

反相高效液相色谱法制备 HMC 毒素纯品

崔 洋 陈永丽 魏建昆* 赵南明

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

(*河北省农林科学院 石家庄 050051)

摘要 本文采用反相高效液相色谱纯化制备了从玉米小斑病病菌 C 小种 (*Helminthosporium maydis* Race C) 分离出来的毒素 Toxin I, 经 NMR 的结构分析证实此制备物纯度较高, 达到结构分析要求。用氯仿提取含有 HMC 的毒素培养滤液, 经过多次 TLC 展层层析 ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 9:1$), 刮取具有侵染活性

1997-12-05 收稿, 1998-03-29 修回

的部分 ($R_f = 0.4$) 溶解在小体积甲醇中备用。色谱柱为 Waters (制备型 250mm × 10mm) 填料为 YWG-C18 反相柱, 粒度 10 μ m, 流动相选用甲醇:水 55:45, 流速为 0.8ml/min, 检测波长 272nm, 进样量每次 100 μ l, 当主要峰出现时, 收集合并冻干保存 (保留时间 9.5min)。

关键词 高效液相色谱, 制备, HMC 毒素

分类号 Q93-33 **文献识别码** B **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-47-49

PREPARATIVE SEPARATION OF HMC-TOXIN FROM *HELMINTHOSPIRIUM MAYDIS* RACE C BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Cui Yang, Chen Yongli, Zhao Nanming

(Department of Bioscience and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Wei Jiankun

(Hebei Academy of Agricultural Science, Shijiazhuang 050051)

Abstract A reversed-phase HPLC method has been successfully used to separate and prepare the HMC-Toxin from *Helminthosporium maydis* Race C. It is evidenced that the separated sample by HPLC is highly purified and suitable for the NMR structural analysis. The filtered toxin culture solution containing HMC-toxin was extracted by chloroform and multi-separated through TLC by using the development reagent of CHCl_3 :MeOH(9:1). Then bioactive fraction of toxin to C-cytoplasm com was collected and dissolved in 500 μ l methanol for HPLC analysis and preparation. The optimum conditions were observed by using a 10 μ m YMG-C₁₈ analytical column (250mm × 4.6mm) and methanol:water eluent in primary experiments. A preparative column, 250mm × 10mm, with the same packings and methanol:water(55:45) as mobile phase at a flow-rate of 0.8ml/min and UV detector at 272nm were used for preparation. 100 μ l of sample were injected into HPLC system with 100 μ l loop of Rheodyne injection valve every time, The eluate containing purified sample was collected when the main peak is appeared. The retention time of main component (Toxin I) from HMC-toxin is 9.5min. This method could be used for preparation for structure analysis of natural products.

Key words High performance liquid chromatography, Preparation, HMC toxin

魏建昆于 1988 年根据病理、生理参数首次报道了在我国存在专性侵染 C 型细胞质玉米的致病生理小种 ~ 玉米小斑病菌 C 小种 (*Helminthosporium maydis* Race C)^[1], C 小种致病机制是产生 HMC 毒素, 这种毒素能够专性侵染 C 型细胞质玉米, 给玉米生产带来很大损失。由于 C 小种是在我国新发现的小种, 国内外对其毒素的研究很少, 尽管关于 HMC 毒素的作用机理和毒素理化及光谱性质有一些报道^[2~3], 但由于纯度和数量的不足, 难以进行结构分析。因此, 本文建立了利用反相高效液相色谱制备 HMC 毒素纯品的方法, 为结构分析奠定了基础, 同时本文提出了利用普通色谱仪制备少量纯化样品的的方法, 也为其它天然产物的制备提

供了参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, 定量管 100 μ L, SPD-10A 紫外检测器, 信号采集与处理为 SC1100 色谱工作站, 甲醇为色谱纯, 水为脱气的去离子水。

1.2 色谱条件选用

色谱柱为国产 Waters 型 (分析柱 250mm × 4.6mm, 制备柱 250mm × 10mm) 填料为 YWG-C₁₈ 反相柱, 粒度 10 μ m, 流动相选用甲醇:水, 通过分析柱选定甲醇与水的比例组成, 流速为 0.8ml/min, 检测波长 272nm。

1.3 样品前处理

取 *H. maydis* Race C 接种于 Fries 液体培养基, 25℃ 培养 20d, 过滤菌丝得滤液, 用氯仿提取含有 HMC 的毒素培养滤液, 经过多次 TLC 展层层析 (CHCl_3 : MeOH = 9:1), 刮取具有侵染活性的部分 (R_f = 0.4) 溶解在小体积甲醇中备用。

1.4 纯品制备

取前处理样品作紫外光谱扫描, 根据最大吸收峰定位检测波长。制备色谱每次进样量 100 μL 流动相选用主要成分和杂质保留时间相差较大的组分, 当主峰出现时, 收集流出物, 合并冻干备用。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

HMC 毒素(溶于甲醇)经紫外光谱扫描其最大吸收波长为 272nm, 因此确定其检测波长为 272nm。

由于 HMC 毒素含量较低, 为了节省样品, 首先用 250mm $\times$ 4.6mm 分析柱 (YWG- C_{18} , 10 μm) 选择流动相, 不同的流动相组成, 引起不同组分保留时间的差异, 选择保留时间差异大的流动相, 分离效果较好。流动相: A: 100% MeOH , B: $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 80:20, C: $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 55:45 D: $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50, 其色谱图见图 1; 通过上述实验可知, A、B 主峰与杂质峰没有很好地分开, 而 D 毒素峰保留时间过长, 浪费时间且部分杂质峰难被此流动相洗脱下来, 易污染色谱柱; 使用 MeOH 低于 50% 以下的组分的流动相, 毒素峰不易被洗脱下来, 因此 C 的条件最好, 所以选择流动相 C 作为制备的分离条件。

2.2 HMC 毒素纯品的制备

选用 250mm $\times$ 10mm 的 C_{18} 制备柱和 C 流动相, 当毒素主峰开始出现时立即收集, 当主峰结束时停止收集, 如此反复, 合并收集液浓缩至干, 此物质即为 Toxin I 纯品, 经 NMR 测定证实 Toxin I 已达到结构分析要求^[3]。制备色谱图见图 2A。将收集的制备物再次用分析柱检测, 流动相为 C (或 B), 色谱图呈单峰, 杂质峰消失。色谱图见图 2B。

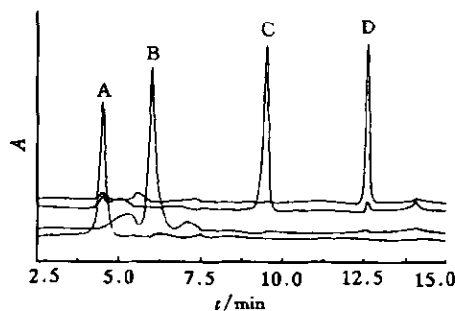


图1 不同比例甲醇流动相的HMC toxin色谱图
A. 100%, B. 80:20, C. 55:45, D. 50:50($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$)

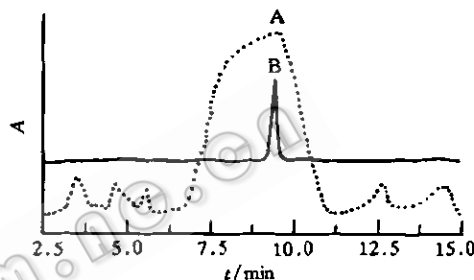


图2 HMC toxin制备与分析色谱图

A. 制备色谱图, B. 分析色谱图

由于色谱柱的性能和质量及操作上的误差, 其保留时间每次重复不是很精确, 而且峰型不是标准的高斯峰(与样品过载有关)但由于 Toxin I 是主要成分, 在色谱图上呈现一个较大的吸收峰, 很易鉴别, 并不影响制备。经过分析柱检测制备物证实其呈单峰。色谱图见图 2, 因此普通色谱仪可以换上制备柱, 作一些生物样品的纯化和半制备工作, 拓宽了仪器的应用范围。

参 考 文 献

- [1] Wei J K, Lui K M, Chen J P *et al.* *Phytopathology*, 1988, 78(5):550~554.
- [2] 崔 洋, 马春红, 刘克明等. *植物病理学报*, 1992, 22(2): 175~178.
- [3] 崔 洋, 魏连昆, 沈子威等. *生物物理学报*, 1997, 13(4): 551~555.