amberlite XAD-4 柱	Deveiosil ODS-5	各种多元组合流动相	电化学
孕激素, 雌激素	口服避孕药	—	Bondapak $C_{18}$	$CH_3OH-H_2O$ 或 $CH_3OH-CH_3CN-H_2O$	UV
雌三醇结合物	胆汁, 尿液	PHP-LH-20 柱	$C_{18}(5\mu m)$	四氢呋喃-磷酸盐缓冲液	UV, 电化学
雌激素、雄激素、孕激素	—	—	Radial-Pak $C_{18}$	$CH_3CN-H_2O(1:1)$ 或 $CH_3OH-H_2O(7:3)$	UV
雌激素	—	—	Partisil 10 ODS-3	$CH_3OH-H_2O(65:35)$ 或 $CH_3CN-CH_3OH(65:35)$	UV280nm
雌激素	尿	酸水解, 乙醚提取	Lichrosorb Si 60	正己烷-乙醇 (2:8)含 0.5% $NH_4OH$ 和 0.05mol/L( $C_4H_9$ ) <sub>4</sub> BF <sub>4</sub>	电化学

雄激素在 3 位、5 位和 17 位上存在立体异构体, 在硅胶柱上, 用二氯甲烷-乙腈-异丙醇 (179:20:1) 为流动相时, 它们的出峰顺序为  $3\beta$ ,  $5\beta > 3\beta$ ,  $\Delta^5 > 3\beta$ ,  $5\alpha > 3\alpha$ ,  $5\beta$ , 而用甲醇-水为流动相和反相 Micropak CH 为分析柱时, 出峰顺序为: 去氢表甾酮、表雄甾酮和雄甾酮, 此时带横键羟基的雄激素比在对位位置上带竖键羟基的雄激素先出峰<sup>(7)</sup>。 $\Delta^4$ -3-酮的睾酮等在 254nm 有强紫外吸收, 低至 30ng 的睾酮可被检测。而

17-酮的雄激素虽然在 280nm 比在 254nm 有更强的紫外吸收, 但其灵敏度甚低, 仅为  $\Delta^4$ -3-酮雄激素的 1/50。这样低的检测灵敏度远远不能满足于体液中雄激素的测定, 因此通常制备成苯甲酸酯, 对-硝基苯甲酸酯或 2,4-二硝基苯胺等衍生物进行紫外或电化学检测。

### § 5-2 肾上腺皮质激素

肾上腺皮质激素分为以醛甾酮、11-去氧可

的松为代表的盐皮质激素和以皮质醇、可的松为代表的糖皮质激素两大类。目前,临床使用的合成的具有消炎作用的甾体药物如泼尼松、泼尼松龙、6 $\alpha$ -甲基泼尼松龙及的塞米松等属于糖皮质激素类。肾上腺皮质激素脂溶性大,因此可用二氯甲烷、乙醚等有机溶剂从生物样品中进行提取。然而,近年来,Bond-Elut、Extrelut等固相提取小柱因回收率高、所得样品更纯等优点而广

泛应用于生物样品的前处理,尤其是提取尿液中的皮质激素时应用更多。因为将提取柱和分析柱串联于HPLC系统中进行柱切换的提取分离方法既节省时间又易于分析自动化,因此在临床测定中应用日广。作为临床诊断或监测甾体消炎药物的治疗和毒理作用的工具,串联提取柱和分析柱进行柱切换的方法在肾上腺皮质激素的HPLC

表 5-2 HPLC 分析肾上腺皮质激素

化合物	样品	前处理	分析柱	移动相	检测器
泼尼松龙乙酯、泼尼松龙、可的松、泼尼松、皮质醇、的塞米松(IS)	血清	Band-Elut 提取柱	Lichrosorb Si 60	四氢呋喃-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH-乙酸	UV 254nm
皮质醇、皮质甾酮	血浆	乙醚洗涤过的硅藻土柱	Lichrosorb Si 60	H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -正己烷(0.1:3:30:66.9)	UV 245nm
皮质醇、马秦雌酮(IS)	血清	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	CH <sub>3</sub> CN-磷酸盐缓冲液(3:7)	UV 254nm
皮质醇、11-去氧皮质醇	血清	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O(6:4)	UV 254nm
皮质醇、的塞米松(IS)	尿	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取, HPLC 硅胶柱, 纯化, 收集	Zorbax CN	CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O(4:6)	UV 254nm
皮质醇、泼尼松龙(IS)	血清	硷化, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取	$\mu$ Porasil	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -EtOH-MeOH-H <sub>2</sub> O(232:5:10:3)	UV 254nm
皮质醇、6-甲基泼尼松(IS)、19-去甲基睾丸酮	血清	硷化, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取	RSILC <sub>18</sub> HL	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH-EtOH-H <sub>2</sub> O(928:40:20:12)	UV 254nm
皮质醇、泼尼松龙(IS)	血清	硷化, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN-四氢呋喃-3mol/L 磷酸盐缓冲液(pH4.4) (63:28:8:1)	荧光 Ex. 366nm Em. 488nm
皮质醇、可的松、泼尼松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、的塞米松(IS)	血清	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -乙醚 (2:1) 提取	硅胶柱	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -四氢呋喃-CH <sub>3</sub> OH-乙酸(96:85:1:2.1:0.05)	UV 254nm
醛甾酮	尿	硫酸水解, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取, TLC 纯化	硅胶柱	CHCl <sub>3</sub> -MeOH(98.5:1.5)	UV 254nm
皮质醇	尿	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取 硷水洗涤	C <sub>18</sub>	—	UV 254nm
皮质醇	尿	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取, 加浓 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	C <sub>18</sub>	—	荧光 Ex. 390nm Em. 475nm
皮质醇	尿	直接进样, 串联 反相 预柱, 柱切换	ODS-Hypersil	20% → 30% CH <sub>3</sub> CN 在水中	UV 254nm
皮质醇、泼尼松龙(IS)	尿	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 提取, TLC 纯化	Nucleosil NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -EtOH(97:3)	UV 254nm
醛甾酮和四氢醛甾酮的葡萄糖醛酸结合物	尿	阴离子交换柱	Diol 柱或 C <sub>2</sub> 柱	多种	UV 254nm
皮质甾体激素	血浆	—	Zorbax Sil 或 ODS, CN 柱	Sil: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -EtOH; ODS, CN: CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O	UV 254nm

分析中得到了成功的应用。

在肾上腺皮质激素的分析中正相和反相的 HPLC 法均有应用, 其中分析尿液样品主要为正相 HPLC, 而分析血液样品则正、反相 HPLC 均有(表 5-2)。

肾上腺皮质激素在 UV254nm 有较强的紫外吸收, 因此紫外检测法在 HPLC 分析中广为应用。但是在分析尿样或血样中超微量存在的某些激素或它们的代谢产物时, 则必须制备高灵敏响应的衍生物才能进行测定。用硫酸处理皮质醇即产生荧光衍生物。用荧光检测法进行检测不但提高了检测灵敏度, 而且提高了检测的选择性, 减少了杂质对检测的干扰<sup>(8)</sup>。Goto 等为了检测血液中超微量存在的皮质醇、的塞米松、醋酸去炎松、可的松和泼尼松等皮质激素, 制备了它们的 9-蒽甲酰脲衍生物进行荧光检测, 其检测限度可达 25pg, 足以测定生物样品中的这些化合物。他们在硅胶正相柱和 C<sub>18</sub> 反相柱上分离这些衍生物的研究结果还表明, 正相 HPLC 能更有效地分离这些脂溶性的衍生物(图 5-1)<sup>(9)</sup>。

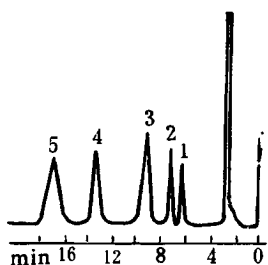


图 5-1 HPLC 分离肾上腺皮质激素的 21-(9-蒽甲酰)衍生物

1. 的塞米松, 2. 醋酸去炎松, 3. 皮质醇, 4. 泼尼松, 5. 可的松。

条件: 分析柱, Cosmosil 5SL; 流动相 正己烷-乙酸乙酯 (7:5), 1ml/min; 荧光检测, Ex.360nm, Em.460nm。

### § 5-3 胆汁酸

由于胆汁酸的分离定量能为临床诊断胆肝疾病和为研究胆汁酸的生理及药理作用提供科学的依据, 因此分析方法的研究十分引人注目, HPLC 法分析胆汁酸的进展也很快。

有机溶剂提取法因其回收率低、易于乳化以及必须加入离子对试剂等等, 已很少用于生物样品中胆汁酸的提取。作为 HPLC 的前处理方法, 最常用的是固相提取。最早用于胆汁酸的固相提取剂为 Amberlite XAD-2 和 XAD-7 树脂, 因为它们的回收再现性比较差, 会因厂家甚至同一厂家因批号的不同而造成回收率的波动很大, 因此近年来逐渐被 C<sub>18</sub> 反相和硅胶正相提取柱以及交联葡聚糖凝胶(Lipidex gels)柱所代替。这些固相提取剂已经广泛用于尿、血、胆汁和粪便等各种生物样品中胆汁酸的提取。系统研究表明, 提取时的温度、溶液 pH、流速及提取柱的材料等对回收率均有影响。例如, C<sub>18</sub> 反相提取柱在硷性介质中, 在 64℃ 时提取效果最佳; 而不锈钢或玻璃管柱比塑料管柱更少杂质。而在酸性水溶液中, Lipidex gel 1000 和 5000 能更有效地提取低极性至中等极性的游离型亲脂性胆汁酸。当用 Lipidex 1000 回收胆汁酸结合物时, 必须加入溴化癸代三甲胺作配对离子才能取得较好的提取效果。

因为游离型和结合型(甘氨酸、牛磺酸、硫酸、葡糖醛酸及脂肪酸结合物)胆汁酸的极性相差很大, 要一次性进行 HPLC 分离十分困难, 因此常常需要先进行同类组分的初步分离, 然后再进行各组的 HPLC 分析。早在 1971 年硅胶柱层析就成功地分离了游离型、甘氨酸和牛磺酸结合型以及一羟基、二羟基和三羟基胆汁酸等各类组分, 但是再现性差和费时是其缺点。用市场出售的硅胶提取柱在 4℃ 时进行分离, 则能克服这些缺点。阴离子交换凝胶 DEAP-LH-20(Diethylaminohydroxypropyl Sephadex LH-20)和 PHP-LH-20(Piperidinohydroxypropyl Sephadex LH-20)是有效的胆汁酸同类组分分离材料。使用含不同比例的乙酸、氢氧化铵的 72% 乙醇可在 DEAP-LH-20 柱上成功地分离中性甾体激素、游离型胆汁酸、胆汁酸的甘氨酸和牛磺酸结合物以及硫酸结合物等各组分; 而用 0.1mol/L 乙酸、0.2mol/L 甲酸及 0.3mol/L 乙酸-乙酸钾 (pH6.5) 的 90% 乙醇可从 PHP-LH-20 柱上顺次洗脱出胆汁酸游离型、甘氨酸及牛磺酸结合型, 接着用含 1% 碳酸铵的 70% 乙醇洗脱出胆汁酸的

硫酸结合物。

正相 HPLC 难以基线分离鹅去氧胆酸和去氧

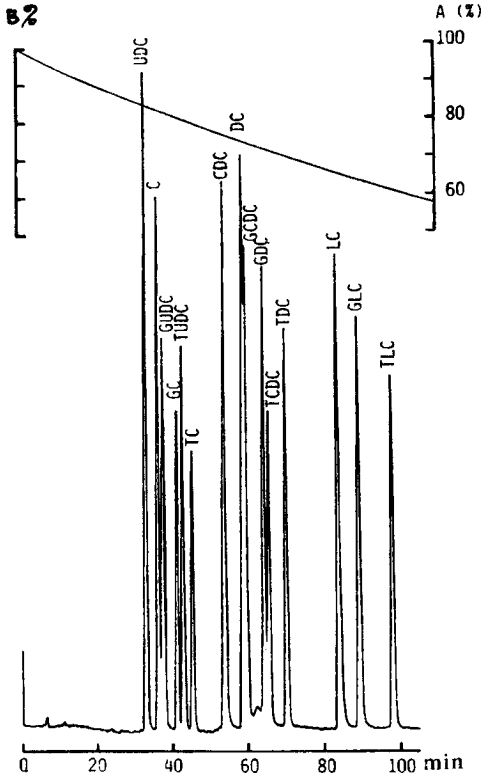


图 5-2 微型 HPLC-固定酶反应柱 / 荧光检测胆汁酸

条件——分析柱: ODS SC-01(20cm × 0.26mm), 预柱: ODS SC-01(5 × 0.2mm), 酶反应柱: 3 $\alpha$ -羟基甾体激素脱氢酶. 流动相: A. 60mmol/L 磷酸盐 (pH9.8) — 60mmol/L 磷酸盐 (pH8.9) 含 18mmol/L NAD-CH<sub>3</sub>CN (70:10:20); B. 60mmol/L 磷酸盐 (pH9.5) — 60mmol/L 磷酸盐 (pH8.9) 含 18mmol/L NAD-CH<sub>3</sub>CN (30:10:60); 流量, 2.1 $\mu$ l/min. 检测: 荧光法, Ex.470nm, Em.365nm.

UDC: 熊去氧胆酸 (21.7ng); C: 胆酸 (24.0ng); GUDC: 熊去氧胆酸甘胺酸酯 (22.0ng); GC: 胆酸甘胺酸酯 (20.4ng); TUDC: 熊去氧胆酸中磺酸酯 (21.1ng); TC: 胆酸牛磺酸酯 (21.7ng); CDC: 鹅去氧胆酸 (22.6ng); DC: 去氧胆酸 (21.7ng); GCDC: 鹅去氧胆酸甘胺酸酯 (20.9ng); GDC: 去氧胆酸甘胺酸酯 (19.9ng); TCDC: 鹅去氧胆酸牛磺酸酯 (20.2ng); TDC: 去氧胆酸牛磺酸酯 (18.7ng); LC: 石胆酸 (20.6ng); GLC: 石胆酸甘胺酸酯 (20.1ng); TLC: 石胆酸牛磺酸酯 (18.8ng).

胆酸的甘胺酸及牛磺酸结合物, 再加上胆汁酸一般具有强极性基团, 因此在实际分离定量中应用较少。使用 C<sub>18</sub> 反相 HPLC 系统则适合于胆汁酸及其结合物的分离。通常胆汁酸母核上羟基和羧基的数目多少及立体构型是影响保留时间的主要因素。母核结构相同的游离型与结合型的组分其色谱行为基本相同, 在反相柱上的出峰顺序都是: 熊去氧胆酸、胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸及石胆酸。横键羟基的胆汁酸较对应的竖键羟基的胆汁酸先出峰, 而横键羟基的胆汁酸与含对应酮基的胆汁酸几乎具有相同的保留时间。

胆汁酸及其结合物的 HPLC 检测方法主要有四种方式。其一是用折光或紫外检测器直接检测, 紫外检测的波长通常选在 195-215nm 之间。此法只适用于含高浓度胆汁酸的生物样品如胆汁, 而无法测定血液或尿液中微量乃至超微量的胆汁酸。其二是制备衍生物进行紫外或荧光、电化学检测, 以提高检测灵敏度。紫外检测的衍生物有对-硝基苯甲酸酯, 常用的荧光检测衍生物

试剂则有 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素、1-溴乙基苊和蒽甲酰腈等。胆汁酸的这些荧光衍生物的检测限度可达 1~5pmol, 因此能够满足体液中微量胆汁酸的测定。

第三种方法是在 NAD 的存在下, 用 3 $\alpha$ -羟基甾体激素脱氢酶 (3 $\alpha$ -HSD) 将 3 $\alpha$ -羟基胆汁酸转变成对应的 3-酮基胆汁酸的同时, 荧光检测生成的 NADH 而间接测定胆汁酸。由于固定酶反应器可串联于分析柱后直接进行检测, 因此简便经济, 可供实用。Ishii 等将此法用于微型 HPLC 分析取得了成功 (图 5-2)<sup>(10)</sup>。由于 3 $\alpha$ -HSD 在弱硷性条件下才具有活性而不能使用酸性流动相, 因此给同时分析多种胆汁酸增加了困难。即使象 Ishii 等采取梯度洗脱法<sup>(10)</sup>, 分析时间也长达 100 分钟。第四种则是利用色谱-质谱联用进行质谱法检测。实践证明, 负离子检测较正离子检测的灵敏度更高, 甘胺酸酯的灵敏度

(下转 201 页)