

高效液相色谱法测定微生物发酵液中四氢嘧啶的含量

LC-340

摘要：本文建立了一种高效液相色谱法测定微生物发酵液中四氢嘧啶含量的方法。通过对不同色谱柱的筛选，最终发现 Shim-pack Scepter Diol-HILIC-120(4.6 x 250 mm, 5 μ m) 对于四氢嘧啶有较好的保留和分离能力。四氢嘧啶在 0.1-2 mg/mL 浓度范围内线性良好，相关系数 > 0.9999。浓度为 0.2 mg/mL 的校准点连续 5 次进样保留时间 RSD% 为 0.104%，峰面积 RSD% 为 0.542%，重复性良好。

关键词：高效液相色谱 发酵液 四氢嘧啶

四氢嘧啶 (Ectoine) 是一种存在于微生物中的氨基酸衍生物，属于环状氨基酸。它仅存在于中度嗜盐细菌中，首先于一种细菌嗜盐绿外硫红螺菌中发现。作为重要的相容性溶质，它能保证微生物细胞具有足够的抵抗渗透压力作用而避免水分丧失的机制。

四氢嘧啶具有高度的水溶性，不带静电荷。除了能使微生物对抗高渗透压、热变性、干燥和冰冻等极端条件外，对于人类生活、健康等也具有重要意义。四氢嘧啶对阿尔兹海默症、帕金森病等神经性疾病有一定的疗效，并且能够提高皮肤再生能力和延缓皮

肤老化。因此，其在制药、食品、化妆品、生物制剂、酶制剂、农业等领域将具有广泛的应用前景。

由于手性结构的存在，四氢嘧啶很难通过化学合成的方法来获取。目前主要通过全细胞催化或者微生物发酵法来制备，而精准测定发酵液中四氢嘧啶的含量对于制备工艺的改进有积极的指导意义。

本文使用岛津高效液相色谱仪，建立了一种可以精准测定微生物发酵液中四氢嘧啶含量的方法。本方法稳定可靠，可供相关从业人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera Bio 生物兼容液相系统，具体配置为：

输液泵：LC-20ADXR

系统控制器：CBM-20A

柱温箱：CTO-20A

检测器：SPD-M20A

自动进样器：SIL-20ACXR

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Scepter Diol-HILIC-120 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)，

P/N:227-31051-06，岛津（上海）实验器材有限公司

柱温：40°C

流动相：A-10 mmol/L 乙酸铵水溶液；B- 乙腈

流速：1 mL/min

进样体积：1 μ L

检测波长：210 nm

洗脱方式：等度洗脱，A/B=5/95(V/V)

1.3 试剂配制

乙酸铵水溶液 (10 mmol/L)：称取 7.7 g 乙酸铵（色谱纯）溶于少量水中，并定容至 200mL，配制成 500 mmol/L 的乙酸铵储备液。取上述乙酸铵储备液 8 mL，用水定容至 400 mL，配制成 10 mmol/L 的乙酸铵水溶液。

■ 样品前处理

取含四氢嘧啶的发酵液 2 mL 至离心管中，12000 rpm 离心 10 min。0.22 μm 水相滤膜将上清液过滤，待测。

■ 结果与讨论

3.1 色谱柱的筛选

根据化合物性质，首先测试了反相色谱柱 Shim-pack GIST C18 和 Shim-pack GIST C18-AQ，使用 100% 水相进样，流速 0.4 mL/min，进样量 1 μL ，测试结果见图 1。

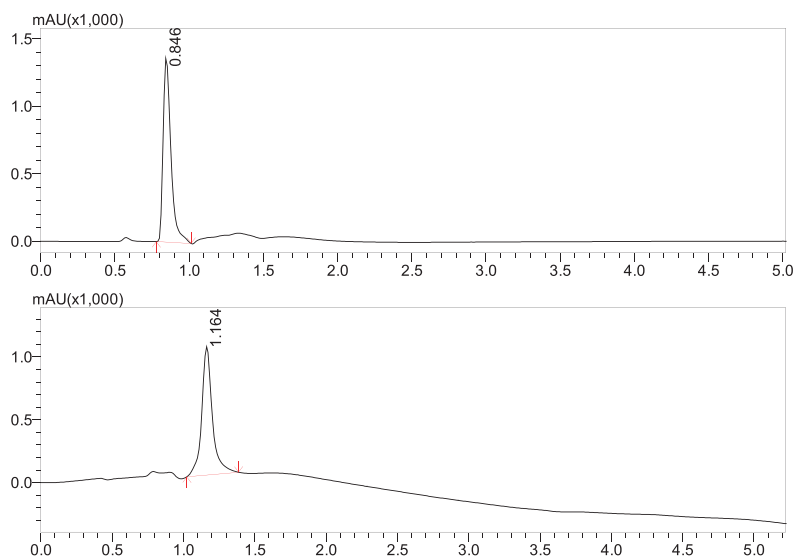


图 1 Shim-pack GIST C18（上）和 Shim-pack GIST C18-AQ（下）色谱柱测试结果

在反相色谱系统中，水相的洗脱能力最弱，但四氢嘧啶的保留能力依然不理想，这与其本身极性较高有关系，使用反相色谱柱难以达到理想效果。因此，进一步测试了 Shim-pack GIST Amide、Shim-pack Scepter Diol-HILIC 色谱柱，测试结果见图 2。

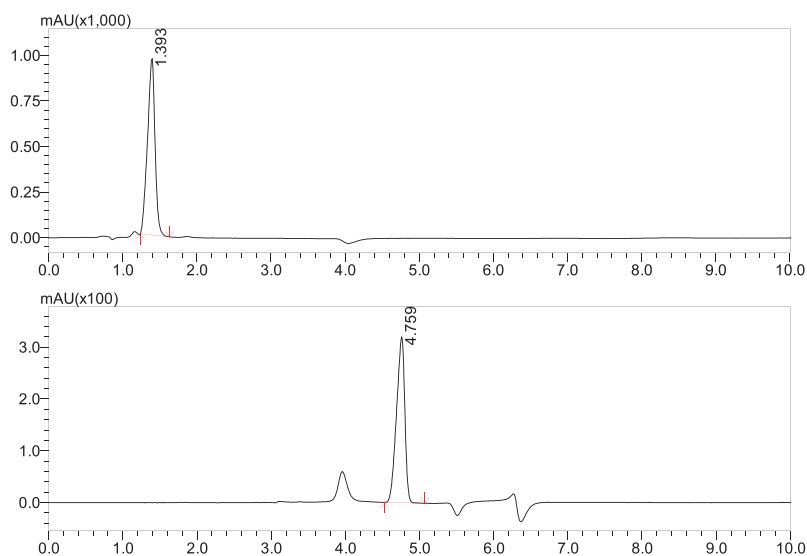


图 2 Shim-pack GIST Amide（上）和 Shim-pack Scepter Diol-HILIC（下）色谱柱测试结果

结果显示，色谱柱键合相极性的增加提高了四氢嘧啶的保留能力。但由于 Shim-pack GIST Amide 柱长只有 10 cm，测定含较多杂质的发酵液中四氢嘧啶时分离能力不够；而 Shim-pack Scepter Diol-HILIC 柱长为 25 cm，对于发酵液中四氢嘧啶的测定不受影响。因此，Shim-pack Scepter Diol-HILIC (4.6 x 250 mm, 5 μm) 为最优选择。

3.2 标准品溶液色谱图

精密量取四氢嘧啶标准品 10 mg，配制成浓度为 10 mg/mL 的标准品母液。用水将上述母液逐级稀释成浓度为 2 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.2 mg/mL、0.1 mg/mL 五个浓度的标准品系列工作溶液。按 1.2 中的分析条件进行测定，水和四氢嘧啶标准品溶液的色谱图如图 1 所示。

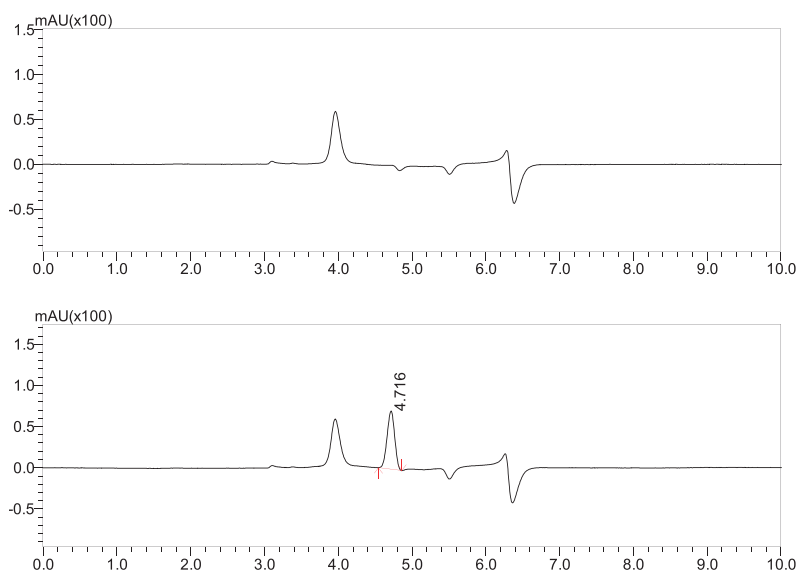


图 3 水（上）和四氢嘧啶标准品溶液（下，0.2 mg/L）色谱图

3.3 线性范围和灵敏度

将 3.2 中不同浓度的标准品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，结果如图 2 所示。四氢嘧啶在 0.1-2 mg/mL 浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数 > 0.9999，具体结果见表 1。

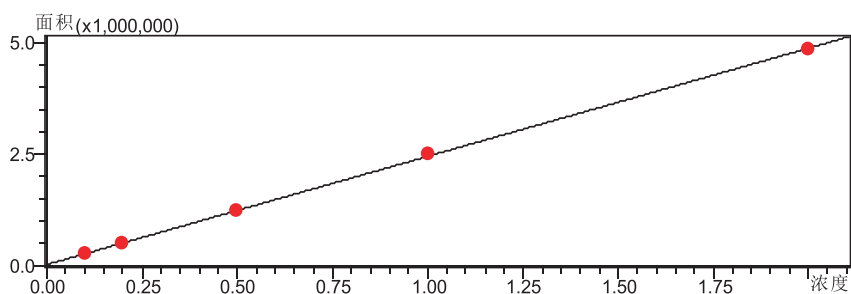


图 4 四氢嘧啶校准曲线

表 1 校准曲线参数

化合物名称	标准曲线	相关系数 r	线性范围 (mg/mL)	准确度	检出限 (mg/mL)	定量限 (mg/mL)
四氢嘧啶	$Y = (2.42403e+006)X + (27372.4)$	0.9999	0.1-2	95.7-101.2%	0.002	0.008

3.4 重复性实验

取浓度为 0.2 mg/mL 的四氢嘧啶标准品溶液，连续进样 5 次，考察重复性。保留时间和峰面积的重复性结果如表 2 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.104% 和 0.542%，重复性良好。

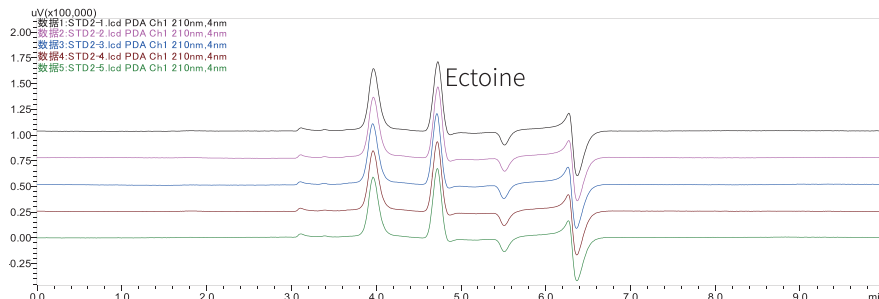


图 5 标准品溶液重复性色谱图（浓度 0.2 mg/mL，n=5）

表 2 保留时间和峰面积重复性结果（n=5）

项目名称	1	2	3	4	5	RSD(%)
保留时间	4.727	4.727	4.716	4.721	4.721	0.104
峰面积	500167	503422	504929	504100	498605	0.542

3.5 样本检测结果

取 17 份微生物发酵液样本，使用 2 中所述前处理方法以及 1.2 中所述分析条件，对其进行定量分析，定量结果见表 3，部分样本色谱图见图 6。

表 3 样本检测结果

化合物名称	样本编号	含量 (mg/mL)	样本编号	含量 (mg/mL)
四氢嘧啶	1	0.635	10	0.201
	2	0.380	11	0.208
	3	0.163	12	0.355
	4	0.457	13	0.231
	5	0.419	14	0.247
	6	0.230	15	0.287
	7	0.196	16	0.692
	8	0.416	17	0.682
	9	0.348		

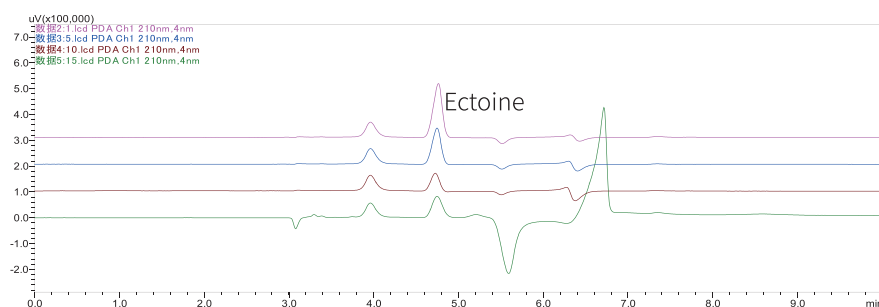


图 6 部分样本色谱图

■ 结论

本文使用岛津高效液相色谱系统建立了一种微生物发酵液中四氢嘧啶含量测定的方法。通过色谱柱筛选，获得综合表现最佳的 Shim-pack Scepter Diol-HILIC 色谱柱。经过高效液相色谱仪测试分析，四氢嘧啶在 0.1-2 mg/mL 浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数 > 0.9999 。通过重复性测试，发现保留时间和峰面积重复性良好。该方法准确可靠，灵敏度高，可供相关从业人员参考。

岛津应用云

