

## 高效液相色谱法同时检测南昌霉素和梅岭霉素

孙宇晖<sup>1,2</sup>, 周秀芬<sup>1</sup>, 涂国全<sup>2</sup>, 邓子新<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学生命科学技术学院 Bio-X 生命科学研究中心, 上海 200030;

2. 江西农业大学生物工程系 生物技术研究开发中心, 江西 南昌 330045)

**摘要:** 采用高效液相色谱法同时分离测定聚醚类抗生素——南昌霉素和十六元大环内酯类抗生素——梅岭霉素。色谱柱为 Waters XTerra<sup>TM</sup> RP18 柱(3.9 mm i. d. × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈水溶液, 流速为 0.8 mL/min, 其梯度洗脱程序为 57% (体积分数, 下同) 乙腈(30 min) → 70% 乙腈(2 min) → 80% 乙腈(2 min) → 90% 乙腈(16 min)。检测波长为 234 nm, 柱温 25 °C。该法测定的灵敏度高, 加标回收率高, 可用于南昌链霉菌发酵液中南昌霉素和梅岭霉素的定量测定。此法具有灵敏、准确、快速的特点。

**关键词:** 高效液相色谱法; 南昌霉素; 梅岭霉素

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2002)01-0043-03

## Determination of Nanchangmycin and Meilingmycin by High Performance Liquid Chromatography

SUN Yu-hui<sup>1,2</sup>, ZHOU Xiu-fen<sup>1</sup>, TU Guo-quan<sup>2</sup>, DENG Zi-xin<sup>1</sup>

(1. Bio-X Life Science Research Center, College of Life Science & Technology, Shanghai

Jiaotong University, Shanghai 200030, China; 2. Biotechnology Research & Development Center,

Department of Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatographic method had been established for the separation and determination of two antibiotics produced by *Streptomyces nanchangensis*, polyether nanchangmycin and 16-membered macrolide meilingmycin. The latter is composed of several components. The operating conditions were Waters XTerra<sup>TM</sup> RP18 column (3.9 mm i. d. × 150 mm, 5 μm) at 25 °C, mobile phase linear gradient elution of acetonitrile-water with 57:43 (volume ratio) during 0 min—30 min, 70:30 during 30 min—32 min, 80:20 during 32 min—34 min, 90:10 during 34 min—50 min at a flow rate of 0.8 mL/min, and photodiode array detector at 234 nm. This method is accurate, rapid and simple, and can be used for the integrated analysis of the two different natural compounds, polyethers and macrolides.

**Key words:** high performance liquid chromatography; nanchangmycin; meilingmycin

南昌霉素(nanchangmycin)和梅岭霉素(meilingmycin)是由南昌链霉菌(*Streptomyces nanchangensis* n. sp. Yan et Ouyang)产生的两种抗生素<sup>[1]</sup>。其中南昌霉素的化学结构和理化特性经鉴定与猎神霉素(dianemycin)同质, 属聚醚类抗生素, 对防治鸡球虫病有显著效果。梅岭霉素则是与密尔比霉素(milbemycin)和阿弗菌素(ivermectin)具有相同母核, 但侧链完全不同的十六元大环内酯类抗生素, 具有广谱、高效的杀虫活性<sup>[2]</sup>。

南昌霉素和梅岭霉素分别属于两种不同类别的

抗生素, 因此其结构和色谱行为差异较大; 梅岭霉素也因个别基团和化学键的差别存在多种不同的组分。目前虽然有色谱法分离密尔比霉素和阿弗菌素的报道<sup>[3~6]</sup>, 但南昌链霉菌发酵产物组分复杂, 在单一色谱条件下, 很难将南昌霉素和梅岭霉素这两种抗生素进行有效的分离。本文在对流动相的组分、比例等条件优化的基础上, 根据南昌霉素和梅岭霉素结构和极性的差别, 通过梯度洗脱, 达到一次进样同时分离南昌霉素和梅岭霉素各组分的目的, 从而为同时检测南昌链霉菌发酵产物中的南昌霉素和

收稿日期: 2001-06-07

作者简介: 孙宇晖, 男, 1967年生, 讲师, 现为上海交通大学生命科学技术学院博士生。

通讯联系人: 邓子新, 男, 教授, 博士生导师, 电话: (021)62933404, E-mail: zxdeng@mail.sjtu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准编号: 39830210; 39970479)

梅岭霉素, 为研究遗传改造对这两种不同抗生素相对含量的影响提供准确、快速、有效的分析方法。

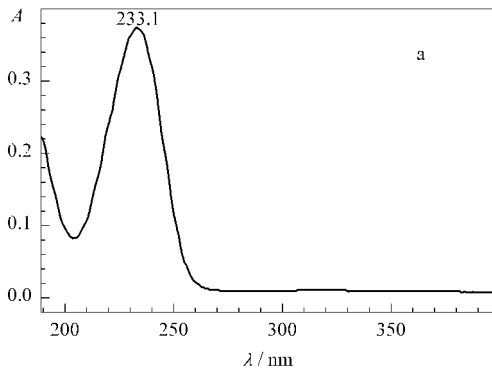
## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters Alliance 2690 高效液相色谱仪, Waters 996 二极管阵列检测器, Waters Millennium<sup>32</sup> 工作站; 甲醇、乙腈(HPLC 级)购自美国 Tedia 公司, 水经美国 Millipore 公司的 Milli-Q 纯水器处理; 南昌霉素和梅岭霉素标准品为本研究室分离精制而得, 质量分数分别为 98.61% 和 96.82%。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Waters XTerra<sup>TM</sup> RP18 (3.9 mm i. d. × 150 mm, 5 μm)。流动相为乙腈水溶液, 流速为 0.8 mL/min, 其梯度洗脱程序为: 57% (体积分数, 下同) 乙腈 (30 min) → 70% 乙腈 (2 min) → 80% 乙腈 (2 min) → 90% 乙腈 (16 min)。检测波长: 234 nm。



柱温: 25 °C。

### 1.3 标准溶液的配制

分别精确称取南昌霉素和梅岭霉素标准品 1 mg, 用甲醇溶解定容至 5 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后备用。

### 1.4 样品溶液的制备

量取南昌链霉菌发酵液 1 mL, 离心 (12 000 r/min) 10 min 后弃去上清液, 再加入甲醇 1 mL, 浸提 10 h 后离心 (12 000 r/min) 10 min, 上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的确定

对南昌霉素和梅岭霉素的甲醇溶液进行紫外全波长 (190 nm ~ 400 nm) 扫描, 得南昌霉素的  $\lambda_{\max} = 233.1$  nm, 梅岭霉素主成分的  $\lambda_{\max} = 236.7$  nm (见图 1)。兼顾两者, 选择 234 nm 为检测波长。

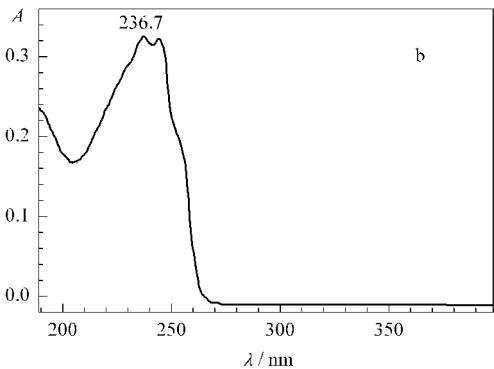


图 1 南昌霉素(a)和梅岭霉素(b)标准品的紫外光谱图

Fig 1 UV spectra of nanchangmycin (a) and meilingmycin (b) standards

### 2.2 分离条件的探索

在低极性流动相中, 南昌霉素和梅岭霉素均出峰较快, 但两者严重重叠, 且梅岭霉素各组分也全部重叠, 无法分离。在高极性流动相中, 梅岭霉素各组分可得到较好分离, 但南昌霉素却拖尾严重, 峰形太宽, 并与梅岭霉素的若干组分重叠。经过优化, 先用高极性流动相乙腈-水溶液 (体积比为 57:43) 将梅岭霉素约 10 个组分进行分离, 再逐渐降低流动相的极性, 使剩余的 2 个组分洗脱, 最后在乙腈所占体积分数为 90% 的条件下将南昌霉素迅速洗脱, 从而使各组分完全分离 (见图 2)。

### 2.3 线性回归

将南昌霉素和梅岭霉素标准品溶液分别进样 10 μL, 20 μL, 30 μL, 40 μL, 50 μL 和 60 μL, 以峰面积 (Y) 对进样量 (X, μL) 进行线性回归分析, 回归方程和相关系数见表 1。

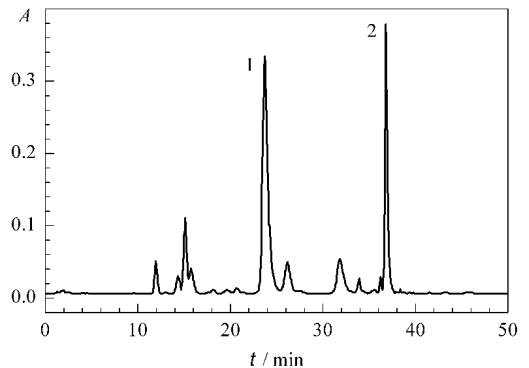


图 2 南昌霉素和梅岭霉素标准品的色谱图

Fig 2 Chromatogram of nanchangmycin and meilingmycin standards

1. meilingmycin major component; 2. nanchangmycin.

### 2.4 精密度

在上述色谱条件下, 将质量浓度均为 200 mg/L

表 1 南昌霉素和梅岭霉素主成分的标准曲线

Table 1 Calibration curves of nanchangmycin and meilingmycin major component

Component	Regression equation	r
Nanchangmycin	$Y = 2.475 \times 10^5 + 3.644 \times 10^5 X$	0.999 6
Meilingmycin major component	$Y = 1.332 \times 10^5 + 3.727 \times 10^5 X$	0.999 7

的标准样连续进样 6 次, 测定各次的峰面积和保留时间。南昌霉素和梅岭霉素主成分的峰面积相对标准偏差(RSD)分别为 0.51%和 0.21%, 保留时间的 RSD 分别为 0.45%和 0.36%。

## 2.5 回收率

将一定量的南昌霉素和梅岭霉素标准品溶液加入到南昌链霉菌发酵液中, 按上述样品处理方法进行测定, 南昌霉素和梅岭霉素主成分 6 次测定的平均回收率分别为 98.63%和 97.23%, RSD 分别为 0.85%和 0.92%。

## 2.6 样品测定

取来自同一批次不同摇瓶的南昌链霉菌发酵液样品 5 瓶(每瓶 250 mL), 按“1.4”节对样品进行预处理, 然后进样 50  $\mu$ L, 通过外标法计算南昌霉素和梅岭霉素的含量, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Table 2 Analytical results of the samples

Component	Mass concentration(mg/L)				
	1	2	3	4	5
Nanchangmycin	350	360	352	357	363
Meilingmycin major component	112	101	98	115	118

## 2.7 讨论

在南昌链霉菌的前期研究工作中, 其发酵产物中南昌霉素和梅岭霉素的检测主要依靠抑菌和杀蚕等生物学方法, 这些方法在定量的准确性和重复性方面有较大局限性。而且, 梅岭霉素为多组分物质, 对各组分以及该菌所产生的其他活性物质的分析与结构鉴定最终仍有赖于对它们的有效分离。本方法的建立将有助于这些工作的进一步开展。

## 参考文献:

- [1] OU-YANG Liang, WAN Shu-wan, TU Guo-quan, *et al.* Acta Microbiologica Sinica, 1984, 24(3): 195  
欧阳谅, 万淑婉, 涂国全, 等. 微生物学报, 1984, 24(3): 195
- [2] OU-YANG Liang, TU Guo-quan, GAO Yong-sheng, *et al.* Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 1993, 15: 148  
欧阳谅, 涂国全, 高勇生, 等. 江西农业大学学报, 1993, 15: 148
- [3] SHAO Yun, HU Feng-zu, SHI Zhi-xian. Chinese Journal of Chromatography, 1998, 16(1): 87  
邵 甦, 胡凤祖, 师治贤. 色谱, 1998, 16(1): 87
- [4] Chen T S, Inamine E S. Arch Biochem Biophys, 1989, 270(2): 521
- [5] Pang C H, Matsuzaki K, Ikeda H, *et al.* J Antibiot, 1995, 48(1): 59
- [6] Takahashi S, Miyaoka H, Tanaka K, *et al.* J Antibiot, 1993, 46(9): 1364