

用分光光度法测定去氢甲基睾丸素*

徐 诗 伟

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用微生物转化 17α -甲基表雄醇形成去氢甲基睾丸素(商品名称大力补, 以 Δ^4 表示)时^[1], 一般经过中间体甲基睾丸素(以 Δ^5 表示)。在产物大力补中往往会含有少量的甲基睾丸素。另外, 由于微生物的脱氢作用进行很快, 它形成的产物大力补又能被进一步氧化。所以必须有一种简便、快速的测定甾体转化液的方法, 以便了解转化的进程。

大力补测定的方法已有盐酸荧光分光光度法^[2]、浓硫酸分光光度法^[3]、缩氨基硫脲法^[4]、纸色谱法^[5]、气相色谱法^[6]以及高压液相色谱法^[7]等。我们主要根据底物与产物之间紫外吸收光谱的特征, 采用了在波长 265 毫微米和 244 毫微米处测定吸收比率的方法。用这种方法可在

甲基睾丸素的存在下, 定量测定微生物转化液中大力补的转化率。

一、原理

图 1 是相同浓度的大力补和甲基睾丸素的紫外吸收光谱。 17α -甲基表雄醇无特征性紫外吸收光谱。大力补的最大吸收峰在 245 毫微米波长处; 甲基睾丸素的最大吸收峰在 241 毫微米波长处。两曲线相交于 244 毫微米处, 即表示在此波长下等量的大力补和甲基睾丸素具有同一光密度值。因此, 在测定未知样品时, 可在 244 毫微米波长下先将甲基睾丸素的量视为大

* 本文承法幼华同志审阅。

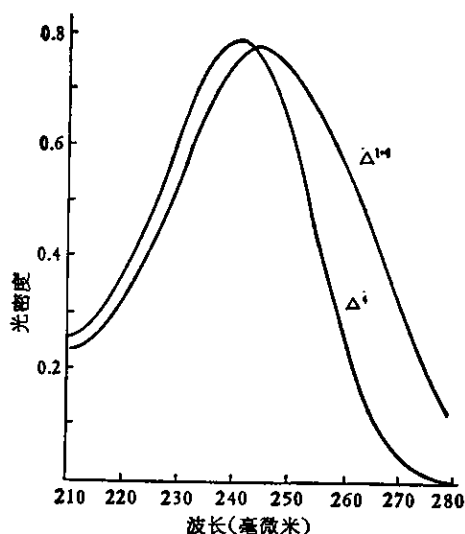


图1 去氢甲基辜丸素(Δ¹⁴)和甲基辜丸素(Δ¹)的吸收光谱

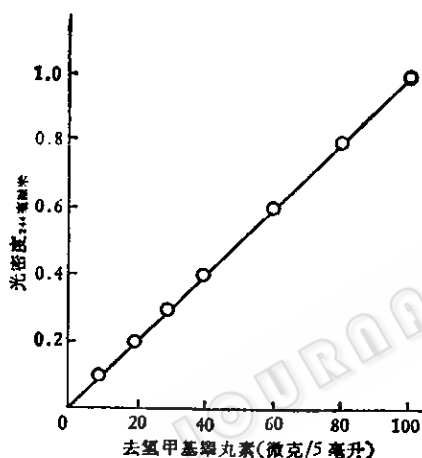


图2 去氢甲基辜丸素的标准曲线

力补的量进行总的脱氢转化率的计算。在 244 毫微米波长处大力补溶液的浓度和光密度值成线性关系(图 2)。

从图 1 光谱中还可见在 275 毫微米波长处甲基辜丸素的吸收几乎为 0, 而大力补仍有最大吸收峰波长处光吸收的 30% 左右。这一差别足以提供分析这两种菌株的可能。为使测定获得较好的结果。先作一在 245 毫微米至 275 毫微米波长范围内的大力补和甲基辜丸素的差别吸收曲线(图3)。图中表示了在 265 毫微米波长处为最大值。另测定用浓度为 15.0 微克/毫升的甲基辜丸素乙醇溶液稀释相同浓度的大力补乙醇溶液所配制成的从 0 到 100% 的溶液范

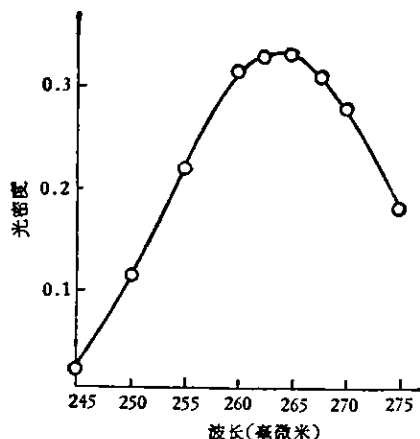


图3 去氢甲基辜丸素和甲基辜丸素的差别吸收曲线

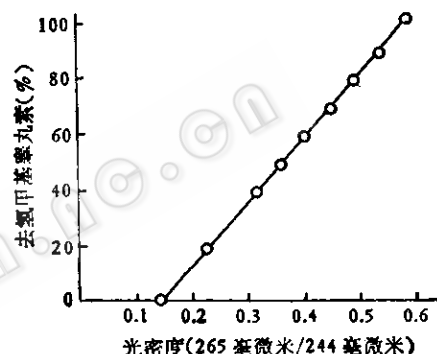


图4 吸收比标准曲线

围内的每种混合液在 244 毫微米和 265 毫微米波长处的光密度值, 作出吸收比标准曲线, 如图 4 所示成线性关系。这种吸收比值不取决于菌株的总浓度, 仅决定于微生物转化液中菌株的相对量。

二、测定步骤与计算

取微生物转化液 5 毫升, 用等量乙酸乙酯抽提, 取 40 微升提取液置于 5 毫升比色管中, 蒸发除去酯。加入 5 毫升乙醇摇匀, 然后在 751 型分光光度计上用 1 厘米厚的石英池于波长 244 毫微米和 265 毫微米处测定光密度值(D)。

根据样品在 244 毫微米处的光密度值按下式计算 17α-甲基表雄醇经微生物脱氢作用形成大力补和甲基辜丸素的总转化率(T):

$$T^{\Delta^{1,4}+\Delta^4}(\%) = \frac{97.5 \times D_{244\text{毫微米}}}{w} \times 100\% \quad (1)$$

式中 w 为 40 微升样品中投加底物的微克量; 97.5 为大力补标准曲线的斜率倒数。

用样品在 265 毫微米波长处和 244 毫微米波长处的吸收比求出大力补和甲基睾丸素各占的百分比, 计算式如下:

$$\Delta^{1,4}(\%) = 231x - 33.1 \quad (2)$$

$$\Delta^4(\%) = 100 - \Delta^{1,4} \quad (3)$$

式中 x 为吸收比, 231 和 33.1 分别是吸收比标准曲线的斜率和截距。

大力补对 17 α -甲基表雄醇的转化率:

$$T^{\Delta^{1,4}}(\%) = T^{\Delta^{1,4}+\Delta^4} \times \Delta^{1,4} \times 100\% \quad (4)$$

三、讨论

此法的精确性用重复分析测定转化样品加以验证。从表 1 列出实验数据, 可见总脱氢作用的转化率、其平均相对误差在 $\pm 2\%$ 范围内; 而大力补的转化率测定的最大误差不超过 $\pm 1\%$ 。此法的准确性用回收甾体的实验加以验证 (表 2), 可见总的大力补和甲基睾丸素以及大力补的回收率的最大偏差均在 $\pm 5\%$ 之内。

用这种吸收比分光光度法测定甾体混合物的范围较广。

表 1 测定结果的重复性

转化时间 (小时)	样品号	$T^{\Delta^{1,4}+\Delta^4}(\%)$	$T^{\Delta^{1,4}}(\%)$
16	1	61.0	52.2
	2	59.1	51.3
24	1	77.5	62.7
	2	76.5	62.5
32	1	90.4	72.1
	2	89.6	72.4
40	1	93.7	77.8
	2	94.5	77.5

E. Ivashkiv^[8] 在测定发酵液中 9 α -氟-16 α -羟基氢化可的松转化为 9 α -氟-16 α -羟基去氢氢化可的松的百分率时, 是先使甾体形成水溶性的硼酸盐络合物, 然后再测定此甾体络合物吸收比值, 最后由标准曲线计算转化的百分率, 而我们根据底物与产物之间的紫外光谱的特征, 同时直接测定 17 α -甲基表雄醇微生物转化形成大力补和甲基睾丸素的转化率, 操作简便、快速, 而且准确度较高。此外, 我们也曾比较过测定大力补的另两种方法: 一是与氨基硫脲反应形成缩氨基硫脲; 另一是与浓硫酸反应形成橙红色溶液, 但这两种方法, 甲基睾丸素都有干扰, 特别是当样品中甲基睾丸素含量较大时, 出现的误差较大。

表 2 甾体的回收

样 品 号	甾体浓度(微克/毫升)				回收值(微克/毫升)		回收率(%)	
	原 样 品		原样品+添加物*					
	$\Delta^{1,4} + \Delta^4$	$\Delta^{1,4}$	$\Delta^{1,4} + \Delta^4$	$\Delta^{1,4}$	$\Delta^{1,4} + \Delta^4$	$\Delta^{1,4}$	$\Delta^{1,4} + \Delta^4$	$\Delta^{1,4}$
1	0	0	312	208	312	208	100.0	99.0
2	379	371	707	589	328	218	105.1	103.8
3	513	417	832	634	319	217	102.2	103.3
4	864	766	1172	975	308	209	98.7	99.5
5	903	812	1220	1019	317	207	101.6	98.6
6	912	814	1233	1029	321	215	102.9	102.4

* 每样品中添加大力补 210 微克/毫升; 甲基睾丸素 102 微克/毫升。

参 考 文 献

- 【1】 法幼华、徐诗伟: 微生物学报, 20(2):185, 1980。
- 【2】 Tishler, F. et al.: *J. Pharm. Sci.* 51(12): 1175, 1962.
- 【3】 Mizsei, A. and A. Szabo: Hung. Pat., 150 246, 1963.
- 【4】 Büki, K. G. et al.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 16: 253, 1969.
- 【5】 Ахрем, А. А. и Н. Е. Войшвилло: *Прик. Биох. Микробиол.*, 6: 654, 1970.
- 【6】 Tibor, F. and S. Erzsebet H: *Acta Pharm. Hung.*, 44(4): 168, 1974.
- 【7】 Butterfield, A. G. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 64: 441, 1975.
- 【8】 Ivashkin, E.: *Biotechnol. Bioeng.*, 13: 561, 1971.