

高效液相色谱-质谱联用法分析微生物降解植物甾醇为雄甾烯酮

沈 微 廖伟宏 饶志明* 方慧英 诸葛健

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院工业微生物研究中心 无锡 214122)

摘 要: 采用高效液相色谱-质谱联用法(HPLC/MS)分析测定植物甾醇侧链降解过程中产物雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)及雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)。其中液相色谱的条件为色谱柱 Alltima C18 ODS-2(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm); 流动相甲醇:水(V/V=7:3); 流速 1 mL/min; 柱温室温; 紫外检测器的检测波长 244 nm。质谱为 ZMD Micromass 电喷雾质谱仪。结果测得 ADD 与 AD 标准样品的保留时间分别为 9.70 min 与 11.13 min, 发酵样品的 HPLC 与 MS 图谱与 ADD 与 AD 标准样品的图谱一致。采用高效液相色谱法定量 ADD 与 AD 的线性范围在 0.01 mg/mL ~ 0.09 mg/mL, 产物回收率分别为 102.6%与 105.90%, 日内精密度分别为 3.02%与 3.08%, 日间 RSD 分别为 3.50%与 3.24%。该方法灵敏度高、选择性好、操作简便、定量准确, 适用植物甾醇微生物侧链降解过程中产物的分析及产品质量控制。

关键词: 植物甾醇, 雄甾-4-烯-3,17-二酮, 雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮, 液质联用

Preliminary Study of Bio-transformation of Phytosterol by HPLC- MS

SHEN Wei LIAO Wei-Hong RAO Zhi-Ming* FANG Hui-Ying ZHUGE Jian

(Key laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Research Center of Industrial Microorganisms, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract: The method for analysis and determination the cleavage of soybean sterol, in which the soybean sterol was degraded and the products androst-1,4-diene-,17-dione (ADD) and androst-4-ene-3,17-dion (AD) were developed by Liquid Chromatography-mass Spectrometry. The HPLC conditions adopted were: a Alltima ODS-2 column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), a mobile phase consisted of menthanol - water (70:30), a flow rate of 1.0 mL/min, a room column temperature. and the detective wavelength was 244 nm.The ZMD Micromass electrospray ionization (ESI)-mass spectrometer was employed. In such conditions the corresponding HPLC chromatogram and MS spectrum were obtained. The method has a linear ranger of 0.01 mg/mL ~ 0.09 mg/mL, $R^2 = 0.9999$, the recoveries of ADD and AD were 102.6% and 105.90%, the RSD of ADD and AD were 3.02%, 3.5% and 3.08%, 3.24%. This method showed high sensitivity, accuracy

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20676053); 国家“863计划”(No. 2006AA020103); 江苏省青年科技创新人才(学术带头人)基金(No. BK2006504); 长江学者和创新团队发展计划资助(No. IRT0532)

* 通讯作者: Tel: 0510-85918109; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-06; 接受日期: 2008-06-19

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

and easy to perform. It is suitable to analysis the process cleavage of soybean sterol as well as quality control of product.

Keywords: Phytosterol, Androst-4-end-3,17-dione, Androst -1,4-end-3,17-dione, Liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC/MS)

雄甾-4-烯-3,17-二酮(androst-4-end-3,17-dione, AD)和雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(androst-1,4-end-3,17-dione, ADD)是制备氢化可的松、蛋白同化激素、性激素、黄体酮、雌烯醇等甾体类药物的重要中间体,对机体起着非常重要的调节作用^[1,2]。60年代中期,美国生物学家 Sih^[3]首先发现某些微生物可以切除饱和甾醇的侧链而得到 ADD 和 AD,70年代初,国外利用微生物以相当好的收率切除植物甾醇 C17位边链,得到了 ADD 与 AD,国内研究主要集中在天津科技大学等高校^[4-6]。目前,我国已把甾体激素药物新资源开发作为医药行业近期技术发展的方向和重点之一,已成为仅次于抗生素的第二类药物^[7]。

AD 与 ADD 仅在 C1,2 位上存在单键与双键的差别(见图 1),采用一般的化学方法很难对其进行分析测定,它的分离技术与定量分析一直处于改善之中。建立一套可靠、准确的分析方法是甾体药物研究工作中的首要问题。目前分析甾体转化产物的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法与紫外吸收定量法^[8]。由于植物甾醇的微生物转化产物结构接近,使用薄层色谱方法灵敏度低,普通液相色谱法的检测器选择性相对较差,难以对产物的结构进行检测。而且发酵样品中存在其他在紫外有吸收的物质,所以很难用吸光度测定发酵样品中雄甾烯酮含量。近年来,液质联用(HPLC-MS)结合二极管阵列检测器(DAD)集分离与鉴定于一体,在定向筛选某些结构的化合物时,显示了强大的检测功能。

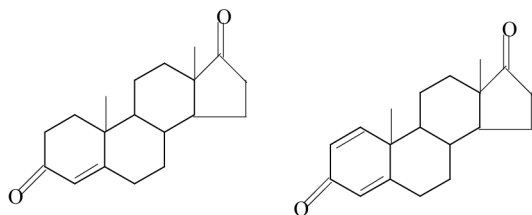


图 1 AD 与 ADD 的结构

Fig. 1 The structure of AD and ADD

本文建立了一种分析植物甾醇的微生物转化产物成分的方法液相色谱-质谱联用方法,从定性与定量两方面对转化产物 ADD 与 AD 进行了分析。为筛

选以植物甾醇为底物产雄甾烯酮的菌株以及甾体药物的研究打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器: Alltech 高效液相色谱仪(美国 Alltech 公司);液相色谱质谱联用仪 Waters Platform ZMD 4000(美国 Waters 公司);U3000 型紫外分光光度(日本日立)。

1.1.2 样品: ADD 为美国 Sigma 化学公司商品。AD 为武汉合中化工制造有限公司商品。待测样品为产 ADD 与 AD 的菌株接种发酵培养基 30°C 培养 168 h 后所取发酵液处理样品。

1.2 方法

1.2.1 发酵样品的处理: 将实验室保藏的可产 ADD 与 AD 的菌株 *Bacillus* sp. ST06-95 从斜面保藏培养基(0.3% 牛肉膏, 0.5% 蛋白胨, 1.5% NaCl, 2.0% 琼脂)接种种子培养基(0.3% 牛肉膏, 1.0% 蛋白胨, 1.5% NaCl, 1.5% 甘油, 0.3% 酵母膏) 30°C 培养 48 h 后取 10 mL 接种至 100 mL 发酵培养基(0.3% 植物甾醇, 1.0% 葡萄糖, 0.2% 柠檬酸, 0.25% 甘油, 0.05% 柠檬酸亚铁铵, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 1.0% (NH₄)₂HPO₄, 0.3% Tween80)中。发酵 168 h 后取样,用等体积的乙酸乙酯抽提 4 次,合并抽提液。每次抽提前剧烈振荡 2 min~3 min 后,3500 r/min 离心 10 min,取上层有机相稀释数倍后用微孔滤膜过滤,所得滤液直接进样测定。

1.2.2 高效液相色谱(HPLC)^[9]分析条件: 色谱柱: Alltima C18 (5 μL, 250 mm×4.6 mm);流动相: 甲醇-水(体积比为 7:3);检测器: UV Detector;检测波长: 244 nm;柱温: 室温;进样量: 40 μL;流速: 1 mL/min。

1.2.3 HPLC 定量标准曲线的制作: 电子天平上精密称取雄甾-4-烯-3,17-二酮(AD)与雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮(ADD)10 mg,用乙酸乙酯溶解,定容到 100 mL。分别取标准溶液 1 mL、3 mL、5 mL、7 mL、9 mL,定容到 10 mL,得到浓度依次为 0.01 mg/mL、

0.03 mg/mL、0.05 mg/mL、0.07 mg/mL 和 0.09 mg/mL 的标准溶液, HPLC 测定得到峰面积, 以峰面积(y)对质量浓度(x , mg/mL)做线性回归曲线进行回归分析。

1.2.4 液质联用^[9-11](MS)条件: ZMD Micromass 电喷雾质谱仪; 离子源 ESI; 极性(检出模式) 负离子; 毛细管电压 3.59 kV; 脱溶剂温度 200℃; 源温度 120℃; 取样椎孔电压 35 V; 萃取椎孔电压 5 V; 离子能量 0.5 V; 六极杆射频透镜电压 0.25 V; 倍增器电压 650 V; 氮气流量 3.7 L/h; 进样量 10 μ L/min; 分流比为 10:1; 数据处理系统 Mass-Lyns NT Version 3.1 数据处理工作站。

2 结果与分析

2.1 检测波长与流动相的选择

为了获得产物在紫外区最佳检测响应值, 在 190 nm~400 nm 范围内对 AD 与 ADD 的标准品进行了吸收强度扫描, 扫描图谱见图 2。产物 ADD 在 248 nm 有特征吸收峰, 产物 AD 在 244 nm 处有特征吸收峰。结合本研究室色谱仪器情况经多次实验选择 244 nm 为 HPLC 检测波长。

比较了 3 种流动相不同比例下的色谱分离效果: (1) 甲醇-乙腈; (2) 甲醇-水; (3) 乙腈-水。由于使用甲醇-乙腈与乙腈-水时出峰较早, 不利于产物的分离。在保证有效分离产物 ADD 与 AD 的前提下, 本文选择了甲醇-水的最佳的梯度条件。不同甲

醇与水的配比下出峰情况见表 1。

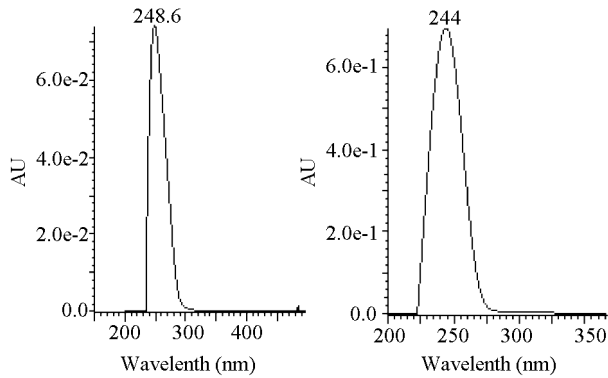


图 2 产物 ADD 与 AD 在紫外区的扫描图谱
Fig. 2 Ultraviolet absorption chromatograms of ADD and AD

表 1 流动相配比的选择			
Table 1 The separation effect of different mobile phase			
甲醇(%)	水(%)	出峰时间	Retention time
Methanol	Water	ADD	AD
80	20	7.56	8.69
70	30	9.70	11.13
60	40	10.32	13.14
50	50	13.32	16.15

2.2 ADD、AD 标样的 HPLC 与 MS 图谱

在选定情况下产物 ADD、AD 标准品的 HPLC 图谱见图 3。ADD 的保留出峰时间为 9.70 min, AD 的保留出峰时间为 11.13 min。

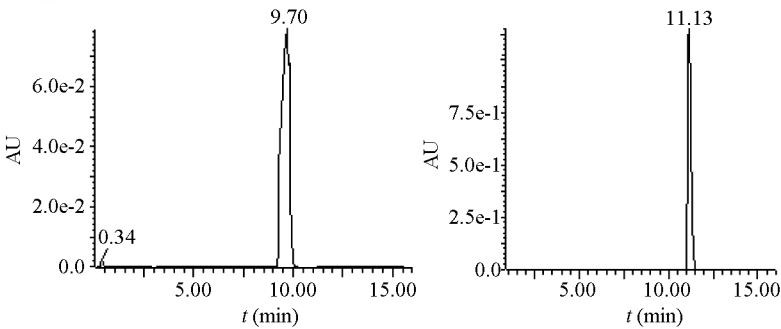


图 3 ADD 与 AD 标准品的 HPLC 图
Fig. 3 The HPLC determining chromatograms of ADD and AD standard

在 ADD 与 AD 的出峰时间 9.70 min 与 11.13 min 时 ADD 与 AD 对应的质谱图见图 4。从图可以看出, m/z 285.5 为 ADD 的酸型($[M+H]^+$), m/z 287.6 为 AD 的酸型, 在电离作用下产生的碎片 m/z 323.5 与 325.6 为 $[M+K]^+$ 。这个结果对应的分子量 M 分别为

284.6 与 286.6, 符合 ADD($C_{19}H_{24}O_2$)与 AD($C_{19}H_{26}O_2$)的分子量。

2.3 高效液相色谱定量标准曲线、回收率与精密

度
将配制好的浓度为 0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、

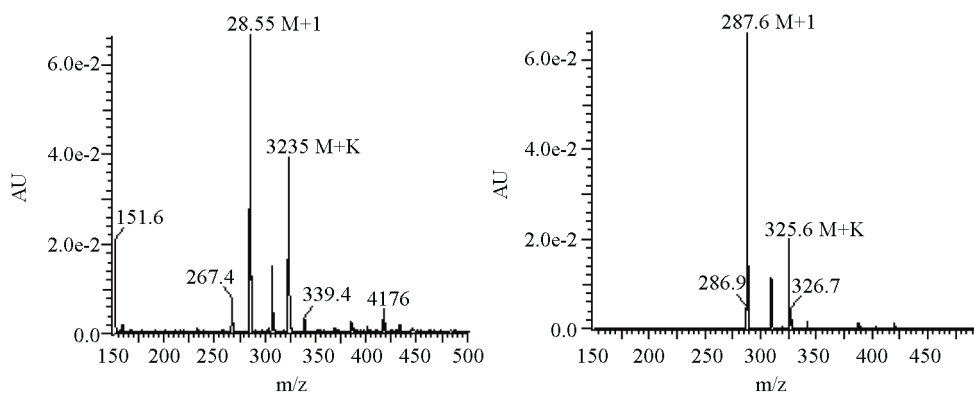


图 4 ADD 与 AD 标准品的质谱图

Fig4 MS chart of ADD and AD standard

0.05 mg/mL、0.07 mg/mL 和 0.09 mg/mL 的标准系列浓度的 ADD、AD 溶液在拟定的色谱条件下进行测定, 3 组平行样取其平均值, 以峰面积(y) 对质量浓度(x , g/L) 做线性回归曲线, 回归直线的线性相关性均较好(表 2), 由此可以计算出发酵液中产物 ADD 与 AD 的含量。

表 2 产物 ADD 与 AD 的标准曲线、线性范围、及相关系数

Table 2 Standard curve, R^2 and linear relationship for ADD、AD

化合物 Component	回归方程 Regression equation	线性范围 (mg/mL) Linear range	R^2
ADD	$y = 4.97 \times 10^6 x + 1.127$	0.01~0.09	0.9991
AD	$y = 4.81 \times 10^6 x + 0.7318$	0.01~0.09	0.9993

将 0.1 mg/mL 的 ADD 与 AD 标准储备液同浓度平行 3 份当日重复进样 5 次, 在已知浓度的样品中分别加入一定量的 ADD 与 AD 对照溶液进行回收率实验, 每个浓度设 3 个平行, 具体添加量及结果见表 3。ADD 与 AD 的平均回收率分别为 102.6% 和 105.9%。

取含 ADD 与 AD 不同比例的混合标样(图谱见图 5), 1 d 内分别重复进样 5 次, 以后每天分析 1 次, 重复 5 次做精密度实验, 结果见表 4。ADD 与 AD 的日内 RSD 平均值分别为 3.02% 与 3.08%, 日间 RSD 平均值分别为 3.50% 与 3.24%。

2.4 发酵样品的 LC-ESI/MS 分析

由于实际甾体微生物转化过程中的基体情况较为复杂, 采用 HPLC-UV/VIS 可能会因基质峰的干扰而出现假阳性结果。因此, 对于液相色谱检测为阳性的样品, 进一步用液质联用 LC-ESI/MS 方法

表 3 回收率实验结果($n=5$)

Table 3 Recovery experiment result

化合物 Component	加入量 Added (mg)	测定量 Detected (mg)	回收率 Recovery (%)
ADD	0.5	0.492	102.4
	1.0	1.161	
	2.0	1.955	
	2.5	2.476	
	3.0	3.033	
AD	0.5	0.584	103.5
	1.0	1.021	
	2.0	1.975	
	2.5	2.462	
	3.0	3.041	

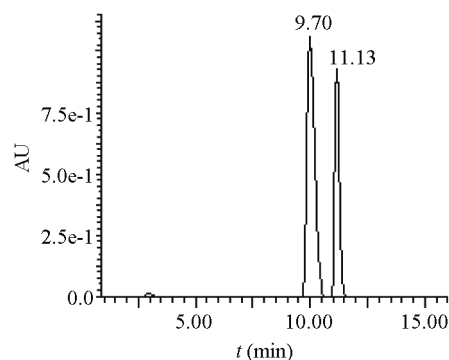


图 5 ADD 与 AD 混合的标准品的 HPLC 图

Fig 5 The HPLC determining chromatograms of ADD and AD mixed standard

来加以确证, 用二极管阵列检测器采集发酵样品的紫外色谱图, ESI 正模式检测化合物的 $[M+H]^+$ 及 $[M+K]^+$ 准分子离子峰, 发酵样品的 HPLC 图谱、MS 图谱与 LC-ESI/MS 分析结果分别见图 6、图 7 和表 5。

表 4 精密度实验结果
Table 4 Precision experiment result

组分名称 Component	天内 Within a day		天间 Every day between	
	平均值 Average (mg/L)	RSD (%)	平均值 Average (mg/L)	RSD (%)
ADD	1.0	3.86	1.5	4.45
		2.43		3.72
		2.77		2.34
		3.06		3.51
		2.98		3.49
		2.35		2.67
AD	1.5	3.81	2.5	4.61
		3.08		2.46
		3.03		3.21
		3.11		3.27

根据发酵样品的 HPLC 图谱可以看出发酵样品中两种产物对应的出峰时间分别为 9.70 min 与 11.11 min, 对应的 MS 图谱(m/z)⁺分别为 285.5 与 287.6. 将发酵样品的 HPLC 图谱和 MS 图谱与 ADD、

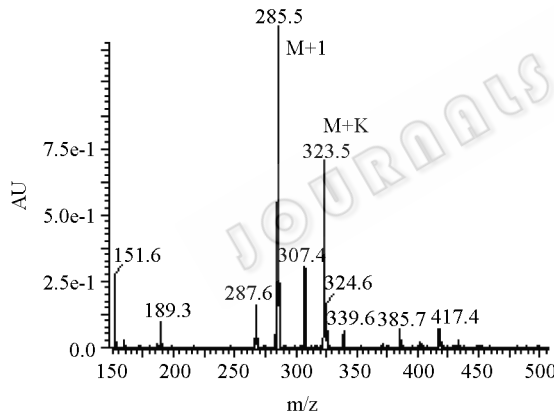


图 7 发酵样品在 T=9.70 min 与 T=11.11 min 的质谱图
Fig. 7 MS chart (T_{ADD}= 9.70 min and T_{AD}=11.11 min) of fermentation sample

样品 Sample	最大吸收波长 γ _{max} (nm)	相对分子 质量 F _W	准分子离子峰 (m/z) ⁺	
			[M+H] ⁺	[M+K] ⁺
ADD 标样	248.4	284.5	285.5	323.5
AD 标样	244	286.6	287.6	325.6
发酵产物 A	248	284.5	285.5	323.5
发酵产物 B	244	286.6	287.6	325.6

2.5 定量测定结果的可信性

通过分析发酵样品的高效液相色谱图(图 6), 发现

AD 标准品的 HPLC 图谱和 MS 图谱对照, 两种产物对应的出峰时间与两种产物完全一致, 说明检测系统重复性好。将发酵样品的峰面积与标准品的峰面积对照即可定量发酵样品中产物 ADD 与 AD 的含量, 可以达到定量发酵样品中产物的目的。在出峰时间下的 MS 图谱对应的(m/z)⁺分别为 285.5 与 287.6. 由发酵样品中两种产物与 ADD、AD 的标准品的 LC-ESI/MS 分析可以确定产物 A 与产物 B 分别对应为 ADD 与 AD。

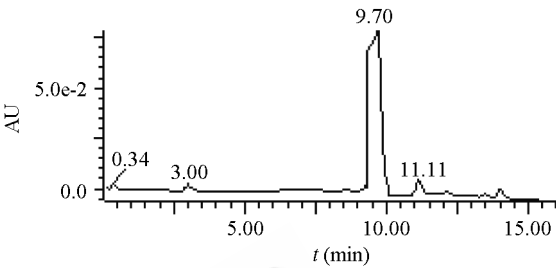
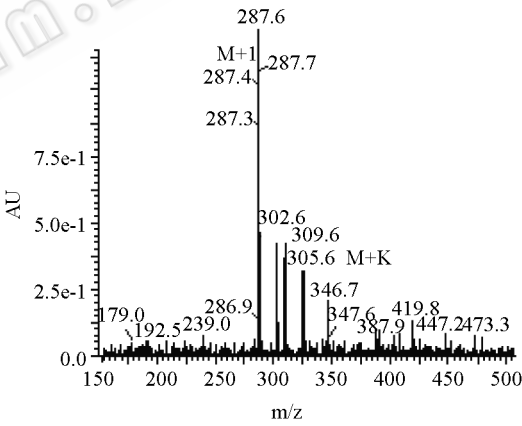


图 6 发酵样品的 HPLC 图
Fig. 6 The HPLC determining chromatograms of fermentation sample



发酵样品中存在副产物, 这些副产物对产物的紫外吸收值的测定存在干扰。为了较准确的推测产物的含量, 在相同的发酵条件下发酵 5 批样品, 分别利用所建立的 HPLC 与文献所报道的 UAS^[8]方法对产物的含量进行了测定。两种方法测定结果的对照见表 6。

表 5 中产物 ADD 与 AD 的质量比为 10:1 左右, 与发酵样品的 HPLC 图谱中 ADD 与 AD 的峰面积对应情况基本相符。由表 3 可知, UAS 与 HPLC 相比存在较大的误差, UAS 的数据比 HPLC 均高, 这是

表 6 HPLC 与 UAS 测定方法对照表(n=5)
Table 6 The results comparison of USA and HPLC

产物与测定方法 Production and mensurate method		不同批次产物生成量(g/L) Different batch of production					误差(%) Error				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ADD	HPLC	1.12	1.15	1.09	1.13	1.15	3.4	4.9	3.5	5.8	4.1
	UAS	1.16	1.21	1.13	1.20	1.20					
AD	HPLC	0.12	0.18	0.20	0.15	0.19	7.6	5.2	9.0	6.2	9.5
	UAS	0.13	0.19	0.22	0.16	0.21					

由于发酵产物中的副产物也有一定的吸光度，对结果有较大的影响。而 HPLC 由于能将产物与副产物分离，能精确地得到两种产物 ADD 与 AD 的含量。在甾体药物的研究过程中，为了能精确的对转化情况进行掌握，我们应该采用 HPLC 的方法对其进行测定。

3 讨论

微生物转化甾醇生产甾体激素是目前研究的热门之一，目前最受关注的是雌激素类物质，它们通常分子量较大，极性较强，需要使用 HPLC/MS 进行分析。与传统的紫外分光法相比，HPLC 法能精确地将发酵样品中各种产物分离，从而准确地得到不同产物的含量，判断微生物转化甾醇的情况。

本研究所建立的 ADD 及 AD 的 HPLC/MS 分析测定方法，对生产实践有一定的指导作用。在本课题组从事研究的过程，采用 HPLC 标准曲线法定量发酵产物 ADD 与 AD，验证了所建立方法的准确性。随着 HPLC/MS 技术的日益成熟，其在生物领域的应用也会越来越多。在微生物转化过程中，如果没有目标产物的纯品，HPLC/MS 是必不可少的分析手段。

致谢：江南大学食品科学国家重点实验室测试中心秦昉教授在测试中给与了指导与帮助。

参 考 文 献

[1] Anthony HC, Muneo N, John WR, *et al.* Microbial con-

version of tall oil sterols to C19 steroids. *Applied and environmental microbiolog.* 1976, **32**: 310–311.

[2] Huang Ch L, Chen YR, Liu WH. Production of androstenediones from phytosterol by mutants of *Mycobacterium* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**: 296–300.

[3] Sih CJ, Wang RC. A new route to estrone from sterols. *Amer Chem Soc*, 1965, **87**: 1387–1388.

[4] 张裕卿, 王东青. 植物甾醇微生物转化制备甾体药物中间体的研究进展. *微生物学通报*, 2006, **33**(2): 142–146.

[5] 车成彬, 欧阳利华, 吴宝华. 不同菌株降解胆甾醇能力的研究. *哈尔滨理工大学学报*, 2002, **7**(2): 13–16.

[6] 叶 丽, 李增霞, 陈 倩, 等. 分歧杆菌降解 β -谷甾醇制备雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮. *复旦学报*, 2002, **29**(4): 280–283.

[7] Donova MV, Egorova OV, Nikolayeva VM. Steroid 17 β -reduction by microorganisms-a review. *Process Biochemistry*, 2005, **40**: 2253-2262.

[8] 王风清, 王 敏, 路福平. 快速分析测定大豆甾醇侧链降解底物的方法. *药物生物技术*, 2003, **10**(3): 177–180.

[9] 于 海, 方慧英, 诸葛健, 等. 液质联机法初步研究洛伐他汀的微生物转化. *中国新药杂志*, 2003, **12**(9): 745–747.

[10] Lan- Fang Huang, Yi- Zeng Liang, Fang- Qiu Guo. Simultaneous separation and determination of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militarris* by LC/ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, **33**: 1155–1162.

[11] Fang-Qiu Guo, Ai Li, Lan-Fang Huang. Identification and determination of nucleosides by high performance liquid-chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, **40**: 623–630.