

气液色谱法测定尿中 17-酮类固醇

田佩珠 徐国瑞

(中国科学院生物物理研究所)

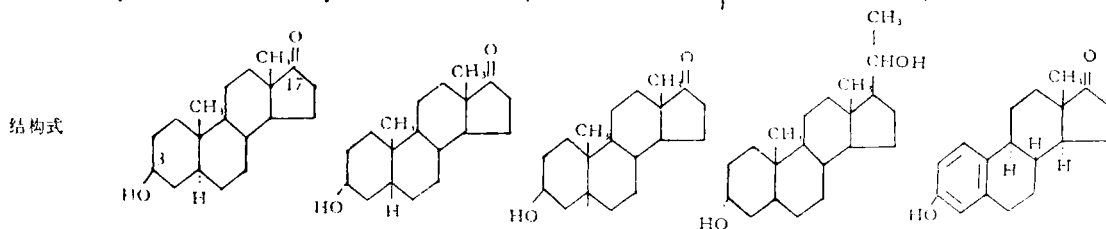
尿中 17-酮类固醇 (以下简称 17-KS) 主要由三种活性较强的雄甾酮 (Androsterone, 简称 A), 5-异雄素酮 (Etiocolanolone, 简称 E) 和脱氢表雄酮 (Dehydroepiandrosterone, 简称 D) 组成。在医学上, 通过对人尿中 A、E、D 含量变化的测定, 可以了解肾上腺功能是否正常, 提供有价值的临床信息。此外, 这类化合物对射线辐照相当敏感, 可以通过这个指标的测定, 研究动物辐射损伤机理。分光光度法能测定 17-KS 总量的变化。但为了研究辐射损伤的详细规

律, 还必须进一步测定各组份的变化。为此, 需要建立一种能够同时测定各组份含量的例行实验方法。

17-KS 主要组份有相当近似的组成和结构 (表 1), 而且含量较低; 而气相色谱法有高的分离效率和鉴定灵敏度, 因此, 很适合于这种多组份低含量样品的分析。1960 年, Horning 等^[1] 首先将气液色谱法用于 17-KS 分析。他们使用了两种不同极性固定液的柱子, 以游离甾体的形式, 分别分离测定了尿中 17-KS 的 A、E、D

表 1 17-KS 的组成与结构

甾体	A	E	D	P*	ES**
分子式	$C_{19}H_{30}O_2$	$C_{19}H_{30}O_2$	$C_{19}H_{28}O_2$	$C_{21}H_{36}O_2$	$C_{18}H_{22}O_2$



* P 为孕二醇 (Pregnenediol), 不属于 17-KS 类, 但其结构与 A 等相似, 也是人尿中的甾体组份。因我们没有 E 标准样品, 故加入 P 用以检验方法的选择性。

** ES 为雌酮 (Estrone) 作内标 (IS) 用。

三种组份。但一次分析需要两次进样, 操作比较麻烦是其缺点。后来, Vanden Heuvel 和 Horning 等^[2] 提出先将甾体制成三甲基硅烷 (TMS) 衍生物, 然后在 XE-60 柱上一次分离鉴定 A、E、D, 并以 β -甾谷醇 (β -Sitosterol) 为内标, 进行定量测定。1963 年, Kirschner^[3, 4] 为了提高选择性, 提出将酶解后的尿萃取物先经过薄层层析预分离除去干扰物后, 再提取各个区域的

甾体, 以 TMS 衍生物形式分别在不同类型的柱子上, 以不同的色谱条件进行分析。这个方法虽有好的选择性, 但手续繁复, 不便于例行分析使用。正田芳郎^[5] 和 Sanghvi^[6] 认为, TMS 衍生物在酸及湿气下不稳定, 建议以游离甾体的形式直接进样, 但其分离效果较差 (A 与 D 两组份不能分开), 对定量分析不利。Ruchelman^[7] 和 Tietz^[8] 已将气液色谱技术应用于临床实验室。

Ruchelman 对几种尿样品水解方法作了比较,并推荐使用简便的热硫酸法。Tietz 则对已有的水解和色谱方法做了详细的叙述。

我们综合比较了文献方法,利用普通的国产色谱仪,对色谱条件进行了系统的实验研究。并以酸解法进行尿样的预处理,以 TMS 衍生物形式进行尿中 17-KS 各组份的色谱分析,获得满意的结果。

实 验 部 分

一、仪器与试剂

1. 仪器

SP-2305E 型气相色谱仪(北京分析仪器厂);TG328A 型电光分析天平(上海天平厂);电动振荡机(康氏)往返振荡数 275 次/分;

2. 试剂(除注明者外,均为 AR 规格)

(1) 固定液 XE-60 (Chrompack, Holland)

(2) 担体 Chromosorb W AW DMCS 80—100 目 (Chrompack, Holland)

(3) TMS 化试剂

六甲基二硅胺烷 (Hexamethyldisilazane, 简称 HMDS) 色谱纯;三甲基氯硅烷 (Trimethylchlorosilane, 简称 TMCS)

(4) 标准尿样

雄甾酮;脱氢表雄酮(中国医药公司上海化学试剂供应站);孕二醇各 2.5 毫克溶于四氢呋喃于 25 毫升容量瓶中。

(5) 内标液

雌酮 5.0 毫克溶于四氢呋喃于 25 毫升容量瓶中。

(6) 溶剂(重蒸)

丙酮、乙醚和四氢呋喃。

二、色谱柱的制备^[8]

称 7.3 克担体放在 250 毫升圆底烧瓶中,加入 50 毫升 3% XE-60 丙酮溶液(W/V)。减压抽气,直到担体表面无气泡逸出为止。放置 5 分钟后,将烧瓶内容物倒入布氏漏斗中,过滤抽干。将担体倒在表面皿上,在室温下预干燥后,再于 80℃ 烘箱内干燥 15 分钟。制备好的担体装入内径 4 毫米,长 2 毫米的不锈钢柱中。

将柱接在系统中,于 240℃ 和氮气流(—40 毫升/分)下条件化 48 小时。

三、尿样的酸解和萃取^[7]

收集 24 小时尿,测量并记录体积。取其中 50 毫升放入 250 毫升梨形瓶中,加入 10 毫升 40% 硫酸溶液,于 80℃ 水浴水解 1 小时。打开塞子并立即用冰水冷却内容物。然后加入 70 毫升乙醚,振荡 15 分钟后,吸出下层水相并弃去。加入 70 毫升 1 N 氢氧化钠溶液,振荡 15 分钟,吸出氢氧化钠液层弃去。向乙醚萃取液中加入适量的固体氢氧化钠(约 45 粒),振荡 15 分钟后,将乙醚提取液定量转移到 100 毫升梨形瓶中,在氮气保护下温热蒸干。

四、TMS 衍生物的制备^[8]

上述的残渣用 1.0 毫升内标液和 1 毫升四氢呋喃溶解并转移到 10 毫升离心管中。取 1.0 毫升标准尿样和 1.0 毫升内标液放入另一只离心管中作为标准。分别向各离心管加入 0.3 毫升 HMDS 和 0.1 毫升 TMCS,混合均匀后,于室温下置干燥器中过夜,或在 56℃ 加热 1 小时。TMS 化后,将离心管内的溶液在氮气保护下减压抽干,保存于干燥器中。色谱分析前,向离心管内加入 0.1 毫升四氢呋喃,离心沉淀后,取 1 微升上层清液进样。

五、气液色谱分析

1. 色谱条件:柱箱温度 220—226℃;检测室温度 250℃;气化室温度 250℃;氢火焰离子化检测器;载气(N₂)流速 70 毫升/分。

2. 计算方法^[8]: 峰面积 = 峰高 × 半峰宽。

甾体的毫克数/24 小时尿 = $R_{st} \times R_u$

$$\times \frac{1}{2^*} \times (U.F.)$$

R_{st} = 标准尿样中内标的峰面积/标准尿样中各甾体的峰面积

R_u = 样品中各甾体的峰面积/样品中内标的峰面积

I = 加到样品和标准尿样中内标的毫克

* 标准样品量为 0.1 毫克,内标量为 0.2 毫克时,计算常数为 2。当标准样品量为 0.05 毫克时,这个因子应为 4。

数

U. F. = 24 小时尿的总体积/水解时使用的尿样体积

结果和讨论

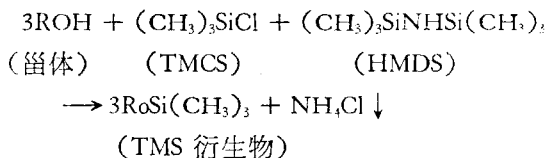
一、峰的鉴定

图 1 和 2 分别为标准尿样和尿样的色谱图。由图可见各组份分离良好,有明确的保留时间。图 2 中 E 组份峰,因无标准样品,是按文献值^[7,8,9]判定的。如将三种标准甾体样品加到尿样中,相应的组份峰增大,而不出现新峰,证实这种定性方法是可靠的。

二、关于 17-KS 衍生物化的优越性

如前言中所提到的,文献上对于气液色谱分析 17-KS 的进样方式——游离甾体还是甾体衍生物——是有争议的。我们对这两种进样

方式也进行了比较。从图 1 和图 3 可见,在拟定的实验条件下,以衍生物形式进样更可取。由于硅烷化将分子中活性的羟基转化为低极性的醚键:



从而增加样品的挥发性,减少保留时间,有助于提高色谱分辨率和降低对仪器高温性能的要求。

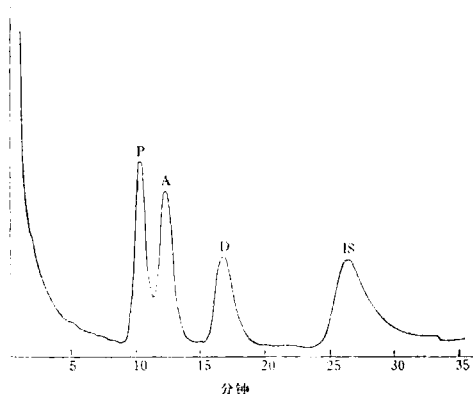


图 1 甾体标准混合物的色谱图

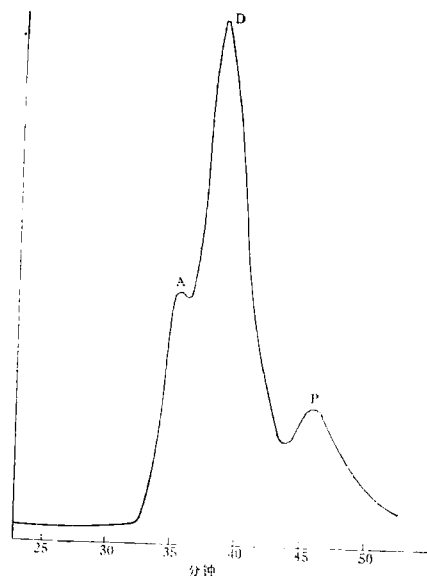


图 3 以游离甾体形式进样的色谱图
(实验条件同图 1)

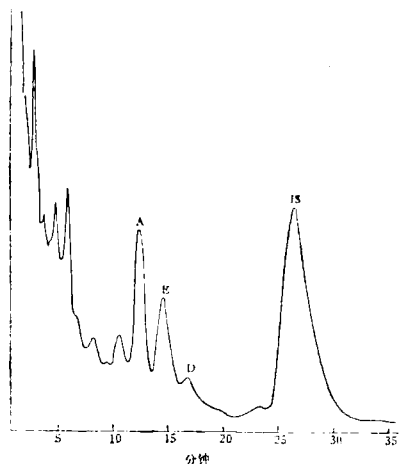


图 2 尿样的色谱图

三、担体的选择

色谱担体的选择是很重要的。分离效果在很大程度上决定于担体的性质。我们将 XE-60 以相同的方法分别涂附在 Chromsorb W AW DMCS, Gas Chrom Q 和酸洗硅烷化处理的国产 101 白色担体上。结果表明 Chromsorb W AW DMCS 分离效果最好(图 4)。而担体粒度(60—80 目, 80—100 目)无显著影响。

四、最佳固定液浓度的选择

以 Chromsorb W AW DMCS 为担体,在 XE-60 固定液浓度分别为 1%, 1.9%, 2.5%, 3.6%, 4% 和 4.5% 的色谱柱上进行标准尿样的

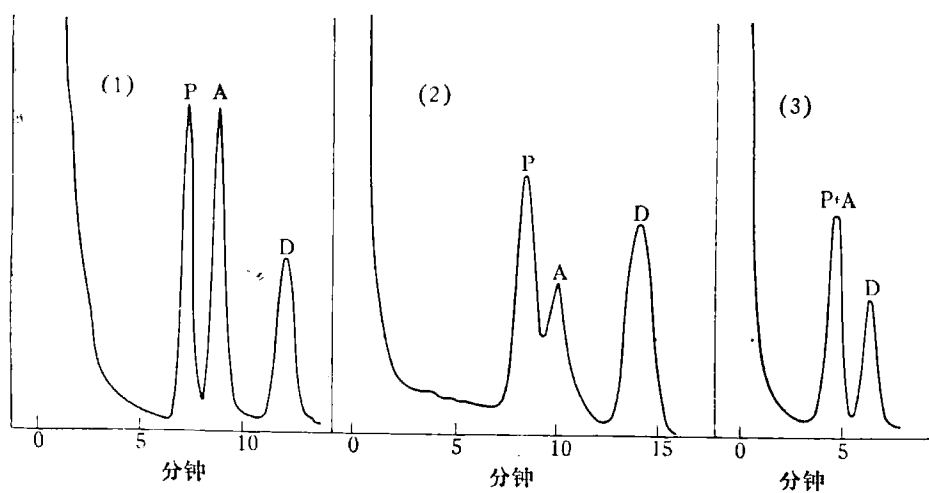
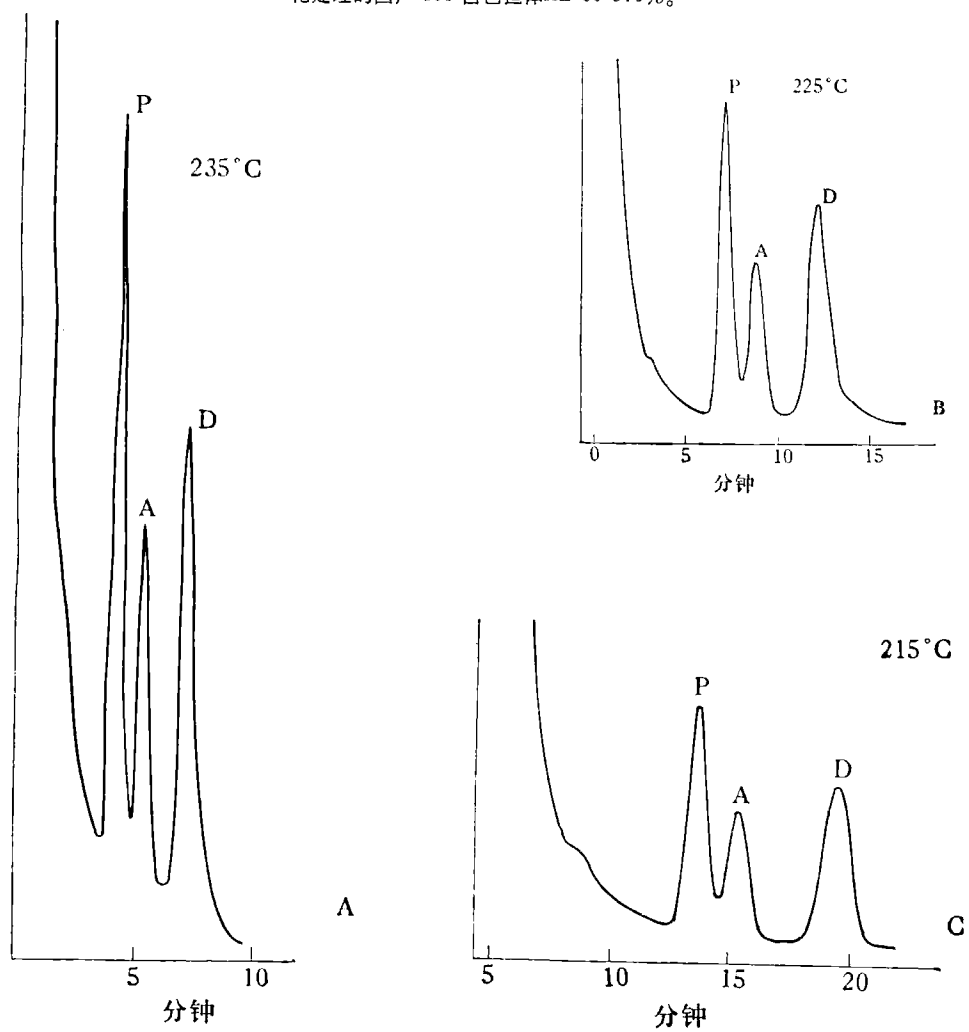


图 4 担体的选择

(1) Chromsorb W AW DMCS XE-60 3.6%; (2) Gas Chrom Q XE-60 3.8%; (3) 酸洗硅烷化处理的国产 101 白色担体 XE-60 3.6%。



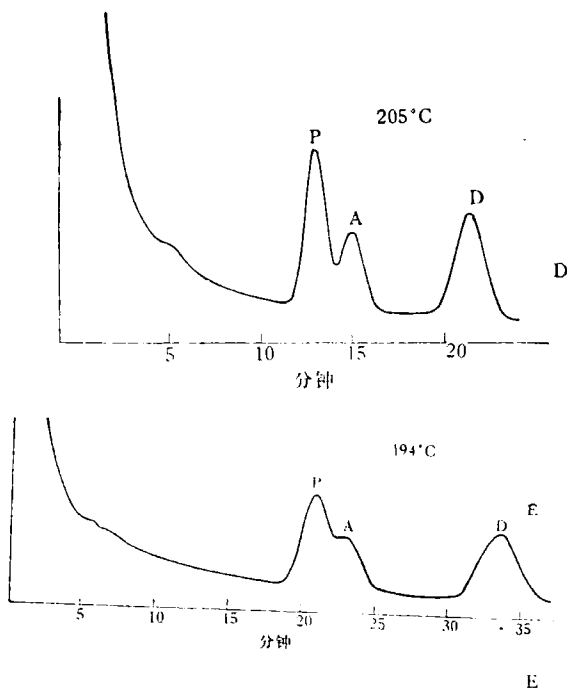


图 5 柱温的选择

色谱分析。实验表明 2.5%—4.5% 左右的固定液浓度效果较好。更低浓度的柱子有分离不完全的倾向,而更高的浓度则会增加保留时间。

五、最佳柱温的选择

在最佳固定液浓度的色谱柱上进行了 190—235°C 范围内的温度实验。结果表明 220—230°C 时分离效果最好(图 5)。柱温过高时,不仅固定液流失严重,影响柱寿命,而且分辨率降低。柱温降到 220°C 以下时,保留时间延长,分离效果逐渐变坏。

六、定量分析

1. 线性范围: 配置一系列不同浓度的标准

表 2 标准样品色谱分析结果

组 份	称量值(毫克)	测定平均值(毫克)*	标准偏差**
A	0.10	0.098	±0.018
D	0.10	0.099	±0.003
P	0.10	0.091	±0.017

* 7 次色谱测定的算术平均值 $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$

** 7 次色谱测定的标准偏差 $\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

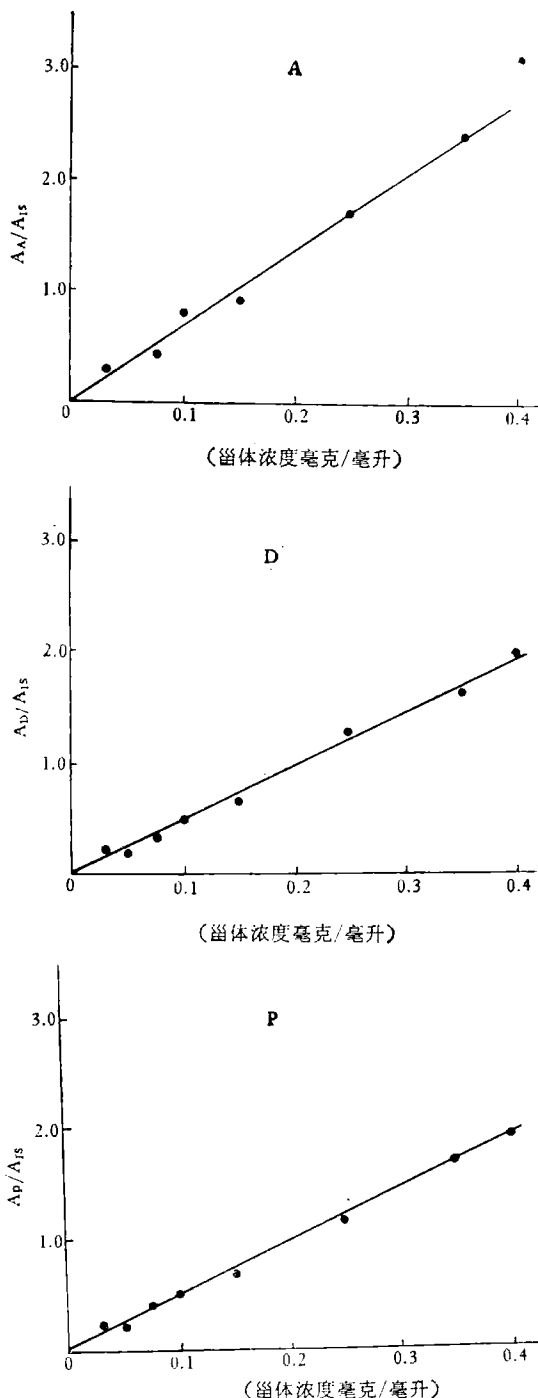


图 6 响应值与留体浓度的关系

(A_i/A_{1s} 为各组份与内标的峰面积之比)

混合物, TMS 化后进行色谱分析。实验结果表明,当留体浓度低于 0.4 毫克/毫升时,峰面积响应值与留体浓度有良好的线性关系(图6)。

说明拟定的方法对于 17-KS 含量 偏高 或 偏低的尿样都是适用的。 本测定中常规进样量为 0.5 微克左右。

2. 色谱分析的精密密度与准确度: 对已知配比的 标准样品的测定结果表明, 拟定的色谱条

表 3 收率实验结果和与文献值比较

组 份	收率%*	文献值% ^[6]	文献值% ^[7]
A	79.5±11.5	98±22	98.3±5.8
D	88.2±9.7	98±22	70.0±7.5
P	104.0±6.9	93±13	—

* 各组份含量为 0.03 毫克的标准样品的四次测定平均值及其标准偏差。

表 4 分析结果 (毫克)

组份 编号	A	D	P
1	2.31	0.38	0.69
2	2.54	0.23	0.64
3	2.49	0.21	0.56
4	2.93	0.24	0.68
5	2.34	0.28	0.55
6	2.30	0.24	0.50
平均值	2.49	0.27	0.60
标准偏差	±0.24	±0.06	±0.08
正常值 ^[8]	2.0—5.0	0.2—2.0	0.2—1.2

件有适当的准确度和测量精度 (表 2)。

3. 收率: 将配制的标准混合物加到尿水解产物中,按拟定的实验方法进行萃取,衍生物制备,色谱测定,然后计算方法的收率 (表 3)。

4. 分析结果: 正常人 (男性) 24 小时尿中 17-KS 和 P 组份的分析结果列于表 4。测定值均在文献列出的正常值范围内。

结 束 语

本文主要报告用普通的国产气相色谱仪进行多组份 17-KS 色谱分析的最佳实验条件。拟定的实验条件与简便的酸解法结合, 得到比较满意的结果,方法可作为例行分析使用。

参 考 文 献

[1] Horning, E. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **2**, 182, 1961.

[2] Vanden Heuvel, W. J. A. et al.: *Anal. Biochem.*, **4**, 191, 1962.

[3] Kirschner, M. A. et al.: *Clinical Endocrinology and Metabolism*, **23**, 255, 1963.

[4] Kirschner, M. A. et al.: *Steroids*, **3**, 3, 277, 1964.

[5] 正田芳郎等: 分析化学,**17**,6,741,1968.

[6] Sanghvi, A. et al.: *Clinica Chimica Acta*, **56**, 49—57, 1974.

[7] Ruchelman, M. W. et al.: *Clin. Chem.*, **12**, 11, 771, 1966.

[8] Tietz, N. W.: *Lab. Diagnosis of Endocrine Diseases*, p. 525, 1971.

[9] Wotiz, H. H. et al.: *J. Chromatog. Sci.*, **11**, 4, 167, 1973.

[本文于 1978 年 12 月 27 日收到]

不同大气压力对稻芽体内多酚氧化酶、过氧化物酶和抗坏血酸氧化酶活性的影响*

叶如欣 张明农 郑进胜
(安徽劳动大学)

不同氧分压对水稻以及其他植物种子发芽和酶活性的影响,已有不少报道^[5,8,11,14]。过去对水分、氧气、温度等影响种子发芽及酶活性变化的机理,已研究得较为清楚,并在农业生产实践

上得到了应用^[4,16]。作为生物重要生态因子之一的大气压力对生物的作用,过去仅知高压能

* 王天云、桂旺来、鲍健雄等同志参加了部分分析工作,特此致谢。