

反向高效液相色谱测定发酵液中的聚苹果酸

乔长晟¹, 姜少丽¹, 马正旺², 李政², 楼鹏²

(1. 天津科技大学工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

(2. 天津北洋百川生物技术有限公司, 天津 300457)

摘要: 采用高效液相色谱柱Alltima™ C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 4 μm)上定量测定发酵生产的聚苹果酸, 流动相为乙腈和0.025 mol/L磷酸二氢钾混合溶液(磷酸调pH 2.5) (V:V=5:95), 流速1.0 mL/min, 检测波长210 nm, 柱温25 °C, 进样量5 μL。发酵液经离心除菌体、纯沉淀多糖、水解处理后进样, 可以将其中的L-苹果酸完全分离定量。采用液相方法的回收率为98.70%~100.65%, RSD为0.4~1.11%。采用试剂盒的方法的回收率为96.7~97.23%, RSD为0.57~1.19%。可见, 液相的精确度和试剂盒相差不大。但液相的价格相对比试剂盒要便宜很多, 说明该法是测定发酵液中聚苹果酸的一种很有效的方法。

关键词: 反相高效液相色谱法; 聚苹果酸; L-苹果酸试剂盒

文章编号: 1673-9078(2012)4-453-455

Determination of Poly(malic acid) in Fermentation Broth by RP-HPLC

QIAO Chang-sheng¹, JIANG Shao-li¹, MA Zheng-wang², LI Zheng², LOU Peng²

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. Tianjin Peiyang Biotrans Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

Abstract: For the detection of poly (malic acid) fermentation broth, a reversed phase high performance liquid chromatography method was developed. The samples was analyzed on a column of Alltima™ C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 4 μm) with a mixture of acetonitrile and 0.025 mol/L KH₂PO₄ buffer (pH 2.5) (5:95, v:v) used as mobile phase at the flow rate of 1.0mL/min. The detection wavelength was 210 nm; the column temperature was 25 °C and the volum of injection was 5 μL. Before sampling, the fermentation broth was centrifuged to remove fungus, added with organic solvent to remove polysaccharide and hydrolysed. L-malic acid were completely separated and determined in 3 minutes. The recovery and relative standard deviation (RSD, n=3) of L-malic acid by RP-HPLC method were 98.70%~100.65%, and 0.40%~1.11%, respectively. The recovery and relative standard deviation (RSD, n=3) of L-malic acid by L-malic acid kit were 96.70%~97.23% and 0.57%~1.19%, respectively. The method was proved to be a effective way to determine the poly (malic acid) in fermentation broth.

Key words: Reversed phase high performance liquid chromatography; Poly (malic acid); L-malic acid kit

聚苹果酸 (Poly malic-acid 或 Poly malate, 简称为 PMLA) 属于聚酯类聚合物, 是一种以苹果酸为唯一单体的均聚高分子聚合物。由于苹果酸含有两个羧基和一个羟基, 其相互酯化的产物主要有三种, 即 α 型、β 型、γ 型 (结构如图 1), 生物体内存在的只有 β 型^[1]。

PMLA本身具有良好的水溶性、生物可降解性、生物相容性, 因此, 在医药领域具有广阔的应用价值^[2]。聚-β-苹果酸可以作为药物载体^[3], 特别是在靶向给药体系^[4,5]、蛋白质药物给药系统^[6]、抗癌药物给药系统^[7-9]方面的应用。

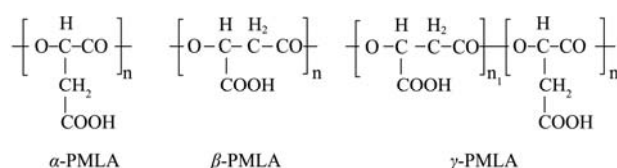


图1 α、β、γ 三种聚苹果酸的结构

Fig.1 The structure of α, β and γ PMLA

目前, 发酵中聚苹果酸的测定方法主要有纸层析法、α-2,7-萘二酚法、酶试剂盒法和高效液相色谱法 (HPLC)。纸层析法和α-2,7-萘二酚法成本较低, 但精密度低, 操作起来比较繁琐。酶试剂盒法虽然精密度较高, 但成本较高。而高效液相色谱法精密度高、重现性好成本相对酶试剂盒法低, 本研究中采用 Alltima™ C₁₈ 色谱柱, 对发酵液中的聚苹果酸进行定量分析。本实验室以前也发表了相关的发酵液中聚苹果酸的检测方法^[10], 通过以前的对比发现试剂盒法的精密度是最高的, 所以本次研究中将液相方法与试剂盒

收稿日期: 2012-02-03

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金计划 (ZD200703); 科技部科技型中小企业技术创新基金 (11C262111200191); 天津市科技型中小企业创新基金 (10ZXCXSY10900)

作者简介: 乔长晟 (1969-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 生物高分子及食品生物技术

方法进行对比以进一步确定其精密度。

1 材料与方法

1.1 材料

Agilent 高效液相色谱仪, 1200系列; 离心机; 精密pH计; CD-4820数控超声波清洗器。

L-苹果酸标样, sunlight公司; 磷酸二氢钾, 分析纯; 乙腈, 色谱纯; 磷酸, 分析纯; 重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 发酵液样品的制备

待测样品为产聚苹果酸菌株(出芽短梗霉)接种发酵培养基在30 L发酵罐中25 °C培养144 h后, 除去菌体和多糖的上清液。

取30 mL发酵液, 经离心(5000 r/min, 20 min)除去菌体和沉淀, 取上清液加入25%乙醇, 将多糖去除, 再加入继续加入甲醇使甲醇体积占溶液总体积的60%使聚苹果酸沉淀出来, 加入30 mL重蒸水将聚苹果酸重新溶解, 取5 mL该溶液加入等体积的1 mol/L硫酸, 90 °C水解9 h^[11,12], 用0.22 μm的微孔滤膜过滤待进样。

1.2.2 苹果酸最大吸收峰的确定

通过对检测的苹果酸进行DAD光谱扫描, 确定苹果酸的最大吸收峰。

1.2.3 流动相中缓冲溶液的确定

选用在紫外波长下没有吸收峰且能够与添加的有机溶剂乙腈互溶的缓冲溶液。

1.2.4 缓冲溶液浓度的选择

选择不同浓度的缓冲溶液, 考察了不同缓冲溶液浓度对苹果酸的分离效果, 以确定最佳的缓冲溶液的浓度。

1.2.5 流动相pH的确定

考察了几个不同pH对苹果酸分离效果的影响。

1.2.6 进样量的确定

考察了几个不同进样量条件下样品的出峰情况及其分离效果。

2 结果与讨论

2.1 苹果酸检测峰值的确定

苹果酸DAD光谱扫描的最大吸收峰在210 nm出现, 如图2所示, 因此选择210 nm为吸收波长。

2.2 流动相的确定

磷酸二氢钾缓冲溶液在紫外区几乎无吸收, 而且在pH=2~8之间有足够大的缓冲容量, 能够与添加的有机溶剂乙腈混溶, 所以本实验采用常用的试剂KH₂PO₄

作为流动相。

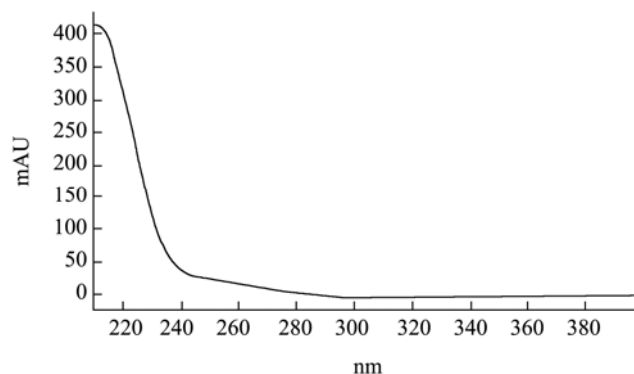


图2 DAD光谱图

Fig.2 The spectrogram of DAD

2.3 缓冲溶液浓度的确定

缓冲液浓度的高低直接影响酸在流动相中的存在形式即其离子强度, 从而影响色谱柱的分离效果。本实验考察了KH₂PO₄浓度分别为0.015、0.025、0.035 mol/L时的分离效果。当KH₂PO₄浓度为0.035 mol/L时, 样品中苹果酸的保留时间较大, 分离度也没有KH₂PO₄浓度为0.025 mol/L时的分离度大。而当KH₂PO₄浓度为0.015 mol/L时, 分离度也没有KH₂PO₄浓度为0.025 mol/L时的分离度大。同时, 过高的盐浓度不仅对泵系统损害大, 还影响色谱柱的寿命, 故将缓冲溶液浓度规定为0.025 mol/L。

2.4 流动相pH的确定

本实验考察了pH为2.3、2.5、3.0对样品的影响。pH值在3.0时的分离度较小, 且出现前伸峰和拖尾峰, pH为2.3时的分离度虽然比pH为2.5时的分离度稍大一点, 但是pH为2.3是样品的总保留时间较长, 而且本实验采用的有机酸柱的耐pH范围为2.0~7.5, pH太低影响柱子的使用寿命。所以, 将流动相磷酸二氢钾的pH值控制在2.5。

2.5 进样量的确定

本实验考察了进样量为5、10、15、20 μL时的样品分离度。随着浓度的增大, 苹果酸峰的前拖尾和后拖尾现象明显增加, 而且分离效果不佳。因此, 选用5 μL作为最优的进样量。

2.6 出峰情况

采用上述色谱条件, 分别对标样和发酵样品处理液进行定量分析, 结果如图3和图4。两者的出峰时间均为2.1 min, 对处理过的发酵液进行检测。具有良好的分离度, 几乎不存在拖尾峰和前伸峰, 完全满足外标法定量要求, 可以达到了检测发酵液中产物聚苹果酸的目的。

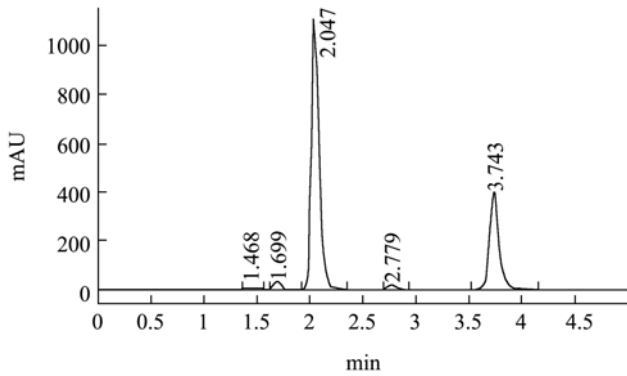


图3 L-苹果酸标样的色谱图

Fig.3 The HPLC chromatogram of L-malic standard sample

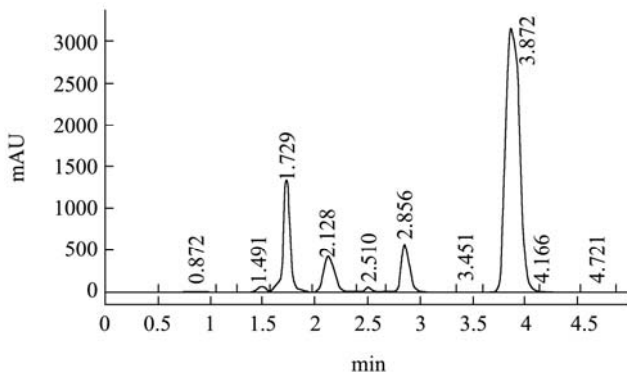


图4 聚苹果酸发酵液处理的色谱图

Fig.4 The HPLC chromatogram of the treated fermentation broth

2.7 L-苹果酸标准曲线的绘制

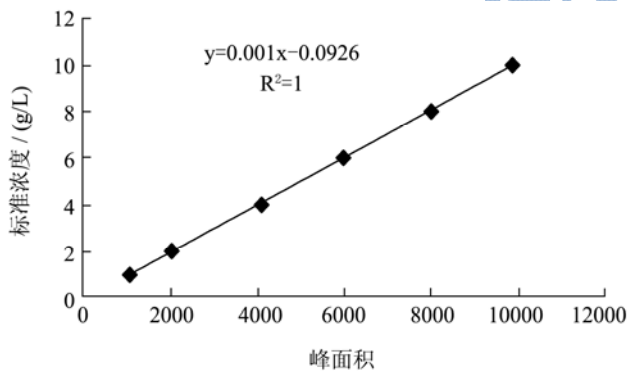


图5 L-苹果酸标准曲线

Fig.5 The standard curve of L-malic

表1 标准曲线的线性参数

Table 1 The linear parameter of standard curve

回归方程	相关系数	线性范围 (g/L)
$y=0.001x-0.0926$	1	1~10

用流动相分别精确配置1、2、4、6、8、10 g/L等不同浓度的标准L-苹果酸溶液，经0.22 μm微孔滤膜过滤后，进样5 μL，得出色谱图，测定峰面积，以质量浓度(Y)为纵坐标、样品峰面积(X)为横坐标，绘制标准曲线，如图5所示，得出回归方程、线性范围、线性相关系数见表1。

2.8 液相测定与试剂盒测定的对比

2.8.1 精密度实验

分别将水解后的发酵液进行不同倍数的稀释，分别采用液相和试剂盒方法检测，测量得到的结果如表2。

表2 精密度实验结果

Table 2 The degree of precision of the experimental result

使用方法	测定值/(g/L)	平均值/(g/L)	RSD/%
高效液相色谱	3.8384	3.8273	0.40
	3.8376		
	3.8058		
试剂盒	3.7983	3.7958	0.57
	3.7892		
	3.7999		
	3.7999		

2.8.2 回收率实验

采用1.2.1方法处理发酵样品，加入一定量的标准品，采用液相和试剂盒检测，测定结果见表3。

表3 回收率实验结果

Table 3 The experimental result of the recovery

使用方法	初始浓度加入标准样品 (g/L)	加入后 浓度/(g/L)	回收率 测定值/(g/L)	RSD /%
高效液相色谱	1	2.7819	3.7686	98.70
	2	2.7819	4.8086	101.33
	3	2.7819	5.8013	100.65
试剂盒	1	2.7819	3.7489	96.70
	2	2.7819	4.7699	99.40
	3	2.7819	5.6989	97.23

由以上结果可以看出，液相数据和试剂盒数据相差不大，但试剂盒价格也比液相要高很多，因此，采用液相的方法比较好。

3 结论

通过上述实验结论可以看出，采用如下液相条件：乙腈和0.025 mol/L磷酸二氢钾混合溶液（磷酸调pH 2.5）(V:V=5:95)，流速1.0 mL/min，检测波长210 nm，柱温25 °C，进样量5 μL。可以很好的分离测定发酵液中的苹果酸，而且高效液相色谱成本低，操作方便，准确性高是测定发酵液中聚苹果酸的一种很好的方法。

参考文献

[1] Naoki N, Nahara T, Tabuchi T. Fermentative production of poly (β-malic acid), apolyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium sp* [J]. Biosci. Biotech. Biochem, 1993, 57(4): 638-642

- [2] Lee B S, Vert M, Holler E. Biopolyme [M]. Weinheim, Germany, 2002, 3: 75-103
- [3] Portilla-Arias J A, Garcia-Alvarez M, de larduya A M, et al. Synthesis, degradability, and drug releasing properties of Methyl ester of fungal poly (β , L-malic acid) [J]. Macromol Biosci, 2008, 8(6): 540-550
- [4] Ljubimova J, Fujita M, Ljubimov V, et al. Poly (malic acid) nanoconjugates containing various antibodies and oligonucleotides for multitargeting drug delivery [J]. Nanomedicine, 2008, 3(2): 247-265
- [5] Portilla-Arias J A, Garcia-Alvarez M, de larduya A M. Nanostructured complexes of poly (β -L-malic acid) and cationic surfactants: synthesis, characterization and structural aspects [J]. Biomacromolecules, 2006, 7(1): 161-170
- [6] Portilla -Arias J A, Garcia -Alvarez M, Galbis A, et al. Biodegradable nanoparticles of partially methylated fungal poly (β -L-malic acid) as a novel protein delivery carrier [J]. Macromol Biosci, 2008, 8(6): 551-559
- [7] Ljubimova J, Fujita M, Khazenzon N, et al. Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting [J]. Chemico - Biological Interactions, 2008, 171(2): 195-203
- [8] Fujita M, Khazenzon N M, Ljubimov A V, et al. Inhibition of laminin-8 in vivo using a noval poly(malic acid)-based carrier reduces glioma angiogenesis [J]. Angiogenesis, 2006, 9(4): 183-191
- [9] Lee B S, Manabu F, Khazenzon N M, et al. Polycefin, a new prototype of a multifunctional nanoconjugate based on poly (β -L-malic acid) for drug delivery [J]. Bioconjugate Chem, 2006, 17(2): 317-326
- [10] 王凤荣, 乔长晟, 江建梅, 等. 出芽短梗霉发酵液中聚苹果酸测定方法的比较[J]. 生物技术, 2007, 17(4): 59-60
- [11] Liu S, Steinbuechel A. Investigation of poly(β -malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 46: 273-278
- [12] Liu Shung-Jian, Steinbuechel Production of poly(malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans* [J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(1): 11-14