

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*

徐其进 张 英 顾忠伟 陈先丽

(国家计划生育委员会科研所 北京 100081)

提 要 胶束电动毛细管色谱法(MECC)被用于左旋十八甲基炔诺酮(LNC)、睾酮(T)和孕酮(P)的分离。电泳缓冲液中含一定量的乙腈或甲醇等有机添加剂时,可以改善分离。当乙腈体积分数为 0~15% 时,样品的迁移时间 t_m 随着乙腈体积分数的增加而增加;但当乙腈体积分数大于 15% 时,样品的 t_m 随乙腈体积分数的增加反而减少。如采用 20 mmol/L 的 2,6-二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)作添加剂,不仅可提高分离度,而且能缩短分析时间,实现最佳分离。

关键词 胶束电动毛细管色谱法,左旋十八甲基炔诺酮,甾体激素,分离

分类号 O658

1 前言

甾体激素和甾体类药物是强疏水性化合物。甾体化合物的分离分析对于临床检验、药理研究和药物分析都有重要意义。某些甾体化合物可在简单的 MECC 电泳缓冲体系中分离^[1,2]。而在电泳缓冲液中添加一定浓度的环糊精(CDs)或有机溶剂可快速分离另一些甾体物质^[3~5]。此外,应用微乳电动毛细管色谱法(MEEKC)分离甾体也有较好的结果^[6]。

我们应用 MECC 方法分离合成药物左旋十八甲基炔诺酮与几种内源性甾体激素,着重探讨了电泳缓冲液中添加剂对分离的影响及其规律性。

2 材料与方法

2.1 试剂与样品 十水合四硼酸钠(分析纯,北京益利精细化学品有限公司);盐酸(分析纯,北京化学试剂二厂);SDS(Sigma 试剂,北方同正生物公司,进口分装); β -环糊精(β -CD), γ -环糊精(γ -CD)(色谱纯,Fluka 试剂);2,6-二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)(自制);甲醇(优级纯,北京化工厂);乙腈(色谱纯,北京昌化精细化工厂);左旋十八甲基炔诺酮(北京制药三厂提供);睾酮,孕酮(Fluka 试剂);超纯水(用 Millipore Milli-Q 纯水器自制)。样品用甲醇溶解,质量浓度:LNG 为 8.9 g/L,T 为 13.8 g/L,P 为 29.3 g/L。缓冲溶液及样品均于使用前经 0.45 μ m 膜过滤、超声波脱气处理。

2.2 仪器 NT 宾达高效毛细管电泳仪,包括 254 nm 固定波长紫外检测器(北京新技术应用研究所);台式自动平衡记录仪(上海自动仪表二厂);石英毛细管柱为 68 cm(有效长度 53 cm) \times 50 μ m i. d.,未涂层(河北永年光导纤维厂)。

2.3 电泳方法 电泳缓冲液为含一定量添加剂和 50 mmol/L SDS 的 10 mmol/L 四硼酸盐(pH 9.2)。最佳条件下添加剂为 20 mmol/L 的 DM- β -CD。工作电压为 24 kV,阳极重力法进样,进样高度为 10 cm,进样时间为 5 s,紫外检测波长为 254 nm。实验前用 0.1 mol/L 的 NaOH 冲洗毛细管柱 5 min,每次进样前先后用超纯水和缓冲液各冲洗 3 min。

3 结果与讨论

3.1 有机添加剂对甾体化合物分离的影响 甲醇、乙腈(ACN)等与水混溶性的有机溶剂由于能影响和调节溶质分子在胶束内外两相的分配而常被用作 MECC 电泳缓冲液的添加剂。加入甲醇、乙腈等的体积分数通常为 5%~20%^[1~3]。图 1 为在 50 mmol/L SDS 的 10 mmol/L 四硼酸盐缓冲液(pH 9.2)中分别加入体积分数为 10%,15%和 20%的乙腈时分离 LNG,T 和 P 的 MECC 色谱图。虽然迁移时间和分离情况各不相同,但都实现了完全分离。提高乙腈体积分数有利于提高相对迁移时间,但也会延长分离时间。

乙腈等有机添加剂可在多方面影响甾体化合物

* 国家计生委科研所资助项目
本文收稿日期:1998-12-26,修回日期:1999-02-27

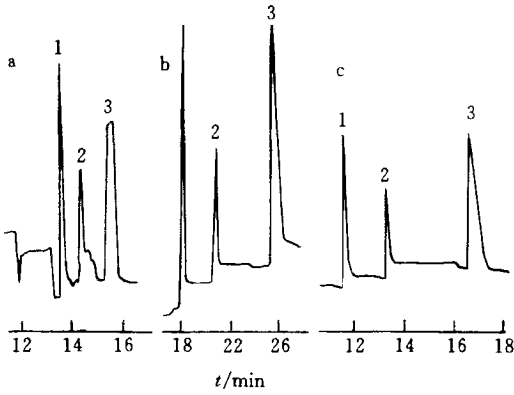


图 1 电泳缓冲液中乙腈体积分数对三种甾体化合物分离的影响

Fig. 1 The effect of acetonitrile (ACN) modifiers on MECC separation

分离条件:电泳缓冲液为含(a)10%(体积分数,下同)ACN, (b)15% ACN, (c) 20% ACN 和 50 mmol/L SDS 的 10 mmol/L 四硼酸盐(pH 9.2);其余条件见文中说明。各峰对应化合物为:1. T, 2. LNG, 3. P。

Conditions: The running buffers were 10mmol/L borate (pH 9.2) containing 50 mmol/L SDS and (a) 10% volume fraction ACN, (b) 15% volume fraction ACN, (c) 20% volume fraction ACN. Other conditions were the same as described in text. Peak identification: 1. T, 2. LNC, 3. P.

在 MECC 中的迁移行为。首先,乙腈等通过改变分配系数而影响迁移率 ν 。乙腈等的体积分数越高,有效淌度 μ_{EFF} 越大,迁移时间 t_m 越短。其次,乙腈等通过改变电渗流(EOF)的大小影响 ν 。乙腈等能改变毛细管壁双电层的 zeta 电势 ζ ,从而影响电渗流。再次,乙腈等有机添加剂还能通过改变电泳缓冲液的介电常数 ϵ 而影响恒压条件下的电流值,结果不仅影响样品分子的 ν ,而且影响毛细管内局部温度,进而影响分配平衡、体系粘度 η ,最终影响样品迁移行为。最后,乙腈等本身也会改变 η 。可见,乙腈等有机添加剂对样品的分离和迁移规律的影响是众多因素综合作用的结果。图 2 反映出乙腈体积分数在 0~20% 范围变化对 t_m 和 μ_{EFF} 的复杂作用规律。从图上可以看出,当乙腈体积分数增加时,样品 t_m 先增加(0%~15% ACN 时),后降低(15%~20% ACN 时), μ_{app} 的变化则相反(图中未表示),但方向相反的电渗淌度 μ_{eof} 和 μ_{EFF} 先增加(0%~10% ACN 时),后降低(10%~15% ACN 时),再增加(15%~20% ACN 时)。这是因为,当乙腈体积分数增加时,一方

面,样品分配系数降低,体系粘度下降, μ_{EFF} (方向为负)降低, ν 趋于增加(胶束为 SDS 时, $\mu_{app} = \mu_{eof} - \mu_{EFF}$);另一方面, ϵ 增加,电流值降低, μ_{eof} 降低, ν 趋于减小。由于这两种相反趋势作用的结果,使得样品的 t_m 和 μ_{eof} 随乙腈体积分数的变化表现出复杂的函数关系。Kobayashi 等^[4]在分离游离甾体和缀合甾体化合物时也发现了类似现象。

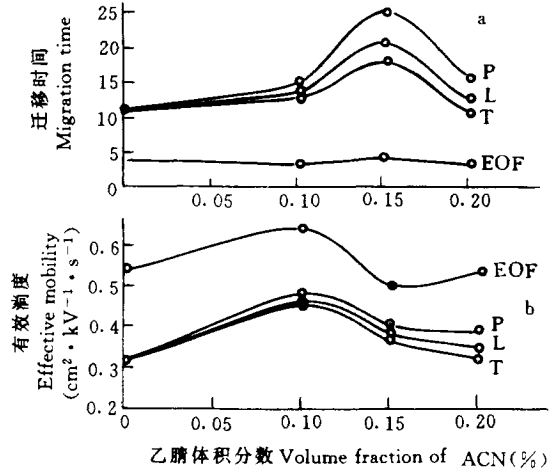


图 2 (a)电泳缓冲液中乙腈体积分数对 3 种甾体化合物和电渗流(EOF)迁移时间的影响;(b)电泳缓冲液中乙腈体积分数对 3 种甾体化合物和 EOF 有效淌度的影响。电泳条件同图 1。

Fig. 2 (a) Effect of acetonitrile volume fraction in the running buffer on migration time of steroids and electroosmotic flow (EOF); (b) Effect of acetonitrile volume fraction in the running buffer on effective mobility of steroids and EOF. Conditions were the same as in Fig 1.

3.2 环糊精(CDs)对甾体化合物分离的影响

β -CD 和 γ -CD 不仅是有效的手性选择剂,而且被广泛用作 MECC 的添加剂^[1,2]。CDs 与此相关的两个重要特性参数是环状分子空腔直径和疏水性。天然 β -CD 和 γ -CD 不同的空腔直径适合于大部分药物分子,但是缺少较强的疏水性基团,对低极性或非极性的分子的选择性稍差。为此许多合成的 β 系列和 γ 系列的环糊精衍生物被用于 MECC 的分离。图 3 首先显示了环糊精的浓度对分离的影响。可以看出, β -CD 或 γ -CD 的浓度都能提高分离度,但 β -CD 和 γ -CD 对分离的选择性彼此不同, β -CD 能选择分离 T, LNG 和 P,而 γ -CD 则能较好地分离 T, LNG 与 P,两种 CDs 均不能完全分离 3 种甾体化合物。另外,分别使用 β -CD 和 γ -CD 作添加剂时,3 种化合物的出

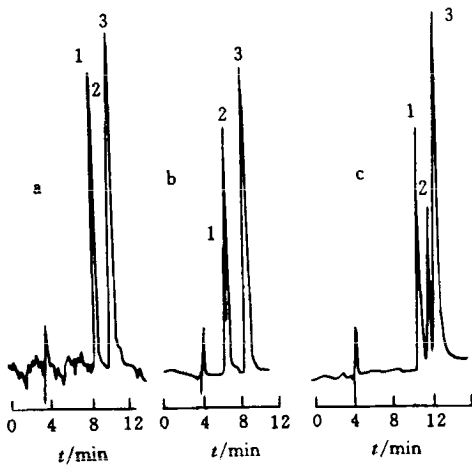


图 3 电泳缓冲液中环糊精对 3 种甾体化合物分离的影响

Fig. 3 The effect of cyclodextrins (CDs) on MECC separation.

分离条件:电泳缓冲液为含(a) 20 mmol/L β -CD, (b) 20 mmol/L γ -CD, (c) 20 mmol/L DM- β -CD 和 50 mmol/L SDS 的 10 mmol/L 四硼酸盐 (pH 9.2); 其余条件见文中说明。各峰对应化合物为:1. T, 2. LNG, 3. P. Conditions: The running buffers were 10 mmol/L borate (pH 9.2) containing 50 mmol/L SDS and (a) 20 mmol/L β -CD, (b) 20 mmol/L γ -CD, (c) 20 mmol/L 2,6-dimethyl- β -cyclodextrin. Other conditions were the same as described in text. Peak identification; 1. T, 2. LNG, 3. P.

峰顺序不同,说明环糊精对甾体化合物的分离选择性直接与空腔直径大小有关。图 3 还表明天然 CDs 与甲基化衍生 CDs 对于这 3 种物质分离的不同效果。在电泳缓冲液中加入 20 mmol/L 的 DM- β -CD 可以实现 T, LNG 和 P 的完全分离,而且与采用有机溶剂添加剂相比时间更短(图 3-c)。DM- β -CD 含有两个甲基,大大增加了 CDs 的疏水性,提高了对强疏水性的甾体化合物的分离选择性。

致谢 感谢北京理工大学材料科学系傅若农、顾俊玲和李方等提供仪器设备和 DM- β -CD 试剂。

参 考 文 献

- 1 Ji A J, Nunez M F, Machacek D et al. J Chromatogr B, 1995, 669:15-26
- 2 Abubaker M A, Petersen J R, Bissell M G. J Chromatogr B, 1995, 674:31-38
- 3 Chan K C, Muschik G M, Issaq H J et al. J Chromatogr, 1995, 690:149-154
- 4 Kobayashi Y, Matsui J, Watanabe F. Biol Pharm Bull, 1955, 18:1614-1616
- 5 Nishi H, Fukuyama T, Matsuo M et al. J Chromatogr, 1990, 513:279-295
- 6 Vomastova L, Miksik I, Deyl Z. J Chromatogr B, 1996, 681:107-113

Separation of Levonorgestrel, Progesterone and Testosterone by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

Xu Qijin, Zhang Ying, Gu Zhongwei and Chen Xianli

(National Research Institute for Family Planning, Beijing, 100081)

Abstract Separation of levonorgestrel, progesterone and testosterone was achieved by using micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). A column of 53 cm (to the detector) \times 50 μ m i. d. uncoated fused-silica capillary (totally 68cm in length) and an ultra-violet detector with fixed wavelength at 254 nm were used throughout all the experiments. MECC analysis was optimized by evaluating three different micelle-forming agents, the concentration of SDS and several of organic additives in a 10 mmol/L borate running buffer (pH 9.2). Complete separations were obtained with either 10%-20% acetonitrile or 20 mmol/L 2,6-dimethyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD) as the modifier in buffer. When the acetonitrile volume fraction was in the range of 0-15%, the migration times of the three steroids increased with the acetonitrile volume fraction, but in the range of 15%-20% acetonitrile concentrations, the situation was opposite. This behavior of the steroids was attributed to the interaction of two opposite effects, an increased mobility due to decreased partition coefficient and a decreased electroosmotic flow (EOF). Both β -cyclodextrin (β -CD) and γ -cyclodextrin (γ -CD) were found to be inadequate for a satisfactory separation.

Key words micellar electrokinetic capillary chromatography, levonorgestrel, steroid hormones