doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2021.4.09

庆大霉素发酵液检测方法研究

张莉萍,牛 春,石彦鹏, 张 萍*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,银川 750002)

[收稿日期] 2020 - 08 - 10　[文献标识码]A　[文章编号]1002 - 1280 (2021) 04 - 0063 - 06　[中图分类号]S859.79

[摘　要]　在庆大霉素微生物发酵过程中,探索发酵液中庆大霉素效价的快速测定方法。在优化的发酵工艺条件下发酵生产庆大霉素,分别运用旋光法、紫外分光光度法和高效液相色谱法(HPLC)对庆大霉素发酵液的效价进行测定。结果最佳发酵条件为:种瓶接种量 2 cm^2,种龄 24 h,发酵瓶接种量 12%,发酵周期 5 d。优化后的庆大霉素发酵液效价相较于优化前提高 70% 左右。紫外分光光度法、HPLC 法和旋光法测定的庆大霉素发酵液效价产生的误差均小于 3%。三种检测方法均能运用在庆大霉素发酵液效价的快速检测中。旋光法操作简单但对标准品需求量大,紫外分光光度法耗时短但只能测定庆大霉素总体效价,HPLC 法需要出峰时间。因此,在庆大霉素发酵液效价测定中需根据自己的需求选择最佳检测方法。

[关键词]　庆大霉素发酵液;检测方法;旋光法;紫外分光光度法;HPLC

Study on Detection Method of Gentamicin Fermentation Broth

Zhang Li - ping, Niu Chun, Shi Yan - peng, Zhang Ping*

(*Ningxia Tere Pharmaceutical Co., LTD., Yinchuan* 750101, *China*)

Corresponding author: Zhang Ping, E - mail: chun. niu@ tairuiWorld. com

Abstract: To explore the rapid determination method of gentamicin titer in fermentation broth during the microbial fermentation of gentamicin. Gentamicin was fermented under optimized fermentation conditions. The potency of gentamicin fermentation broth was determined by optical rotation method, ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC). The best fermentation conditions were: seed bottle inoculation volume 2 cm^2, seed age 24 h, fermentation bottle inoculation volume 12%, fermentation period 5 d. The optimized potency of gentamicin fermentation broth is increased by about 70% compared with that before optimization. The errors of gentamicin fermentation broth titers determined by ultraviolet wind photometric method, HPLC method and optical rotation method are all less than 3%. The three detection methods can be used in the rapid detection of gentamicin fermentation broth titer. The optical rotation method is simple to operate but has a large demand for standard products. The ultraviolet spectrophotometry method takes a short time but can

作者简介: 张莉萍,硕士,从事生物制药方向研究。

通讯作者: 张 萍。E - mail: chun. niu@ tairuiWorld. com

only determine the overall potency of gentamicin. The HPLC method requires peak time. Therefore, in the determination of gentamicin fermentation broth titer, it is necessary to choose the best detection method according to your needs.

Key words: Gentamicin fermentation broth; detection method; polarimetry; ultraviolet spectroscopy; HPLC

庆大霉素(Gentamicin,GM)主要是由绛红小单孢菌(*Micromonospora Purpurea*)和棘孢小单孢菌(*M. echinospora*)发酵产生的一种氨基糖苷类广谱抗生素,对多数革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌均有较强的抗菌作用,是临床上广泛使用的抑菌抗生素之一[1]。

庆大霉素因自身没有紫外吸收特性,其效价检测一直以来是国内研究热点。主要检测方法有微生物检测法、旋光法和衍生法,目前这些检测方法通常只用于较纯的庆大霉素制剂浓度分析。在发酵生产过程中,由于发酵液中的成分比较复杂,且对发酵液效价检测一般要求需要多次重复的快速检测,微生物检测法操作步骤繁琐复杂、且耗时长,本实验利用庆大霉素的旋光性以及庆大霉素氨基糖苷上的氨基与特定化合物发生衍生反应原理,分别采用旋光法、紫外分光光度衍生法和高效液相色谱衍生法测定降红小单孢菌发酵生产的庆大霉素发酵液效价,通过比较各检测方法测定的效价含量筛选出最适合庆大霉素发酵液的效价检测方法。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　出发菌株　绛红小单孢菌(Micromonospora purpurea)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),编号 4.5706。

1.1.2　培养基及培养条件　斜面培养基(%)及培养条件:可溶性淀粉 1.0%,$NaCl_2$ 0.05%,KNO_3 0.1%,$CaCO_3$ 0.1%,K_2HPO_4 0.03%,麸皮 2.0%,$MgSO_4$ 0.05%,琼脂 2.0%,天冬素 0.002%,pH7.40 ~ 7.60,37 ℃培养 7 d[2]。

种子培养基(%)及培养条件:葡萄糖 0.1%,玉米淀粉 1.0%,玉米粉 1.5%,蛋白胨 0.2%,黄豆饼粉 1.0%,$CaCO_3$ 0.6%,$COCl_2$ 1 ug/mL,KNO_3 0.05%,植物油 0.2%,pH 自然,34 ℃培养 24 h[3]。

发酵培养基(%)及培养条件:葡萄糖 0.5%、玉米淀粉 5.0%、玉米粉 1.0%、蛋白胨 0.6%、黄豆饼粉 3.0%、$CaCO_3$ 0.7%、$COCl_2$ 0.001%、$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%、KNO_3 0.15%、淀粉酶 0.02% 和泡敌 0.03%,pH7.50 ~ 7.60,33 ℃培养 4 d[4]。

1.1.3　试剂　庆大霉素标准品(中国药品生物制品检定所,纯度为 638 u/mg);甲醛(分析纯);乙酰丙酮(分析纯);邻苯二甲醛(OPA);甲醇(分析纯);巯基乙酸(分析纯)异丙醇(分析纯);庚烷磺酸钠(分析纯);甲酸(分析纯)。

1.2　方法

1.2.1　发酵工艺优化　起始发酵工艺是待斜面孢子成熟后,刮取成熟孢子 2 cm^2 于装有 30 mL 种子培养液的 300 mL 直口三角瓶中,34 ℃培养 24 h,将扩培活化的种子液按 10% 接种量转入装有 40 mL 发酵培养液的 300 mL 直口三角瓶中,33 ℃培养 4 d。本文分别对种瓶接种量和种龄、发酵瓶接种量和发酵周期进行优化。

1.2.2　发酵液预处理　用 6 mol/L 的硫酸溶液将发酵液酸化至 pH1.8 – 2.0,静置 30 分钟后过滤,滤液待用。

1.2.3　旋光法　标准曲线绘制:精密称取庆大霉素标准品适量,分别加水配制成 4、6、8、10 和 12 mg/mL不同浓度的标准溶液,放置自动旋光仪测定旋光度值,标绘制标准曲线。

效价检测:滤液用20%氢氧化钠调 pH 至6.0 – 7.0,加入阳离子交换树脂吸附,再用 0.5 mol/L 的硫酸溶液解析[5],解析液放置自动旋光仪测定旋光度值。

1.2.4　紫外分光光度衍生法　标准曲线绘制:精密称取庆大霉素标准品适量,加水配制标准品储存溶液,分别用水稀释至浓度 20 u/mL、40 u/mL、60 u/mL、80 u/mL 和 100 u/mL,精密吸取各浓度标

准品 2 mL 置 25 mL 比色管中,衍生步骤同发酵液样品。

效价检测:将滤液稀释到标准曲线范围内待用。精密吸取稀释滤液 2 mL 置 25 mL 比色管中,加衍生剂乙酰丙酮 – 甲醛溶液 5 mL(乙酰丙酮 – 甲醛溶液配制参考文献[6]),沸水浴 30 min,室温冷却,精密加入纯化水 7 mL,充分混匀,于 339 nm 波长处测定吸收度。以纯化水经同样处理后作空白对照。

1.2.5　高效液相色谱(HPLC)衍生法　标准品配制:精密称取庆大霉素标准品,加水配制成 10 mg/mL 的标准品储存溶液,4 ℃冰箱保存,临用时稀释进行测定。

效价检测:精密吸取滤液 4 mL 置 25 mL 比色管中,加衍生剂 OPA1.6 mL(OPA 溶液配制参考文献[5]),加异丙醇至 10 mL,摇匀,60 ℃水浴 15 min,至于冰水中终止反应,12 000 r/min 离心 5 min,取上清待测。色谱流动相为庚烷磺酸钠水溶液(5 g/L):甲醇:甲酸 =21:5:74;波长 330 nm。以纯化水经同样处理后作空白对照。

2　结果与分析

2.1　种瓶接种量和种龄对发酵水平的影响　本文分别刮取斜面生长成熟的孢子 1 cm^2、2 cm^2和3 cm^2到种瓶,每隔 4 h 测种瓶菌体含量,每隔 8 h 转发酵,探究种瓶接种量和种龄对庆大霉素效价的影响。

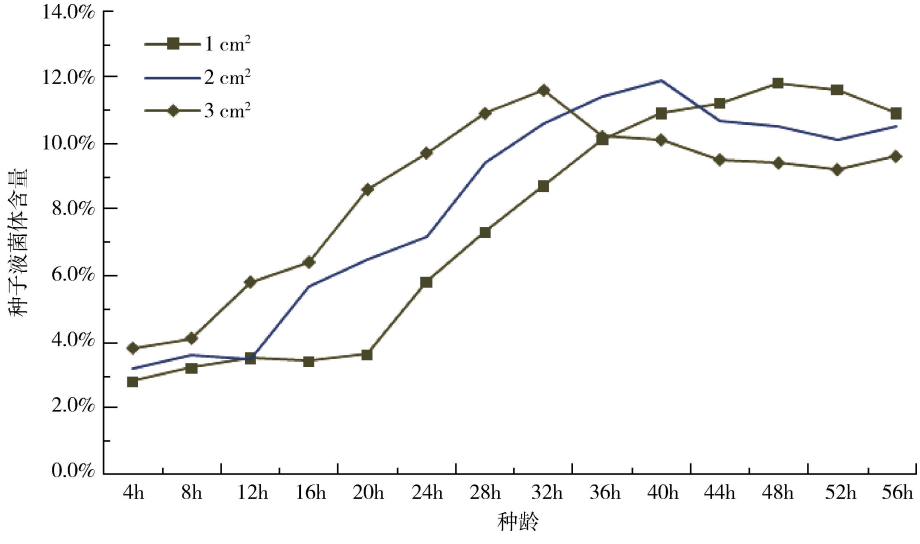

图 1　种子液生长曲线

Fig 1　The growth curve of Seed

种子生长曲线如图 1 所示,当孢子接种量为 1 cm^2时,降红小单孢菌从培养第 20 h 进入对数生长期,48 h 后进入平稳期,当接种量为 2 cm^2时,从培养第 12 h 进入对数生长期,40 h 后进入平稳期,当接种量为 3 cm^2时,培养 8 h 后,降红小单孢菌快速进入对数生长期,32 h 后菌体生长开始下降。从发酵水平来看,种瓶接种量 2 cm^2和种龄 24 h 组合的庆大霉素发酵液效价最高(表 1)。这说明种瓶接种量与种龄相互影响,孢子量过大会导致种瓶培养基中菌丝体生长旺盛,提前进入对数生长期,过小则会延迟进入对数生长期。通常种龄以菌丝处于生命力极为旺盛的对数生长期,且培养液中菌体量还未达到最高峰时为宜。若过于年轻的种子接入发酵瓶,往往会出现前期生长缓慢而使整个发酵周期延长,产物开始形成的时间推迟甚至会因菌体量过少而在发酵瓶内结球,造成异常发酵的情况。而过老的种子则会造成生产能力下降,菌体过早自溶。

表 1　种瓶接种量与种龄组合结果的效价分析

Tab 1　Potency analysis of the combination of seed bottle inoculation volume and seed age

效价测定方法	种瓶接种量	种龄					
		8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h
旋光法(u/mL)	1 cm^2	85	254	1852	2472	2421	2315
	2 cm^2	152	487	2741	2654	2587	2274
	3 cm^2	216	1126	2683	2641	2071	1926
UV 法(u/mL)	1 cm^2	98	261	1862	2486	2438	2327
	2 cm^2	168	482	2761	2669	2597	2291
	3 cm^2	224	1139	2674	2653	2094	1954
HPLC 法(u/mL)	1 cm^2	105	258	1877	2481	2427	2324
	2 cm^2	171	493	2756	2663	2585	2285
	3 cm^2	237	1129	2691	2674	2083	1935

2.2　发酵瓶接种量、发酵周期和发酵液 pH 值对庆大霉素含量的影响　在最优的种瓶接种量和种龄条件下,我们分别选取 8%、10%、12% 和 14% 接种量,从发酵第 3 天开始每天放瓶,分别用旋光法、紫外分光光度法和 HPLC 法测定发酵液效价。

随着发酵周期延长,庆大霉素发酵液的 pH 整体呈现增长趋势(图 2),而效价呈现先增后减趋势(表 2)。当接种量为 8% 和 10% 时,发酵第 6 天效价达到最高,分别为 2179 u/mL 和 3159 u/mL,此时发酵液 pH 接近 7.5;当接种量为 12% 时,发酵第 5 天达到最高效价 4217 u/mL,发酵液 pH 接近 7.5;接种量为 14% 时,摇瓶效价整体偏低(表 2)。这说明发酵瓶接种量与发酵周期也相互影响,降红小单孢菌生产庆大霉素的最佳 pH 为 7.5 左右。发酵瓶接种量的大小决定了生产菌种在发酵瓶中的生产繁殖速度。较大的接种量可以缩短发酵瓶中菌丝繁殖到达高峰的时间,使次级代谢产物的形成提前到来,且在生产菌迅速占据整个培养环境时,减少杂菌生长机会。但若接种量过多会导致菌丝生长过快,使培养液黏度增加,造成溶解氧不足而影响代谢产物的形成。

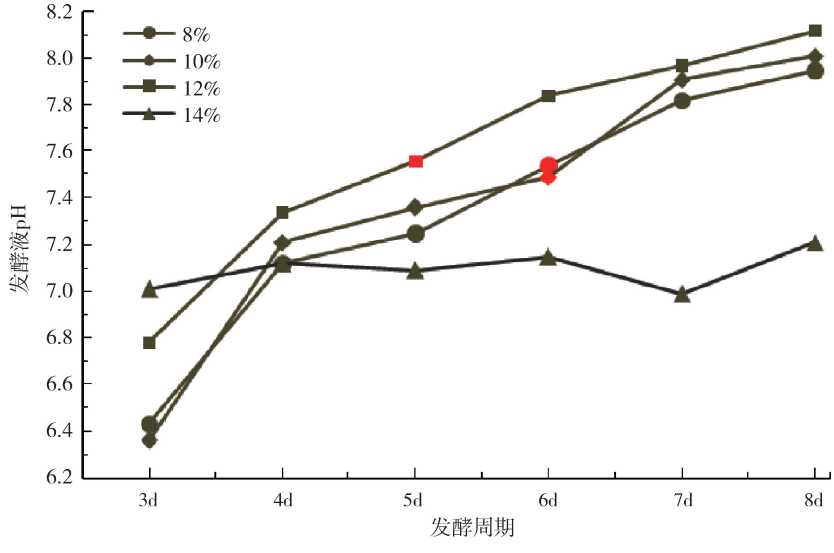

图 2　发酵液 pH 变化

Fig 2　The pH change of fermentation broth

表 2　发酵瓶接种量与发酵周期组合结果的效价分析

Tab 2　Potency analysis of the combined results of fermentation flask inoculation volume and fermentation cycle

效价检测方法	发酵瓶接种量	发酵周期					
		3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
旋光法(u/mL)	8%	1032	1978	2468	2679	2441	2516
	10%	1537	2735	2943	3159	2714	2239
	12%	1846	3274	4217	4121	3682	3269
	14%	1184	1642	1743	1701	1687	997
紫外分光光度法(u/mL)	8%	1068	1956	2510	2741	2458	2524
	10%	1552	2749	3002	3264	2723	2245
	12%	1859	3269	4229	4136	3674	3284
	14%	1201	1657	1753	1721	1691	983
高效液相色谱法(HPLC)(u/mL)	8%	1042	1994	2497	2716	2451	2531
	10%	1547	2751	2967	3187	2729	2241
	12%	1851	3281	4234	4129	3691	3276
	14%	1196	1649	1761	1698	1699	1008

2.3　紫外分光光度法、高效液相色谱法(HPLC)和旋光法的比较　紫外分光光度法的标准曲线如图 3 所示,当庆大霉素浓度在 20 ~ 100 u/mL 之间,其与吸光值呈现较好的线性关系,得线性方程 $y = 156.8x + 4.5085$,其中 y 为浓度,x 为吸光值,相关系数 $r^2 = 0.9998$。旋光法的标准曲线如图 4 所示,当庆大霉素浓度在 4 ~ 12 mg/mL 之间,其余旋光值呈现较好的线性关系,得线性方程 $y = 2.2607x + 1.9098$,其中 y 为浓度,x 为吸光值,相关系数 $r^2 = 0.9992$。

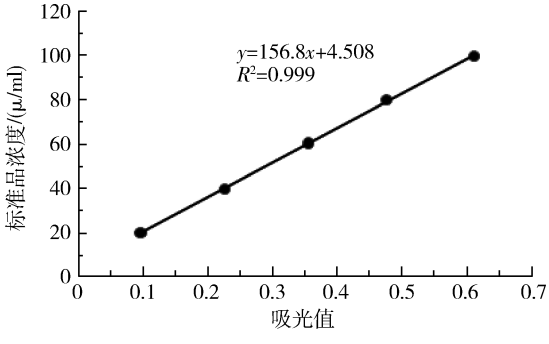

图 3　紫外分光光度法的标准曲线

Fig 3　Standard curve of ultraviolet spectrophotometry

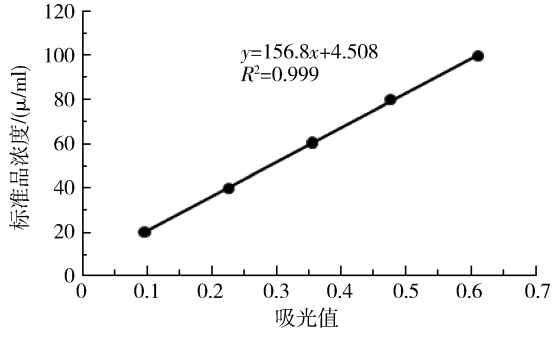

图 4　旋光法的标准曲线

Fig 4　Standard curve of polarimetry

分别以优化前和优化后的发酵工艺为培养条件,摇瓶发酵获得庆大霉素发酵液。优化前和优化后的发酵液效价检测结果如表 3 所示。发酵工艺优化前,三种检测方法测得的庆大霉素发酵液效价约为 2600 ~ 2700 u/mL,平均相对偏差均小于 2%;发酵工艺优化后,三种检测方法测得的庆大霉素含量约为 4500 ~ 4700 u/mL,平均相对偏差均小于 3%。整体来看,三种检测方法测定的庆大霉素发酵液效价相差不大。因此,三种检测方法都能运用在庆大霉素发酵液效价快速检测中。

表 3　三种检测方法测定发酵工艺优化前后发酵液效价的比较

Tab 3　Comparison of three methods for determining the potency of fermentation broth before and after fermentation process optimization

		效价(u/mL)			K_2-K_1 相对偏差	K_3-K_1 相对偏差
		旋光法(K_1)	UV 法(K_2)	HPLC 法(K_3)		
优化前	1	2647	2715	2681	2.57%	1.28%
	2	2653	2694	2690	1.55%	1.39%
	3	2671	2714	2711	1.61%	1.50%
	K_{ave}	2657	2708	2694	1.91%	1.39%
优化后	1	4531	4594	4671	1.39%	3.09%
	2	4468	4542	4587	1.66%	2.66%
	3	4529	4624	4652	2.10%	2.72%
	K_{ave}	4509	4587	4637	1.73%	2.84%
增长率%		69.7%	69.4%	72.0%	–	–

3　讨论与结论

主要进行了庆大霉素发酵工艺优化以及旋光法、紫外分光光度法和高效液相色谱法三种不同庆大霉素发酵液检测方法在庆大霉素发酵液效价检测中的比较研究。

在发酵工艺优化中,最佳种瓶接种量和种龄的组合为刮取成熟孢子 2 cm^2 于种子培养液,活化培养 24 h 转接发酵瓶。最佳发酵瓶接种量和发酵周期的组合为按发酵培养液体积的 12% 吸取种子液到发酵瓶,摇瓶培养 5 d 后放瓶。发酵工艺优化后的庆大霉素发酵液效价相较于优化前提高 70% 左右。

旋光法、紫外分光光度法和高效液相色谱法三种检测方法都能运用在庆大霉素发酵液效价快速检测中。旋光法操作简单但其对标准品需求量大,紫外分光光度法和高效液相色谱法均需要经过衍生反应,高效液相色谱法需要出峰时间但能测得庆大霉素各组分含量,紫外分光光度法耗时短但只能测定庆大霉素总体效价。因此在庆大霉素发酵生产过程中,若对时间要求紧迫,可选择紫外分光光度法,若对庆大霉素各组分含量需要定量分析,则可选择 HPLC 法作为首选检测方法。

参考文献:

[1]　范一文,梁伟凡,李嘉胜,等. 庆大霉素发酵液的分离提取[J]. 实验室研究与探索, 2011(08):41 – 44.
Fan Y W, Liang W F, Li J Sh, *et al*. Separation and extraction of gentamicin fermentation broth[J]. Laboratory Research and Exploration, 2011(08):41 – 44.

[2]　颉红霉,杨伟成. 不同能量重离子对庆大霉素生产菌绛红小单孢菌诱变的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1998,23(6):462 – 463.
Jie H M, Yang W Ch. Study on the mutagenesis of gentamicin – producing bacterium Micromonospora cristatum with different energy heavy ions[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 1998,23(6):462 – 463.

[3]　刘 华,韩文儒. 三十烷醇对庆大霉素产生菌生长代谢影响的研究[J]. 微生物学通报, 1996, 023(004):222 – 223.
Liu H, Han W R. The effect of triacontanol on the growth and metabolism of gentamicin – producing bacteria [J]. Microbiology Bulletin, 1996, 023(004):222 – 223.

[4]　陈梁军. 庆大霉素发酵工艺的研究[J]. 中国医药指南, 2011(33):253 – 255.
Chen L J. Research on the fermentation process of gentamicin [J]. Chinese Medical Guide, 2011(33):253 – 255.

[5]　丁碧粉,张 韬,李继安,等. 庆大霉素 C1a 生产过程中不同样品的 HPLC 法检测[J]. 中国医药工业杂志, 2016, v. 47(03):69 – 74.
Ding B F, Zhang T, Li J A, *et al*. Detection of different samples in the production process of gentamicin C1a by HPLC method [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2016, v. 47(03):69 – 74.

[6]　潘 进,邱凌峰,方圣琼,等. 衍生化紫外分光光度法测定硫酸庆大霉素含量[J]. 环境工程, 2015(S1):295 – 297.
Pan J, Qiu L F, Fang Sh Q, *et al*. Determination of gentamicin sulfate content by derivatization ultraviolet spectrophotometry[J]. Environmental Engineering, 2015(S1): 295 – 297.

(编 辑:陈 希)