

# 液相色谱定量分析发酵液中的井冈霉素A

## LC-061

**摘要：**本文使用岛津LC-20A液相色谱仪建立了测定发酵液中的井冈霉素A的分析方法。以甲醇和0.005M的磷酸缓冲液(pH7.0)为流动相，紫外检测器的波长为210 nm。井冈霉素A的标准曲线的线性相关系数为0.9995，定量结果的RSD %在0.04%至0.44 %之间。并且本方法成功地应用于实际样品发酵产物中井冈霉素A的含量测定。

**关键词：**反相液相色谱 井冈霉素 定量分析

井冈霉素(国外又称有效霉素)是我国及东南亚水稻主产区用于防治水稻纹枯病的最佳生物农药之一，它高效无毒、对环境友好、无真菌抗药性发生，在我国年使用面积已达2亿亩，减少了该病所造成的大量农业经济损失。同时，它还是用于生产阿卡波糖(拜糖平)和伏格列波糖(倍欣)两种糖尿病临床用药的直接原料，其产品也大量出口。

井冈霉素，是由吸水链霉菌发酵产生的，发酵温度是影响产率的一个重要因素，但是有关发酵温度对抗生素发酵过程中基因和酶层次的研究十分有限。井冈霉素共有A, B, C, D, E, F六个组分，通常以主要有效成分井冈霉素A的含量来衡量产品的质量。本实验中建立了高效液相色谱法对发酵产物中的井冈霉素A进行分离和定量检测的方法，并应用于在35℃和37℃发酵条件下实际样品中井冈霉素A的含量分析。

## 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

#### 1.1.1 试剂

甲醇，HPLC级；磷酸氢二钠、磷酸，分析纯；井冈霉素A标准品。

#### 1.1.2 仪器

LC-20A液相系统

### 1.2 色谱条件

色谱柱：Inertsil C<sub>8</sub> column(4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm)；流动相：A-0.005 mol/L的磷酸氢二钠-磷酸溶液，pH7.0；B-甲醇；流速：1.0 mL/min；洗脱方式：梯度洗脱(梯度见表1)；柱温：35℃；检测波长：210 nm，进样量：5 μL。

表1 梯度洗脱程序

Time	B %
0	3
5	6
5.5	20
5.6	3
15	stop

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 标准溶液的制备

用流动相A稀释井冈霉素A标准品至8.0 g/L, 4.0 g/L, 2.0 g/L, 0.50 g/L, 0.25 g/L, 用来测试分析得到标准曲线。

#### 1.3.2 样品的收集和制备

取发酵液10000 g离心除去菌体，随后加入等体积的氯仿，剧烈震荡数分钟直到形成乳浊液，室温静置15 min，以最大转速离心5 min吸取少量的上清液到新的ependorf管中保存。氯仿抽提后的清液取1/5直接上液相色谱进行分析。

## 结果与讨论

### 2.1 井冈霉素A标准品的分析结果

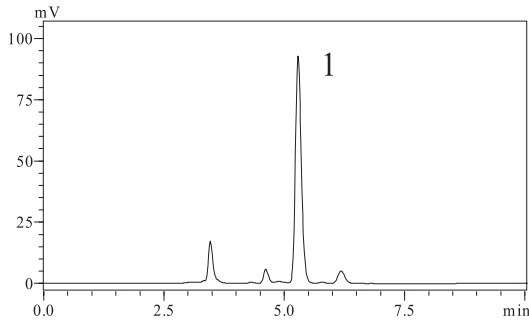


图1(1=井冈霉素A)井冈霉素 A 标准溶液的色谱图

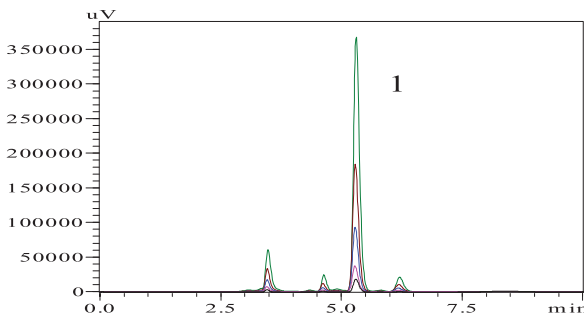


图2 (1=井冈霉素A)五个不同浓度的井冈霉素 A 标准溶液色谱图

图1是浓度为2.0 g/L的井冈霉素A标准溶液的色谱图，图2是井冈霉素A标准溶液在五种不同浓度下采集得到的色谱图，各组分均可得到良好的分离。其中，井冈霉素A的校准曲线如下(图3)。

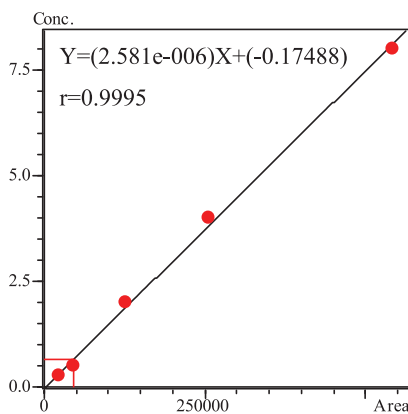


图3 井冈霉素 A 的标准曲线

### 2.2 方法的精密度及稳定性实验

对同一份浓度为2 g/L的井冈霉素A标准溶液重复进样3次，得到的色谱图见图4。各浓度的井冈霉素A标准溶液的方法重现性结果见表2和表3。每个浓度样品的3次重复进样结果的保留时间RSD%为0.01-0.12%，峰面积RSD%为0.04-0.44%。结果的重现性良好。

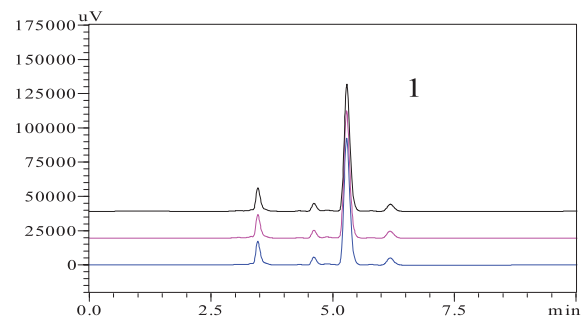


图4 (1=井冈霉素A)井冈霉素 A 标准溶液的重复分析结果

表2 保留时间的重现性结果

Conc.(g/L)	0.25	0.50	2.0	4.0	8.0
1st	5.295	5.277	5.282	5.284	5.302
2nd	5.285	5.28	5.287	5.284	5.301
3rd	5.284	5.281	5.283	5.294	5.301
Average	5.288	5.279	5.284	5.287	5.301
RSD %	0.12	0.04	0.05	0.11	0.01

表3 峰面积的重现性结果

Conc.(g/L)	0.25	0.50	2.0	4.0	8.0
1st	158100	318840	797279	1592778	3185298
2nd	158829	319035	798572	1590552	3187437
3rd	159487	318818	798722	1591387	3184839
average	158805	318898	798191	1591572	3185858
RSD %	0.44	0.04	0.10	0.07	0.04

### 2.3 发酵液中的井冈霉素A的分析结果

对35°C和37°C发酵条件下的实际样品中的井冈霉素A进行了3次重复分析，得到的色谱图见图5和6。汇总的重现性结果见表4和表5。从结果中可见，35°C发酵液中的井冈霉素A的浓度为5.087 g/L，相对浓度为45.4%。37°C发酵液中的井冈霉素A的浓度为5.742 g/L，相对浓度为53.7%。

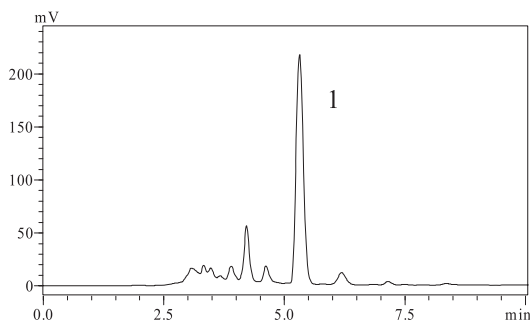


图5(1=井冈霉素A)发酵液1的色谱图结果

表4 发酵液1的分析结果汇总

	1st	2nd	3rd	Average	RSD%
R.Time	5.285	5.287	5.283	5.285	0.03
Area	2031056	2042875	2041561	2038497	0.26
Conc.	5.067	5.098	5.095	5.087	0.27
Area%	45.584	45.327	45.288	45.40	0.35

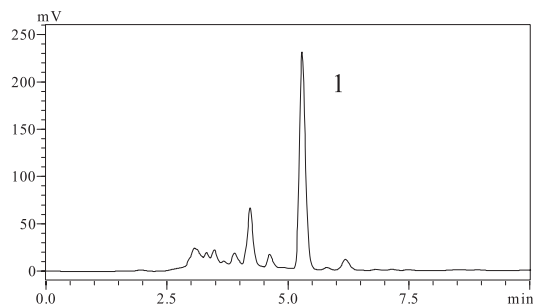


图6(1=井冈霉素A)发酵液2的色谱图结果

表5 发酵液2的分析结果汇总

	1st	2nd	3rd	Average	RSD%
R.Time	5.310	5.315	5.313	5.313	0.04
Area	2294632	2288508	2293669	2292270	0.12
Conc.	5.748	5.732	5.745	5.742	0.12
Area%	54.42	53.38	53.39	53.73	1.12

### 讨论

本实验建立了高效液相色谱分析发酵产物中的井冈霉素A的定量分析方法，定量结果的重现性RSD%在0.04%至0.44%之间。并应用于35°C和37°C发酵条件下实际样品中的井冈霉素A的含量测定。通过比较发现，37°C时的发酵液中井冈霉素A的含量更高，浓度为5.742 g/L，相对浓度为53.7%。