

文章编号:1673-1689(2008)05-0128-06

庆大霉素发酵液薄层色谱(TLC)分析方法研究

杨绪明¹, 张家骊^{*1}, 李江华², 房峻²

(1. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:通过对庆大霉素(GM)薄层色谱(TLC)检测体系进行优化,得出了最佳的制板条件,最佳展开剂系统以及显色系统,并对该检测方法的重复性以及检测限进行了考察。最终将得到的最佳检测体系应用到庆大霉素发酵液的检测中,成功实现了对发酵液主组分 $C_1, C_{1a}, C_2 (C_{2a} + C_2)$ 的有效分离检测,分离度及 R_f 值均达到要求。并且,通过对发酵液进行简单的纯化浓缩后,运用该检测体系成功实现对 10 个组分的有效检测。另外,将该 TLC 体系与微生物效价测定法结合,可以较准确地得到各组分的含量比,通过与 HPLC 检测结果进行比较,发现结果基本一致。该方法简单快速,结果可靠,能满足发酵试验与生产中成份需要快速检测的要求。

关键词:薄层色谱法(TLC);庆大霉素;发酵液

中图分类号:R 927.2

文献标识码:A

Studies on Determination of Gentamicin Fermentation Broth by TLC

YANG Xu-ming¹, ZHANG Jia-li^{*1}, LI Jiang-hua², FANG Jun²

(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The optimum condition for the operation of TLC for gentamicin (GM) was obtained. The detection limit, reproducibility were also investigated. Base on the optimized system, the main components of GM (C_1, C_{1a} and C_2) were successfully separated. Both the resolution and R_f were acceptable. The system was also used for the detection of components ratio combining with titer test. The result was highly according to that of the HPLC. The method described here was simple, rapid and reliable, and could further facilitate the GM research.

Key words: TLC; Gentamicin; fermentation broth

庆大霉素(GM)是由绛红小单孢菌、棘孢小单孢菌等发酵产生的多组分氨基糖苷类抗生素,由于价廉,疗效可靠,目前已经成为氨基糖苷类抗生素中的首选药。庆大霉素各组分在结构上很相近,根据分子结构的差异可以分为庆大霉素 C(包括 C_{1a} ,

C_2, C_{2a}, C_1 等)、庆大霉素 A(包括 A, $A_1 \sim A_4$),庆大霉素 B,庆大霉素 B_1 和庆大霉素 X 等。其中庆大霉素 C 组为主组分,在发酵液中占 60%~80%,是杀菌力较强的广谱抗生素,目前在临床上被广泛使用。而庆大霉素 A、B、 B_1 和 X 等抗菌活性相对较

收稿日期:2008-07-05.

作者简介:杨绪明(1982-),男,山东新泰人,工学硕士.

* 通讯作者:张家骊(1962-),女,江苏宝应人,理学博士,副教授,主要从事生物制药研究. Email:9989 card@sina.com

弱,但对原虫、蠕虫却有很好的效果^[1]。由于组分较多且结构相似,这给庆大霉素的检测带来了很大的困难。目前的检测方法一般是针对C组分,而微量组分的研究也越来越受到关注。主要检测方法有HPLC、NMR、HPLC-ELSD等,而这些检测方法通常用于如硫酸庆大霉素粉剂、针剂以及片剂等较纯物质的分析,而且步骤烦琐,检测成本较高。在发酵实验以及生产过程中,对发酵液的组分分析一般要求快速,而且需要多次的重复检测,上述检测方法无法满足。薄层色谱(TLC)是最早被开发用于分析庆大霉素C组分的方法^[3],该方法操作简便,检测成本低,主要问题在于色谱系统不稳定,展开剂系统不成熟。针对这些问题,作者对TLC体系进行了优化,对TLC体系的稳定性进行了考察,成功实现对庆大霉素发酵液C组分的有效分离和检测。将发酵液进行简单的纯化浓缩后还可以实现对微量组分的有效检测,从而为全面研究庆大霉素提供了便利。另外,通过对显色斑点的大小及颜色等的综合考察,可以快速估算出组分比,结合微生物检定法,则可以较准确地得到各组分的效价,从而为筛选产高效低毒抗生素的高产菌株提供良好的检测方法。由于C₂与C_{2a}很难分开,一般合记作C₂,本文中均用C₂代指C₂+C_{2a}。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

庆大霉素标准品:Sigma公司产品;庆大霉素发酵液:作者所在实验室发酵所得;检验菌:短小芽孢杆菌;无锡市药品检验所提供;薄层玻璃板,厚度0.25 mm,规格10 cm×20 cm;微量进样器;牛津杯;游标卡尺;硅胶G:化学纯,青岛海洋化工集团出品;磷酸二氢钠、乙二胺四醋酸二钠、羧甲基纤维素钠、碘、氯仿、甲醇、氨水;分析纯,均为国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 样品和标准品溶液的制备

TLC检测体系标准品液:精密称取标准品40 mg,加水2 mL,振荡使其溶解,制成20 mg/mL的标准品溶液;HPLC检测体系标准品液:将标准品溶液1适当稀释,制成2 mg/mL的标准品溶液;样品溶液:将实验室所得发酵液进行预处理后,分别取原液以及经离交纯化后的浓缩液作为样品溶液。

1.3 薄层板的制备

取硅胶G适量,按照1:3的体积比例加入到选择的溶液中,混合研磨调成糊状后,均匀分布在玻璃板上,室温下放置晾干备用,临用前在105℃

条件下活化2 h^[2]。

1.4 展开系统配制

精确量取氯仿,甲醇,氨水(体积分数25%),按照不同的比例混合摇匀后,根据实验设计分取上相,下相或混合液作为展开剂。

1.5 显色剂的配制

显色剂1:碘蒸气;显色剂2:茛三酮溶液(1 g茛三酮溶于体积分数95%乙醇50 mL和冰醋酸10 mL的混合溶剂)

1.6 TLC操作步骤

1.6.1 点样 将标准液和样品溶液按一定顺序分别点样在薄层板上。点样量按照实验计划从1 μL到10 μL不等,点样量大时采取分次滴加,保证点样扩散后其直径不超过3 mm。点样过程中用吹风机使样品干燥。

1.6.2 展层 将点好样品的薄层板置于层析缸内预饱和0.5 h,然后迅速放置展开剂中,上行法于室温下展开,待展距约为15 cm的时候,取出在流通空气中吹干或用风吹在自然风档吹干。

1.6.3 显色 碘蒸气显色:将展开完毕的板晾干后,置碘蒸气中显色10~15 min。此时在层析板上可见明显的棕色斑点;茛三酮显色:将展开完毕的板在135℃下烘干20 min后放冷至室温,均匀地喷洒10 mL新配的茛三酮溶液,再于135℃下加热15 min即可在白色的薄层板背景上显现清晰的鲜红斑点。

1.7 组分比测定

显色完毕后,以斑点中心为圆心,沿斑点边缘做圆,然后用游标卡尺测量每个斑点的直径,结合斑点的颜色深浅,估算出各组分的含量比。

1.8 HPLC分析

1.8.1 HPLC系统 Beckman 118型HPLC仪,色谱柱:20RBAX SB C₁₈, 5 μm 4.6 mm×250 mm;体积流量:1.0 mL/min,波长:330 nm,进样量:10 μL。

1.8.2 方法 样品经邻苯二醛试剂衍生化,以V(甲醇):V(水):V(甲酸)=74:21:5配制庚烷磺酸钠溶液(4.0 g/L)为流动相。

1.9 各组分效价检测

将显色完毕的薄板置于120℃烘箱中烘烤20 min,使碘挥发充分,用刀片轻轻地将标记好的斑点区域刮下,分别移入已经编号的离心管中,加入5 mL 0.1 mol/L的硫酸溶液40℃水浴保温30 min,后3 000 r/min离心10 min,吸取上清液用氢氧化钠调至中性,最后加入pH 7.0的磷酸盐缓冲液10

mL 制成待测液,用微生物检定法测定效价。

2 结果与讨论

2.1 薄层板制备实验对比分析

为减少铺板操作对 TLC 结果的影响,笔者设计以下几组对比实验,展距均为 15 cm,实验结果见表 1,对各组实验中标准品 C 组分的展开结果见图 1。实验中展距均为 15 cm。

表 1 薄层制备实验的检测结果

Tab. 1 Results of TLC preparation

编号类别	R_f			制板溶液质量分数/%	
	C_{1a}	C_2	C_1		
A	标准品	0.194	0.252	0.299	磷酸二氢钠 5; 乙二胺四醋酸二钠 0.1
	发酵液	0.188	0.246	0.293	
B	标准品	0.203	0.253	0.287	含羧甲基纤维素钠 0.2
	发酵液	0.203	0.250	0.287	
C	标准品	0.181	0.233	0.263	含羧甲基纤维素钠 0.3
	发酵液	0.177	0.217	0.249	
D	标准品	0.165	0.210	0.241	含羧甲基纤维素钠 0.4
	发酵液	0.150	0.197	0.233	
E	标准品	0.140	0.200	0.247	含羧甲基纤维素钠 0.5
	发酵液	0.133	0.190	0.233	
F	标准品	0.130	0.182	0.227	含羧甲基纤维素钠 0.6
	发酵液	0.128	0.180	0.223	
G	标准品	0.157	0.203	0.247	含羧甲基纤维素钠 0.5; 磷酸二氢钠 5; 乙二胺四醋酸二钠 0.1
	发酵液	0.145	0.192	0.237	
H	标准品	0.293	0.338	0.373	含羧甲基纤维素钠 0.2, 制作成径向展开板

结果表明,软板易粉化,给实验带来不便,而将薄板制作成为径向板虽然可以改善分离效果,但点样量少且斑点不规则,只能作为辅助手段。而当 CMC 质量分数 2% 时操作及分离效果最好,且通过添加磷酸二氢钠和乙二胺四醋酸二钠可以进一步改善分离效果。所以确定最佳的铺板溶液组成(质量分数/%):羧甲基纤维素钠 0.2;磷酸二氢钠 5;乙二胺四醋酸二钠 0.1。

2.2 展开系统及其分离效果

根据文献资料^[4-10],设计了如下 10 组试实验,分析得到最佳的展开剂比例。每组标准品及样品做 3 个平行,取平均值进行分析,实验中展距均为 15cm,结果见表 2,将标准品 C 组分在各展开系统

中最终的 R_f 值绘制成图 2,进行对比分析。

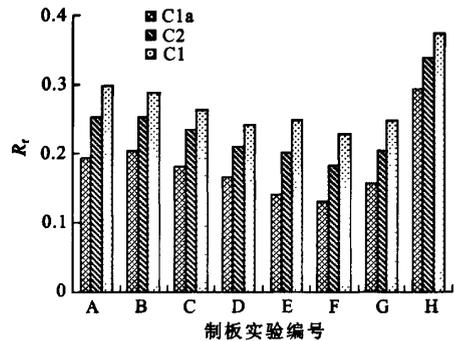


图 1 制板实验中标准品的分离效果分析

Fig. 1 Separation effect of different preparation methods

表 2 不同展开系统的 TLC 结果

Tab. 2 TLC results of different solvents

编号类别	显色结果(R_f 值)			展开剂的选择	
	C_{1a}	C_2	C_1		
A	标准品	0.203	0.253	0.287	V(氯仿): V(甲醇): V(氨水 25%) = 1: 1: 1, 静置分层, 上相饱和, 下相展开
	发酵液	0.203	0.250	0.287	
B	标准品	距基线 11.03~12.77 的大斑点, 未分离开。		V(氯仿): V(甲醇): V(氨水 25%) = 1: 1: 1, 静置分层, 上相饱和并展开	
	发酵液	距基线 11.37~12.76 的大斑点, 未分离开。			
C	标准品	距基线 10.33~12.2 的大斑点, 未分离开。		V(氯仿): V(甲醇): V(氨水 25%) = 1: 1: 1, 用该混合液饱和并展开	
	发酵液	距基线 10.37~11.76 的大斑点, 未分离开。			
D	标准品	0.49	0.582	0.645	V(氯仿): V(甲醇): V(氨水 25%) = 5: 6: 5, 静置分层, 上相饱和, 下相展开
	发酵液	0.483	0.575	0.638	
E	标准品	0.295	0.339	0.403	V(氯仿): V(甲醇): V(氨水 25%) = 5: 7: 6, 静置分层, 上相饱和, 下相展开
	发酵液	0.242	0.320	0.400	
F	标准品	0.287	0.353	0.393	V(氯仿): V(甲醇): V(氨水 25%) = 5: 4: 3, 静置分层, 上相饱和, 下相展开
	发酵液	0.270	0.330	0.363	
G	标准品	0.303	0.397	0.471	V(氯仿): V(甲醇): V(氨水 25%) = 5: 4: 1.5, 静置未出现分层现象, 于是取混合液饱和并展开
	发酵液	0.297	0.390	0.467	

续表 2

编号	类别	显色结果(R_f 值)			展开剂的选择
		C_{1a}	C_2	C_1	
H	标准品	0.140	0.189	0.241	V(氯仿):V(甲醇):V(氨水 25%)=5:3:3, 静置分层,上相饱和,下相展开
	发酵液	0.137	0.183	0.230	
I	标准品	0.220	0.283	0.320	V(氯仿):V(甲醇):V(氨水 25%)=5:3:1.5, 静置分层,上相饱和,下相展开
	发酵液	0.220	0.287	0.320	
J	标准品	0.0353	0.0593	0.0847	V(氯仿):V(甲醇):V(氨水 25%)=2:1:1, 静置分层,上相饱和,下相展开
	发酵液	0.0360	0.0560	0.0827	

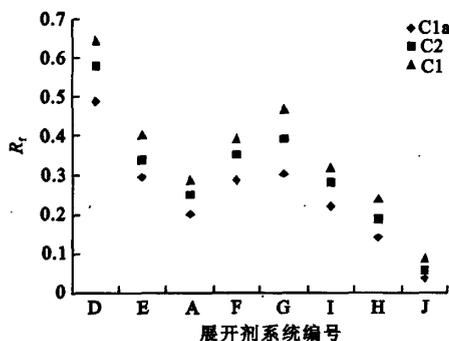


图 2 各展开系统中标准品各组分展开分析图

Fig. 2 Profile of the separation effect by different solvents

由实验结果可以看出,在药典所采用的展开系统(A系统)基础上,采用该系统的上相或混合液作为展开剂,可以显著提高组分的 R_f 值,但是分离情况变得很差,组分连接为一个散大的斑点,说明B或C展开系统仅适用于单一组分的快速定性检测。从对比图上,还可以看出,在A展开系统的基础上,同步提高或降低甲醇与氨水的含量均可以改善分离效果,同时提高 R_f 值,而在氯仿和甲醇的比例不变时,提高氨水比例,虽然一定程度上会降低 R_f 值,但可以明显改善斑点散大的问题,这主要是因为,当采用两种强溶剂与一种弱溶剂组成的三元混合流动相时,溶剂强度由弱溶剂控制,而溶剂选择性则由两强溶剂控制。

综合分析实验结果,作者认为F展开系统为最佳的展开系统。

2.3 显色剂的比较

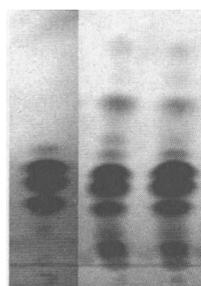
通过对碘蒸气和茚三酮两个显色系统的对比,发现采用碘蒸气显色,操作方便,时间短,显色效果

好,相比之下,茚三酮显色的操作较为复杂,烘干时间以及喷洒的均匀程度不好掌握,从而影响显色结果。所以,碘蒸气为最佳显色系统。

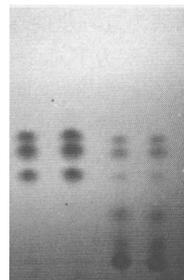
2.4 重现性及最低检测限

2.4.1 重现性 取上述各供试品溶液,经个人和不同人员按上述操作步骤多次试验,结果重现性很好。取不同批次的发酵液进行试验,结果重现性也很好。结果见图2(a)、(b)。

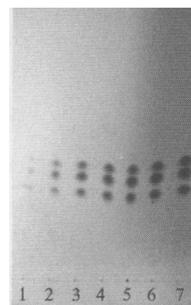
2.4.2 最低检测限 分别点样1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 μg 的标准品溶液于同一薄层板上,分别用1, 2, ..., 7标记。同条件同法操作,结果如图3(c)。



1 为标准品; 2, 3 为浓缩样品
(a) 浓缩后的发酵液分析图



1, 2 为标准品; 3, 4 为发酵液样品
(b) 发酵液分析图



(c) 检测限测定结果

图 3 TLC 检测结果

Fig. 3 Analysis results of samples detecting by TLC

由图可以看出,点样量 $1.0 \mu\text{g}$ 时,斑点模糊,肉眼辨别困难,而且在空气中很快退色,所以认为该方法的最低检测限为 $1.0 \mu\text{g}$,但以点样量 $20.0 \mu\text{g}$ 的薄层展开效果最佳。

2.5 对发酵液的检测分析

2.5.1 对发酵液原液的检测 采用出发菌株发酵,对所得发酵液进行 TLC 检测,结果如图 3(b)。从图中可以看出,发酵液组分斑点与标准品有很好的-致性,分离效果较好,而且还可以较清楚地看到各组分的含量,为筛选优良出发菌株提供了方便。

2.5.2 经离交浓缩后发酵液的检测 为了有效检测庆大霉素发酵液中的微量组分,通过离交浓缩的方法,将发酵液进行了适当的浓缩,然后再进行 TLC 检测,结果如图 3(a)。从图上可以看出,浓缩后再用 TLC 进行检测,可以清楚地分出 10 个左右的组分,斑点明显且分离效果好。这样,就为庆大霉素微量组分的检测研究提供了方便。

2.6 快速检测各组分比及效价

2.6.1 目测 在选育低毒高效优良菌株的过程中,采用最佳 TLC 体系对发酵液进行分析,其检测结果为 C_1, C_{1a}, C_2 斑点直径平方分别为 15.5, 9.1, 12.5; 各组分比为 $C_1 : C_{1a} : C_2 = 5 : 3 : 4$ 。从结果可以看出,综合考虑斑点直径和颜色,可以估算出组分的含量比,从而为进一步的选育提供依据。

2.6.2 HPLC 分析 为了对 2.6.1 的检测进行验证,又进行了 HPLC 检测,结果见图 4 和图 5。

采用“面积归一法”计算庆大霉素的含量及组分比。TLC 检测结果为: C_1, C_{1a}, C_2 质量分数为 45.95%, 18.34%, 35.72%, $C_1 : C_{1a} : C_2 = 5 : 3 : 4$ 。与 HPLC 检测结果具有很好的一致性,由于庆大霉素在 HPLC 分析前,必须进行衍生化处理,操作相对繁琐,所以,采用 TLC 检测更显方便实用,尤其在发酵试验与工业生产中,在不要求精确定量的情况下更是如此。

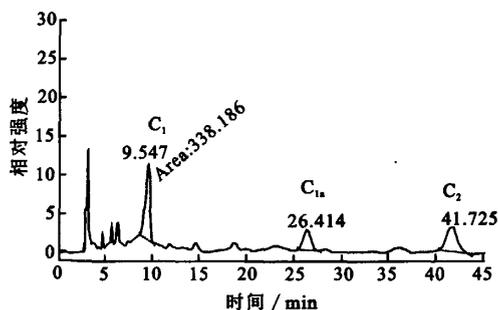


图 4 标准品 HPLC 分析图

Fig. 4 HPLC profile for standard

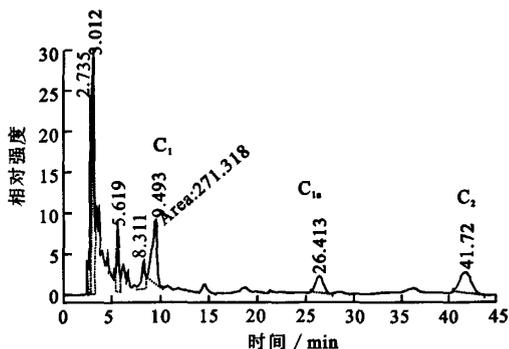


图 5 发酵液的 HPLC 分析图

Fig. 5 HPLC profile for culture broth

2.6.3 各组分的效价检测 使用二剂量法生物效价测定软件对数据进行处理,结果为 TLC 斑点洗脱液中 C_1, C_{1a}, C_2 效价分别为 184.9037, 142.2853, 279.2711 U/mL。从结果可以看出,虽然 C_1 组分的相对含量得到了提高,但效价还是没有 C_2 高,这主要是因为,虽然 C_1 组分毒副作用小,不易产生耐药性,但疗效不如 C_{1a} 和 C_2 组分疗效高,与文献报道一致。由此看出, TLC 结合生物检测法可以较为简单准确地检测出各组分的生物效价,为 GM 组分的研究提供了便利。

3 结 语

1) 对各铺板体系最终的展层效果从分离度及比移值等方面进行综合分析比较,含羧甲基纤维素钠质量分数 0.2%, 磷酸二氢钠质量分数 5%, 和乙二胺四醋酸二钠质量分数 0.1% 的溶液,与硅胶粉按照 3 : 1 的比例混合研磨 0.5 h 后铺板,适合 GM 组分的分离检测。

2) 对各展开体系的检测结果进行分析发现,采用 $F: V(\text{氯仿}) : V(\text{甲醇}) : V(\text{质量分数 } 25\% \text{ 的氨水}) = 5 : 4 : 3$, 静置分层,上相饱和,下相展开,斑点明显且圆整,比移值较大,分离效果好。

3) 通过对两种显色剂的比较,碘蒸气显色操作简单,斑点颜色明显,整体优于茚三酮显色。

4) 确定最佳体系下,该试验方法的检测限为 $1.0 \mu\text{g}$ 。

5) 用最佳体系对发酵液进行检测分析,可以实现对 GM 主组分的分离检测,效果较好。通过将发酵液进行离交浓缩后,在最佳体系下进行检测,可以分离检测到 10 个左右的组分,分离效果较好。

6) 在最佳体系下进行 TLC 检测,综合考虑斑点直径与颜色,可以快速估算出 GM C 的组分比,与

HPLC 检测结果存在较好的一致性。同时,结合生物效价检定法,可以较准确地得到主组分的效价。

参考文献(References):

- [1] 杨利红,胡昌勤,刘文英. HPTLC法测定庆大霉素组分及其相关物质[J]. 药物分析杂志,2006,26(2):221.
YANG Li-hong, HU Chang-qin, LIU Wen-ying. HPTLC determination of gentamicin and its related substances[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2006,26(2):221. (in Chinese).
- [2] 《中华人民共和国药典》编辑委员会. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [3] Galand N,Ernouf D, Montigny F, et al. Separation and identification of cannabis components by different planar chromatography techniques(TLC, AMD,OPLC)[J]. *J Chromatogr Sci*,2004,42(3):130.
- [4] 解翠珠. 薄层色谱法鉴别硫酸庆大霉素注射液的改进[J]. 华西药学杂志,2006,21(4):410.
XIE Cui-zhu. The Improvement of identification of gentamicin sulfate injection by TLC[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*,2006,21(4):410. (in Chinese)
- [5] 李传响,马鸣晓,刘红. 硫酸庆大霉素薄层快速鉴别方法的探讨[J]. 中国药事,2006;20(8):511.
LI Chuan-xiang, MA Ming-xiao, LIU Hong. Study on the fast identification of getamicin sulfate by TLC[J]. *China Pharmaceutical Affairs*,2006,20(8):511. (in Chinese)
- [6] 夏金尧. 硫酸庆大霉素片薄层色谱法鉴别的改进[J]. 西南国防医药,2005;15(6):638.
XIA Jin-yao. The improvement of the identification of gentamicin sulfate tablet by TLC chromatography[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China*,2005,15(6):638. (in Chinese)
- [7] 梅群,杨钟娣. 硫酸小诺霉素薄层色谱的鉴别探讨[J]. 西北药学杂志,2004;19(5):201.
MEI Qun, YANG Zhong-di. Study on the identification of micronomicin sulfate by TLC chromatography[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*,2004,19(5):201. (in Chinese)
- [8] 赵长敏,崔春英,徐捷京. 硫酸庆大霉素缓释片薄层鉴别方法的改进[J]. 中国药品标准,2000,1(2):54.
ZHAO Chang-min, CUI Chun-ying, XU Jie-jing. Improvement of identification method by thin-layer chromatography for gentamicin sulfate sustend release tablets[J]. *Drug Standards of China*,2000,1(2):54. (in Chinese)
- [9] 吴世杰,丁红雨. 薄层色谱法分离鉴别复方霉唑乳膏中的硫酸庆大霉素[J]. 中国微生态学杂志,2003;15(2):117.
WU Shi-jie, DING Hong-yu. Identification and isolation of gentamicin sulfate in compound preparation of clotrimazole by TLC[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2003,15(2):117. (in Chinese)
- [10] 贾忠,袁继勇,吕东煜. 薄层扫描法测定注射用硫酸庆大霉素中3组分的含量[J]. 中国药房,2005;16(3):217.
JIA Zhong, YUAN Ji-yong, LU Dong-yu. Content determination of three components in gentamicin with Scan-TLC[J]. *China Pharmacy*,2005,16(3):217. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)