

定孔玻璃珠担体应用于甾体气液层析*

高魁雄 周冠中

(上海实验生物研究所)

在人体和哺乳动物中,甾体激素是由肾上腺、雌雄生殖腺、胎盘、胎儿等产生的。由于此类激素对生殖生理和避孕药的研究以及对于某些疾病的诊断、治疗和预后具有重要意义,所以测定体液或组织中的雌激素、孕激素、雄激素、皮质激素和胆固醇的含量,在临床上受到广泛的重视。六十年代以来,发展起甾体化合物的气液色谱(GLC)分析方法,其精确度和灵敏度都比较令人满意,GLC测定甾体激素业已成为临床及科研的重要手段之一,并已有不少资料^[1-3]。

层析柱质量的优劣是GLC分析的关键,通常将层析柱比作GLC的心脏。甾体类物质由于分子量大,气化温度高,一般还带有极性基团,故对于层析柱的柱效能要求很高。需慎重选择担体和固定剂,注意制备层析柱的具体操作等问题。在临床分析时,因为样品较多,尚需兼顾分离效能和缩短滞留时间。兹介绍一种适合于快速分离甾体化合物的、用定孔玻璃珠(Controlled-pore Glass,简称CPG)作为担体制成的,性能较好的低固定剂填充柱如下。

材 料 与 方 法

(一) 担体的硅烷化处理

担体采用多孔玻璃珠(CPG-10,平均孔径2023埃,比表面积12.6米²/克,120—140目),外形及细微结构见扫描电镜照片(图1A和B)。量取一定体积的CPG(50克左右),经浓硝酸浸渍,蒸馏水洗至中性,300℃,6小时烘干,冷至100℃左右倾入重蒸正己烷(沸程60—80℃),每25克CPG用80毫升正己烷,再加15毫升六甲基二硅氨烷(HMDS)置于小电炉上回馏1小时(开口处接硫酸钙干燥管),加入2毫升正

丙醇(重蒸),放置30分钟后再回馏数小时,随后用2×50毫升石油醚(沸程60—80℃)漂洗,50毫升正丙醇漂洗,2×50毫升石油醚再洗,80℃烘干。

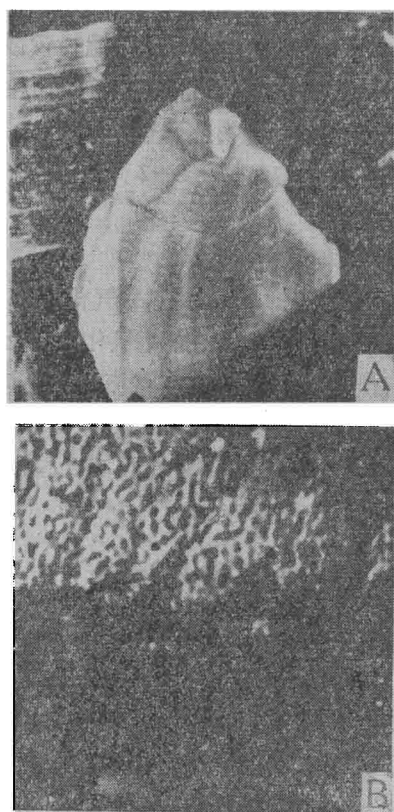


图 1

A: CPG-10(120—140目)喷金后扫描电镜低倍观, 600×; B: 同上颗粒的部分区域放大, 6,000×。

从图中可看到小孔孔径约在 1.2 ± 0.3 毫米左右,按计算与原标定孔径2023埃相接近

(二) 固定剂涂布及装柱

称取SE-30 0.19克,预先用甲苯溶解,倾入蒸发皿内,再加入25克的硅化CPG(甲苯的用

* 本工作得到上海市药品检验所张叔良、宋增明、王仲山同志的协助。

量以略多于能够全部浸没担体为度),置于小电炉上缓缓加热,不断地用钢丝小叉轻轻翻拌,使甲苯挥发到恰好与担体面相齐,停止加热,在冷却过程中继续用小钢丝叉翻拌,使担体相互间渐渐松散,室温过夜,进一步任其预干,再在130℃烘箱中烤至担体能自由流动。涂得的是0.76%SE-30于CPG担体。装于长119厘米,内径3毫米的“U”型硅化玻璃柱中,280℃氮流中老化24小时以上。

(三) 甾体化合物衍生物的制备

称取一定量的甾体样品(一般在毫克水平以下)放入5毫升的离心管中,加入醋酐0.5毫升,吡啶0.1毫升,塞紧盖子,室温过夜或60℃保温30分钟,将剩余反应液用氮流吹干便得到相应的甾体乙酯衍生物。残留物加50—100微升干燥的正戊烷溶解,取1—2微升作气相层析进样。

(四) 气相层析条件

仪器为Schimadzu GC-5A气相色谱仪,氢火焰离子检测器检测。柱温、气化温、检测温、载气氮气流速、氢气流速、空气流速见色谱图说明。参考用柱为Schimadzu产品,1.5%SE-30于Chromoserb W-AW-DMCS,柱长160厘米,内径3毫米“U”型玻璃管柱。

实验结果与讨论

用上述方法制备的0.76%SE-30于CPG的层析柱(柱I)和1.5%SE-30于Chromoserb W的参考柱(柱II),在相同的仪器和相同的气相层析条件下,对五种甾体化合物的乙酯衍生物进行了分析。柱I所得的结果见色谱图2A及B。柱II的结果见图3。两根层析柱均能将雌酮(E_0)、雌二醇(E_2)、雌三醇(E_3)、孕二醇(P_2)及胆固醇(Ch)的乙酯衍生物的混合样品完全分离开。但是用CPG作担体的柱I对激素的保留时间较用Chromoserb W作担体的柱II对激素的保留时间约短一半左右,即在单位时间内柱I可以测定双倍数量的分析样品。通过计算得到 E_3 峰的等板高度(HETP),柱I为0.78毫米,柱II为0.84毫米。说明用多孔玻璃珠所制

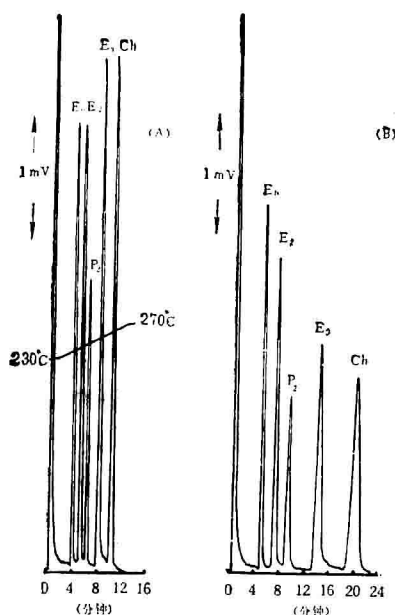


图2 五种甾体化合物雌酮(E_0)、雌二醇(E_2)、雌三醇(E_3)、孕二醇(P_2)及胆固醇(Ch)的乙酯衍生物的气液层析图谱

色谱柱: 0.76%SE-30于120—140目CPG,柱长119厘米,内径3毫米。气相条件: 氮气流速68毫升/分,氢气流速40毫升/分,空气流速420毫升/分。气化温和检测温270℃,柱温(A)230—270℃顺序升温,3℃/分,(B)225℃等温。进样2微升内含 E_0 2微克, E_2 2微克, E_3 4微克, P_2 3.2微克, Ch 4微克。氢火焰离子检测,灵敏度 $10^2 \times 16$,记录仪1毫伏满刻度,纸速2.5毫米/分。

作的层析柱,不但对样品的滞留时间较短,同时柱效能亦高于Schimadzu的硅藻土作担体的层析柱。

以CPG作为担体,用上述方法制备的层析柱性能较好的原因,主要有以下三个方面:

1. CPG系由纯 SiO_2 (96%)构成,比一般硅藻土担体含有更少的金属元素,也不像普通的玻璃那样含有 CaO 、 MgO 、 B_2O_3 、 Al_2O_3 等杂质,因此减少了由钙和硼等金属离子引起的Lewis基的表面活性基团。同时我们采用硝酸处理CPG,而不是像常法那样用盐酸处理担体,据松浦多闻推荐^[4,5],这样处理水晶担体效果较佳。

2. CPG的孔径比白色担体和红色担体更均一(参见Filbert和Hair的报道^[6])。我们从扫描电镜摄得的照片(图1, B)可以看出,小孔是十分整齐均一的,而硅藻土担体却是由杂乱的、大

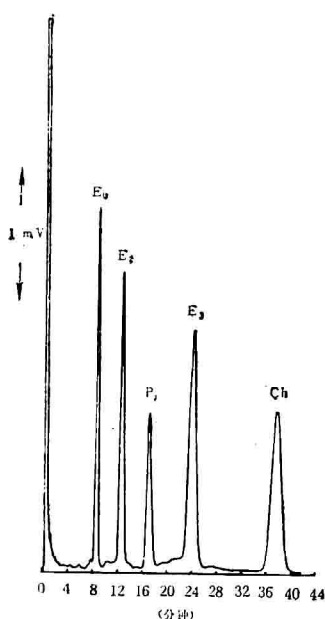


图 3

1.5% SE-30 于 Chromoserb W-AW-DMCS, 柱长 160 厘米, 内径 3 毫米, 气相层析条件同图 2B

[注意: 同样的样品其滞留时间较图 2 B 的长一倍左右。]

小和形态都不相同的各种硅藻骨架所构成。因此用 CPG 作担体时, 样品在孔穴中发生气液交换的平均时间比较一致, 这就能减少拖尾现象, 防止了峰形扩散。尚需说明, 我们选用的 CPG 的孔径规格为 2023 埃, Guillemin^[7]等认为, 这样的孔径范围正适合于大分子化合物的分析。

3. 在担体的硅烷化处理方面, 我们采用了六甲基二硅氮烷 (HMDS), 这种硅烷化剂被认为比常用的二甲基二氯硅烷 (DMCS) 更优越^[8]。CPG 在六甲基二硅氮烷中回馏后加入正丙醇,

其作用是帮助湿润担体; 而且, 虽然正丙醇可以与未起反应的剩余 HMDS 形成 SiMe_3opr , 但它仍可以进一步与担体的一OH 基起反应, 充分地使担体起烷化作用, 这保证了低固定剂涂布的均一性, 提高了柱效能, 缩短了样品的滞留时间。

综上所述, 我们觉得上述方法硅烷化处理的 CPG 担体是值得推荐用作甾体化合物和其他分子量较大、气化温度较高的有机化合物的气液层析的。用 0.76% SE-30 的低固定剂所涂的 CPG 担体制成的层析柱, 分析 E₀、E₂、E₃、P₂ 和 Ch 五种甾体化合物的乙酯衍生物时, 能达到快速完全分离, 并且不会产生样品裂解现象, 故适于药厂、临床和科研工作分析甾体类化合物。

参 考 文 献

- [1] Patti, A. A. & Stein, A. A. Steroid Analysis by Gas Liquid Chromatography, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1964.
- [2] Wotiz, H. H. & Clark, S. J.: Gas Chromatography in the Analysis of Steroid Hormones. Plenum Press, New York, 1966.
- [3] Elk-Nes, K. B. & Horning, E. C., eds.: Gas-phase Chromatography of Steroid. Springer-Verlag, New York, 1968.
- [4] 松浦多闻等: 工业化学杂志(日本), 64, (5), 795, 1961.
- [5] 同上, 64, (5), 799, 1961.
- [6] Filbert, A. M. et al.: J. Chromatog. Sci., 7, (2), 72, 1969.
- [7] Guillemin, C. L. et al.: Analytical Chemistry, 39, (8), 940, 1967.
- [8] Hishta, C. & Bomstein, J.: J. Gas Chromatog. 5, (8), 395, 1967.

[本文于 1977 年 7 月 18 日收到]

科技消息

核 小 体 的 结 构

用中子及 X-线散射及其他物理化学方法观察研究染色质核小体的轴心粒, 得到非常有意义的模型。核小体是染色质的重复单元。它由 200 对碱基和组蛋白 H₂A、H₂B、H₃ 及 H₄ 各两个分子和 H₁ 一个分子所组成。模型的大致情况为: 二个盘状的四聚体组蛋白, 面对面形成轴心蛋白。每一个四聚体由一个环状 DNA 覆盖, 二个 DNA 环有一个连接的片段。这样的模型可以预测在溶液中这些轴心粒自组装的方式以及在染色体复制和转录过程中轴心粒的构型变化。