

高效液相色谱(HPLC)用于微生物中醌的分析

吴诚华 陆晓涛 秦敏 王杨声 阮继生

(中国科学院微生物研究所,北京)

醌是微生物化学分类指征之一,它是原核生物原生质膜上的组份,在电子传递和氧化磷酸化中起重要作用。醌主要有两种类型:甲基萘醌和泛醌。在革兰氏阳性细菌和放线菌中主要合成甲基萘醌。醌作为分类指征的基础在于其异戊烯基侧链的长度和氢的饱和度。美国、日本、英国、德国等都先后开展了这方面的研究^[1-4]。醌的测定通常用薄板层析(TLC)与质谱。近年来国外已采用高效液相色谱分离测定。我们采用了薄板扫描与高效液相色谱方法测定细菌和放线菌中的醌。大量菌种醌的数据已在微生物学报发表^[5]。本工作着重研究三种菌在不同培养基,不同菌龄对组份的影响,以及流动相不同比例是否影响醌主要组份与次要组份的变化,其目的在于将 HPLC 应用于微生物分类。

材料与方 法

1. 仪器:薄板扫描仪(CS 930 日本岛津公司)高效液相色谱仪(Waters 公司),柱子用 μ BONDAPAKC18,流动相:乙腈/异丙醇,其比例用三种:75:25 (V/V), 85:15 (V/V), 65:35(V/V)。流速:1.0 ml/min、温度 35℃, 40℃, 45℃。在 254 nm 紫外光波下检测。

2. 菌种:所用细菌如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),放线菌如链霉菌(*Streptomyces*),假诺卡氏菌(*Pseudonocardia*),游动放线菌(*Actinoplanes*)等进行测试。

为了查明不同培养基,不同菌龄对醌的组份与含量的影响,我们选用了三种培养基:葡萄糖天门冬素,贝奈特,燕麦粉培养基;菌龄为 3, 5, 7 天或 2, 4, 6 天, 28℃摇床培养。

3. 醌的提取与纯化:菌种摇床培养,定期收集菌体,蒸馏水洗两次,冷冻干燥。取 100mg 干菌体,用氯仿-甲醇(2:1V/V)提取,抽取液用旋转蒸馏器蒸干,用少量氯仿:甲醇(2:1 V/V)溶解后在 Kieselgel 60 F 254 薄板上进行层析从而得到纯化的醌混合物。

4. 醌的标准品: MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-9(H₂), MK-9(H₄), MK-9(H₆) 和 MK-9(H₈) 来自西德。

结果与讨论

1. TLC 和 HPLC 分析醌的结果基本一致。这两种方法都可用于醌的分析,但 HPLC 比 TLC 灵敏,分辨率高。如游动双孢菌在 TLC 上只显示出两个峰,而在 HPLC 上则显示出 9 个峰。虽然 TLC 法很简单,但仅凭 TLC 法是不够的,结合 HPLC 测定更为可靠。

2. 链霉菌,假诺卡氏菌与游动放线菌在三种培养基及三种菌龄测定的结果表明:三种菌的醌组分(主要成分与次要成分)不因菌龄(3, 5, 7 天)和发酵培养基种类不同而发生变化,但相对含量稍有变化。链霉菌三种菌龄与不同培养基的醌皆为 MK-9(H₆) [9(H₈), 9(H₄)] (图 1, 2, 3); 假诺卡氏菌三种菌龄与不同培养基的醌皆为 MK-9(H₄) (图 4, 5, 6); 游动放线菌的醌皆为 MK-9(H₄) [MK-10(H₄)]。这说明菌体细胞膜上的醌较稳定。

3. 链霉菌的醌用一种流动相(乙腈:异丙醇)的三种不同比例(75:35V/V; 75:25V/V; 85:15V/V)。其结果表明:放线菌中大多数的

本课题为国家自然科学基金资助项目

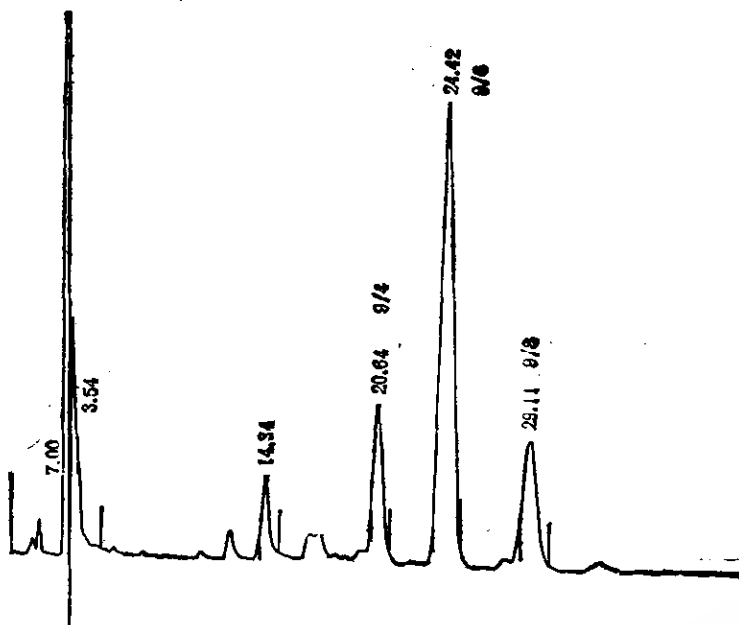


图1 链霉菌 (*S. griseus*) 在葡萄糖、天门冬素培养基上培养5天后菌的提取物在 HPLC 上的分离

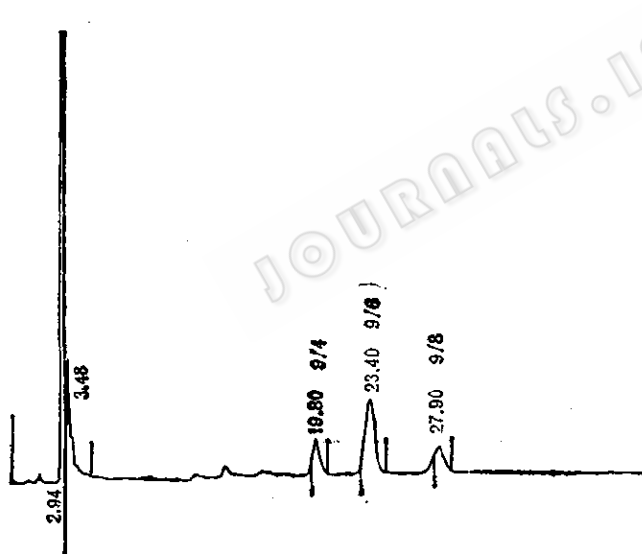


图2 链霉菌 (*S. griseus*) 在贝奈特培养基上培养5天后菌的提取物在 HPLC 上的分离

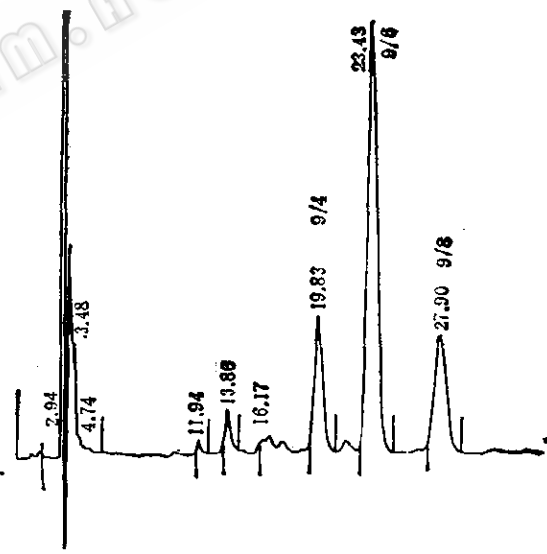


图3 链霉菌 (*S. griseus*) 在燕麦粉培养基上培养5天后菌的提取物在 HPLC 上的分离

酮以流动相乙腈: 异丙醇 75:25 (V/V) 较好, 个别菌的组分较复杂, 也可用 85:15 (V/V) 比例的流动相, 这样的组分可分得开。

同时也比较了温度的效果, 结果以 40℃为

最佳, 温度降低, 分离时间相对加长。

酮是细菌和放线菌分类中属划分的重要特征^[9]。高效液相色谱测定酮更快速, 灵敏度高, 操作简单, 因此, 可作为较理想的测定方法。

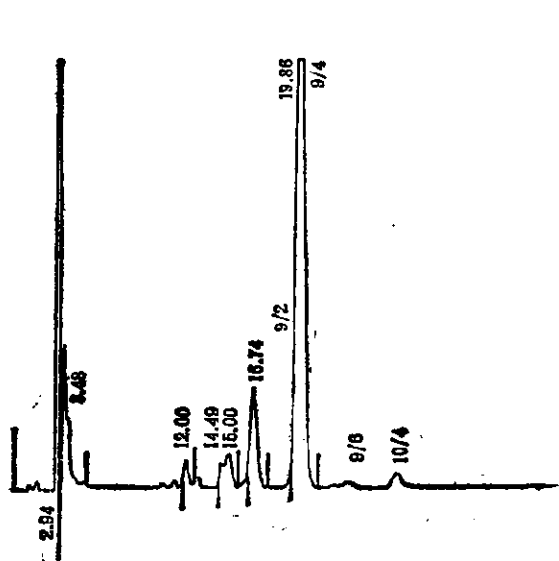


图4 假诺卡氏菌 (*P. azurea*) 在葡萄糖天门冬素培养基上培养5天后菌的提取物在 HPLC 上的分离

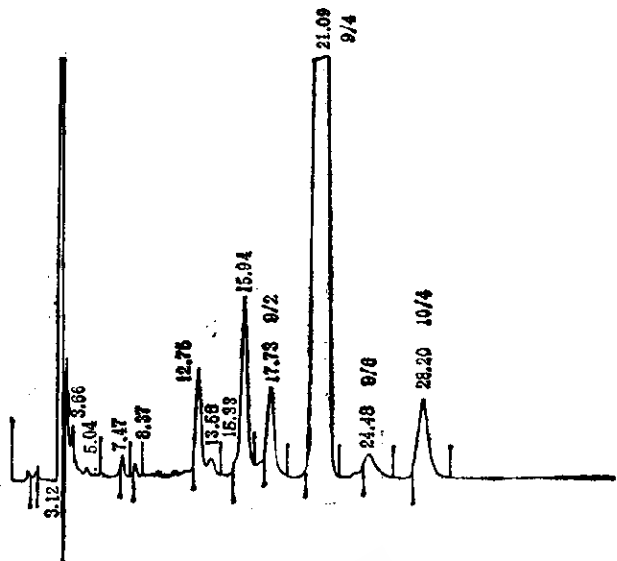


图5 假诺卡氏菌 (*P. azurea*) 在贝奈特培养基上培养5天后菌的提取物在 HPLC 上的分离

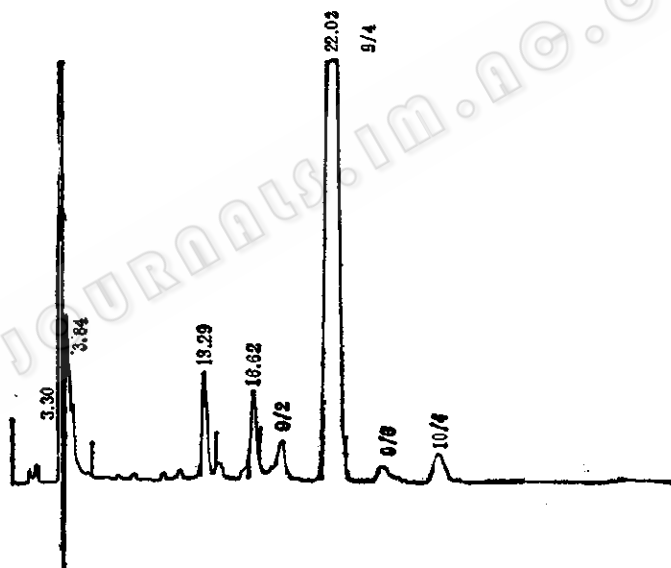


图6 假诺卡氏菌 (*P. azurea*) 在燕麦粉培养基上培养5天后菌的提取物在 HPLC 上的分离

参 考 文 献

- [1] Jeffries, L. Harnis, M. and Price, S. A.: *Nature*, London, 216: 808—809, 1967a.
- [2] Jeffries, L. et al., *Nature*, London, 215—259, 1967b

- [3] Yamada, Y. et al.: *Agricultural and Biological Chemistry*, 32: 786—788, 1968.
- [4] Collins, M. D. In Goodfellow et al. (eds.): *Chemical methods in Bacterial Systematics*, 216—287, 1985.
- [5] 陆晓涛, 阮继生: *微生物学报*, 待发表.