

高效液相色谱法测定发酵液中截短侧耳素的含量

邹 祥

(西南大学生命科学学院,重庆,400715)

摘 要 建立了测定发酵液中截短侧耳素含量的高效液相色谱法。发酵样品用甲醇萃取后进样,色谱柱 Shim-pack VP-ODSC18($5\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\times 200\text{ mm}$),流动相为甲醇:0.1 mol/L KH_2PO_4 (50:50,体积比),流速为 1.00 mL/min,紫外检测波长 205 nm 和柱温 25°C 。结果表明,截短侧耳素在 $106.25\sim 2\,500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $y=1790.3x+145405$, $r=0.9996$,平均回收率为 96.5%,最低检测限为 3.28 ng。该法具有操作简单、快速、回收率好和准确性好等优点,可有效地检测发酵液中截短侧耳素的含量。

关键词 截短侧耳素,高效液相色谱法,发酵液

截短侧耳素(Pleuromutilin)是一种二萜烯类抗生素,从截短侧耳素中半合成可得到泰妙菌素,截短侧耳素和泰妙菌素作为抗生素类药物,目前被广泛用作兽药,以饲料添加剂形式使用,主要用于治疗革兰氏阳性细菌、密螺旋体、钩端螺旋体与支原体^[1,2]目前国内生产规模较小,在截短侧耳素产生菌的菌种选育和发酵工艺研究过程中,需要建立一种对截短侧耳素组分和含量的快速检测方法。目前,在药典中还无相关的检测方法,本实验室曾建立常规的化学分析方法如紫外吸收法,由于前处理时间长、误差大等原因,无法进行发酵菌株选育及发酵工艺过程控制的定量分析。本研究采用反相高效液相色谱法,选择合适的分离条件(如色谱柱、流动相、流动相流速、最大吸收波长等),对发酵液中截短侧耳素的定量测定进行了研究,获得了较为满意的结果,可作为截短侧耳素的质量检测控制方法。

1 仪器与药品

1.1 仪 器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,UV-2100 型紫外可见分光光度计(岛津),电子分析天平(梅特勒, $d=0.1\text{ mg}$), $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂),台式冷冻高速离心机 TG-16B(长沙湘仪离心机厂)。

1.2 药 品

甲醇(色谱纯,天津大发试剂厂)、 KH_2PO_4 (分析纯,上海试剂一厂)、超纯水(自制)。

2 实验方法与结果

2.1 色谱分析条件

色谱柱:岛津 Shim-pack VP-ODSC18($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\times 200\text{ mm}$);流动相:甲醇-0.1 mol/L KH_2PO_4 (50:50,体积比);流速 1.00 mL/min;检测波长 205 nm;进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$;柱温 25°C 。

2.2 溶液的制备

(1)对照品的制备。精确称取 100.00 mg 的截短侧耳素对照品(自制,纯度 95%),用甲醇溶解,定容至 200 mL,配成浓度为 500 mg/L 的截短侧耳素贮备液(4°C 避光保存,1 周后使用)。临用时用甲醇稀释至所需浓度即得截短侧耳素对照溶液,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,滤液用于 HPLC 测定。

(2)发酵液样品的制备。取 10 mL 截短侧耳素发酵液,加入一定量的甲醇,充分振荡后, $4\,000\text{ r/min}$ 离心 20 min 除去菌丝体,取上清液用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,即得到待测液。

2.3 检测波长的确定

将截短侧耳素的对照品溶解于甲醇中,制备成浓度约 5 mg/L 的溶液,在 200~400 nm 的波长范围进行紫外光全波扫描(图略),从光谱图中看出,截短侧耳素的吸收波长较弱,最大吸收波长为 205 nm,故选择 205 nm 作为检测波长。

2.4 流动相和流速的确定

实验中曾采用乙腈-磷酸(体积比 45:55)作为流动相。样品出峰时间较短,分离效果差,考虑到乙腈价格较高,流动相 pH 过低,从操作成本和分离效果上考虑,参考其他相关文献^[3-5],分别配制不同组成的流动相进行试验,经过多次筛选,结果表明,甲醇-0.1 mol/L KH_2PO_4 (50:50,体积比)的系统效果最

第一作者:硕士。

收稿日期:2005-11-20,改回日期:2006-01-19

好。同时,对不同流速(0.80、1.00、1.20 mL/min)条件下的分离情况进行研究。与 1.00 mL/min 相比较,流速为 0.80 mL/min 时保留时间增加,分离效果较差;流速为 1.20 mL/min 时保留时间缩短,但不明显,且分离效果与 1.00 mL/min 相差不大,考虑到柱压的因素,最终确定流速为 1.00 mL/min。

2.5 标准曲线的绘制

定量方法用外标法,用甲醇将截短侧耳素对照储备液分别稀释为 50.00、106.25、625.00、1 250.00、2 500.00 $\mu\text{g/mL}$,在上述优化的色谱条件下进样 20 μL ,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作标准曲线,线性回归方程为: $y = 1\,790.3x + 145\,405$, $r = 0.999\,6$,结果表明,在 106.25~2 500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.6 最低检测限

在选定的色谱条件下,当信噪比为 3 时对最低检测限进行测定,结果表明,截短侧耳素的最低检测限为 3.28 ng。

2.7 加样回收率的测定

精密量取已知含量的发酵液 5 mL 共 3 份,分别加入 1 250 $\mu\text{g/mL}$ 标准品溶液 0.5、1.0、2.0 mL,精确进量 20 μL ,每份进样 5 次,测出其峰面积,平均回收率 96.5%, $\text{RSD} < 3\%$ 。

2.8 发酵液样品的测定

在上述优化的色谱条件下,对照品和经过处理后的发酵液样品得到充分的洗脱和分离,保留时间分别为 11.586 和 11.644 min,色谱图见图 1 和图 2。从图 1 和图 2 中可知,在本色谱条件下,发酵液中的截短侧耳素能得到很好的分离,保留时间与对照品基本一致,且无明显的干扰峰。

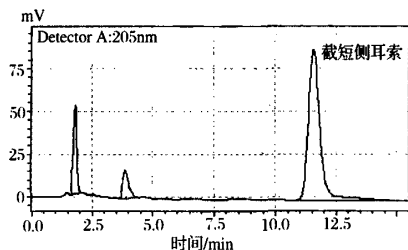


图 1 对照品色谱图

分别取 3 个批次的发酵液,按上述方法测定,结果见表 1。

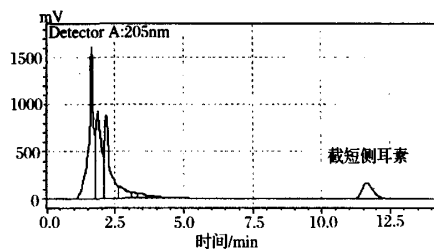


图 2 样品色谱图

表 1 发酵液中截短侧耳素测定结果

批次	截短侧耳素含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
1	3.84
2	3.65
3	3.48

3 讨论

在现行药典中还没有截短侧耳素的相关检测方法。作者曾试图采用紫外分光光度法对发酵液中的截短侧耳素进行定量分析,但因截短侧耳素最大紫外吸收波长较低(仅为 205 nm),紫外定量分析结果误差较大,同时由于发酵液中成分复杂,未能取得良好的分析效果;而采用高效液相色谱法测定,检测精度显著提高,干扰小,而且本法的色谱系统简单,操作简便、快速、试剂易得、费用低廉,适合于发酵液中截短侧耳素的常规检测。在截短侧耳素产生菌的菌种选育和发酵工艺研究中,采用本法,可有效地对菌株生产能力和发酵条件进行评价,为菌株改良,发酵与分离工艺的优化,提高单位发酵液的抗生素产率和分离提取的收率提供了有效的分析分离手段。

参考文献

- 郭 腾. 动物专用抗生素类新药沃尼妙林研究进展[J]. 兽药与饲料添加剂, 2003, 8(5): 8~10
- Matous Heinrich F. Pleuromutilin derivative complexes[P]. U S Pat: 5,578,585, 1996-08-21
- Waldvogel Erwin. Novel process for the production of antibacterially active pleuromutilin derivatives[P]. U S Pat, 4,107,434. 1978-08-15
- Michael P, Schlusener, Kai Bester, et al. Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(7): 942~945
- Michael P, Schlusener, Michael S, et al. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1003(5): 21~23

Determination of Pleuromutilin in Fermentation Broth by HPLC

Zou Xiang

(School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT A RP-HPLC method for the determination of pleuromutilin fermentation broth was developed. The fermentation broth was extracted by methanol and the extraction was analysed by HPLC. The sample was separated at temperature 25°C on a Shim-pack VP-ODSC18(5 μ m, 4.6 mm \times 200 mm) eluted at a flow rate of 1.00 mL/min with mobile phase of methanol-0.1 mol/L KH_2PO_4 (50:50, V/V), pleuromutilin was detected and quantified by the absorbance at 205 nm. The linearity was obtained over the range of 106.25~2500 μ g/mL for pleuromutilin with the coefficient being 0.9996 and the regression equation being $y = 1790.3x + 145405$. The average recovery was 96.5% and the detective limit was 3.28 ng. This method is simple, accurate, highly specific and reliable for the determination of pleuromutilin.

Key words pleuromutilin, HPLC, fermentation broth

(上接第 82 页)

Determination of Oligomeric Proanthocyanidins in Grape Seeds by RP-HPLC/ESI-MS

Ren Qilong Wei Guanhong Jin Micong Su Baogen Huang Mei

(National Laboratory of Secondary Resources Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

ABSTRACT A method has been established for the identification of oligomeric proanthocyanidins in grape seeds using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography /Electrospray Ionization Mass Spectrometry. The purified proanthocyanidins, which were extracted from grape seeds by 60% ethanol in water, were eluted by gradient CH_3CN -1% CH_3COOH in H_2O from ZORBAX SB-C₁₈ column. Mass detection was performed in the negative ion mode. According to the mass of charged quasi-molecular ion $[\text{M}-\text{H}]^-$, Three monomers, eight dimers, four monogalloylated dimers and four trimers were identified. At the same time, we have discussed the proposed ESI-MS fragmentation pathways of proanthocyanidins.

Key words proanthocyanidins, RP-HPLC, ESI-MS, grape seeds

行业动态

彪拉克(PVRAC)公司在泰国兴建亚洲最大的乳酸厂

世界上最大的乳酸厂荷兰彪拉克公司目前正在泰国兴建亚洲最大的乳酸厂。因为可利用泰国廉价而丰富的木薯等原料,故预期市场竞争力极强,初期投资为 130 亿日元,2008 年初完成年产 10 万 t 的生产能力。原先该公司的荷兰本部加上西班牙、法国、美国(与嘉吉公司合资)的分厂,届时总产量可达 20 万 t 之多,将是目前产量的 1.5 倍。而首先进入亚洲(中国)的日本武藏野化学研究所、比利时加拉古特与中国 BBKA 公司合资的 B.G 公司则分别次之。

乳酸及其衍生物的应用领域很广,世界市场正以每年 10% 的速度增长,估计需求量达 25~28 万 t/年。因美国农业部等对付里斯特菌而推行在畜肉制品中添加乳酸钠,致使市场需求急增,再从环保需要的角度考虑,利用植物性塑料(聚乳酸)原料制作的器具将会额外引人注目,特别是精制乳酸,在亚洲中国、印度等发展中国家,在食品加工,营养强化食品领域以及医药中间体,半导体工业等的市场发展潜力很大。该公司选择在泰国开设第 5 个生产基地,正是瞄准亚洲经济增长的全球战略的重要一环。