

doi:10.3969/j.issn.1672-5425.2011.08.024

HPLC 法同时测定发酵液中纽莫康定 A₀ 与 B₀ 的含量

张雪霞, 李 宁, 李晓露, 林 旻, 张金娟, 林 毅, 蒋 沁

(微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心,
华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 河北 石家庄 050015)

摘要:采用 HPLC 方法同时测定发酵液中纽莫康定 A₀ 与 B₀ 的含量。色谱柱为 SepaxSapphire C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(体积比 45:55, 内含 0.1% 三氟乙酸), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 紫外检测波长为 214 nm。结果表明, 纽莫康定 A₀ 与 B₀ 的浓度分别在 47.5~191.4 μg·mL⁻¹ 和 38.4~153.6 μg·mL⁻¹ 的范围内, 与峰面积呈良好的线性关系(*R* 分别为 0.9997 和 0.9998); 检测灵敏度分别为 6.86 ng、5.95 ng; 平均回收率分别为 99.15% (RSD=0.96%, *n*=9) 和 99.31% (RSD=0.98%, *n*=9)。该方法简便、准确、重现性好, 可用于发酵液中纽莫康定 A₀ 与 B₀ 含量的测定。

关键词:高效液相色谱法; 纽莫康定 A₀; 纽莫康定 B₀**中图分类号:** O 657.72**文献标识码:** A**文章编号:** 1672-5425(2011)08-0088-03

天然产物纽莫康定(Pneumocandins)是一类新型环脂肽类抗真菌化合物, 具有环状六肽母核和脂肪酸侧链结构^[1], 将其中的纽莫康定 A₀ 和纽莫康定 B₀ 的脂肪酸侧链脱掉后的环状六肽母核分别是合成米卡芬净(Micafungin)和卡泊芬净(Caspofungin)的主要原料^[2,3]。米卡芬净和卡泊芬净是一类全新的棘白菌素(Echinocandins)类抗真菌药, 对大多数念珠菌(包括一些对唑类耐药的菌株)具有快速的杀灭作用、对大多数曲霉有抑制作用^[4,5]。

纽莫康定的发酵液中含有纽莫康定 A₀ 与纽莫康定 B₀, 同时测定纽莫康定 A₀ 与 B₀ 含量的方法尚未见报道。作者在此采用 HPLC 法同时测定发酵液中纽莫康定 A₀ 与 B₀ 的含量, 对检测条件进行了考察, 为同时测定发酵液中纽莫康定 A₀ 与 B₀ 的含量提供了一条有效途径。

1 实验

1.1 试药、试剂与仪器

纽莫康定发酵液, 华药集团新药公司。

纽莫康定 A₀ 对照品(含量 95.72%)、纽莫康定 B₀ 对照品(含量 96.14%), 自制; 分析用甲醇, 色谱纯,

Merck 公司; 提取用甲醇, 分析纯; 去离子水, 自制。

高效液相色谱仪(515 泵, 996 检测器), Waters 公司。

1.2 对照品溶液的配制

精密称取纽莫康定 A₀ 对照品 20.0 mg、B₀ 对照品 16.0 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解后定容, 摇匀, 得混合对照品贮备液。精密量取贮备液 5 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释, 定容, 摇匀, 得混合对照品溶液。

1.3 供试品溶液的制备

量取 50 mL 纽莫康定发酵液, 过滤, 得菌丝滤饼, 向菌丝滤饼中加入甲醇 200 mL, 超声提取 30 min, 过滤, 重复提取 2 次, 合并滤液, 混合均匀, 用 0.22 μm 的膜滤过, 得供试品溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱为 SepaxSapphire C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温为室温; 流动相为甲醇-水(体积比 45:55, 内含 0.1% 三氟乙酸); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 214 nm; 进样量 10 μL。

纽莫康定 A₀ 与 B₀ 的高效液相色谱图见图 1。**基金项目:** 国家“重大新药创制”科技专项(2010ZX09401-403)**收稿日期:** 2011-04-07**作者简介:** 张雪霞(1972-), 女, 河北栾城人, 硕士, 高级工程师, 主要从事天然药物的分离纯化研究, E-mail: zhangxuexiazxx@163.com。

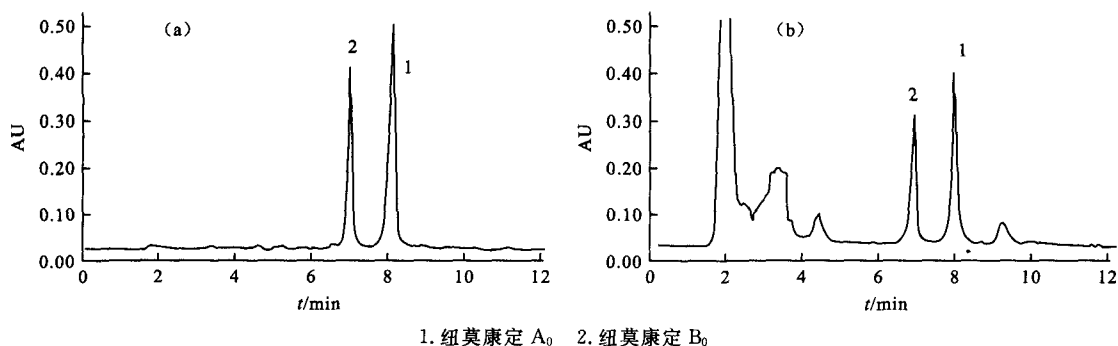


图 1 纽莫康定 A₀ 与 B₀ 的对照品(a)与供试品(b)的高效液相色谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of pneumocandin A₀ and B₀ control(a) and sample(b)

2 结果与讨论

2.1 检测波长

通过二极管阵列检测器在线扫描,纽莫康定 A₀ 与 B₀ 均为末端吸收,当检测波长为 214 nm 时,二者均可得到满意的响应值。因此,确定检测波长为 214 nm。

2.2 方法的线性范围

精密量取混合对照品贮备液 7.5 mL、6.0 mL、5.0 mL、4.0 mL、2.5 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释,定容,摇匀。6 份溶液(含未稀释混合对照品贮备液)在 1.4 色谱条件下分别进样,记录峰面积,以相应的质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,拟合线性回归,得纽莫康定 A₀ 和 B₀ 的回归方程分别为:

$Y_{A_0} = 2.17 \times 10^5 X + 1.92 \times 10^4$, 相关系数 $R = 0.9997$, 线性范围为 $47.5 \sim 191.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

$Y_{B_0} = 2.06 \times 10^5 X + 9.65 \times 10^4$, 相关系数 $R = 0.9998$, 线性范围为 $38.4 \sim 153.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 精密度

精密吸取供试品溶液 10 μL , 重复进样 5 次, 记录纽莫康定 A₀ 与 B₀ 峰面积。结果表明, 纽莫康定 A₀ 峰面积的 RSD 为 0.94%, 纽莫康定 B₀ 峰面积的 RSD 为 0.92%。

2.4 灵敏度

取纽莫康定 A₀ 浓度为 $10.732 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纽莫康定 B₀ 浓度为 $8.591 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 进样 5 μL 测定。以信噪比为 3 所对应的样品量进行计算。结果表明, 纽莫康定 A₀ 的检测灵敏度为 6.86 ng、纽莫康定 B₀ 的检测灵敏度为 5.95 ng。

2.5 稳定性

取同批号供试品溶液, 分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、10

h 进样测定。结果表明, 纽莫康定 A₀ 峰面积的 RSD 为 1.01%、纽莫康定 B₀ 峰面积的 RSD 为 0.96%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.6 回收率

取 9 份已知纽莫康定 A₀ 和 B₀ 含量的发酵液 50 mL, 分别按高、中、低 3 组加入纽莫康定 A₀ 对照品及 B₀ 对照品(组 1 加入 10.0 mg 和 8.0 mg; 组 2 加入 15.0 mg 和 12.0 mg; 组 3 加入 20.0 mg 和 16.0 mg), 每组 3 份, 按 1.3 方法制备供试品溶液, 进样 10 μL , 按色谱条件进样测定。计算得纽莫康定 A₀ 的平均回收率为 99.15% ($n=9$)、RSD 为 0.96%; 纽莫康定 B₀ 的平均回收率为 99.31% ($n=9$)、RSD 为 0.98%。

2.7 重复性

取同批号发酵液, 按 1.3 方法制备供试品溶液 5 份, 进样 10 μL , 分别测定纽莫康定 A₀ 与 B₀ 峰面积, 计算含量。结果表明, 纽莫康定发酵液中 A₀ 平均含量为 $876.31 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 0.96% ($n=5$); 纽莫康定 B₀ 平均含量为 $682.74 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 0.94% ($n=5$)。

2.8 含量测定

精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 10 μL 进样测定, 测得 3 批纽莫康定 A₀ 含量 ($n=3$) 分别为 $862.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $877.46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $871.59 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 0.95%、0.93%、0.94%; 纽莫康定 B₀ 含量 ($n=3$) 分别为 $685.35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $679.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $675.72 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 0.95%、0.93%、0.94%。

3 结论

建立了发酵液中纽莫康定 A₀ 和 B₀ 高效液相色谱检测方法。结果表明, 纽莫康定 A₀ 的检测灵敏度为 6.86 ng, 纽莫康定 B₀ 的检测灵敏度为 5.95 ng; 纽

莫康定 A₀ 浓度在 47.5~191.4 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈线性关系, 纽莫康定 B₀ 浓度在 38.4~153.6 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈线性关系; 纽莫康定 A₀ 的平均回收率为 99.15% (n=9)、RSD 为 0.96%, 纽莫康定 B₀ 的平均回收率为 99.31% (n=9)、RSD 为 0.98%。该方法简便、准确、重现性好, 可用于发酵液中纽莫康定 A₀ 和 B₀ 含量的同时测定。

参考文献:

[1] Hensens O D, Liesch J M, Zink D L, et al. Pneumocandins from *Zalerion arboricola*. III. Structure elucidation[J]. The Journal of Antibiotics, 1992, 45(12):1875-1885.

- [2] Stone E A, Fung H B, Kirschenbaum H L. Caspofungin: An echinocandin antifungal agent[J]. Clinical Therapeutics, 2002, 24(3): 351-377, 329.
- [3] Chandrasekar P H, Sobel J D. Micafungin: A new echinocandin [J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 42(8):1171-1178.
- [4] Ishikawa J, Maeda T, Matsumura I, et al. Antifungal activity of micafungin in serum[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(10):4559-4562.
- [5] Pfaller M A, Messer S A, Boyken L, et al. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12):5729-5731.

Simultaneous Determination of Content of Pneumocandin A₀ and B₀ in Fermentation Broth by HPLC

ZHANG Xue-xia, LI Ning, LI Xiao-lu, LIN Yang, ZHANG Jin-juan, LIN Yi, JIANG Qin

(National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, New Drug Research & Development Company of NCPC, Shijiazhuang 050015, China)

Abstract: Simultaneous determination of content of pneumocandin A₀ and B₀ in fermentation broth by HPLC was studied. The HPLC conditions consisted of a SepaxSapphire C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-H₂O (45:55) containing 0.1% trifluoroacetic acid with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 214 nm. The linearity of pneumocandin A₀ and B₀ concentration was shown in the range of 47.5~191.4 μg·mL⁻¹ (R=0.9997) and 38.4~153.6 μg·mL⁻¹ (R=0.9998); the sensitivity of pneumocandin A₀ and B₀ was 6.86 ng, 5.95 ng; the average recovery of pneumocandin A₀ and B₀ was 99.15% with RSD=0.96% (n=9) and 99.31% with RSD=0.98% (n=9), respectively. The HPLC method, which was simple and accurate with good repeatability, could be applied to simultaneous determination of content of pneumocandin A₀ and B₀ in fermentation broth.

Keywords: high performance liquid chromatography (HPLC); pneumocandin A₀; pneumocandin B₀

(上接第 62 页)

Corrosion Inhibition Performance of A Elacostearic Amide in HCl Solution

FAN Zhi-hai^{1,2}, ZHANG Hong¹, YIN Cheng-xian², ZHANG Juan-tao², LIU Fang-li³, WANG Yuan²

(1. College of Mechanical and Transportation Engineering, China University of Petroleum, Beijing 102200, China; 2. Tubular Goods Research Institute, CNPC, Xi'an 710065, China; 3. Xi'an Modern Chemistry Research Institute, Xi'an 710065, China)

Abstract: Elacostearic acid was synthesized from tung-oil, and then a elacostearic amide was synthesized by the reaction of elacostearic acid and diethylenetriamine. The structure of the product was characterized by IR spectrum. And its corrosion inhibition performance on steel N80 in HCl solution was investigated by weight loss and potentiodynamic polarization curve method. Results showed that the corrosion of steel N80 in HCl solution was inhibited in the presence of elacostearic amide. The corrosion inhibition efficiency of the product increased with the rise of its amount, firstly increased and then decreased with the rise of temperature, decreased with the rise of concentration of HCl solution. Electrochemical results showed that the elacostearic amide was a mixed type inhibitor which mainly controlled the cathodic reaction of steel N80.

Keywords: tung-oil; elacostearic amide; corrosion inhibitor