

水包油型微乳液相色谱分离激素类药物的影响因素

李 宁*, 侯璇珠, 杨 雯, 黄光亮, 叶秀金

(广东药学院, 广东 广州 510006)

摘要 :采用水包油型微乳液相色谱(MELC)分离了6种激素类药物(醋酸可的松、泼尼松龙、己烯雌酚、炔雌醇、醋酸氟轻松及黄体酮)。考察了微乳流动相的组成成分(包括表面活性剂的浓度、油相种类、有机添加剂种类)及固定相孔径等对分离的影响。实验得到的最佳分离条件:色谱柱为 Venusil ASB C₁₈(T) 粒径 5 μm, 孔径 30 nm, 250 mm × 4.6 mm, 微乳流动相为 30 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)-0.8% 正辛烷-6.6% 正丁醇, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 35 °C。该方法可用于甾体药物及其制剂的分离鉴别以及快速测定。

关键词 :水包油型微乳;微乳液相色谱;分离选择性;激素类药物

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)03-0323-05 栏目类别 :研究论文

Influence factors of the separation of steroids using oil-in-water microemulsion liquid chromatography

LI Ning*, HOU Xuanzhu, YANG Wen, HUANG Guangliang, YE Xiujin

(Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China)

Abstract : The effect of the varying operating parameters on the separation of steroids was studied by oil-in-water microemulsion liquid chromatography (MELC). The parameters included the surfactant concentration, the type of oil phase, the nature of organic solvent additives, and the pore size of the stationary-phase. The optimized conditions for the separation of 6 steroids were as follows: a Venusil ASB C₁₈(T) column (5 μm, 30 nm, 250 mm × 4.6 mm) was used at 35 °C, the microemulsion mobile phase consisted of 30 g/L sodium dodecylsulfate (SDS), 0.8% (w/w) *n*-octane, 6.6% (w/w) *n*-butanol. The optimized method can be used for the separation, identification and simultaneous determination of steroids in bulk drugs and in pharmaceutical dose forms.

Key words : oil-in-water microemulsion; microemulsion liquid chromatography (MELC); separation selectivity; steroids

微乳液相色谱(microemulsion liquid chromatography, MELC)是在胶束液相色谱(micellar liquid chromatography, MLC)^[1]基础上发展起来的一种新的液相色谱技术。自从1992年 Berthod 等^[2,3]首次将微乳应用在液相色谱分离后, MELC 以独特的分离选择性和广泛的适用性引起了人们极大的关注,近年来关于 MELC 的研究逐渐增多。采用 MELC 等度洗脱可同时分离酸性、碱性、中性和两性化合物^[4]。在 MELC 分离过程中,溶质的保留由其固定相(或其吸附层)、微乳分散相和水相之间的分配平衡所决定,其色谱分离具有新的机理,同时也带来可控参数较多、容易改善溶质的保留行为、提高分离度的优势。上述优点使 MELC 在药物分析中日益显示出其应用潜力,是反相液相色谱

(RPLC)较好的补充,尤其是对于天然药物和中药多组分分析具有重要意义。据文献检索,应用 MELC 分离药物混合物及分析制剂的报道有 20 余篇,其应用主要体现在多组分的分离^[4-6]、药物制剂^[7-11]以及生物样品的分析^[12]。

采用 MELC 分离激素类药物的文献报道很少。Cartas 等^[13]以 0.1 mol/L 十二烷基硫酸钠(SDS)-7% 戊醇为流动相测定多种蛋白同化激素制剂的含量,但组分的分离效果不好,8 种组分中只有 2 种达到基线分离。本文在系统优化分离的基础上,运用 MELC 分离了 6 种激素类药物(包括糖皮质激素、孕激素、雌激素),且在 14 min 内使 6 种药物达到基线分离,同时对影响分离的主要因素及分离机理进行了初步的研究。应用所建立的方法对甾体药物制剂

* 通讯联系人:李 宁,副教授,从事药物分析及色谱学应用研究。Tel: (020)39352136, E-mail: godhs@tom.com.

收稿日期:2008-09-21

进行了测定,结果表明该方法准确、简便、快速。

1 实验部分

1.1 仪器与实验条件

高效液相色谱仪:LC-10ATVP 泵,SPD-10AVP 紫外检测器(日本 SHIMADZU 公司);色谱工作站:HW-2000(南京千谱软件有限公司)。QT-330 柱温箱(天津旗美科技有限公司)。

色谱条件:色谱柱为 Venusil ASB C₁₈(T)(粒径 5 μm,孔径 30 nm,250 mm × 4.6 mm,Agela 公司);微乳流动相为 30 g/L SDS-0.8% 正辛烷-6.6% 正丁醇;流速为 0.8 mL/min;柱温为 35 °C;检测波长为 254 nm;进样量为 10 μL。

1.2 药品与试剂

醋酸可的松、泼尼松龙、己烯雌酚、炔雌醇、醋酸氟轻松及黄体酮(中国药品生物制品检定所);黄体酮注射液(广东药学院药剂教研室提供,规格为 1 mL/10 mg),所用辅料为药用辅料;甲醇、乙腈均为色谱纯(DIKMA 公司);SDS(纯度为 99.9%,SIGMA 公司);正丁醇、正辛烷、正辛醇、正庚烷、四氢呋喃均为分析纯;水为超纯水。

1.3 微乳流动相、对照品溶液与样品溶液的制备

微乳流动相:将微乳成分表面活性剂(SDS,30 g/L)、油相(正辛烷 0.8%(质量分数,下同)、助表面活性剂(正丁醇 6.6%)及水(89.6%)按顺序添加混合,超声 30 min,即得透明稳定的微乳溶液,经过 0.45 μm 滤膜过滤,静置过夜,以此作为流动相。

对照品储备液:取黄体酮对照品约 12.5 mg,精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品储备液。

样品溶液:取黄体酮注射液 10 瓶,按中国药典的方法^[14]进行操作,精密加入内标溶液 5 mL(0.6 mg/mL 的泼尼松龙),置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取 5 mL,置于 10 mL 量瓶,用甲醇稀释至刻度,摇匀。

2 结果与讨论

2.1 SDS 浓度对分离的影响

尽管水包油型(oil-in-water,O/W)微乳中 SDS 的质量浓度可在 17.5 ~ 50 g/L 范围内,但其低于 30 g/L 时色谱条件不稳定^[5]。本文考察了 SDS 质量浓度为 30 ~ 45 g/L 时的影响。图 1 显示了微乳中 SDS 的浓度对 6 种药物保留因子(*k*)的影响。随着 SDS 浓度的增加,微乳流动相中的微乳液滴体积增大,洗脱能力增强,但是吸附在固定相上的表面活

性剂分子层性质没有改变,因此不影响溶质与固定相的相互作用,只对与微乳液滴有作用的溶质(液滴结合型溶质)起作用^[4]。在 SDS 的质量浓度为 30 ~ 40 g/L 时,随着 SDS 浓度的增加,6 种药物的 *k* 值均减小,可视其为液滴结合型溶质;*k* 值的降低程度与其油水分配系数 log *P* 值(见表 1)有关,log *P* 值大的药物,疏水性强,*k* 值降低较明显。但是当 SDS 的质量浓度增加到 45 g/L 时,己烯雌酚和黄体酮的 *k* 值增加,炔雌醇和醋酸氟轻松的 *k* 值变化较小,泼尼松龙和醋酸可的松的 *k* 值有所减小。这是由于微乳流动相的洗脱能力降低,增加了疏水性药物的保留,对泼尼松龙、醋酸可的松、炔雌醇和醋酸氟轻松的影响较小。

混合物在 SDS 浓度为 30 g/L 和 45 g/L 时均能达到基线分离,但由于 SDS 的浓度增大,柱压也随着增高,故本文选择 SDS 的质量浓度为 30 g/L。

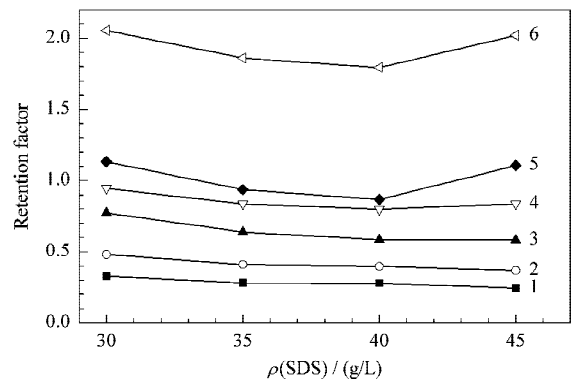


图 1 微乳液中 SDS 质量浓度对甾体药物保留因子的影响
Fig. 1 Effect of the SDS concentration in microemulsion on the retention factors of steroids

Experimental conditions: microemulsion, 30 - 45 g/L SDS-0.8% (w/w) *n*-octane-6.6% (w/w) *n*-butanol; temperature, 35 °C; flow rate, 0.8 mL/min; detection wavelength, 254 nm; column, Venusil ASB C₁₈(T)(5 μm, 30 nm, 250 mm × 4.6 mm).

1. prednisolone; 2. cortisone acetate; 3. ethinylestradiol; 4. fluocionide; 5. diethylsilbestrol; 6. progesterone.

表 1 6 种甾体药物的油水分配系数(log *P*)
Table 1 Octanol-water partition coefficients(log *P*) of six steroids

No.	Steroid	log <i>P</i>
1	prednisolone (泼尼松龙)	1.62
2	cortisone acetate (醋酸可的松)	2.10
3	ethinylestradiol (炔雌醇)	3.67
4	fluocionide (醋酸氟轻松)	3.19
5	diethylsilbestrol (己烯雌酚)	5.07
6	progesterone (黄体酮)	3.87

2.2 不同油相对分离的影响

微乳液中 SDS、正丁醇的浓度与“1.1”节中相同,分别以 0.8%(w/w)的正辛烷、正庚烷、正辛醇为油相构成微乳流动相,在“1.1”节的色谱条件下

分离 6 种甾体药物,考察油相的种类对分离的影响,结果见图 2。

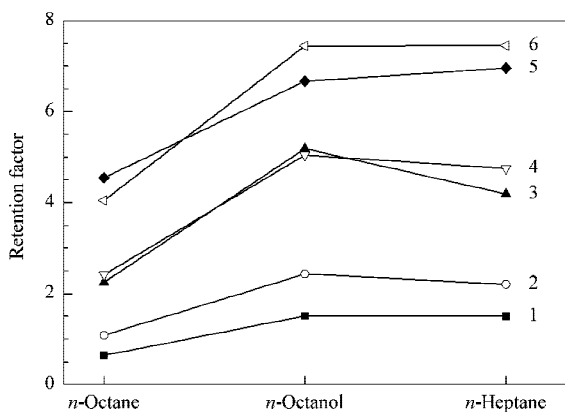


图 2 不同油相对甾体药物保留因子的影响

Fig. 2 Effect of oil types in the microemulsion on the retention factors of steroids

Experimental conditions: microemulsion, 30 g/L SDS-0.8% (w/w) *n*-octane-6.6% (w/w) *n*-butanol; temperature, 35 °C; flow rate, 0.8 mL/min; detection wavelength, 254 nm; column, Venusil ASB C₁₈ (T) 5 μm, 30 nm, 250 mm × 4.6 mm).

For curves, see Fig. 1.

Marsh 等^[4]的研究表明,油相在水包油型微乳中的含量一般为 0 ~ 1.2%。油相的含量高于 1% 时,微乳系统不稳定,色谱重现性较差,油相的最佳含量约为 0.8%;被分离组分的 *k* 值随着作为油相的有机溶剂的碳原子数增多而降低,且有机溶剂的碳数相同时,醇作为油相时被分离组分的 *k* 值大。

从实验结果可知,以辛烷为油相的 6 种药物 *k* 值均小于以正庚烷和正辛醇为油相的 *k* 值。由于以正辛烷为油相的微乳流动相对稳定,且药物的分离选择性较好,故本文选择油相为 0.8% 正辛烷。

2.3 助表面活性剂的浓度对分离的影响

助表面活性剂一般采用正丁醇,其浓度为 6.6% ~ 16.5%。超出这个范围微乳不能形成;浓度高于 9% 对分离效果的影响很小,只是能降低保留时间^[4]。本文选择正丁醇的浓度为 6.6%。

2.4 有机添加剂对分离的影响

按“1.3”节的方法配制微乳流动相,分别向微乳液中加入适量的有机溶剂,分别以微乳-甲醇(体积比为 96:4)、微乳-乙腈(体积比为 96:4)、微乳-四氢呋喃(体积比为 96:4)为流动相,按“1.1”节的色谱条件对 6 种药物的混合对照品溶液进行分离,结果见图 3。从图 3 可知,加入有机添加剂能使各药物的保留因子发生变化,且影响的程度不同,其中添加 4% 乙腈和 4% 甲醇能使药物达到基线分离,但添加 4% 四氢呋喃的分离效果不好。由于在微乳液中不添加有机添加剂也可使 6 种药物达到基线分离,故本文在微乳流动相中没有添加有机添加剂。

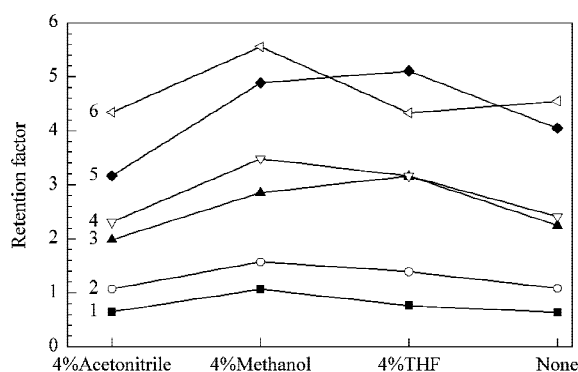


图 3 不同有机添加剂对甾体药物保留因子的影响

Fig. 3 Effect of organic additive to microemulsion on the retention factors of steroids

Experimental conditions: microemulsion, 30 g/L SDS-0.8% (w/w) *n*-octane-6.6% (w/w) *n*-butanol; column, Venusil ASB C₁₈ (T) 5 μm, 30 nm, 250 mm × 4.6 mm); other conditions are the same as in Fig. 1.

For curves, see Fig. 1.

2.5 固定相孔径对分离的影响

由于微乳液滴的直径(10 ~ 20 nm)与普通液相色谱填料的孔径相当,因此以微乳做流动相时,在普通液相色谱填料表面空隙内部吸附的溶质不易被洗脱;使用大孔径的色谱填料可增加微乳的洗脱能力^[15],减少扩散,提高柱效及分离度。对比了固定相孔径分别为 30, 15 及 10 nm 的 C₁₈ 柱分离 6 种药物的柱效(见表 2),表明孔径为 30 nm 的色谱柱的分离选择性好,柱效高于孔径为 10 nm 的色谱柱。

2.6 温度对分离的影响

设置分离温度分别为 30, 35, 40, 45, 50 °C,在每个温度下平衡 30 min,在其他色谱条件与“1.1”节相同的条件下测定 6 种药物的混合溶液,色谱图见图 4。从图 4 得知,柱温对甾体药物的保留因子影响较小,说明微乳流动相受温度影响较小。

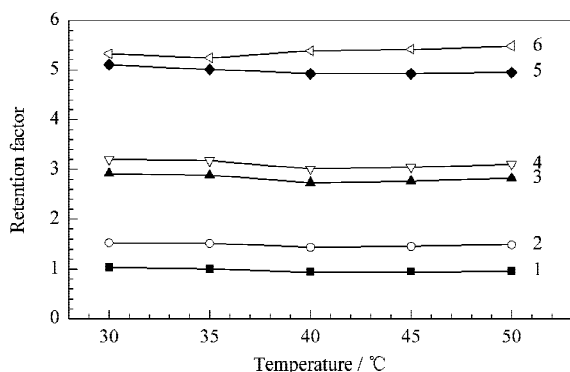


图 4 柱温对甾体药物保留因子的影响

Fig. 4 Effect of column temperature on the retention factors of steroids

Experimental conditions: microemulsion, 30 g/L SDS-0.8% (w/w) *n*-octane-6.6% (w/w) *n*-butanol; others are the same as in Fig. 1.

For curves, see Fig. 1.

表 2 不同孔径固定相的色谱柱分离甾体药物的柱效(N)和分离度(R_s)($n=3$)

Table 2 Effect of the pore sizes of packing on the column efficiency (N) and resolution (R_s) for the separation of steroids ($n=3$)

Steroid	Column 1		Column 2		Column 3	
	N	R_s	N	R_s	N	R_s
Prednisolone	6695	2.25	2728	2.96	1172	2.37
Cortisone acetate	6031	3.13	3439	4.86	2289	1.27
Ethinylestradiol	3263	1.68	2011	1.10	2694	0.66
Fluocionide	7223	1.75	3530	7.32	3181	5.31
Diethylsilbestrol	5568	7.30	6205	1.56	3071	1.42
Progesterone	8254	-	10205	-	4378	-

Column 1 : Venusil ASB C_{18} ($T \chi$ 5 μm , 30 nm , 250 mm \times 4.6 mm) ; column 2 : Venusil ASB C_{18} (5 μm , 15 nm , 250 mm \times 4.6 mm) ; column 3 : Diamonsiol C_{18} (5 μm , 10 nm , 250 mm \times 4.6 mm). Other conditions are the same as in Fig. 1.

2.7 与反相液相色谱分离模式的比较

从图 5 可以看出 , 由流动相性质决定的 3 种分离模式 , 各溶质的保留时间的大小顺序为 MELC < MLC < RPLC , 并且前两种分离模式中各溶质均达到了基线分离。MELC 的微乳液滴内含有油相(正辛

烷)对甾体类药物的洗脱能力高于 MLC 的胶束 , 其特殊的分离机制使溶质的保留时间明显提前 , 使其能在 14 min 内达到基线分离 , 而 RPLC 不能使快雌醇和己烯雌酚分离 , 两者完全重合 , 并且分离时间延长。

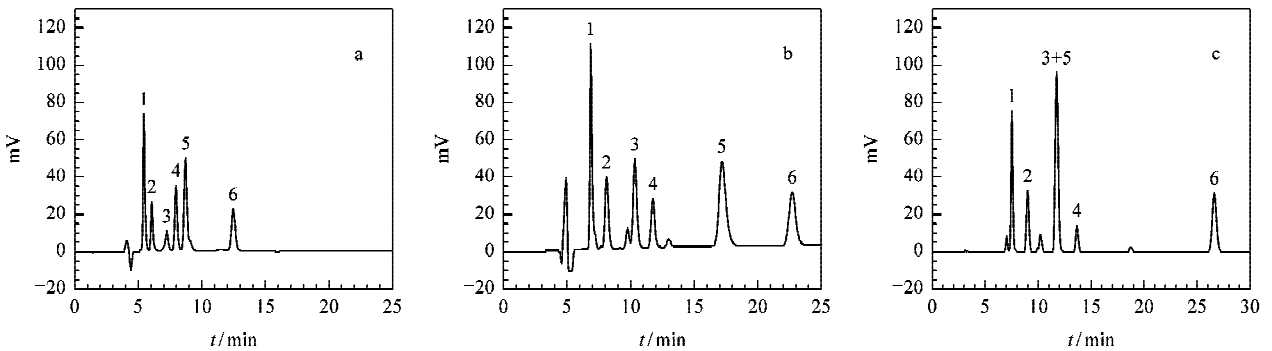


图 5 采用 (a) MELC、(b) MLC 和 (c) RPLC 3 种模式分离 6 种药物混合物的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of 6 steroids by (a) MELC, (b) MLC and (c) RPLC

Mobile phases : a. 30 g/L SDS-0.8% (w/w) *n*-octane-6.6% (w/w) *n*-butanol ; b. 30 g/L SDS-6.6% (w/w) *n*-butanol ; c. methanol-water (65:35 , v/v)^[13].

1. prednisolone ; 2. cortisone acetate ; 3. ethinylestradiol ; 4. fluocionide ; 5. diethylsilbestrol ; 6. progesterone.

2.8 保留时间与峰面积的重复性

表 3 的结果显示 , 6 种药物的保留时间和峰面积 6 次重复测定的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.07% 和 1.67% , 说明其重复性较好。

表 3 MELC 分离甾体药物的保留时间和峰面积的重复性 ($n=6$)

Table 3 Repeatabilities of retention times and peak areas of the steroids by MELC ($n=6$)

Steroide	Retention time		Peak area	
	t_R /min	RSD/%	A	RSD/%
Prednisolone	5.394	0.08	718190	1.67
Cortisone acetate	6.009	0.06	291611	1.60
Ethinylestradiol	7.194	0.05	189969	1.97
Fluocionide	7.908	0.10	498637	0.98
Diethylsilbestrol	8.648	0.05	891836	1.96
Progesterone	12.404	0.06	453932	1.82

Experimental conditions : microemulsion , 30 g/L SDS-0.8% (w/w) *n*-octane-6.6% (w/w) *n*-butanol ; other conditions are the same as in Fig. 1.

2.9 标准曲线

精密吸取对照品储备液 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.0 , 2.5 3.0 3.5 mL , 分别置于 10 mL 量瓶 , 分别加内标溶液 2 mL , 加甲醇稀释至刻度 , 配制成质量浓度分别为 25 , 50 , 75 , 100 , 125 , 150 , 175 mg/L。以对照品质量浓度 X 为横坐标 , 对照品与内标物的峰面积比值 Y 为纵坐标进行回归运算 , 得回归方程为 $Y = 0.0665 + 0.0214X$, $r = 0.9996$ 。

2.10 选择性试验

处理后的空白注射用油的色谱分离图见图 6-a , 可看出基质对目标组分的测定及内标无干扰。

2.11 回收率的测定

分别按处方量的 80% , 100% , 120% 配制样品 , 测定样品的回收率 , 平均回收率分别为 100.2% ($n=3$, RSD = 1.8%) , 98.6% ($n=3$, RSD = 1.5%) , 101.3% ($n=3$, RSD = 2.1%)。

2.12 黄体酮注射液的测定

采用本文建立的方法对 3 批黄体酮注射液样品进行了测定,测定结果分别为标示量的 102.4%, 97.3%, 96.5% ($n=3$), 其中 1 个样品的色谱图见图 6-c。

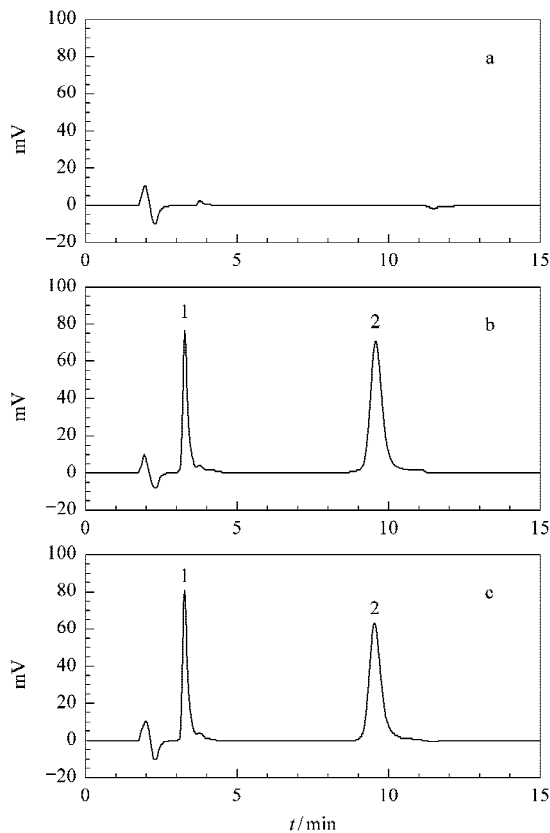


图 6 (a)空白样品、(b)空白样品加标和(c)黄体酮注射液样品的 MELC 色谱图

Fig. 6 Chromatograms of (a) a blank sample, (b) a blank sample spiked with progesterone standard and (c) a progesterone injection

1. prednisolone; 2. progesterone.

3 结论

实验结果表明,微乳中表面活性剂的浓度、油相的种类、各种添加剂(有机溶剂)以及反相液相色谱固定相的孔径对甾体药物的 MELC 分离有显著的

影响,通过优化以上条件可使 6 种甾体药物在 14 min 内达到基线分离。用优化的色谱条件对黄体酮注射剂进行了检测,表明该方法准确、简单、快速。由于 MELC 的强洗脱能力,各甾体药物可互作内标物,在甾体药物快速检测方面显示其优越性。MELC 的理论研究及在药物分析方面的应用还比较少,在复杂药物组分的分离应用还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Berthod A, Garcia-Alvarez-Coque C. Micellar Liquid Chromatography. [S. l.]: CRC Press, 2000
- [2] Berthod A, De Carvalho M. Anal Chem, 1992, 64: 2 267
- [3] Berthod A, Lasema J, Carretero L. J Liq Chromatogr, 1992, 15: 3 115
- [4] Marsh A, Clark B, Altria K. Chromatographia, 2004, 59: 531
- [5] El-Sherbiny D T M, El-Ashry S M, Mustafa M A, et al. J Sep Sci, 2003, 26: 503
- [6] Marsh A, Clark B J, Altria K D. Chromatographia, 2005, 61 (11/12): 539
- [7] El-Sherbiny D T, El-Enany Nahed, Belal F F, et al. J Pharmaceut Biomed Anal, 2007, 43(4): 1 236
- [8] Jancic B, Medenica M, Ivanovic D, et al. Anal Bioanal Chem, 2005, 383: 687
- [9] Malenovic A, Ivanovic D, Medenica M, et al. J Chromatogr A, 2006, 1 131(1/2): 67
- [10] Malenovic A, Ivanovic D, Medenica M, et al. J Sep Sci, 2004, 27: 1 087
- [11] He S, Zhang Z Y, Zhang S Y. Journal of Instrumental Analysis (贺帅, 张忠义, 张守尧. 分析测试学报), 2008, 27 (6): 654
- [12] Jancic B, Ivanovic D, Medenica M, et al. J Chromatogr A, 2005, 1 088: 187
- [13] Torres Cartas S, Garcia Alvarez-Coque M C, Villanueva Camanas R M. Anal Chim Acta, 1995, 302: 163
- [14] The Pharmacopoeia Committee of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Part II. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 二部. 北京: 化学工业出版社), 2000: 369, 643
- [15] David P T, Joe P F. J Chromatogr A, 2004, 1 060: 195