

# 用高效液相色谱法测定开裂甾体化合物

徐诗伟 孙筱林\*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

**摘要** 用反相 HPLC 内标定量方法测定 18-甲基-3-甲氧基-8, 14-开裂雌甾-1, 3, 5(10), 9(11)-四烯-14, 17-二酮微生物不对称还原成具有光学活性 17 $\beta$ -羟基化合物的转化率。色谱采用  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 色谱柱; 甲醇-水 73:27(V/V) 为流动相, 流量 0.8 ml/min; UV 254 nm 检测; 雌甾-4-烯-3, 17-二酮作内标。

**关键词** HPLC; 微生物不对称还原; 17 $\beta$ -羟基-18-甲基-3-甲氧基-8, 14-开裂雌甾-1, 3, 5(10), 9(11)-四烯-14-酮

17 $\beta$ -羟基-18-甲基-3-甲氧基-8, 14-开裂雌甾-1, 3, 5(10), 9(11)-四烯-14-酮(简称开裂醇, 以 P 表示)是全合成避孕药 D-18-甲基炔诺酮的重要前体, 可由相应开裂-14, 17-二酮(简称开裂二酮, 以 S 表示)为基质经酵母菌立体选择性还原制得<sup>[1,2]</sup>。在还原过程中对发酵液中产物的分析, 我们曾用 TLC 斑点洗脱法进行紫外定量<sup>[2]</sup>。现介绍用反相 HPLC 以雌甾-4-烯-3, 17-二酮(简称 4AD; 以 I<sub>s</sub> 表示)为内标定量测定方法。

## 材料和方法

### (一) 仪器及色谱条件

法国 Gilson HPLC 仪; 色谱柱:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (30 cm  $\times$  3.9 mm I. D., 10  $\mu$ m); 紫外检测波长 254 nm, 0.2 Abs; 流动相: 甲醇-水 73:27 (V/V); 流量 0.8 ml/min; 纸速 2 mm/min。

### (二) 甾体化合物

开裂二酮: 北京第三制药厂提供; 开裂醇: 本所实验室制备的分析样品; 4AD: 美国 Sigma 化学公司产品。上述三种化合物分别准确配制成 0.2 mg/ml 甲醇溶液。

### (三) 发酵液预处理

取发酵液 2 ml, 用 4 ml 氯仿提取, 取 100

$\mu$ l 有机相蒸干后于残余物中加入含 0.6  $\mu$ g 内标物的 4AD 甲醇溶液, 再加甲醇至 0.5 ml。此试样离心后供进样用。

### (四) 定量方法

采用峰高值 (mm) 以 4AD 内标定量, 产物的转化率 (T) 按下式计算:

$$T(\%) = \frac{W_P}{W_S + W_P} \times 100$$

$W_S$ 、 $W_P$  分别为发酵液中基质和产物的含量。

## 结果

### (一) 分离图谱

将配制的 4AD、开裂醇和开裂二酮甲醇溶液混合后按上述色谱条件进样, 结果见图 1。由图可见, 三种化合物完全被分离, 其保留时间( $t_R$ ) 依次为 8.3, 12.0 和 14.9 分。

### (二) 开裂醇和开裂二酮曲线的制作

从 0.2 mg/ml 开裂醇和开裂二酮甲醇溶液中分别取 1, 3, 4, 5 和 7 ml 各加入 1 ml 0.2 mg/ml 4AD 甲醇溶液, 混合后进样量为 5  $\mu$ l。测量开裂醇和开裂二酮分别对内标物的峰高比 ( $H_i/H_{is}$ ), 并分别以与内标物的重量比 ( $W_i/W_{is}$ ) 为横坐标, 相应  $H_i/H_{is}$  为纵坐标绘制成

\* 山东大学微生物系八八届毕业生; 本工作承法幼华先生的支持, 谨致谢意。



图1 峰序 1.4AD; 2.开裂醇; 3.开裂二酮

开裂醇和开裂二酮曲线,选定每 ml 含 0.2mg—1.4 mg 范围内呈线性关系良好。经线性回归得开裂醇  $y = 0.920x - 0.022$  相关系数

$$r_p = 1.000;$$

开裂二酮  $y = 0.671x - 0.104$  相关系数

$$r_s = 0.999。$$

### (三) 转化率的测定

取微生物还原 24 和 48 小时的发酵液经预处理后进样 5  $\mu$ l,每一时间重复四次。根据开

裂醇或开裂二酮与 4AD 的峰高比由回归方程求得各自含量计算转化率。

由测定结果可见(表 1),最大相对平均偏差在 1%之内。

表 1 转化率的测定

转化时间(h)	进样次数(n)	转化率(%)	平均转化率(%)	平均偏差(%)	相对平均偏差(%)
24	1	45.0	44.5	0.35	0.8
	2	44.7			
	3	44.2			
	4	44.1			
48	1	86.3	86.1	0.28	0.3
	2	86.4			
	3	85.6			
	4	86.0			

### (四) 回收率测定

将 0.2 mg/ml 的开裂醇、开裂二酮和 4AD 甲醇溶液分别以 2:3:1, 3:2:1, 4:1:1 体积比混合,各取 9  $\mu$ l 重复进样两次,由相应峰高比计算开裂醇和开裂二酮含量测定回收率。表 2 结果表示开裂醇和开裂二酮的平均回收率分别为 97.7, 100.5%。

表 2 回收率测定

进样次数(n)	开 裂 醇			开 裂 二 酮		
	加入量( $\mu$ g)	测得量( $\mu$ g)	回收率(%)	加入量( $\mu$ g)	测得量( $\mu$ g)	回收率(%)
1	0.6	0.591	98.5	0.9	0.892	99.1
2	0.6	0.586	97.7	0.9	0.907	100.8
3	0.9	0.898	99.8	0.6	0.601	100.1
4	0.9	0.878	97.6	0.6	0.592	98.7
5	1.2	1.158	96.5	0.3	0.302	100.7
6	1.2	1.153	96.1	0.3	0.311	103.7

## 讨 论

上述 HPLC 内标定量法测定发酵液中开

裂醇转化率操作简便、灵敏、重复性好。分析结果与 TLC-分光光度法相比基本一致(表 3)。

### 参 考 文 献

- [1] Rufer, C. et al.: *Liebigs Ann. Chem.*, 702:141—148, 1967.
- [2] 法幼华等: *微生物学报*, 18(3):232—238, 1978.

表 3 HPLC 和 TLC 测定结果比较

	HPLC 法				TLC-UV 法			
	1	2	3	4	1	2	3	4
测定次数(n)	86.3	86.4	85.6	86.0	88.0	87.3	87.9	88.5
转化率(%)								
平均转化率(%)		86.1				87.9		
S. D.(%)		0.36				0.49		
C. V.(%)		0.42				0.56		