

藏羚粪便中类固醇激素的高效液相色谱分析

于鸿浩^{1,2}, 赵新全^{1*}, 尤进茂¹ (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810008; 2. 榆林学院 陕西榆林 719000)

摘要 [目的]通过建立粪便中生殖激素含量的测定方法,为研究藏羚羊的繁殖特征奠定基础。[方法]以2-(11H-苯(α)卡唑)-乙基胍基甲酸酯(BCECH)为柱前衍生化试剂,探讨皮质醇、皮质酮、睾酮和孕酮4种类固醇激素衍生物的最佳色谱分离条件。通过比较4种类固醇激素标准品出峰时间,确定粪样中目标物质峰。[结果]最优衍生条件为:以乙腈为衍生化溶剂,以三氯乙酸为催化剂,衍生化温度65℃,衍生试剂用量为总摩尔类固醇的10倍以上。在建立的色谱条件下,藏羚羊粪样中4种类固醇激素含量色谱图有较多的杂质峰,表明粪样中的成分很复杂。[结论]该研究建立了藏羚羊粪便中类固醇激素高效液相色谱的分析方法,实现了藏羚羊粪便中4种类固醇化合物的定量测定。

关键词 高效液相色谱; 柱前衍生; 类固醇; 藏羚

中图分类号 S864 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2011)21-12881-03

Analysis of Steroids from Chiru Feces by High Performance Liquid Chromatography

YU Hong-hao et al (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810008)

Abstract [Objective] The research aimed to lay a foundation for studying the reproductive characters of chiru through establishing the measurement method of reproductive hormone content in the feces. [Method] Using 2-(11H-benzo(α)carbazol-11-yl) ethylcarbonylhydrazine (BCECH) as pre-column derivatization reagent, the optimum chromatographic separation conditions of 4 kinds of steroid hormone ramification (including cortisol, corticosterone, testosterone and progesterone) were discussed. Through comparing the peak time of 4 kinds of standard steroid hormones, the peak of the target substance was confirmed. [Result] The optimum derivatization conditions were as follows: with acetonitrile as derivatization solvent, with trichloroacetic acid as activator, derivatization temperature of 65℃, derivatization solvent dosage was ten times than total moles of steroid. Under the established chromatography conditions, the chromatogram of the content of 4 kinds of steroid hormones had more impurity peaks, showing that the components in the feces samples. [Conclusion] The analysis method of steroid hormone in feces by high performance liquid chromatography was established and the quantitative measurement of 4 kinds of steroid compounds in the feces of chiru was realized.

Key words High performance liquid chromatography; Pre-column derivatization; Steroids; Chiru

藏羚(*Pantholops hodgsoni*)隶属于偶蹄目牛科山羊亚科藏羚属^[1],为青藏高原特有物种,被列为国家一级保护动物,为《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)中严禁进行贸易活动的濒危动物。藏羚的交配与繁殖呈季节规律性,交配发生在12月中下旬,繁殖季节为6~8月。引起动物繁殖行为周期性规律变化的最直接内分泌因子是生殖腺分泌的性激素,因此要了解动物周期性繁殖的生理机制,首先要研究其繁殖行为的性激素调节过程。血浆中激素含量可以反映动物个体的生理状态,然而由于该研究中藏羚血样的采集非常困难,而且藏羚的应激性特别强,势必会造成血浆中激素浓度的波动,因此采用无损采样方法,在动物不受人为干扰的情况下取其粪便测定动物的激素水平。值得庆幸的是,已有研究表明性激素在血浆和粪样中的浓度有很高的相关性^[2],Wasser和Lasley等认为这种方法在许多研究尤其是野生动物的生理生态研究中具有很大的应用潜力^[2-3]。

笔者以皮质醇、皮质酮、睾酮、孕酮分析对象,这4种激素是一类小分子脂溶性化合物,对动物体内调节代谢、促进生殖器官的发育成熟、调节生殖机能以及对动物胁迫作用具有调节功能^[4-7]。以往对类固醇的分析多采用放射性免疫法(IAs)^[5-8],但该方法不能实现多种类固醇的同时测定。尽管方法能提供较高的灵敏度,但由于抗体的可交叉反应,被分析的基质中存在的雌激素酮、雌激素硫酸盐和其他一些雌激素严重干扰类固醇激素的测定^[9],检测选择性差。采用在线的UV-LC测定已有报道^[5],但是相对低的灵敏度难以获得满意结果。

笔者采用自制的衍生化试剂2-(11H-苯(α)卡唑)-乙基胍基甲酸酯(BCECH)对皮质醇、皮质酮、睾酮、孕酮进行荧光标记,对藏羚羊粪便中4种类固醇激素含量进行测定。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 1100型高效液相色谱(美国Agilent公司)配备四元梯度泵、在线真空脱气机、100位自动进样器、荧光检测器;Hypersil BDS C₁₈色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm,大连依利特公司)。2-(11H-苯(α)卡唑)-乙基胍基甲酸酯(自制);无水乙腈(禹城化学试剂厂)用P₂O₅干燥后蒸馏处理;三氯乙酸为分析纯,纯水由Milli-Q超纯水系统制备。孕酮、睾酮、皮质醇和皮质酮的标准品均购自Sigma公司,其结构如图1所示。

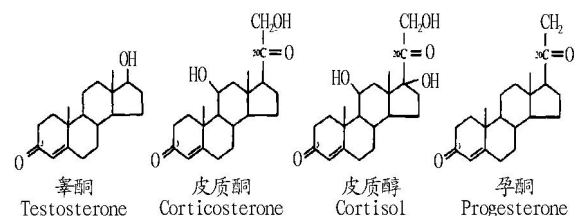


图1 4种类固醇的化学结构式

Fig. 1 Structural formula of four steroid compounds

1.2 标准溶液的配制 分别称取4种类固醇标准品,用乙腈配成 1.0×10^{-2} mol/L的溶液,相应低浓度的混合类固醇标准溶液(1×10^{-4} mol/L)用乙腈稀释而成。称取15.95 mg的2-(11H-苯(α)卡唑)-乙基胍基甲酸酯,用无水乙腈定容至10 ml,浓度为 5×10^{-3} mol/L。

1.3 实验动物及类固醇的提取 试验中粪便的供体动物为人工驯养藏羚。驯养藏羚圈养于青海省海北藏族自治州铁卜加草原改良实验站的围栏内,围栏内无其他家畜,藏羚可

基金项目 青海省重点科技攻关项目(2006-N-152)。

作者简介 于鸿浩(1983-),男,内蒙古乌兰浩特人,讲师,博士,从事行为生态学研究。*通讯作者,研究员,博士,从事生态学研究, E-mail: xqzhao@nwipb.ac.cn。

收稿日期 2011-04-11

在围栏内自由采食。

粪样来自围栏内藏羚的新鲜粪便,于 -80°C 保存。试验时常温解冻 60°C 烘干后粉碎成粉末状,剔除杂质、粗纤维和未消化的食物残渣。准确称取 0.5 g 粉末放入 5 ml 离心管中,依次加入双蒸水 1.5 ml 、二氯甲烷 2.5 ml ,摇匀。将离心管超声振荡 30 min ,然后摇床振荡 2 h , 6000 r/min 离心 20 min ,取出二氯甲烷提取液 1 ml 于 2 ml 离心管中,自然挥发干燥, 4°C 保存待测。

1.4 衍生化过程 向安培瓶中依次加入 $40\text{ }\mu\text{l}$ 衍生试剂溶液, $50\text{ }\mu\text{l}$ 混合类固醇标准液(或 $300\text{ }\mu\text{l}$ 粪便提取液), $30\text{ }\mu\text{l}$ Cl_3CCOOH 的乙腈溶液,封口后 65°C 恒温水浴振荡反应 30 min 。冷却至室温,稀释 10 倍后进样分析(进样量 $10\text{ }\mu\text{l}$)。衍生化反应如图2所示。

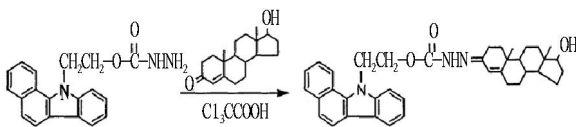


图2 2-(11H-苯(a)卡唑)-己基胍基甲酸酯与睾酮衍生反应

Fig.2 Scheme of 2-(11H-benzo(a)carbazol-11-yl)ethylcarbonylhydrazine react with testosterone

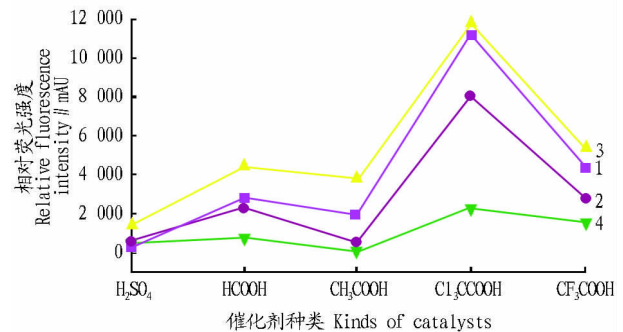
1.5 色谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 色谱柱($4.6\text{ mm} \times 200\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相 A: 30% 乙腈水溶液(含有 20 mmol/L 的 HCOONH_4 , $\text{pH} = 3.5$); B: 100% 的乙腈。梯度洗脱程序: 由 90% A 经 35 min 线性梯度到 80% B 经 2 min 线性梯度到 100% B 保持 8 min 。每次进样前用流动相 A 平衡柱子 5 min 。流速为 1.0 ml/min 柱温 30°C 。荧光激发和发射波长分别为: $\lambda_{\text{ex}} = 275\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 380\text{ nm}$ 。

1.6 质谱条件 大气压化学电离源(APCI) 正离子模式 喷雾压力 413 685.6 Pa , 干燥气流量为 5 L/min , 干燥气温度 350°C , 气化温度 450°C 毛细管电压 3 500 V 电晕电流 4 000 nA 。

2 结果与分析

2.1 衍生条件的优化 以二甲亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃(THF)、1,4-二氧六环、甲醇和乙腈等作为衍生化溶剂,比较了类固醇的衍生化率,结果表明在DMSO和DMF中衍生化率很低,可能是催化剂乙酸在2种溶剂中容易产生质子化反应,使之失去催化活性的结果。THF、1,4-二氧六环衍生化率处于中等水平,甲醇和乙腈衍生化率最大,考虑到乙腈对衍生化产物具有较大的溶解度,因此选择乙腈作为衍生化溶剂。催化剂的催化活性以硫酸、甲酸、冰醋酸、三氯乙酸和三氟乙酸为对象进行了考察,结果表明三氯乙酸具有最高的催化活性(图3)。对衍生化温度的考察表明:温度的升高衍生化率增大,当温度达到 65°C 时,衍生化率达最大值,进一步提升温度将会引起试剂轻度分解导致产率下降。对衍生试剂用量的考察表明,衍生化率随着试剂用量的增大而提高,当衍生试剂为总摩尔类固醇的 10 倍以上时,产率恒定(图4)。

2.2 标准品的色谱分离和质谱鉴定 按上述优化条件,4种类固醇标准品衍生物的色谱分离结果见图5。尽管衍生后产生多个杂质峰,但通过调整流动相比,使其保留值落入 $20\sim 40\text{ min}$,杂质峰对4种类固醇衍生物均不产生干扰。理论上,

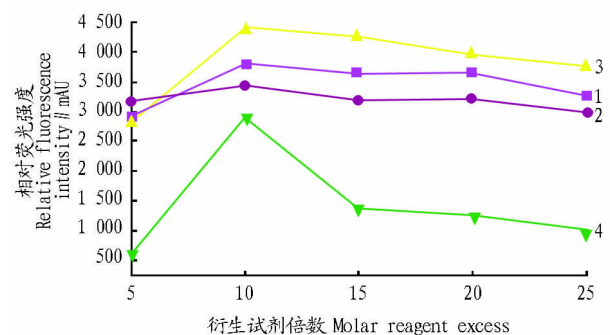


注: 1. 孕酮; 2. 睾酮; 3. 皮质醇; 4. 皮质酮。

Note: 1. progesterone; 2. testosterone; 3. cortisol; 4. corticosterone.

图3 不同催化剂对类固醇衍生化率的影响

Fig.3 Effects of different catalyst on derivatization yields



注: 1. 孕酮; 2. 睾酮; 3. 皮质醇; 4. 皮质酮。

Note: 1. progesterone; 2. testosterone; 3. cortisol; 4. corticosterone.

图4 衍生试剂用量对衍生率的影响

Fig.4 Effects of the molar amount of reagent on derivatization yields

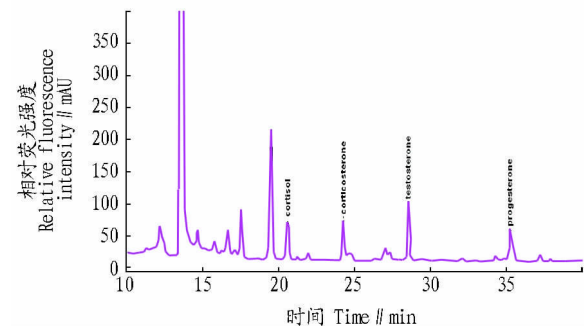


图5 标准类固醇衍生物的色谱图

Fig.5 The HPLC graph of steroids derivative

皮质醇、皮质酮和孕酮分子中的C-3和C-20位羰基都有与试剂发生反应的可能性,但通过对4种类固醇衍生物的质谱扫描可以发现:试剂主要与分子中的C-3位羰基反应,C-20位上的羰基即使进行长达 5 h 的衍生反应,其转化率与C-3位的羰基相比也不足 1% ,说明2-(11H-苯(a)卡唑)-乙基胍基甲酸酯(BCECH)与类固醇中的C-3位羰基有较高的反应活性。其可能的原因是C-20位处的羰基邻位的甲基或羟基产生了较大的空间位阻作用,导致较低的反应活性。此位阻效应有利于在C-3位羰基上获得高产率的单一衍生物,有利于类固醇化合物的准确定量。在线柱后质谱鉴定结果表明,各衍生物显示出强烈的分子离子峰和相应的特征碎片离子峰(图6)。

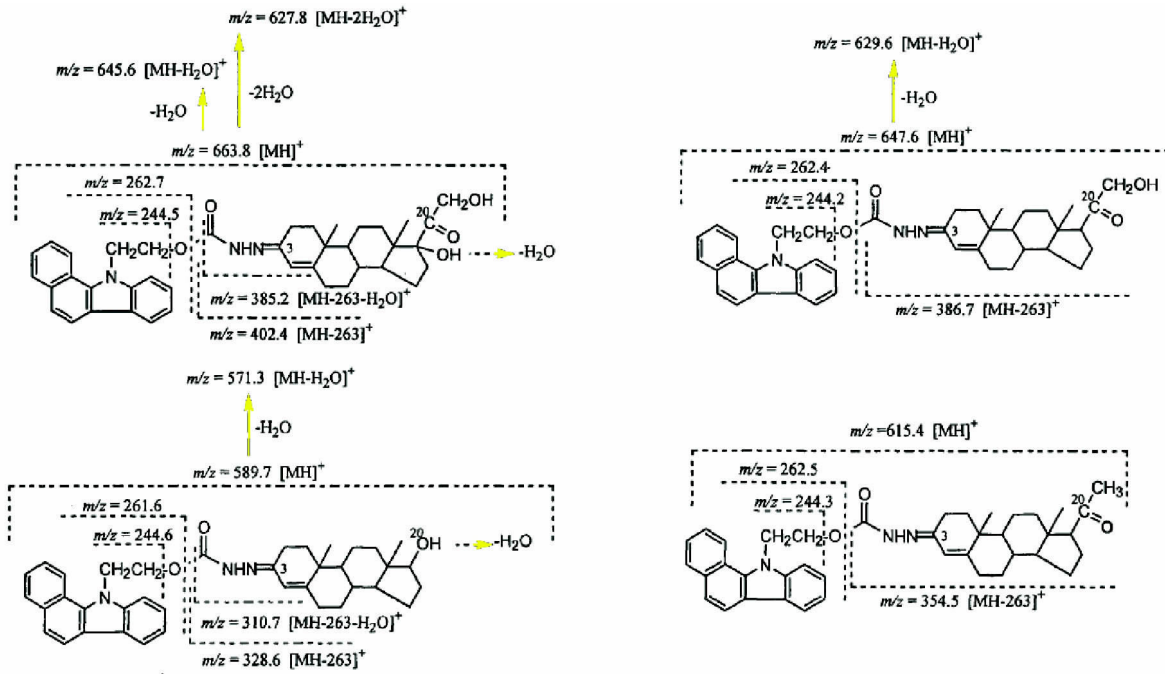


图 6 类固醇衍生物的质谱裂解模式

Fig. 6 Scheme of MS/MS analysis of steroid derivatives

2.3 线性方程 配制不同浓度的系列标准溶液,进样量为 0.05 ~ 100.0 pmol。根据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得各类固醇衍生物的回归方程、相关系数见表 1。

表 1 类固醇衍生物的线性回归方程与相关系数

类固醇	$Y = AX + B$	相关系数 r
Steroid		Correlation coefficient
皮质醇 Cortisol	$Y = 9.25X - 1.47$	0.999 5
皮质醇 Corticosterone	$Y = 9.35X + 8.18$	0.999 3
睾酮 Testosterone	$Y = 12.63X + 16.49$	0.999 7
孕酮 Progesterone	$Y = 10.19X + 3.07$	0.999 7

注: X. 进样量 (pmol); Y. 峰面积。

Note: X. Sample size (pmol); Y. Peak area.

2.4 藏羚粪便中类固醇含量测定 在建立的色谱条件下,对藏羚粪便中类固醇激素的测定结果见图 7。测定藏羚粪便中 4 种类固醇激素含量时,液相色谱图有较多的杂质峰,表明粪样中的成分很复杂,然而通过与 4 种类固醇激素标准品出峰时间的比对可以确定粪样中目标物质峰,通过该方法实现了藏羚粪样中 4 种类固醇激素的同时测定。

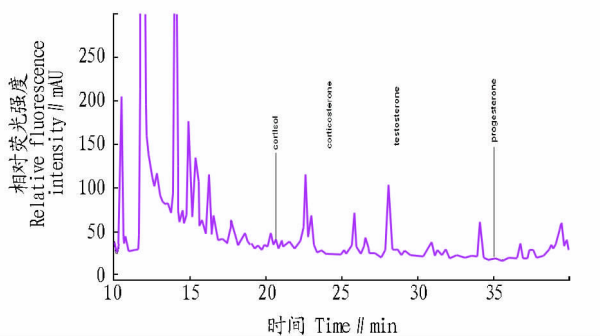


图 7 藏羚粪样中类固醇的色谱分离图

Fig. 7 Chromatogram of steroids extracted from chiru feces

3 小结

采用 2-[[11H-苯(α) 唑]-乙基胍基甲酸酯 (BCECH) 为标记试剂,考察了 4 种类固醇激素衍生物的最佳色谱分离条件,实现了实际藏羚粪便样品中皮质醇、皮质酮、睾酮和孕酮的准确定量。

参考文献

- [1] SCHALLER G B. Wildlife of the Tibetan Steppe [M]. Chicago: University of Chicago Press 1998.
- [2] LASLEY B L, KIRKPATRICK J F. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids [J]. J Zoo Wild Med 1991 22: 23 - 31.
- [3] WASSER S K, MONFORT S L, WILDT D E. Rapid extraction of fecal steroids for measuring reproductive cyclicity and early pregnancy in free-ranging yellow baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) [J]. J Reprod Fert 1991 92: 415 - 423.
- [4] GOYMANN W, MOSTL E, VANIT HOF T et al. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas *Crocuta crocuta* [J]. Gen Com Endocrinol 1999 114(3): 340 - 348.
- [5] TURNER J W, TOLSON P, HAMAD N. Measurement of fecal glucocorticoids in parrotfishes to assess stress [J]. Gen Com Endocrinol 2003 133: 341 - 352.
- [6] REN B P, XIA S Z, LI Q F et al. Relationships between levels of adult male urinary testosterone and social context in a confined group of Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) [J]. Acta Zoologica Sinica 2003 49(3): 325 - 331.
- [7] GOOD T, KHAN M Z, LYNCH J W. Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in oldfield mice (*Peromyscus polionotus*) [J]. Physiol Behav 2003 80: 405 - 411.
- [8] MATEO J M, CAVIGELLI S A. A validation of extraction methods for non-invasive sampling of glucocorticoids in freelifving ground squirrel [J]. Physiol Biochem Zool 2005 78: 1069 - 1084.
- [9] FARRE M, KUSTER M, BRIX R et al. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples [J]. J Chromatogr A 2007 1160(1/2): 166 - 175.