# HPLC 法测定发酵液中灵菌红素的含量

夏永军，艾连中
（上海理工大学医疗器械与食品学院，上海 200093）

**摘要：**灵菌红素是具有由三个吡咯环组成的甲氧基吡咯骨架结构的次级代谢产物，因为具有良好的抗癌活性而受到广泛关注。目前，灵菌红素主要是通过分光光度法进行检测。为实现对发酵液中灵菌红素的快速准确测定，实验采用三氟乙酸酸化的流动相体系，利用高效液相色谱法梯度洗脱检测灵菌红素含量。实验结果显示，在优化后的色谱条件下，乙腈-水梯度洗脱体系可以显著改善灵菌红素的色谱峰形以及洗脱时间，并与杂质达到较好的分离度。色谱条件为：sepax Bio-C18 色谱柱（150 mm×4.6 mm, 3 μm）；柱温 35 ℃；流速为 0.6 mL/min。灵菌红素的线性范围为 6~150 μg/mL，检测限为 0.0058 μg/mL，加标回收率为 95.74~98.41%。实验表明，研究所用的分析方法灵敏度、精密度、重现性和准确度均较好，能够较好的应用于灵菌红素发酵样品的分析检测，。

**关键词：**灵菌红素；高效液相色谱；检测

**文章篇号：**1673-9078(2013)11-2772-2776

# Determination of Prodigiosin in Fermentation Broth by HPLC

**XIA Yong-jun, AI Lian-zhong**
(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093)

**Abstract:** Prodigiosin is a multifaceted secondary metabolite with tripyrrole structure, which attracts great interest for its anticancer activities. At present, the main detection method is spectrophotometry. In order to detect prodigiosinin fermentation broth accurately and rapidly， a high performance liquid chromatography（HPLC）method with gradient elution was developed. The best conditions were established as follows: the separation performed on sepax Bio-C18 column (150 mm×4.6 mm, 3 μm) at 35 ℃ with flow rate of 0.6 mL/min. Under the chosen conditions, prodigiosin could be separated well and showed a symmetrical peak shape with acetonitrile-water gradient elution system. The liner range of prodiogisin was 6~150 μg/mL, and the limit of detection was 0.0058 μg/mL. The recovery of standard addition was 95.74~98.41% with precision of 0.92% relative standard deviation (RSD). The proposed HPLC method could be used for the determination of prodigiosinin fermentation broth with high sensitivity, good repeatability and accuracy.

**Key words:** prodigiosin; high performance liquid chromatography; detection

灵菌红素类化合物是一族天然红色素，通常具有由三个吡咯环组成的甲氧基吡咯骨架结构。由 Amako 等人在 1929 年研究沙雷氏菌生长时发现的，随后在 1960 年由 Harashima K 等人首次分离得到，自此，不断有学者对该类物质的生物活性进行研究[1]。自然界中产灵菌红素类化合物的菌株主要是粘质沙雷氏菌（*Serratiamarcecens*），此外还有一些放线菌（*Streptomyces coelicolor*）、以及海洋细菌（*Hahellachejuensis*、*Pseudoalteromonasdenitrificans*）[2~3]。如图 1 所示，天然灵菌红素类化合物可以分为四种结构类型。第一种为直链结构，如灵菌红素（Prodigiosin）和十一烷基灵菌红素；其余三种均为灵菌红素的环状衍生物[4]。

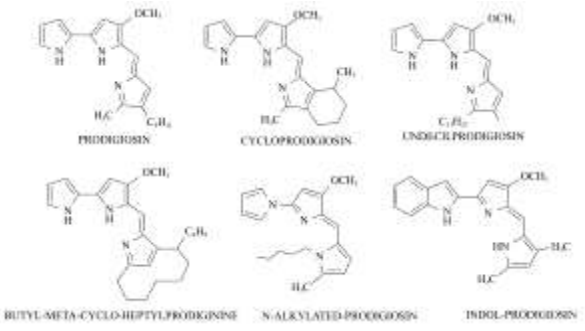


图 1 灵菌红素家族化合物的结构

**Fig.1 Chemical structure of some prodigiosin family members**

近年来，灵菌红素由于在免疫抑制和抗癌方面良好的功效而受到越来越多的关注。灵菌红素家族化合物是一类非常有潜力的抗癌待选药物，对许多癌细胞（如肺癌、结肠癌、肾癌以及乳腺癌）都具有良好的细胞凋亡作用，而对正常细胞的毒性非常低[5~7]，值得

收稿日期：2013-07-03

作者简介：夏永军（1981-），男，博士，讲师，益生菌资源开发、药用微生物

通讯作者：艾连中（1976-），男，博士，教授，食品生物技术

注意的是，除了诱导细胞凋亡，灵菌红素能够有效抑制癌细胞的浸润转移作用。灵菌红素可以与细胞表面受体结合，阻断 γ 链的信号转换，从而显示出免疫抑制活性[8]。灵菌红素能够抑制 T 细胞介导的免疫应答反应，但是对 B 细胞的没有显著影响。研究表明灵菌红素的抑制免疫机制与目前常见的免疫药物不同，是一种潜在的新型抑制免疫药物[9~10]。此外，灵菌红素还显示出抗菌、抗原生动物以及抗疟疾等诸多功效[6,11]。由于灵菌红素类化合物的结构新颖，抗肿瘤活性高，同时对正常细胞毒性较低，已成为抗癌药物的关注热点，并有合成出多种相关的衍生物[12~13]。

与灵菌红素生物活性研究相比，其分析检测和发酵调控技术研究相对落后。灵菌红素在可见光 535 nm 下具有特征吸收，因此，目前主要利用分光光度计对其含量进行测定，但是灵菌红素对 pH 较为敏感，溶剂 pH 的变化会导致色素颜色发生转变，而这对于吸光度值是有一定影响的；同时，吸光度值并不能反映发酵产物中所含的杂质情况，不利于日后药物开发的品质分析。因此，我们考虑采用 HPLC-DAD 法，利用其高灵敏度和准确性测定发酵样品中灵菌红素的含量。此外，在今后灵菌红素类化合物生物合成调控的研究中，利用 HPLC-DAD 技术或是与质谱联用，可以更加直观的观测到灵菌红素相关衍生物合成水平的变化，为提高产量或是筛选新的化合物提供技术支持，也为今后灵菌红素工业化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂

蔗糖、蛋白胨、酵母膏、乙酸、$MgSO_4$、$KH_2PO_4$、NaCl 和无水乙醇均为国产分析纯试剂；乙腈、甲醇和三氟乙酸(TFA)均为色谱纯。

#### 1.1.2 主要仪器设备

Agilent 1260 高效液相色谱系统，美国 Agilent 公司；恒温摇床，上海智城分析仪器制造有限公司；高速离心机，Beckman coulter Inc.。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 标准溶液的配置

准确称取灵菌红素标准品 1.50 mg，与 10 mL 容量瓶中用甲醇定容，配置成 0.15 mg/mL 的标准溶液。然后分别配置质量浓度为 0.12、0.06、0.03、0.015、0.006 mg/mL 的标准液，绘制标准曲线。

#### 1.2.2 灵菌红素样品制备

取灵菌红素发酵液 2.0 mL，加入 9 倍体积无水乙醇（含有 0.1%乙酸），45 ℃振荡萃取 1 h，8000 r/min 离心 5 min，取上清 0.22 μm 滤膜微滤后用于 HPLC 分析。分析条件如下：色谱柱：Sepax Bio-C18 （3 μm，4.6 mm×150 mm）；流速：0.6 mL/min；检测波长：535 nm；流动相 A：水/TFA=100/0.1，流动相 B：乙腈/TFA=100/0.09；洗脱梯度如下：0~15 min，流动相 B 25~90%；15~15.5 min，流动相 B 90~25%；15.5~21 min，流动相 B 25%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相等度洗脱对灵菌红素检测的影响

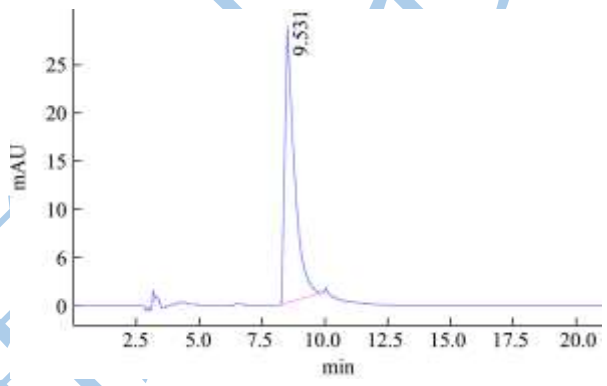



图 2 35%乙腈等度洗脱时灵菌红素色谱图

**Fig.2 The chromatogram of prodigiosin under 35% acetonitrile isocratic elution**

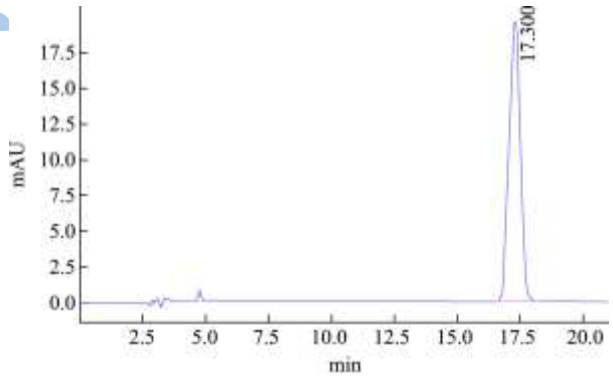



图 3 45%乙腈（添加 0.1% TFA）等度洗脱时灵菌红素色谱图

**Fig.3 The chromatogram of prodigiosin under 45% acetonitrile isocratic elution with 0.1 TFA**

实验考查了乙腈-水流动相体系等度洗脱对灵菌红素分离及色谱峰形的影响。如图 2 所示。当乙腈浓度为 35%时，灵菌红素保留时间为 9.53 min，时间较为合适，但是拖尾严重，并且拖尾导致主峰与之后的杂质没有完全分离，后续试验表明，提高降低乙腈浓度并不能有效地改善这个问题。因此，我们在流动相中添加 0.1%的 TFA，考察酸性环境下，灵菌红素拖尾现象是否改善，实验结果如图 3 所示。有一点不同的

是，当乙腈浓度仍然为 35%时，在采集时间内（21 min），灵菌红素不能被洗脱下来，因此我们将乙腈浓度加大到 45%，此时灵菌红素的保留时间为 17.30 min，色谱峰的拖尾现象消除了，但是峰宽较大，提高乙腈比例对于减小峰宽效果有限，且会严重降低主峰与杂质峰的分离度。提高流速对于峰宽影响也不大，但是会使得柱压快速升高，影响色谱柱寿命。

由以上实验可知，流动相中添加少量的酸对灵菌红素的检测影响非常显著。在等度洗脱条件下，加入 TFA 可以有效地改善峰形，提高其对称性，但是酸会加强灵菌红素与色谱固定相的作用，使得保留时间发生极大地延后，从而导致色谱柱中灵菌红素分离条带的扩散，色谱峰变宽。因此，等度洗脱并不适合灵菌红素检测。

## 2.2 流动相梯度洗脱对灵菌红素检测的影响

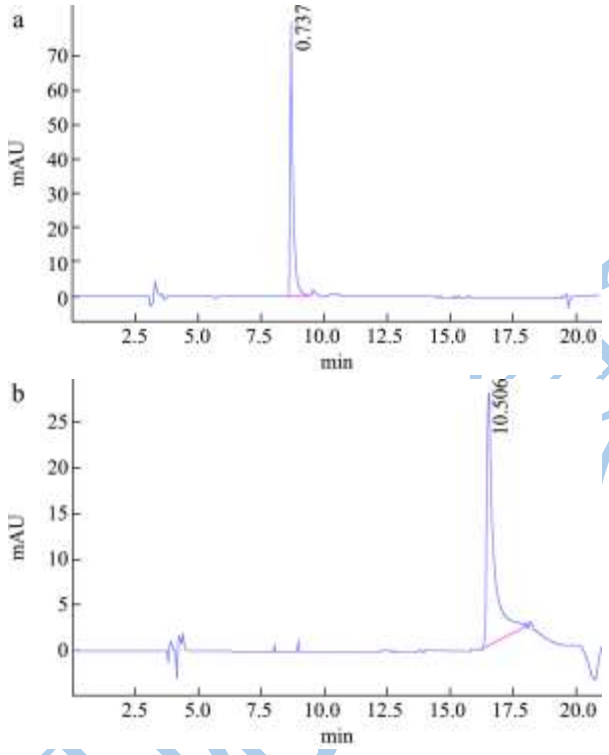



图 4 梯度洗脱对灵菌红素检测的影响

**Fig.4 Effect of gradient elution on prodigiosin detection**

注：a：乙腈-水流动相体系；b：甲醇-水流动相体系。

由上述实验可知，在等度洗脱条件下，灵菌红素并不能保持较好的峰形，并且色谱峰较宽。因此，我们考虑采用梯度洗脱，改善灵菌红素的出峰情况。实验选择甲醇-水和乙腈-水两种流动相洗脱体系，结果如图 4 所示。在梯度洗脱条件下，乙腈-水流动相体系要明显好于甲醇-水体系，色谱峰宽小，拖尾小，保留时间合适。

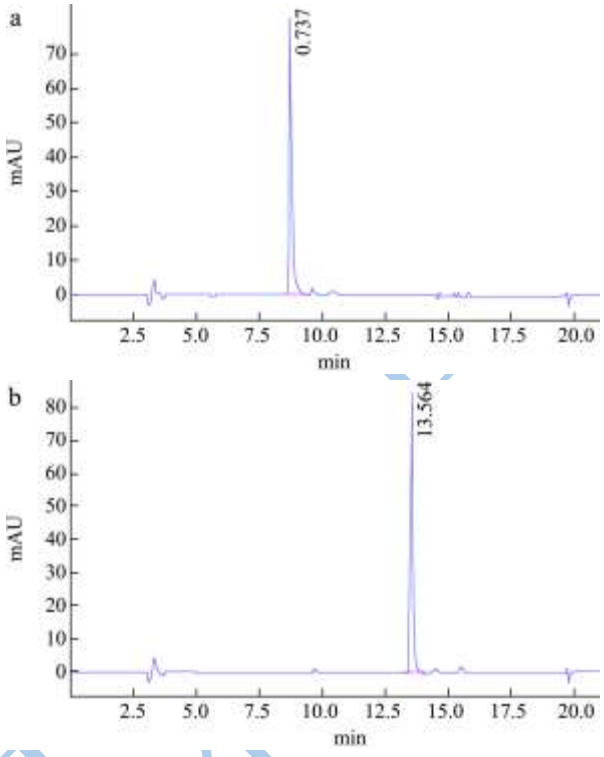



图 5 TFA 对灵菌红素检测的影响

**Fig.5 Effect of TFA on prodigiosin detection**

注：a：未添加 TFA；b：添加 TFA。

确定使用乙腈-水流动相体系之后，我们考察了在流动相体系中添加 TFA 对灵菌红素分离及峰形的影响，实验结果如图 5 所示。在流动相体系中添加 0.1%TFA，能使得灵菌红素出峰时间适当延后，但是不增加色谱峰峰宽，提高与杂质的分离度；同时，可以显著改善灵菌红素的峰形，减少拖尾，从而提高积分的准确性。

## 2.3 分析方法的线性相关性

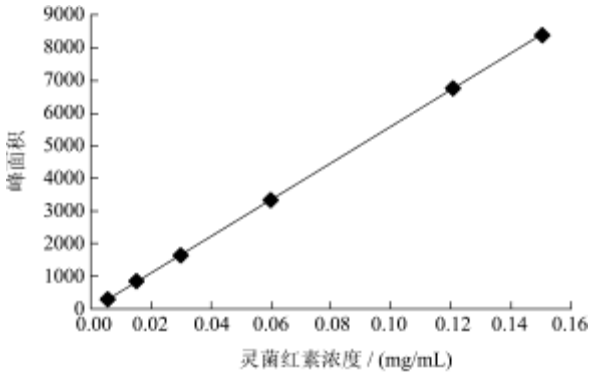



图 6 灵菌红素标准曲线

**Fig.6 The standard curve of prodigiosin**

将配置好的系列标准溶液分别进样，根据峰面积绘制标准曲线，实验结果如图 6 所示。以峰面积 y 对灵菌红素浓度 x 进行线性回归，回归方程为

y=56023x+0.34，$R^2$=0.9999，既灵菌红素在 6-150 μg/mL 范围内线性关系良好。HPLC 检测限和定量限分别按色谱基线信噪比的 3 倍和 10 倍测定，测定结果分别为检测限 0.0058 μg/mL，定量限 0.0178 μg/mL。

## 2.4 精密度分析

表 1 精密度分析结果

**Table 1The precision of the method for the determination of prodigiosin**

| 化合物 | 进样次数 | 峰面积 | 保留时间/min |
|---|---|---|---|
| Prodigiosin | 1 | 638.40 | 13.56 |
| | 2 | 635.40 | 13.52 |
| | 3 | 640.30 | 13.57 |
| | 4 | 640.10 | 13.60 |
| | 5 | 644.30 | 13.55 |
| RSD % | - | 0.45 | 0.25 |

灵菌红素发酵样品 HPLC 分析方法精密度分析结果见表 1。对灵菌红素样品进行 5 次平行进样测定，实验结果显示，灵菌红素的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 3%，表明仪器的精密度良好。

## 2.5 重复性分析

灵菌红素发酵样品 HPLC 分析方法重复性分析结果见表 2。对同一发酵样品测定 5 个平行处理样，实验结果显示，灵菌红素色谱峰面积的 RSD 小于 3%，表明检测方法的重复性良好。

表 2 重复性分析结果

**Table 2 The reproducibility of the method for the determination of prodigiosin**

| 样品批次 | Prodigiosin |
|---|---|
| 1 | 790.20 |
| 2 | 787.70 |
| 3 | 795.50 |
| 4 | 793.10 |
| 5 | 788.40 |
| RSD/% | 0.37 |

## 2.6 回收率分析

灵菌红素发酵样品 HPLC 分析方法回收率分析结果见表 3 所示。对灵菌红素发酵样品进行回收率试验，按照上述色谱条件进行测试，结果显示，加样回收率达到了 97~103%之间，各组分加样回收率的 RSD 均小于 3%，说明本试验的分析条件下测定灵菌红素的方法可靠。

表 3 回收率测定结果

**Table 3 The recovery of the method for the determination of Prodigiosin**

| 组分 | 样品中含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|
| Prodigiosin | 0.064 | 0.062 | 0.122 | 96.82 | |
| | 0.064 | 0.062 | 0.124 | 98.41 | 0.92 |
| | 0.064 | 0.062 | 0.124 | 98.41 | |
| | 0.064 | 0.124 | 0.18 | 95.74 | |
| | 0.064 | 0.124 | 0.182 | 96.81 | 1.06 |
| | 0.064 | 0.124 | 0.184 | 97.87 | |

## 2.7 灵菌红素液态发酵样品测定

按照样品处理方法对灵菌红素发酵液进行处理，根据确定的色谱条件进样分析，色谱图如图 7 所示，经过计算，液态发酵灵菌红素产量为 1.13 g/L。

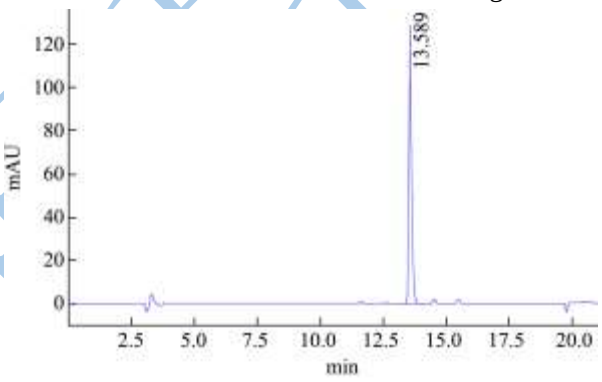



图 7 发酵液中灵菌红素 HPLC 测定图谱

**Fig.7 The chromatogram of prodigiosinin fermentation broth**

## 3 结论

与常规的分光度法相比，HPLC-DAD 法可以有效地分离检测灵菌红素，在 TFA 的调节下，可以保持良好的峰形以及出峰时间，在较短时间内完成检测。研究所用的分析方法灵敏度、精密度、重现性和准确度均较好，能够较好的应用于灵菌红素发酵样品的分析检测。

## 参考文献

[1] Williams RP, Qadri SM H. The pigment of *Serratia*.In The genus *Serratia* [M]. CRC press, 1980: 31-75

[2] Kawauchi K, Shibutani K, Yagisawa H, et al. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonasdenitrificans* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 237: 543-547

[3] Jeong H, Yim JH, Lee H, et al. Genomic blueprint of

*Hahellachejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: 7066-7073

[4] Bennett JW, Bentley R. Seeing red: the story of prodigiosin [J]. Advances in Applied Microbiology, 2000, 47: 1-32

[5] Williamson NR, Fineran PC, Gristwood T, et al. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines [J]. Future Microbiology, 2007, 2(6): 605-618

[6] Perez-Tomas R, Vinas M. New Insights on the Antitumoral Properties of Prodiginines [J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(21): 2222-2231

[7] Perez-Tomas R, Montaner B, Llagostera E, et al. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties [J]. Biochemical Pharmacology, 2003, 66(8): 1447-1452

[8] D`Alessio R, Bargiotti A, Vanotti E. Synthesis and immune suppressive activity of novel prodigiosin derivatives [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2000, 43: 2565-2577

[9] Kim H, Kim Y, Han S, et al. Process if using Prodigiosin as an immunosuppressive [P]. United States, US6645962BI, 2003

[10] Han SB, Lee CW, Yoon YD, et al. Effective prevention of lethal acute graft-versus-host disease by combined immunosuppressive therapy with Prodigiosin and cyclosporine [J]. Biochemical Pharmacology, 2005, 70: 1518-1526

[11] Alihosseini F, Ju KS, Lango J, et al. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials [J]. Biotechnology progress, 2008, 24: 742-747

[12] Melvin MS, Tomlinson JT, Manderville RA, et al. Double-strand DNA cleavage by copper prodigiosin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122: 6333-6334

[13] D'Alessio R, Bargiotti A, Vanotti E, et al. Synthesis and immune suppressive activity of novel prodigiosin derivatives [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2000, 43: 2565-2577

欢迎订阅 EI 收录期刊、中文核心期刊

《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620

每期定价 15 元，全年 12 期仅 180 元。欢迎食品及相关行业的机构和科学工作者到各地邮局订阅，并踊跃投稿或建立广告宣传和产学研合作关系。

**地址：广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508，邮编：510640**

**电话：020-87113352**

**E-mail：xdspkj@126.com**

**投稿系统：www.xdspkj.cn**