

# 纳他霉素效价测定方法的改良及含量的快速测定

雷德柱, 李青嵘, 黄永健

(广州大学生命科学学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 为了确定固体发酵过程中纳他霉素含量快速测定和生物效价准确测定方法, 本文采用高效液相色谱法、紫外分光光度法和管碟法测定了同一批褐黄孢链霉菌固体发酵产物纳他霉素的含量。其中高效液相色谱法和紫外分光光度法测定纳他霉素固体发酵产物含量分别为 2351.52 mg/L 和 1979.87 mg/L, 前者结果准确而稳定。后者测定准确率为 96.97% (以高效液相色谱的测定结果为 100% 计)。适用于固体发酵过程中的纳他霉素含量的快速测定。管碟法测定纳他霉素平均效价为 1979.87 mg/L。改良管碟法采用正己烷封盖纳他霉素溶剂甲醇后, 测定的平均效价达到 1990.29 mg/L, 准确率由 84.20% 提高到 84.64% (以高效液相色谱的测定结果为 100% 计)。采用正己烷封盖能有效控制纳他霉素溶剂甲醇的挥发性并提高管碟法的准确性和测定的浓度范围, 而正己烷本身不具有抑菌效果。

**关键词:** 纳他霉素; 褐黄孢链霉菌; 固体发酵; 生物测定; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2014)11-251-255

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.044

## An Improved Method for Natamycin Titer Measurement and the Rapid Determination of Its Content

LEI De-zhu, LI Qing-rong, HUANG Yong-jian

(College of life science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** To find an effective method for the rapid detection of natamycin and an accurate analysis of biological potency during solid-phase fermentation, three methods including high-performance liquid chromatography (HPLC), ultraviolet spectroscopy, and the cylinder-plate method were used to determine the natamycin content in the product of a batch of *Streptomyces ghosporue* during solid-state fermentation. The natamycin content in the solid fermentation product determined by HPLC and ultraviolet spectroscopy was 2351.52 mg/L and 2280.16 mg/L, respectively. The former showed good accuracy and reproducibility, while the accuracy of latter was 96.97% of the former (assigning the accuracy of HPLC method as 100%) and proved to be applicable for the rapid determination of natamycin content during solid fermentation. The average potency of natamycin determined by the cylinder-plate method was 1979.87 mg/L, and using an improved cylinder-plate method was 1990.29 mg/L when *n*-hexane was used in combination with methanol as the solvent. The accuracy of HPLC determined result increased from 84.20% to 84.64% using the cylinder-plate method (assigning the accuracy of HPLC method as 100%). The results indicated that *n*-hexane could effectively control the volatility of methanol, and improved the accuracy and concentration range for measurements using the cylinder-plate method, without having an antimicrobial effect.

**Key words:** natamycin; *Streptomyces ghosporues*; solid-state fermentation; bioassay; rapid detection

纳他霉素英文名称 Natamycin, 又称 Pimaricin, 是一种多烯大环内酯类抗真菌素剂, 由 *Streptomyces ghosporues* 和 *Streptomyces chatanoogensis* 等链霉菌合成, Natamycin 对几乎全部真菌都具有抑制和杀灭活性, 并能抑制黄曲霉毒素的形成, 但无抗细菌活性<sup>[1-7]</sup>。采用固体发酵技术生产纳他霉素, 并把固体发酵物直接投入饲料防霉应用, 是一条低成本、高安全性、防霉效果好的纳他霉素作为饲料防霉剂的途径<sup>[8]</sup>。发酵液中纳他霉素检测方法报道较多, 但固体发酵过程

收稿日期: 2014-05-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2011B020305008)

中的纳他霉素含量快速测定和生物效价测定方法的未见报道, 《中国兽药典》(2005 年版)<sup>[9]</sup> 记载的兽用抗生素药品效价的微生物检定包括两种方法, 即管碟法和浊度法。目前多数使用者仍以管碟法为主。管碟法作为抗生素效价测定的经典方法, 具有它的优点, 但还存在一定的缺陷<sup>[10-12]</sup>。固体发酵中纳他霉素含量快速测定和生物效价测定方法的与液体发酵的差别在于前者的纳他霉素提取物中可能含有多孔载体本身的杂质而后者没有。室温条件下, 纳他霉素在水中的溶解度很低, 为 30~100 mg/L。在水和较低级醇类中, 纳他霉素的溶解度随着 pH 值的变化而变化, 其中, 在 pH

为中性的情况下溶解度最低,当 pH 低于 3 或高于 9 时纳他霉素的溶解度增加。根据文献中报道纳他霉素在各种典型溶剂中的溶解度<sup>[3]</sup>,常用的纳他霉素溶剂可选择甲醇,但甲醇容易挥发,会影响到实际应用效果,这也是固体发酵中纳他霉素含量生物效价测定法的难点所在。本文拟对管碟法测定纳他霉素生物效价过程中的影响因素进行探讨及改进,使测定条件得到较好的控制,提高效价测定结果的准确度和测定范围,建立或选择则一种快速有效检测固体发酵纳他霉素的效价和含量的方法,为纳他霉素的固体发酵生产和产品实际应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

#### 1.1.1 试验菌株

褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces glvosporus*) (广州大学生物工程研究所保存);

#### 1.1.2 固体发酵培养基

5%大豆蛋白胨 54 mL 添加至装有 24 g 珍珠岩 1000 mL 锥形瓶中。充分混合,灭菌后,取已灭菌的 6 mL 60%葡萄糖添加至固体培养基中,搅拌均匀,备用。

#### 1.1.3 生物鉴定法培养基

上层培养基 (YPD): 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 琼脂 8 g/L。下层培养基: 琼脂 15 g/L。

#### 1.1.4 主要试剂

甲醇,天津市百世化工有限公司,AR; 纳他霉素,钱江生化股份有限公司产品; 正己烷,天津市百世化工有限公司,AR。

### 1.2 主要仪器设备

高速离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司; 振荡恒温水浴锅, Memmert Co. Ltd; 霉菌培养箱,重庆市永生实验仪器厂; 恒温振荡培养箱,太仓市实验仪器厂; 血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司; UV-1100 型紫外分光光度计,上海美普达仪器仪器有限公司; 岛津高效液相色谱仪。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 纳他霉素标准溶液和样品溶液的准备

纳他霉素标准溶液: 先配制 2 g/L 纳他霉素甲醇标准溶液。再取母液,按实验的具体要求,用甲醇稀释相应的倍数,再通过 0.22 μm 的滤膜,备用。

样品溶液: 称取 1 g 固体发酵物料,置于 10 mL 离心管中,用玻璃棒充分研磨,加入 2 mL 甲醇溶剂,震荡,离心,上清液即为样品液。按各组实验需要,稀释相应的倍数,再通过 0.22 μm 的滤膜,备用。

#### 1.3.2 管碟生物效价法<sup>[9]</sup>

无菌条件下,从斜面上挑取一环酿酒酵母菌种,接种至 100 mL 液体 YPD 培养基中 (500 mL 锥形瓶), 180 r/min, 30 °C 恒温摇床培养 12 h, 无菌条件下使用血球计数板技术,并用无菌水稀释至 10<sup>8</sup> cfu/mL, 作为检测菌液备用。

无菌条件下,准确量取 10 mL 琼脂,加入水平放置的平板中,凝固,作为底层;另取上层培养基,待其冷却至 50 °C 左右时,按 1:10 的比例添加上述检测菌悬液,振荡摇匀,准确量取 10 mL 培养基,迅速添加至已铺好底层的平皿中,待其凝固,作为菌层。

无菌条件下,于菌层表面等距离均匀放置等规格的 4 个牛津杯,静置 5 min 后分别滴加纳他霉素标准溶液和样品溶液各 50 μL。取标准品和待测样品各制备高低两种浓度的溶液,高低剂量的比率为 2:1,于牛津杯中分别加入不同剂量的标准品和待测样品。另做两组平行组,共 3 组,置于 30 °C 培养箱,培养 24 h。

培养结束后,将平板从培养箱中取出,用游标卡尺测量抑菌圈直径,代入效价测定公式:

$$\log \frac{M'}{M} = \frac{(Uh)^2 - (Sh)^2 + (Ul)^2 - (Sl)^2}{(Sh)^2 + (Uh)^2 - (Sl)^2 - (Ul)^2} \times \log K$$

注: Uh-高剂量样品的抑菌圈的直径, mm; Ul-低剂量样品的抑菌圈的直径, mm; Sh-高剂量标准品的抑菌圈的直径, mm; Sl-低剂量标准品的抑菌圈的直径, mm; M'-待测样品中纳他霉素的效价, mg/L; M-标准品中纳他霉素的效价, mg/L; K-高剂量标准品 (或样品) 低剂量标准品 (或样品) 中纳他霉素的效价之比。

#### 1.3.3 分光光度法<sup>[14]</sup>

配制质量浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 mg/L 的纳他霉素标准溶液,并以甲醇溶剂作为空白对照,在紫外波长为 303 nm 处,测定吸光度,制作标准曲线。

取样品液,用甲醇稀释 150 倍,共计稀释样品 300 倍。以甲醇溶剂为空白对照,于紫外波长 303 nm 处测定吸光度,记录数据,并标准曲线计算出结果。

#### 1.3.4 高效液相色谱法<sup>[15]</sup>

InertSustain C18 色谱柱,柱温: 35 °C; 流动相: 35%的乙醇溶液; 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 303 nm; 标准品浓度: 0.2 g/L; 进样量: 20 μL; 稀释倍数: 10 倍; 样品进样量: 20 μL; 样品稀释倍数: 10 倍。

## 2 结果与讨论

### 2.1 管碟法测定生物效价及其改进

管碟法测定结果如表 1 所示。纳他霉素固体发酵物提取液平均效价：989.93 mg/L，纳他霉素固体发酵物平均效价：1979.87 mg/kg。

表 1 纳他霉素抑菌圈

Table 1 Inhibition zone of natamycin

序号	高剂量样品/mm	低剂量样品/mm	高剂量标准品/mm	低剂量标准品/mm	效价/(mg/L)	平均效价/(mg/L)
1	22.70	20.00	23.20	20.90	985.84	
2	22.60	19.80	23.00	20.80	992.72	989.93
3	22.60	19.90	23.10	20.80	991.24	



图 1 高剂量纳他霉素的抑菌圈

Fig.1 Inhibition zone of natamycin at high dosage

据文献报道，管碟法存在一定的缺陷<sup>[6-8]</sup>。本实验过程中也发现当溶剂为挥发性强的甲醇时，长时间存放，易导致纳他霉素浓度升高甚至析出，影响实验结果。析出白色粉末，并导致高剂量的抑菌圈大小过于接近。如图 1 所示。

采用其他挥发性较低的物质作为纳他霉素溶剂，

表 2 改进方法后测定的纳他霉素抑菌圈

Table 2 Inhibition zone of natamycin using the improved method

序号	高剂量样品/mm	低剂量样品/mm	高剂量标准品/mm	低剂量标准品/mm	效价/(mg/L)	平均效价/(mg/L)
1	22.9	20.1	23.5	20.9	1004.11	
2	22.9	20.0	23.6	20.9	985.84	995.15
3	23.0	20.1	23.6	21.0	995.49	

表 3 甲醇和正己烷的抑菌圈

Table 3 Inhibition zone of methanol and n-hexane

序号	甲醇/mm	正己烷/mm	高剂量标准品/mm	低剂量标准品/mm
1	7.0	0	22.1	20.2
2	6.8	0	22.3	20.4
3	7.1	0	21.8	19.6

空白甲醇和正己烷的抑菌实验结果如图 3 及表 3 所示。经验证，正己烷对指示菌酿酒酵母没有抑菌效

包括无水乙醇，丙醇，丙二醇，丙三醇，正丁醇，异戊醇等溶剂进行尝试，由于纳他霉素在这些溶剂中的溶解度比甲醇的低很多，无法达到测定的要求。尝试采用一种溶剂封盖纳他霉素的甲醇溶液，避免甲醇挥发。几经尝试，采用正己烷，可以有效封盖纳他霉素的甲醇溶液，使纳他霉素甲醇溶液稳定，即在标准液和样品液注入牛津杯后，再于各个牛津杯中加入 100 μL 正己烷，其他步骤如上。实验结果如图 2 及表 2 所示。纳他霉素固体发酵物提取液平均效价：995.15 mg/L，纳他霉素固体发酵物平均效价为 1990.29 mg/kg。



图 2 改进方法后的纳他霉素的抑菌圈

Fig.2 Inhibition zone of natamycin for the improved method

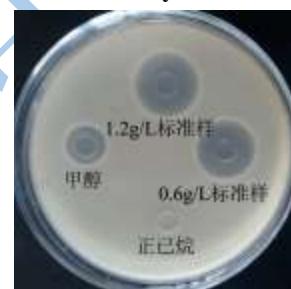


图 3 甲醇和正己烷的抑菌圈

Fig.3 Inhibition zone using methanol and n-hexane

果，而甲醇具备对酿酒酵母一定的抑制性，甲醇所产生的抑菌圈为 7 mm（3 次重复平均值）。表 2 和表 3 所示数据的重点在于证明用正己烷封盖甲醇可以减少甲醇的挥发，而正己烷本身不影响纳他霉素的生物效价，因此可以提高生物效价法的准确性。同时甲醇没有挥发，可以有效溶解更多供试样品，从而扩大纳他霉素的测试浓度范围。由于纳他霉素必须溶解于甲醇中，而且只要所有样品都采用同样的溶剂，甲醇本身



对抑菌效果的影响可以作为系统误差来处理。

## 2.2 紫外分光光度法测定结果

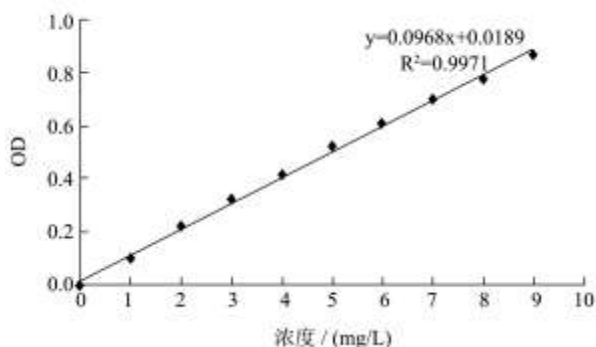


图4 纳他霉素标准曲线

Fig.4 Standard curve of natamycin

测定结果如图4和表4所示。纳他霉素固体发酵物平均含量为：2280.16 mg/kg

表4 紫外分光法测定纳他霉素含量

Table 4 Natamycin content determined by ultraviolet spectrophotometry

序号	1	2	3
OD	0.387	0.386	0.387
OD 对应浓度/(mg/L)	3.802	3.795	3.802
纳他霉素固体发酵物提取液/(mg/L)	1140.81	1138.63	1140.81
发酵物纳他霉素含量/(mg/kg)	2281.61	2277.27	2281.61

## 2.3 高效液相色谱测定纳他霉素含量结果

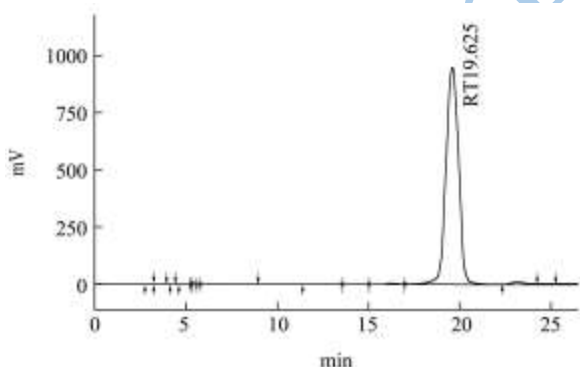


图5 纳他霉素标准品色谱峰

Fig.5 Chromatogram of natamycin standard solution

高效液相测定实验结果如图5和图6所示。由高效液相色谱单次测定得固体发酵提取物液样品浓度为：1176 mg/L，本次固体发酵产品的纳他霉素含量为：2352 mg/kg。

## 2.4 讨论

采用管碟法测定纳他霉素效价，平均效价为1979.87 mg/L。对比高效液相色谱法的测定结果

(2351.52 mg/L)，比率为84.20%，其中大部分误差的原因是，纳他霉素必须溶解后才起到抑菌作用。如果仅仅是因为样品浓度过高的问题，可以考虑将样品稀释后测定，所得结果再乘以稀释倍数即可，但管碟法测定生物效价采用的溶剂为甲醇，而且实验持续24小时，即使降低样品浓度，甲醇仍会挥发导致纳他霉素析出，因此效价值是低于实际值的。改进方法后，平均效价为1990.29 mg/L。对比高效液相色谱法的测定结果(2351.52 mg/L)，比率为84.64%，证明这一改进方法对提高管碟法测定纳他霉素效价准确性有一定效果，这一效果来自甲醇挥发性的有效控制，而不是正己烷本身具有抑菌效果。

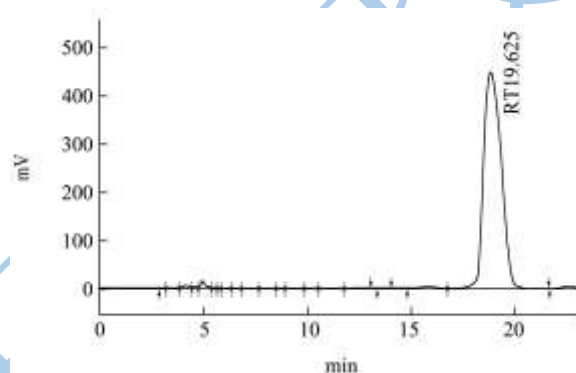


图6 样品纳他霉素色谱峰

Fig.6 Chromatogram of a natamycin sample

在固体发酵过程中，需要一种能快速测定纳他霉素含量的方法，以便及时对发酵过程进行调控。生物效价测定方法是测定有生物活性的物质，而高效液相色谱法和紫外分光光度法是测定物质的质量，包括没有生物活性包含体。因此作为快速检测的高效液相色谱法和紫外分光光度法，特别是紫外分光光度法不能替代生物效价测定。紫外分光实验的结果显示，测得固体发酵物纳他霉素含量为：2280.16 mg/kg，对比高效液相色谱实验的测定结果(2351.52 mg/kg)，比率为96.97%。说明紫外分光的测定结果精确度略低于法，但测定条件相对简单，耗时较少，适合作为固体发酵过程快速测定纳他霉素含量的方法。该方法也是大多数文献所采用的测定纳他霉素的方法。采用该方法的隐患是如果多孔介质含有干扰性杂质，则可能对测定结果有一定影响。

## 3 结论

三种纳他霉素检测方法互相印证，虽然结果略有差异，但可根据需要选择使用：生物效价法适用于产品生物活性检测，紫外分光光度法适用于产品的快速检测，而高效液相色谱法适用于产品的精确检测。采用正己烷封盖甲醇，可有效防止甲醇的挥发，提高生

物效价检测法的准确性和检测的浓度范围。

### 参考文献

- [1] Antonievan Leeuwenhoek. Natamycin [J]. International Journal of General and Molecular Microbiology, 1981, 47(2): 170-171
- [2] Edelman PH, Edelman MA. Natamycin as a selective antifungal agent in media for growth of Legionella spp [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(1): 185-187
- [3] Jens Christian Pedersen. Natamycin as a fungicide in agar media [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(3): 1064-1066
- [4] Davidson P M, Dona C H. Natamycin [J]. Antimicrobiol in Foods, 1993,7: 395-407
- [5] STRUYK A P, HOETTE I, DROST G. A new antifungal antibiotic [J]. Antibiot. Annu.,5: 878-885
- [6] EL-ENSHASY H A, FARID M A, EL-SAYED EL-SA. Influence of inoculum type and cultivation conditions on Natamycin production by Streptomyces Natamycin [J]. J Basic Microbiology, 2000,40(5/6): 333-342
- [7] 李东,杜连祥,路福平,等.纳他霉素的抑菌谱及最小抑菌浓度[J].食品工业科技,2004,25(7):143-144  
LI Dong, DU Lian-xiang, LU Fu-ping, et al. Inhibitory range and minimal inhibitory concentration of natamycin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 25(7): 143-144
- [8] 李青嵘,黄永健,江学斌,等.纳他霉素固体发酵工艺优化[J].食品科技,2013,38(9):226-228  
LI Qing-rong, HUANG Yong-jian, JIANG Xue-bin, et al. Optimization on solid state fermentation process for producing natamycin [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(9): 226-228
- [9] 中国兽药典委员会,中华人民共和国兽药典[M].(2005年一部).北京:中国农业出版社:附录103-105  
Commission of Chinese veterinary pharmacopoeia, Veterinary pharmacopoeia of People's Republic of China [M]. (2005). Beijing: China Agriculture Press: appendix 103-105
- [10] 梁玉,孙汝萌,陈慧敏.浅析抗生素生物效价测定中的异常情况[J].山东医药工业,2002,21(2):32-33  
LIANG Yu, SUN Ru-meng, CHEN Hui-min. Brief analysis on abnormalities in bioassay of antibiotics [J]. Shandong Pharmaceutical Industry, 2002, 21(2): 32-33
- [11] 李凡,朱志华,姜凤丽,等.管碟法测定生物效价影响因素的探讨及改进[J].中国兽药杂志,2008,42(1):45-48  
LI Fan, ZHU Zhi-hua, JING Feng-li, et al. Discussion on influencing factors of bioassay in oxford plate assay system and the improvement thereof [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2008, 42(1): 45-48
- [12] 蒋惠岚.管碟法测定抗生素效价的影响因素及控制方法[J].中国兽药杂志,2011,45(8):53-55  
JIANG Hui-lan. Influencing factors of bioassay of antibiotics in oxford plate assay system and solution thereof [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(8): 53-55
- [13] 胡海洋,乔春明,葛菁萍等.纳他霉素的特性和生产研究状况[J].中国现代药物应用,2009,3(02):200-201  
HU Hai-yang, QIAO Chun-ming, GE Jing-ping, et al. The characteristic and production research condition of a new polyenemacrolide antimycotics natamycin [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2009, 3(2): 200-201
- [14] 康健,王敏,杜连祥.发酵液中纳他霉素的提取及鉴定[J].药物生物技术[J].2006,13(4):293-298  
KANG Jian, WANG Min, DU Lian-xiang. Extraction and identification of natamycin from fermented broth, pharmaceutical biotechnology, 2006, 13(4): 293-298
- [15] 陈冠群,杨东靖,杜连祥.反相高效液相色谱法测定发酵液中的纳他霉素[J].天津轻工业学院学报,2003,18(1):9-11  
CHEN Guan-qun, YANG Dong-jing, DU Lian-xiang. Determination of natamycin in fermentation broth by reverse-phase high performance liquid chromatography [J]. Journal of Tianjin University of light industry, 2003, 18(1): 9-11