

HPLC法测定金褐霉素生物效价的研究

孟宪军¹, 魏杰^{1,2}, 王琼¹, 李辉²

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110161;

2.辽宁大学生命科学院, 辽宁沈阳 110036)

摘要:目的:建立高效液相色谱(HPLC)测定发酵液中金褐霉素的方法。方法:发酵液样品取1mL,加入9mL甲醇,充分震荡后离心除去菌丝体的不溶物,取1mL上清液用甲醇进行10倍的稀释后,高速离心所得上清液即为待测液。色谱柱为BONDAPAK™C₁₈柱,流动相为甲醇:水:冰醋酸(48:32:1, v/v),流速1.0mL/min,紫外检测波长302.5nm。结果:在上述色谱条件下,金褐霉素分离良好,回归方程为 $Y = 8 \times 10^7 X - 381894$,相关系数 $R = 0.9998$,线性范围为1~1000μg/mL,最低检测浓度为0.001mg/mL。结论:通过加入甲醇,建立了HPLC法测定发酵液中金褐霉素浓度的方法。此法操作简单,耗时少,有良好的准确度,适用于生物效价检测。

关键词:金褐霉素,大孔吸附树脂,紫外光谱,HPLC法

Study on determination of aureofuscin biological value by HPLC

MENG Xian-jun¹, WEI Jie^{1,2}, WANG Qiong¹, Li Hui²

(1.Food Sciences Academy, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China;

2.Life and Sciences Academy, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Objective: To develop a method for determination of aureofuscin in fermented broth using HPLC. Methods: 1mL of the fermented sample was precipitated adding 9mL methanol by centrifuge after thoroughly shocking, then mycelial insoluble substance was removed. We can obtain supernatant fluid by high speed centrifugation after 1mL of supernatant fluid was diluted by 10 multiple methanol. BONDAPAK™C₁₈ column was used as stationary phase and the ratio of methanol, water and glacial acetic acid was 48:32:1 as mobile phase, flow rate was 1.0mL/min, UV wavelength was at 302.5nm. Results: The typical chromatogram of fermented samples showed clear separation from aureofuscin. Regression equation was: $Y = 8 \times 10^7 X - 381894$, $R = 0.9998$. The linear range was 1 ~ 1000μg/mL and the lowest detection density was 0.001mg/mL. Conclusion: HPLC method for determination of aureofuscin in fermented broth was developed by adding methanol.

Key words: aureofuscin; macroporous resin; ultraviolet spectroscopy; HPLC method

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)02-0299-03

金褐霉素(Aureofuscin)是链霉菌新种—金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus.n.sp*)产生的一种四烯大环内酯类抗真菌抗生素,其化学结构与国外文献报道的纳他霉素(Natamycin)结构相似。早期研究表明,金褐霉素对霉菌、多种酵母菌及丝状真菌有很强的抗菌作用,但不抗细菌,临床上用于治疗真菌性角膜炎,其疗效优于两性霉素B,同时对一些真菌引起的皮肤病及霉菌性阴道炎等也有很好疗效。金褐霉素早在1975年发现时只作了早期化学结构和初步药效实验后,一直未作深入研究和进行产业化开发^[1-3]。迄今为止,国内真正拥有自主知识产权的四烯类抗生素只有金褐霉素。在1997年我国正式批准使用纳他霉素作为安全食品防腐剂后,金褐霉素

才被重新重视起来,由于未作高产菌种选育和分离提取工艺的深入研究,发酵单位和提取收率都不高,难以达到产业化开发要求^[4-6]。金褐霉素与纳他霉素有着相似的化学结构和生物活性,而纳他霉素现在主要依赖进口,鉴于此,金褐霉素的研究开发在真菌疾病的防治和食品防腐上显示出了极好的应用前景和市场潜力,这对促进新药研制、食品防腐和发酵工业的发展都具有积极意义。目前还没有关于金褐霉素提取和检测方面的研究报道。本研究采用大孔吸附树脂从发酵液中分离提取金褐霉素,并对所得提取物用高效液相色谱进行分析,找到较优的提取工艺和检测条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus.n.sp*)由沈阳农业大学食品学院实验室保存;金褐霉素标样,色谱纯甲醇,超纯水。

收稿日期:2008-03-14

作者简介:孟宪军(1960-),男,教授,博士,现从事果蔬加工教学与科研。

高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; GS-6 BECKMAN 高速离心机, HS-1000D 超声波清洗机, Sartorius-CP64 电子天平。

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶发酵实验 将斜面活化好的菌种用挖块法接种于装有 50mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中, 摇床培养, 在 29℃、220r/min 条件下培养 40h, 使菌体处于迅速生长期。然后以 10% 的接种量接种种子液到装液量为 50mL 的 250mL 三角瓶中, 在 29℃、220r/min 条件下摇床发酵 72h。

1.2.2 发酵样品处理 取发酵液(总体积 6.0L) 1mL, 加入 9mL 甲醇, 充分震荡后离心(3000r/min, 20min) 除去菌丝体的不溶物, 取 1mL 上清液用甲醇进行 10 倍数的稀释后, 高速离心(10000r/min, 10min) 所得上清液即为待测液。

1.2.3 金褐霉素的提取 取发酵液 3000r/min 离心 20min, 保留上清液。将含有菌丝体的不溶物用 95% 的乙醇浸提 2 次, 合并浸提液, 减压浓缩至原发酵液体积的 1/4, 将浓缩液和保留的上清液充分混合, 并调 pH 至 8.0。将混合液过大孔吸附树脂 HP-10 树脂柱, 80% 乙醇洗脱, 将洗脱液减压浓缩、抽滤得到黄色粉末, 在甲醇中重结晶得到金褐霉素结晶物。

1.2.4 金褐霉素含量的测定 采用高效液相色谱法(HPLC)。通过紫外分光光度计在波长 200~400nm 内扫描, 获得金褐霉素最大吸收波长作为金褐霉素的检测波长。

1.2.5 色谱条件 色谱柱: BONDAPAK™ C₁₈; 流动相: 甲醇-水-冰醋酸, 体积比: 48:32:1; 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 302.5nm; 进样量: 10μL。

1.2.6 金褐霉素标准曲线绘制 准确称取 1mg 金褐霉素, 溶于 1mL 甲醇, 制成标准储备液。用储备液配制金褐霉素的系列标准溶液: 0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1mg/mL。其余操作步骤同样品。以峰面积值对标准浓度(mg/mL) 进行直线回归。

2 结果与分析

2.1 金褐霉素的紫外光谱测定

取发酵液 1mL, 加入 9mL 甲醇, 充分震荡后离心除去菌丝体的不溶物, 取 1mL 上清液用甲醇进行 10 倍数的稀释后, 高速离心所得上清液即为待测液。通过紫外分光光度计在波长 200~400nm 内扫描, 获得金褐霉素最大吸收波长为 302.5nm, 因此, 选择 302.5nm 作为金褐霉素的检测波长。

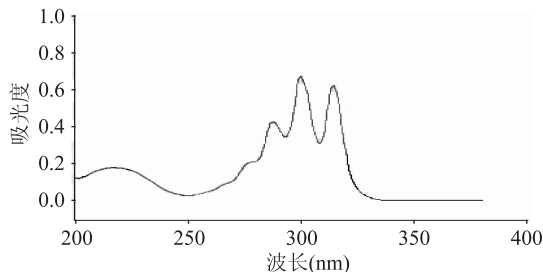


图1 金褐霉素的紫外光谱图

2.2 金褐霉素的高效液相色谱法测定

用 100% 甲醇平衡 C₁₈ 柱, 将发酵液的提取样品上柱, 用 60% 的甲醇(0.1% 冰醋酸) 进行等度洗脱, 检测波长在 302.5nm, 流速 1mL/min, 保留时间在 6.932min 时得到目标产物。在上述色谱条件下, 标化样品和发酵液样品均能实现基线分离, 峰形良好(图 2, 图 3)。

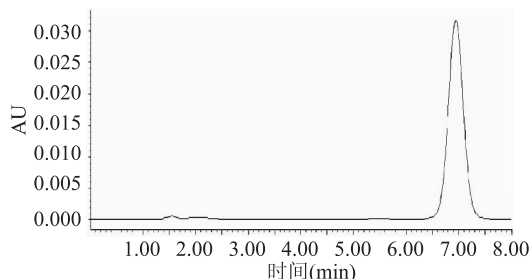


图2 金褐霉素标准品的高效液相色谱图

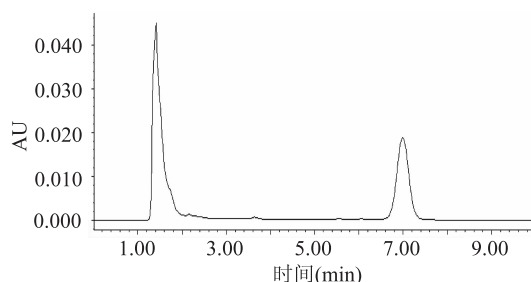


图3 金褐霉素发酵液样品的高效液相色谱图

2.3 标准曲线

本法在 0.001~1mg/mL 之间有良好的线性关系, 回归方程为 $Y = 8 \times 10^7 X - 381894$, 相关系数 $R = 0.9998$ 。

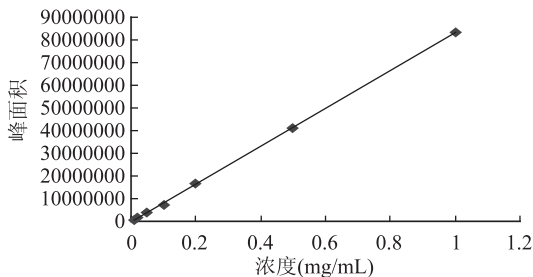


图4 金褐霉素的标准曲线

3 讨论

采用大孔树脂吸附分离方法制得的金褐霉素成品经高效液相分析归一化后, 含量可达到 98%, 比溶剂萃取法制得的成品归一化含量提高很多, 说明大孔吸附树脂对金褐霉素的提取纯化有一定的应用价值。经过分离提取工艺的深入研究, 可以解决提取收率不高, 难以达到产业化开发的问题。

发酵液中金褐霉素测定可以有多种方法, 比如酶法、HPLC 法和质谱法, 其中单纯酶法不如放射性同位素酶法敏感性高, 但后者有放射污染。质谱法精确度好、灵敏度高, 但需要昂贵的仪器, 操作复杂。本研究在样品处理上, 采用甲醇沉淀和高速离心, 避免加入其它化学试剂。在色谱柱的选择上应用了 Waters 公司 BONDAPAK™ C₁₈ 色谱柱, 它对极性化合物有非常强的保留能力。本实验结果显示: 标准样品各浓度的金褐霉素和发酵液中的均能实现基线分离。标准曲线、精密度与回收度均达到满意的结果。

通过金褐霉素高效液相色谱条件的研究,可以不需要纯品,对发酵液采用简单处理方法得到的待测液进行定性定量检测。此法方便快捷,准确度较高,是一种比较理想的快速定性定量检测方法。

参考文献:

[1] 上海药物研究所金褐霉素研究小组. 一种新的抗真菌的抗生素——金褐霉素[J]. 微生物学报, 1975, 15 (3): 180~187.
[2] 周亦昌, 龚炳永. 金褐霉素化学结构的研究[R]. 论文摘要汇编, 1989.20.
[3] Basilico J C , Debasilico M Z , Chlericattic , et al .

Characterization and contron of thread mould in cheese[J]. Lett Appl Microbiol, 2001, 32(6): 419~423.
[4] 王富金, 武济民. 金褐霉素微生物检定法[J]. 抗生素, 1980, 5(5): 25~26.
[5] 范德彰, 蔡松年. 金褐霉素治疗真菌性角膜溃疡——实验研究及 248 例临床疗效观察[J]. 中华眼科杂志, 1985, 21(5): 257~259.
[6] 骆健美, 金志华, 岑沛霖. RP-HPLC 法测定发酵液中纳他霉素含量[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(11): 653~656.
[7] 王华, 高勇生. 金褐霉素产生菌——金褐链霉菌固体种子培养的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 602~605.

(上接第 277 页)

表 1 不同处理南果梨不同部位在果实总体呼吸量中所占的比例

不同处理	全果呼吸 (mgCO ₂ /kg·h)	不同部位	不同部位占果实总呼吸量比例(%)			
			正算	逆算	差值	平均值
9 月 7 日采 CK	8.90	果皮	96.35	91.04	5.31	93.70
		果梗 + 果萼	8.96	3.65	5.31	6.31
		果梗	7.74	2.00	5.74	4.87
		果萼	8.01	2.30	5.71	5.16
9 月 7 日采 1-MCP	1.24	果皮	94.70	90.44	4.26	92.57
		果梗 + 果萼	9.56	5.30	4.26	7.43
		果梗	8.32	2.50	5.82	5.41
		果萼	8.86	2.70	6.16	5.78
9 月 15 日采 CK	16.09	果皮	97.07	95.64	1.43	96.36
		果梗 + 果萼	7.34	2.93	4.41	5.14
		果梗	6.65	1.50	5.15	4.08
		果萼	6.23	1.70	4.53	3.97
9 月 15 日采 1-MCP	2.70	果皮	95.11	90.76	4.35	92.94
		果梗 + 果萼	9.24	4.89	4.35	7.07
		果梗	8.01	3.10	4.91	5.56
		果萼	8.79	2.70	6.09	5.75

很高,故可以推测是因为果核部位处于果实内部,透气性不良,还可能是长期处于无氧呼吸状态所造成的;同时同一产品不同部位呼吸强度就不一样,这是不同部位的物质基础不同,氧化还原系统及组织的供氧情况所造成的。果心部位的高浓度 CO₂ 会对果实本身产生一定的影响,研究发现,CO₂ 在果实组织中溶解成为 CO₃²⁻,会与 Ca²⁺ 结合成为 CaCO₃,从而减少了组织中水溶性 Ca 的含量,而 Ca 具有稳定细胞膜,防止 PPO 与酚类物质的结合的作用^[7],减少 Ca 使其容易发生褐变。而经过 1-MCP 处理之南果梨体内溶解的 CO₂ 较少,有可能是因为经 1-MCP 处理的南果梨呼吸强度较弱,气体交换较少所造成的,而且对照的南果梨后熟较快,组织变软,水分含量增加,也会造成 CO₂ 溶解量增加。

3 结论

3.1 南果梨呼吸主要是通过果皮与外界进行气体交换,果皮部分呼吸量约占整个南果梨呼吸总量的 90% 以上,而果梗、果萼部分各占呼吸总量的 5% 左右;晚采的南果梨呼吸强度要高于早采的南果梨,CK 要明显高于经 1-MCP 处理过的,此外呼吸量愈大,表皮部分呼吸所占比例可能愈大。

3.2 随着 CO₂ 浓度的加大,南果梨组织内 CO₂ 浓度加大;不同部位 CO₂ 的溶解量有很大差异,基本上是从果实的皮下肉、中层肉、果核,由外到里逐步增加,果心部位溶解的 CO₂ 要显著高于果肉;同时未经过 1-MCP 处理的南果梨体内溶解的 CO₂ 要高于经其处理过的南果梨。

参考文献:

[1] 陈祖钺, 李克志, 高燕译. 绪方邦安. 水果蔬菜贮藏概论[M]. 北京: 农业出版社, 1982.74~103.
[2] 闫师杰. 鸭梨采后果实褐变的影响因素及发生机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.76~87.
[3] 孙希生, 王文辉, 李志强, 等. 1-MCP 对砀山酥梨保鲜效果的影响[J]. 保鲜与加工, 2001(6): 14~17.
[4] 胡小松, 王小霞, 肖华志, 等. 天然涂被剂在苹果贮藏保鲜中的作用[J]. 落叶果蔬, 2003(2): 1~3.
[5] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.
[6] 闫师杰, 赵梅霞, 陈计峦, 等. 几种果实不同部位呼吸量的初步研究[J]. 园艺学报, 2005, 33(1): 56~58.
[7] 胡安生, 王少峰. 论水果采后处理和经营管理[J]. 中国果品研究, 1995(3): 3~8.