

雄甾-4-烯-3,17-二酮的浓硫酸乙酸酐分光光度测定

汪文俊,刘妍

(中南民族大学 生命科学学院,武汉 430074)

摘要 为建立一种雄甾-4-烯-3,17-二酮(4-AD)快速而简便的测定方法,用乙酸乙酯-浓硫酸(15:1,v/v)溶液溶解4-AD标准品,配成标准溶液,并稀释为一定的浓度梯度后加乙酸酐反应15 min,测定吸光度,绘制标准曲线,进行稳定性试验、加样回收率试验和精密度试验,并通过分光光度法检测分支杆菌转化植物甾醇所得转化液中4-AD含量,与高效液相法进行了比较。结果表明:4-AD在0.08~0.48 mg/mL的范围内呈良好线性关系,相关系数 $R^2 = 0.9993$,精密度RSD为0.672%,样品平均回收率为99.69%,分光光度法和高效液相方法检测结果差异不显著($p > 0.05$)。故此法操作简单、快速,准确性高,重现性好。

关键词 分光光度法;雄甾-4-烯-3,17-二酮;浓硫酸-乙酸酐;分支杆菌;植物甾醇

中图分类号 TQ 224.23; O 657.32 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2014)04-0043-04

The Determination of 4-Androstene-3,17-Dione by Spectrophotometry Using Concentrated Sulfuric Acid and Acetic Anhydride as Solvent

Wang Wenjun, Liu Yan

(College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract To develop a quick and convenient analysis method for 4-androstene-3,17-dione (4-AD), standard was dissolved in concentrated sulfuric acid and acetic anhydride (volume ratio = 15 : 1) and diluted to different concentrations. Acetic anhydride was added to react 15 min, and the absorbency was measured. The stability, average recovery rate and precision of the experiment were evaluated based on the standard curve. The content of 4-AD in the broth by biotransforming phytosterols using *Mycobacterium neoaurum* were analyzed by our spectroscopic method and high pressure liquid chromatography (HPLC), respectively. The results indicated that when the concentration of 4-AD were in the range of 0.08 ~ 0.48 mg/mL, the linear correlation was excellent ($R^2 = 0.9993$), and the average recovery rate and precision were 99.69% and 0.672% (RSD), respectively. There was no significant difference between the results of the spectroscopic and HPLC methods ($p > 0.05$). So this is an effective, simple, and rapid method with high accuracy and repeatability for the analysis of 4-AD.

Keywords spectrophotometry; 4-androstene-3,17-dione; concentrated sulfuric acid; acetic anhydride; *Mycobacterium neoaurum*; phytosterol

雄甾-4-烯-3,17-二酮(4-androstene-3,17-dione, 简称雄烯二酮或4-AD)是甾体激素类药物不可替代的中间体,几乎所有甾体激素药物都能以4-AD为起始原料生产^[1]。作为前体,4-AD能继续合成类皮质激素、雌激素、雄激素等甾体类激素药物,是目前激素类中间体研究的热点^[2]。

目前4-AD的测定方法主要有薄层层析法、气

相色谱法、高效液相色谱法和毛细色谱法等^[3-7]。薄层层析法准确度不高且操作时间长,色谱法因其测定准确、灵敏度高而被普遍采用,但设备使用维护昂贵,多样品时操作时间长,仪器超负荷运转。依据4-AD在酸性条件下可转化为烯醇式结构,能与醋酐、浓硫酸发生特征性颜色反应(Lieberman反应)的性质^[8],本文采用浓硫酸-乙酸酐为反应溶剂,利用分

收稿日期 2014-05-12

作者简介 汪文俊(1973-)男,副教授,博士,研究方向:天然产物与动物营养, E-mail: hustwsir@126.com

基金项目 中国博士后基金资助项目(20090460950)

光光度计探讨了4-AD快速而准确测定的方法,该方法测定结果准确、耗时短、费用低、节约成本,具有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 试样和仪器

雄甾-4-烯-3,17-二酮标准品(SIGMA),测试样为本室保存菌种 *Mycobacterium neoaurum* 转化植物甾醇所得4-AD萃取液,参见文献[8]。浓硫酸、乙酸酐、乙酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司),所有试剂均为分析纯。紫外分光光度计(UV-2000,尤尼柯上海仪器有限公司),电子分析天平(ALC-310.3, ACCULAB),高效液相色谱仪(UltiMate 3000,戴安公司)。

1.2 溶液的配制

乙酸乙酯-浓硫酸溶液的制备:量取150 mL乙酸乙酯,缓慢加入浓硫酸10 mL,混合均匀。4-AD标准溶液的制备:精确称取4-AD标准品80 mg,用上述乙酸乙酯-浓硫酸溶液40 mL溶解,配成2.0 mg/mL的4-AD标准溶液。

1.3 浓硫酸乙酸酐法测定4-AD

1.3.1 标准品紫外扫描

取3 mL 4-AD标准溶液于比色皿中,用紫外分光光度计进行紫外扫描,以确定4-AD的最大吸收峰。

1.3.2 线性范围

精密吸取4-AD标准液0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL于试管中,分别用体积比为15:1的乙酸乙酯-浓硫酸溶液稀释至3 mL,摇匀,加入2 mL乙酸酐,轻轻振摇,室温下反应15 min,用1 cm石英比色皿,在上述确定的波长下测定吸光度。空白对照为乙酸乙酯-浓硫酸溶液3 mL,其余操作同前。根据吸光度(y)和浓度(x)关系绘图,得4-AD的线性范围、回归方程和相关系数。

1.3.3 精密度

精密度指用该方法重复测定同一均质样品所得的测定值彼此接近程度,表示分析结果的重复性,常用相对标准偏差(RSD)表示。

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \times 100\% \quad (1)$$

按上述方法,在同一天内连续5次测定混合标准溶液,以各组分的吸光值,计算相对标准偏差。

1.3.4 准确度

准确度是指用该方法测定的结果与真实值或参考值接近的程度,一般用回收率(%)表示(2)。准确度应在规定的范围内测试,用于定量测定的分析方法均需做准确度验证。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测定值} - \text{空白值}}{\text{添加量}} \times 100\% \quad (2)$$

取4-AD标准品2 mg,采用与待测样品相同的处理方法制备样品,重复测定5次。利用外标法计算出4-AD的值,进而计算出4-AD的回收率(%)和平均回收率。

1.3.5 稳定性

精确吸取4-AD标准液1 mL,用乙酸乙酯-浓硫酸溶液稀释至3 mL,摇匀,加入2 mL乙酸酐,轻轻振摇,室温下反应15 min,密封保存,分别于0, 0.5, 1, 1.5, 2 h测定吸光度。

1.3.6 样品的测定

取3个试管,分别加入1 mL甾醇转化液,再用3 mL乙酸乙酯萃取后取上清备用。分别取1 mL上清液在沸水浴中将其蒸干,冷却至室温,加15:1的乙酸乙酯-浓硫酸3 mL,充分振摇使其完全溶解。其余操作与标准曲线制作法相同。利用标准曲线线性方程计算样品溶液中4-AD的质量浓度(mg/mL)。上述样品采用HPLC进行测定,方法见文献[8]。

2 结果与讨论

2.1 波长的选择

4-AD在浓硫酸存在下能发生酮式、烯醇式互变,转化生成烯醇式结构,从而与乙酸酐-浓硫酸发生特征性颜色反应(Lieberman反应)。在紫外分光光度计上对4-AD的标准溶液进行紫外扫描,因吸收波长小于220 nm时,吸收干扰较大,故选定大于220 nm的波长对4-AD标准品进行全波长扫描,结果如图1所示,图1中4-AD在312 nm处有最大吸收峰,故选定4-AD的检测波长为312 nm。

2.2 浓硫酸乙酸酐法测定4-AD

2.2.1 浓硫酸乙酸酐法线性检测

在波长312 nm下,对不同浓度的4-AD标准品测定吸光度,以验证浓硫酸乙酸酐法的线性,结果如图2所示。由图2算得4-AD的回归方程为: $y = 0.714x$ (y 为吸光值, x 为4-AD浓度),相关系数 $R^2 = 0.9993$ 。说明在0.08~0.48 mg/mL范围内4-AD的吸光值与浓度的线性关系良好。

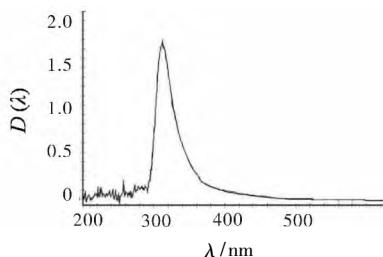


图 1 4-AD 标准品的紫外全波长扫描图

Fig. 1 The scanning curve of 4-AD standard under ultraviolet broad spectrum

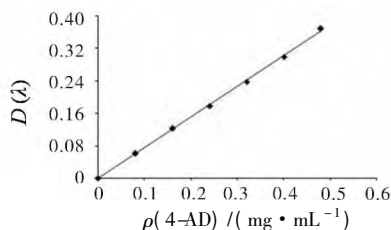


图 2 4-AD 标准曲线

Fig. 2 The 4-AD standard curve analysis

2.2.2 精密度试验

在波长 312 nm 下 在 0.08 ~ 0.48 mg/mL 范

围内,选取样品浓度为 0.48 mg/mL,通过测定其吸光值,研究了测定结果的精密度实验,结果见表 1. 由表 1 可算得 4-AD 的 RSD 为 0.672%,说明该方法精密度较高.

2.2.3 准确度试验

在波长 312 nm 下,加入 2.00 mg 标准品,按上述方法配置成浓度为 0.40 mg/mL 的标准溶液,在 0.08 ~ 0.48 mg/mL 范围内,测定其吸光值,研究了测定结果的准确度实验,结果如表 2 所示.可见 4-AD 的平均回收率为 99.69%,说明该方法准确度较高,可满足科研工作及生产中常规测定的要求.

2.2.4 稳定性验证

在波长 312 nm 下,在 0.08 ~ 0.48 mg/mL 范围内,选取样品浓度为 0.40 mg/mL,通过测定其吸光值,研究了测定结果的稳定性实验,结果如表 3 所示.表 3 中可见 RSD 为 1.968%,表明供试品溶液在 2 h 内是稳定的.

表 1 4-AD 精密度

Tab. 1 The RSD of 4-AD analysis

样品	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	RSD/%
吸光值	0.361	0.357	0.360	0.355	0.359	0.672

表 2 4-AD 回收率

Tab. 2 The recovery rate of 4-AD analysis

编号	加入量/mg	测定值/mg	回收率/%	平均回收率/%
1	2.0000	1.9798	98.99	99.69
2	2.0000	2.0243	101.22	
3	2.0000	1.9670	98.35	
4	2.0000	2.0052	100.26	
5	2.0000	1.9925	99.63	

表 3 稳定性试验结果

Tab. 3 Results of stability test

编号	放置时间/h	测定值	平均吸光度	RSD/%
1	0.0	0.299	0.307	1.968
2	0.5	0.304		
3	1.0	0.307		
4	1.5	0.310		
5	2.0	0.315		

2.2.5 样品测定

在波长 312 nm 下,对样品含量进行测定,测得样品的浓度分别为:1.548,1.545,1.547 mg/mL. 样品测得的含量相差不大,平均浓度为(1.547 ± 0.002) mg/mL,与 HPLC 测定结果(1.545 ± 0.002)

mg/mL 相比, $p > 0.05$,无显著差异,说明该法可用于样品的测定,结果可靠,可用于将来的工业化生产中的常规测试.

3 结语

本文建立的雄甾-4-烯-3,17-二酮的浓硫酸乙酸酐-分光光度法,利用其 Lieberman 反应,在 312 nm 处有最大吸收值的特征,通过测定吸光值,获得标准曲线线性关系良好,回收率较高,精密度良好,样品检测结果与 HPLC 检测结果之间差异不显著,可用此法于雄甾-4-烯-3,17-二酮的检测,具有良好的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Garrido M, Bratoeff E, García-Lorenzana M, et al. Biological evaluation of androstene derivatives [J]. *Arch Pharm* 2013, 346(1): 62-70.
- [2] 袁东超,董艳苓,杜连祥. 分枝杆菌降解大豆甾醇侧链的发酵研究 [J]. *天津轻工业学院学报*, 2003, 18(4): 11-23.
- [3] Wenqing Zhang, Minglong Shao, Zhiming Rao, et al. Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-4-ene-3,17-dione by recombinant *Bacillus subtilis* expressing ksdd gene encoding 3-ketosteroid-Δ1-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12 [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 135: 36-42.
- [4] Andrúsi N, Helenkúr A, Vasánits-Zsigrai A, et al. The role of the acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and cholic acids by gas chromatography – mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A* 2011, 1218(45): 8264-8272.
- [5] Onuchak L A, Kudryashov S Y, Arutyunov Y I, et al. Influence of flow parameters of the mobile phase on the retention and thermodynamic characteristics of sorption in gasliquid chromatography [J]. *Russ J Phys Chem*, 2006, 80(8): 1315-1320.
- [6] Matsuoka C, Nohta H, Kuroda N, et al. Simultaneous determination of cholestanol and cholesterol in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr*, 1985, 42(14): 432-436.
- [7] Muskiet F A J. Capillary gas chromatographic profiling of total long chain fatty acids and cholesterol in biological materials [J]. *J Chromatogr*, 1983, 29(9): 231-244.
- [8] Wang W J, Yu L. Preparation, characterization, and biotransformation of the inclusion complex of phytosterols and hydroxypropyl-β-cyclodextrin by *Mycobacterium neoaurum* [J]. *Z Naturforsch C*, 2011, 66(5/6): 277-282.