

文章编号: 1001-8689(2011)010-0772-03

HPLC-ELSD法测定阿卡波糖发酵液中 麦芽糖、葡萄糖和阿卡波糖的含量

孙敏 王欣荣

(中医药集团总公司四川抗菌素工业研究所, 成都 610051)

摘要: 目的 建立HPLC-ELSD法测定阿卡波糖发酵液中麦芽糖, 葡萄糖和阿卡波糖的含量。方法 采用Inertsil氨基柱(4.6mm×250mm, 5 μ m), 柱温: 30℃; 乙腈-水(75:25)为流动相, 流速: 1.3mL/min; ELSD气化室温度95℃; 气体流速: 3L/min; 气体压力: 1.5×10⁵Pa。结果 麦芽糖在8~400 μ g范围内与峰面积有良好的线性关系($r=0.9991$), 葡萄糖在4~200 μ g范围内与峰面积有良好的线性关系($r=0.9994$), 阿卡波糖在1.6~80 μ g范围内与峰面积有良好的线性关系($r=0.9985$), 葡萄糖峰, 麦芽糖峰和阿卡波糖峰完全分离。结论 方法可靠, 简便, 准确, 可用于同时检测阿卡波糖发酵液中底物和产物。

关键词: 高效液相色谱法; 蒸发光散射法; 麦芽糖; 葡萄糖; 阿卡波糖; 发酵液

中图分类号: R97 **文献标识码:** A

Determination of maltose, glucose and acarbose in acarbose fermentation broth by HPLC-ELSD

Sun Min and Wang Xin-rong

(China National Pharmaceutical Group Corporation, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610051)

Abstract To establish an HPLC-ELSD method for the determination of maltose, glucose and acarbose in acarbose fermentation broth. **Method** Column: Inertsil NH₂ (4.6mm×250mm, 5 μ m), Column temperature: 30℃; Mobile phase: acetonitrile-water (75 : 25), flow rate: 1.3mL/min; ELSD temperature of drift tube: 95℃; gas flow: 3L/min; gas pressure: 1.5×10⁵Pa. **Results** The assay displayed good linearity, the linear range of maltose was 8~400 μ g ($r=0.9991$), that of glucose was 4~200 μ g ($r=0.9994$) and that of acarbose was 1.6~80 μ g ($r=0.9985$). **Conclusion** The method is simple and can be used for determination of maltose, glucose and acarbose in acarbose fermentation broth.

Key words HPLC; ELSD; Maltose; Glucose; Acarbose; Fermentation broth

阿卡波糖是一个假性四聚糖, 属于 α -葡萄糖苷酶抑制剂。阿卡波糖在肠道内竞争性抑制葡萄糖苷水解酶, 抑制多糖及双糖分解成葡萄糖, 使糖的吸收相应减缓, 因此, 具有使饭后血糖降低的作用。阿卡波糖作用机理清楚、疗效确切、毒副作用低, 主要用于治疗II型糖尿病, 但是如果I型糖尿病病人在用胰岛素治疗的同时加用阿卡波糖, 则可以改

善血糖控制, 减少餐后早期高血糖和餐后晚期低血糖, 并可使每天胰岛素需要量减少。目前, 阿卡波糖作为一线药物用于糖尿病的治疗。

阿卡波糖是由游动放线菌发酵产生, 麦芽糖和葡萄糖为阿卡波糖生物合成的前体^[1], 在发酵过程中添加麦芽糖和葡萄糖, 能促进阿卡波糖的合成。麦芽糖和葡萄糖对阿卡波糖的促进作用与糖的添加

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 重大新药创制(编号: 2011ZX09401-403-10)

作者简介: 孙敏, 女, 生于1969年, 研究员。

时间, 浓度和比例有关, 为了提高阿卡波糖的生成量, 必须不断的检测发酵液中的麦芽糖和葡萄糖以及阿卡波糖的浓度, 并根据微生物代谢情况及时调整前体的补加方案, 最大限度促进阿卡波糖生成。

麦芽糖和葡萄糖都是还原糖, 无紫外吸收, 目前, 在国家标准中, 采用碳水化合物分析柱, 示差折光检测器来测定两者的含量^[2]。阿卡波糖为一假四糖, 有一双键, 目前生产和研究中多采用部颁标准和欧洲药典收载的高效液相色谱法来测定。该方法采用紫外检测器来测定其含量, 检测波长为210nm。本文首次采用氨基柱, 蒸发光散射检测的HPLC方法, 同时检测麦芽糖, 葡萄糖和阿卡波糖的含量, 该方法快速, 灵敏, 定量重现性好。

1 材料和方法

1.1 菌种

游动放线菌*Actinoplanes* sp. CK2019, 四川抗菌素工业研究所菌种保藏中心保藏。

1.2 仪器与试剂

岛津LC-10AT高效液相色谱仪; Alltech 2000蒸发光散射检测器; 葡萄糖和麦芽糖购自成都市科龙化工试剂厂; 阿卡波糖由本所自制; 乙腈(HPLC)购自Fisher公司。

1.3 色谱条件

色谱柱为Inertsil氨基柱(250mm×4.6mm, 5 μ m, GL Sciences Inc.); 流动相为乙腈-水(75: 25); 流速: 1.3mL/min; ELSD气化室温度95 $^{\circ}$ C; 气体流速: 3L/min; 气体压力: 1.5×10⁵Pa; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

1.4 对照品溶液的配制

精密称定麦芽糖1000mg、葡萄糖500mg和阿卡波糖200mg, 混合, 加入50%的甲醇配制成每毫升含麦芽糖20mg, 葡萄糖10mg和阿卡波糖4mg的对照品储备液。

精密吸取5mL对照品储备液, 置于10mL容量瓶中, 加入50%的甲醇配制成每毫升含麦芽糖10mg, 葡萄糖5mg和阿卡波糖2mg的对照品溶液。

1.5 供试品的制备

发酵液经滤纸过滤后, 准确吸取滤液2mL于试管中, 加入75%甲醇4mL, 充分摇匀, 倒入离心管中, 离心(8000r/min)10min, 取上清液经0.45 μ m微孔滤膜过滤后进行分析。

2 结果与分析

2.1 系统适用性实验和标准曲线的绘制

精密吸取供试品溶液按1.3项下色谱条件进行测定, 葡萄糖、麦芽糖峰和阿卡波糖及其他相关物质的峰的分离度大于1.5。

吸取对照品储备液0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6和8mL, 置入10mL容量瓶中, 50%甲醇定容。依次取对照品储备液及其稀释液注入液相色谱仪, 按1.3项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 以峰面积的常用对数为纵坐标, 以进样量的常用对数为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程分别为葡萄糖 $y=1.0495x+5.5945$, $r=0.9994$; 麦芽糖 $y=1.0133x+5.8924$, $r=0.9991$; 阿卡波糖 $y=1.0133x+5.6715$, $r=0.9985$ 。麦芽糖在8~400 μ g范围内, 葡萄糖在4~200 μ g范围内和阿卡波糖在1.6~80 μ g范围内与峰面积线性关系良好。

2.2 精密度试验

精密吸取对照品溶液20 μ L, 重复进样6次, 测得葡萄糖峰面积对数值的相对标准偏差为0.098%, 麦芽糖峰面积对数值的相对标准偏差为0.141%和阿卡波糖峰面积对数值的相对标准偏差0.072%, 表明该方法精密度良好。

2.3 重复性试验

取同一发酵液样品6份, 按1.5项下方法处理样品, 并按1.3项下色谱条件进行测定, 测得葡萄糖含量的相对标准偏差为1.38%, 麦芽糖含量的相对标准偏差为1.82%和阿卡波糖含量的相对标准偏差为1.95%, 表明该方法重复性好。

2.4 回收率试验

取发酵液样品, 测定其中的葡萄糖、麦芽糖和阿卡波糖含量, 然后加入其含量80%, 100%和120%的葡萄糖、麦芽糖和阿卡波糖, 按1.5法处理后按1.3项下色谱条件测定。结果葡萄糖的平均回收率为100.54%, 相对标准偏差1.95%; 麦芽糖的平均回收率为100.83%, 相对标准偏差2.36%; 阿卡波糖的平均回收率为99.69%, 相对标准偏差2.22%, 表明该方法准确可靠。

2.5 发酵液测定

分别精密吸取对照品储备溶液5 μ L, 10 μ L, 20 μ L与供试品溶液(按1.5法处理)20 μ L, 注入液相色谱仪, 按1.3项下色谱条件测定, 以葡萄糖, 麦芽糖和阿卡波糖进样量的常用对数与相应峰面积的常用对数计算各自的回归方程, 并根据回归方程, 分别计算样品中葡萄糖, 麦芽糖和阿卡波糖的含量。结果见图1表1。

3 结论与讨论

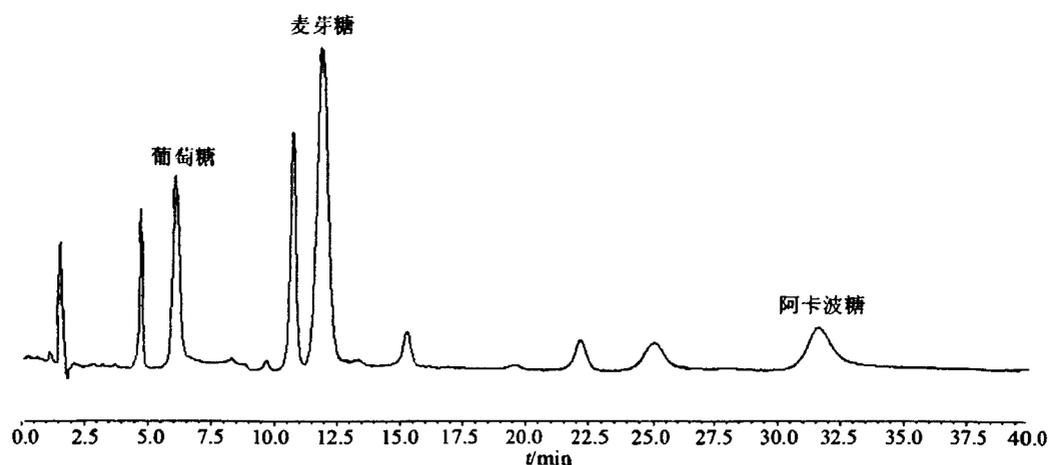


图1 发酵液的HPLC图

Fig. 1 Chromatogram of fermentation broth

表1 发酵液测定结果

Tab. 1 Contents of fermentation broth

发酵液	葡萄糖/(mg/mL)	麦芽糖/(mg/mL)	阿卡波糖/(mg/mL)
101101	12.457	28.654	2.752
101102	10.256	22.432	2.697
101103	15.321	33.784	3.473

(1)葡萄糖和麦芽糖无紫外吸收,不能用紫外检测器检测;阿卡波糖虽然可以用紫外检测器检测,但因其为末端吸收,检测灵敏度较低。用蒸发光散射检测器检测,不仅可以同时检测上述三个糖,而且有足够的灵敏度,并可减少温度和流动相溶剂的干扰。

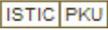
(2)采用HPLC-ELSD同时测定了阿卡波糖发酵液中葡萄糖,麦芽糖和阿卡波糖的含量,该方法精密度高,重复性好,分离效果佳。葡萄糖,麦芽糖和阿卡波糖与其他峰的分​​离良好。该方法简单快速,能准确的测定阿卡波糖发酵液中底物和产物的含

量,从而为生产过程中的代谢调控提供及时和准确的指导,以获取最高的发酵单位和节约生产成本。

参考文献

- [1] Lee S, Sauerbrei B, Niggemann J, *et al.* Biosynthetic studies on the α -glucosidase inhibitor acarbose in actinoplanes sp.: Source of the maltose unit[J]. *J Antibiot*, 1997, 50(11): 954-960.
- [2] GB/T 18932.22-2003. 蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的测定方法液相色谱示差折光检测法[S].
- [3] WS1- (X-315)-2004Z Drug Specifications Promulgated by Ministry of Public Health, PR China [S].
- [4] The European Pharmacopoeia 5.1, Strasbourg, France: the Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe[S]. 2005: 2873-2874.
- [5] Melissa wilcos. HPLC-ELSD法分析橙汁中的碳水化合物[C]. 蒸发光散射检测器文集(第三版), 美国奥泰科技(中国)有限公司: 167-168.

HPLC-ELSD法测定阿卡波糖发酵液中麦芽糖、葡萄糖和阿卡波糖的含量

作者: 孙敏, 王欣荣, Sun Min, Wang Xin-rong
作者单位: 中医药集团总公司四川抗菌素工业研究所, 成都, 610051
刊名: 中国抗生素杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Antibiotics
年, 卷(期): 2011, 36(10)

参考文献(5条)

1. [Melissa wilcos HPLC-ELSD法分析橙汁中的碳水化合物](#)
2. [The European Pharmacopoeia 5.1, Strasbourg, France: the Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe 2005](#)
3. [WS1-\(X-315\)-2004Z Drug Specifications Promulgated by Ministry of Public Health, PR China](#)
4. [GB/T 18932.22-2003. 蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的测定方法液相色谱示差折光检测法](#)
5. [Lee S; Sauerbrei B; Niggemann J Biosynthetic studies on the \$\alpha\$ -glucosidase inhibitor acarbose in actinoplanes sp.: Source of the maltose unit 1997\(11\)](#)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgksszz201110010.aspx