

高效液相色谱法同时测定血浆中的 10 种蛋白同化激素

张 兰¹, 陈金凤^{1,2}, 童 萍¹, 李天麟¹

(1. 食品安全分析与检测教育部重点实验室(福州大学), 福州大学运动科学研究中心, 福建 福州 350002 ;
2. 龙岩出入境检验检疫局, 福建 龙岩 364000)

摘要 :建立了一种用于 10 种蛋白同化激素的同时分离检测的高效液相色谱法。根据被分析物的性质,以 C18 反相色谱柱为分离柱,以乙腈和水为流动相,采用梯度洗脱方式,并在 194 ~ 290 nm 的范围内快速调节检测波长,使各物质均在最大吸收波长处被检出。在优化的条件下,10 种被测组分在 10 min 内实现了快速的基线分离,检出限在 0.01 ~ 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内。在兔血浆中进行加标回收率测定,10 种被测组分的加标回收率为 70.3% ~ 120%。选取美雄醇为代表进行实际动物实验,成功检测到耳脉注射美雄醇后兔血浆内的美雄醇成分。实验结果表明该方法可行,快速简便,准确可靠。

关键词 :高效液相色谱 ;蛋白同化激素 ;美雄醇 ;兔血浆

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)04-0449-05 栏目类别 :兴奋剂检测方法专栏

Simultaneous analysis of ten anabolic steroids in blood plasma using high performance liquid chromatography

ZHANG Lan¹, CHEN JinFeng^{1,2}, TONG Ping¹, LI Tianlin¹

(1. Key Laboratory of Analysis and Detection for Food Safety, Ministry of Education, Sport Science Research Center, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China ;
2. Longyan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Longyan 364000, China)

Abstract : A method for the simultaneous separation and determination of ten anabolic steroids in blood plasma using high performance liquid chromatography (HPLC) was established. An RP-C18 column was used as the analytical column, and the mixture of acetonitrile and water was used as the mobile phase with gradient elution according to the characteristics of the analytes. The analytes were detected at the adjustable wavelengths ranging from 194 to 290 nm. Under the optimal conditions, ten compounds were separated within 10 min. The detection limits were in the range of 0.01 - 0.10 $\mu\text{g/mL}$. The spiked recoveries of standards in a rabbit plasma sample were from 70.3% to 120%. Methandriol was injected into the ear meridian of a rabbit, and then the anabolic steroid methandriol in the plasma was successfully detected with the established method. The results show that the method is feasible, rapid, simple and accurate.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); anabolic steroids ; methandriol ; rabbit plasma

蛋白同化激素是兴奋剂的一个重要构成部分,其结构特异性显著,通过衍生的方法可以得到不同结构但却具有相当药效作用的新品种^[1]。对蛋白同化激素的检测始于 1976 年蒙特利尔奥运会^[2],目前,蛋白同化激素的分析检测主要采用色谱法,包括高效液相色谱法(HPLC)^[3-5]、超高效液相色谱^[6]、薄层色谱法(TLC)^[7]、毛细管电泳(CE)^[8]以及色谱-质谱联用技术^[9,10]。其中国际反兴奋剂中心主

要采用气相色谱-质谱(GC-MS)检测蛋白同化激素^[11]。但是 GC-MS 法具有成本高、预处理和衍生复杂费时、分析效率低等不足之处。建立高效率、低成本的分析方法对于蛋白同化激素类兴奋剂的检测具有重要的现实意义。

本文所要测定的 10 种蛋白同化激素,包括 3 种内源性蛋白同化激素(双氢睾酮(STA)、普拉雄酮(PRA)、雄烯二醇(AE))、5 种外源性蛋白同化激素

收稿日期 2008-01-05

通讯联系人:张 兰,教授,博士生导师,主要从事色谱研究。Tel : (0591) 87893207, E-mail : zlan@fzu.edu.cn.

基金项目 :福建省科技重大专项基金(HX2005-74)、福建省自然科学基金(B0510006, 2007J0219)和福建省高校新世纪优秀人才支持计划资助项目。

(美雄醇(MAL)、 苯丙酸诺龙(TP)、 丙酸睾酮(NP)、 折仑诺(ZER)、 达那唑(DAN))和一对代谢物的异构体(3α -羟基- 5α -雄烷-17-酮(AND)、 3β -羟基- 5α -雄烷-17-酮(EPI))(结构式见图 1)。 其中

AE、AND、EPI 3 种蛋白同化激素是 2005 年《世界反兴奋剂条例》禁用清单中新增的蛋白同化激素。 目前还未见有关这 10 种蛋白同化激素类药物的高效液相色谱法同时检测的报道。

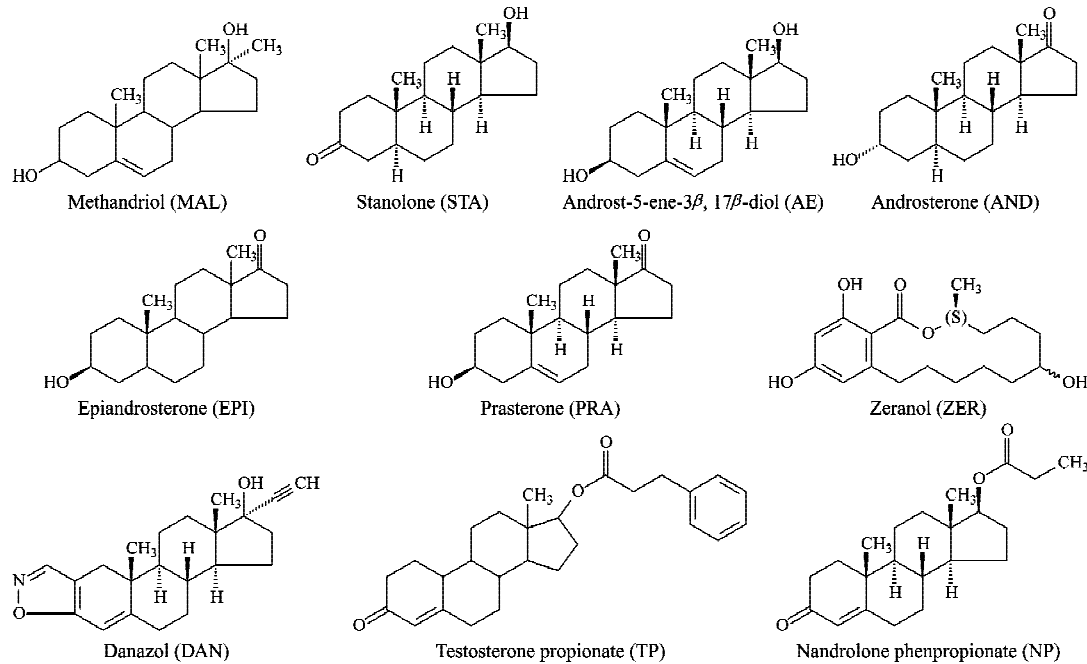


图 1 10 种蛋白同化激素的化学结构式
Fig. 1 Chemical structures of ten anabolic steroids

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC 仪 ,包括在线脱气装置、四元泵、六通阀进样器、紫外可变波长检测器 ;KQ-100E 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司) ;Milli-Q 超纯水系统(Millipore , USA) ;溶剂过滤器(齐力特实验设备有限公司) ;Finnpipette 可调式移液器(上海热电仪器有限公司) ;HGC-24A 氮气吹干仪(厦门精艺兴业科技有限公司) ;漩涡冷凝器(江苏海门市麒麟医用仪器厂) ;TDZ4-WS 离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。

折仑诺(购自 GmbH 公司) ,雄烯二醇(购自 ACROS 公司) ;美雄醇、双氢睾酮(购自 TCI 公司) , 普拉雄酮、 3α -羟基- 5α -雄烷-17-酮(购自 Fluka 公司) 3β -羟基- 5α -雄烷-17-酮(购自 Sigma 公司) ;达那唑、丙酸睾酮、苯丙酸诺龙(购自中国药品生物制品检定所)。 甲醇和乙腈均为色谱纯(山东禹王实业有限公司禹城化工厂)。

所有溶剂在放入贮液罐之前经 0.45 μ m 滤膜过滤。

1.2 标准溶液的配制

准确称取一定量的 ZER、AE、MAL、PRA、EPI、

STA、AND、DAN、NP 和 TP ,将其溶于 1 mL 甲醇中 ,所得标准溶液置于避光下保存。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent C18 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm , 5 μ m) 20 μ L 定量环 ,梯度洗脱程序见表 1 ,检测波长调节程序见表 2。

表 1 梯度洗脱程序			
Table 1 Adjustable gradient elution program			
Time/ min	φ (Acetonitrile)/ %	φ (Water)/ %	Flow rate/ (mL/min)
5.00	67	33	1.0
5.60	85	15	1.0
5.61	85	15	2.0
7.20	85	15	2.0
7.21	85	15	1.0

表 2 检测波长调节程序			
Table 2 Adjustable detection wavelength program			
Time/ min	Detection wavelength/ nm	Time/ min	Detection wavelength/ nm
2.00	260	5.40	290
2.01	194	5.41	240
4.71	194	8.50	240
4.72	290	8.51	194

1.4 动物实验

实验动物为健康大耳兔 ,体重约为 2.5 kg ,由福

建医科大学动物饲养中心提供。给药前兔禁食 12 h,全程不禁饮水。实验前耳缘静脉注射肝素抗凝,注射剂量为 0.5 mL/kg。

试剂的制备:取美雄醇 10 mg 溶于 1 mL 乙醇中,用于家兔耳缘静脉注射溶液。

血浆样品的制备:在未给药时抽取 5 mL 血样;在注射美雄醇注射液后的一定时间点于耳缘静脉取血,血样于低温下保存。分析前于 4 ℃ 下离心(离心速率为 3 000 r/min)血样 10 min,弃去沉淀,取上清液,得兔血浆样品。

兔血浆样品的预处理:取血浆样品 100 μL,加入正己烷 700 μL 振荡 5 min 后于 2 000 r/min 速率下离心 5 min。移取 400 μL 上层有机相,于 40 ℃ 下用氮气吹干,加入甲醇 100 μL 溶解样品,所得样品直接用于 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱方法的选择

首先根据分析对象的性质选择分析方法。由于所研究的蛋白同化激素多为极性化合物,因此可采用反相液相色谱法进行分析。本文试验了 C8 和 C18 两种反相色谱柱,发现研究对象在 C8 柱上的出峰时间较短,导致 10 种组分无法实现较好的分离,相比之下,以 C18 柱能够更好地实现 10 种组分的分离。故选择以 C18 柱为分离柱的反相液相色谱分析方法。

2.2 分离条件的优化

在高效液相色谱分析中,除了固定相对样品的分离起主要作用外,选择恰当的流动相对改善分离效果也有重要的辅助作用。由于 10 种组分中有部分物质的紫外吸收在 194 nm 处,因此必须选用紫外截止波长(λ_{UV})小于 194 nm 的流动相。反相液相色谱常用的流动相主要有甲醇、乙腈、四氢呋喃和水,它们对应的 λ_{UV} 分别为 205,190,212 和 180 nm;其他常用流动相的 λ_{UV} 均大于 194 nm;只有乙腈和水作为流动相符合这一要求,因此本文选用乙腈-水体系作为流动相。

乙腈与水的不同配比会极大地影响组分的分离,因此对流动相的配比进行了分离度实验。实验结果表明,由于乙腈的洗脱能力较强,当乙腈含量高于 67% 时,导致几种物质同时被洗脱出来,无法实现有效分离;当乙腈含量低于 67% 时,10 种物质虽能被分离,但分析时间长,大大影响了分离效率。因此选择乙腈-水以 67:33 的比例为初始的流动相配比,以保证分离度,再进行梯度洗脱优化,以提高分离效率。

图 2 是在等度洗脱和梯度洗脱模式下 10 种蛋白同化激素的色谱图。通过对比可以看出在保证分离度的前提下,采用梯度洗脱使分析效率得到了很大的提高,分析时间由 35 min 缩短至 10 min 以内。

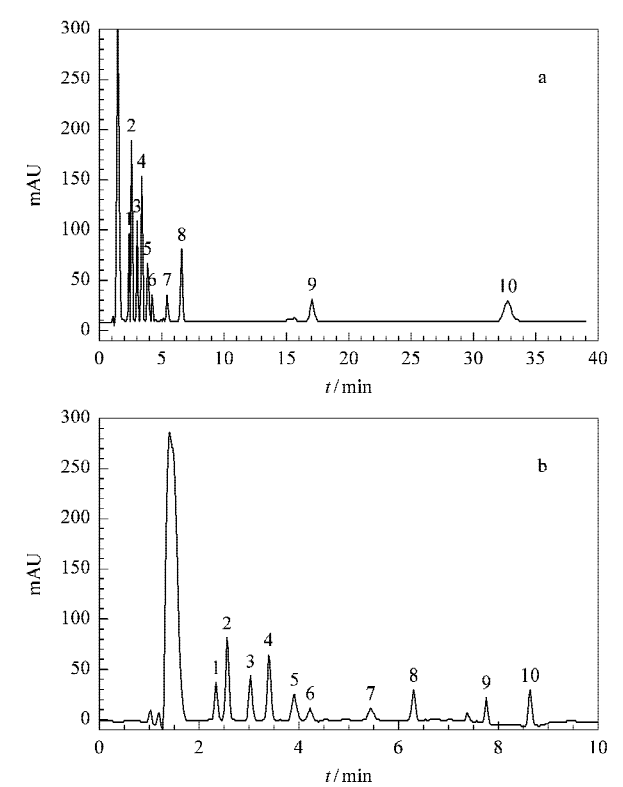


图 2 洗脱方式对 10 种蛋白同化激素分析效率的影响
Fig. 2 Effects of elution modes on the analysis efficiency for the ten anabolic steroids
a. isocratic elution: mobile phase, acetonitrile-water (67:33, v/v); flow rate, 1 mL/min; detection wavelength, 194 nm. b. gradient elution: mobile phase A, acetonitrile; mobile phase B, water; gradient program, 67% A to 85% A in 5 min; flow rate, 1 mL/min; detection wavelength, 194 nm.
1. ZER; 2. AE; 3. MAL; 4. PRA; 5. EPI; 6. STA; 7. AND; 8. DAN; 9. NP; 10. TP.

2.3 检测波长的选择

检测波长的选择对检测灵敏度有重要的影响,故本文采用紫外连续可变波长检测器进行检测。从 10 种组分的分子结构可以看出 MAL、STA、AE、AND、EPI 和 PRA 的结构非常相似,它们的最大吸收波长也十分接近,分别为 194,192,195,194,194 和 194 nm;ZER、DAN、TP 和 NP 的最大吸收波长分别为 218,284,194 和 240 nm。为了提高各组分的检测灵敏度,利用仪器可进行检测波长转换的特殊功能,使检测波长按照程序在规定的时间内进行切换,使各个组分在它们各自的最高吸收波长下进行检测,从而得到最大的灵敏度。本文最终选择的检测波长程序见表 2。

2.4 最优色谱条件下的色谱分离

通过分析样品特性,选定色谱分析方法,并优化

色谱条件 ,图 3 为在优化的色谱条件下得到的 10 种标准品的色谱图 ,由图 3 可见 10 种组分在 10 min 内即得到了快速分离。

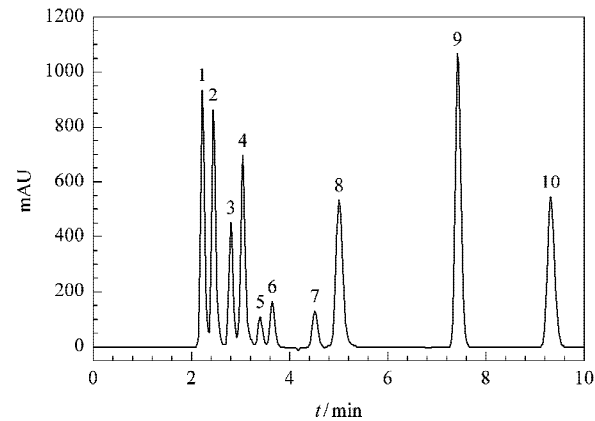


图 3 优化的色谱条件下 10 种蛋白同化激素标准品的色谱图
Fig. 3 Chromatogram of ten analyte standards under the optimal conditions

For HPLC conditions , see Table 1 and Table 2.
For peak identifications , see Fig. 2.

2.5 方法的线性方程及检出限

取一系列浓度逐渐递减的被测标准品混合样 ,

在优化的色谱条件下进行分析 ,以峰面积 Y ($\text{mAU} \cdot \text{s}$)对组分的质量浓度 X ($\mu\text{g}/\text{mL}$)作图 ,得出各组分的线性回归方程、线性范围及检出限 ,结果见表 3。

2.6 精密度

在优化的色谱条件下进行方法的精密度实验。用低浓度的混合标准样品在同一天内平行进样 7 次 ,获得保留时间和对应的峰面积的相对标准偏差 (RSD) ,结果见表 4。

2.7 生物样品实验

2.7.1 兔血浆模拟实验

于空白兔血浆中加入混合标准样品 ,按照“ 1.4 ”节方法进行样品预处理 ,按“ 1.3 ”节条件测定 ,得到的回收率结果列于表 5 ,空白兔血浆加标样品的色谱图见图 4。由表 5 可见 ,方法的回收率为 70.3% ~ 120% ,RSD 均小于 8%。

2.7.2 动物体内药物的检测

选取 MAL 为代表进行蛋白同化激素动物血浆药物检测 ,按“ 1.4 ”节方法获得注射 MAL 后的血浆样品 ,对此进行分析 ,所得色谱图见图 5。

表 3 各组分的线性回归方程及检出限

Compound	Regression equation *	Correlation coefficient (r^2)	Linear range/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Detection limit/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
ZER	$Y = 49.745X + 147.39$	0.9977	0.12 - 105	0.05
AE	$Y = 44.253X + 173.56$	0.9972	0.13 - 113	0.07
MAL	$Y = 32.697X + 122.19$	0.9962	0.18 - 82.0	0.1
PRA	$Y = 45.080X + 175.89$	0.9950	0.10 - 100	0.06
EPI	$Y = 6.4105X + 36.447$	0.9958	0.13 - 120	0.09
STA	$Y = 9.6239X + 59.153$	0.9962	0.14 - 124	0.07
AND	$Y = 4.9745X + 28.181$	0.9977	0.50 - 220	0.1
DAN	$Y = 43.143X + 154.74$	0.9961	0.040 - 120	0.02
NP	$Y = 65.458X + 245.17$	0.9956	0.050 - 130	0.03
TP	$Y = 64.558X + 224.46$	0.9933	0.030 - 86.0	0.01

* Y : peak area , $\text{mAU} \cdot \text{s}$; X : mass concentration , $\mu\text{g}/\text{mL}$.

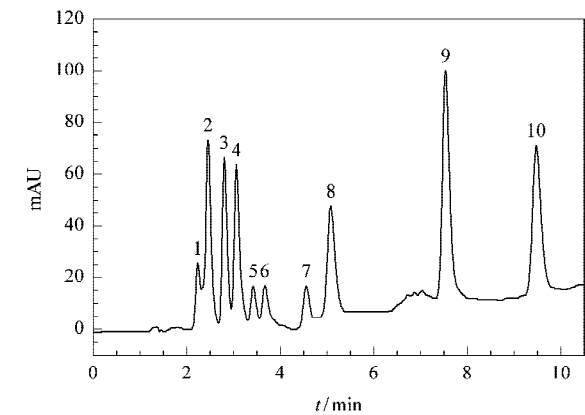


图 4 添加标准样品的兔血浆的色谱图
Fig. 4 Chromatogram of rabbit plasma spiked with standards
For the conditions , see Table 1 and Table 2. For peak identifications , see Fig. 2.

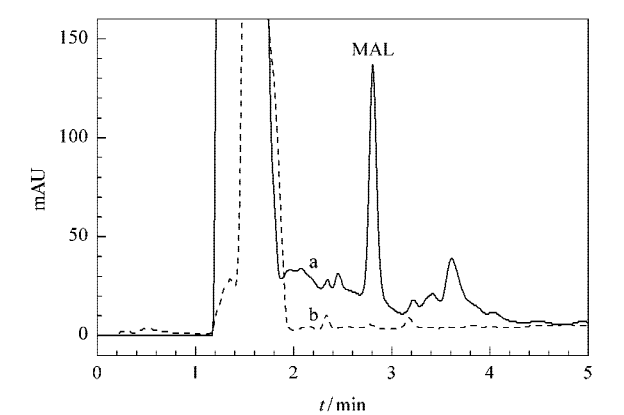


图 5 兔血浆样品的色谱图
Fig. 5 Chromatograms of rabbit plasma samples
a. rabbit plasma sample after injection of MAL into the rabbit ear meridian ; b. blank rabbit plasma sample.

表 4 保留时间和峰面积的精密度($n=7$)

Table 4 Precisions of retention time and peak area ($n=7$)

Compound	Retention time		Peak area	
	t_R/min	RSD/%	$A/(\text{mAU} \cdot \text{s})$	RSD/%
ZER	2.240	0.09	103.3	6.2
AE	2.459	0.04	381.2	2.7
MAL	2.806	0.05	305.4	3.6
PRA	3.066	0.07	313.5	4.8
EPI	3.424	0.07	86.6	1.7
STA	3.677	0.08	130.4	2.3
AND	4.561	0.08	93.0	3.5
DAN	5.091	0.09	309.7	1.3
NP	7.561	0.07	823.4	1.5
TP	9.539	0.06	442.8	3.4

表 5 标准样品在兔血浆中的回收率

Table 5 Recoveries of standards in rabbit plasma samples

Compound	Added/ ($\mu\text{g/mL}$)	Found/ ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery/ %	RSD/ %
ZER	2.63	1.96	74.5	4.4
	5.25	3.83	73.0	3.9
	7.88	5.89	74.7	5.0
AE	2.82	1.99	70.6	7.5
	5.65	5.46	96.6	4.2
	8.48	9.81	116	3.3
MAL	4.10	3.20	78.0	3.1
	8.20	6.74	82.2	6.7
	12.3	12.6	102	4.2
PRA	2.50	1.80	72.0	3.3
	5.00	4.05	81.0	3.9
	7.50	8.81	117	4.1
EPI	9.00	7.65	85.0	2.9
	18.0	13.2	73.3	6.5
	27.0	24.1	89.3	3.0
STA	6.20	4.36	70.3	5.4
	12.4	9.58	77.3	6.0
	18.6	17.8	95.7	4.8
AND	5.50	4.14	75.3	5.6
	11.0	12.3	112	4.4
	16.5	17.9	108	3.5
DAN	3.00	2.41	80.3	4.3
	6.00	4.49	74.8	3.1
	9.00	8.72	96.9	3.7
NP	2.15	1.66	77.2	2.9
	4.30	5.05	117	3.3
	6.45	7.73	120	4.2
TP	3.25	2.64	81.2	4.6
	6.50	6.24	96.0	3.8
	9.75	8.60	88.2	3.3

3 结论

所建立的同时测定 10 种蛋白同化激素的高效液相色谱法快速、简便 ,所分析的对象涵盖了内源性、外源性及蛋白同化激素的代谢产物。在满足分离度的前提下 ,通过优化梯度洗脱程序和检测波长程序 ,有效提高了分析效率和检测灵敏度 ,使分析方法得到最大程度的优化。应用所建立的方法 ,通过耳缘注射 MAL 到大耳兔体内并采集血样 ,对实际生物样品血浆中的蛋白同化激素进行了检测。方法的前处理步骤简便 ,回收率符合要求。所建立的方法能够满足兴奋剂检测对大量样品进行初筛工作的要求 ,有望用于兴奋剂检测的初筛工作。

参考文献：

[1] You Q D. Pharmaceutical chemistry. Beijing : Chemical Industry Press (尤启东. 药物化学. 北京 : 化学工业出版社) , 2004 : 568

[2] Catlin D H. Anabolic androgenic steroids. In : Karch S B ed. Drug abuse handbook. London : CRC Press , 1998 : 653

[3] Izquierdo-Hornillos R , Gonzalo-Lumbreras R. J Chromatogr B , 2003 , 798(1) : 69

[4] Wang C , Ma Q , Wang X. Chinese Journal of Chromatography (王超 , 马强 , 王星. 色谱) , 2006 , 24(6) : 654

[5] Zhao S , Wu D N , Wang P. Chinese Journal of Chromatography (赵珊 , 吴大南 , 王鹏. 色谱) , 2004 , 22(3) : 267

[6] Ma Q , Wang C , Wang X , et al. Chinese Journal of Chromatography (马强 , 王超 , 王星 , 等. 色谱) , 2007 , 25(4) : 541

[7] Cimpoiu C , Hosu A , Hodisan S. J Pharm Biomed Anal , 2006 , 41(2) : 633

[8] Lu M H , Tong P , Xiao H , et al. Electrophoresis , 2007 , 28 : 1 461

[9] Nielsen M W , Vissers J P , Fuchs R E , et al. Rapid Commun Mass Spectrom , 2001 , 15(17) : 1 577

[10] Xia R , Che B Q , Zhang Z. Chinese Journal of Chromatography (夏瑞 , 车宝泉 , 张喆. 色谱) , 2007 , 25(6) : 926

[11] Wolthers B G , Kraan G P B. J Chromatogr A , 1999 , 843 : 247