

HPLC 法测定刺囊毛霉微生物转化 甘草次酸的主产物含量

马 晶¹ 辛秀兰^{1,2*} 袁其朋¹ 吴志明² 李晓燕²

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院 北京 100029)

(2. 北京电子科技职业学院生物技术应用中心 北京 100029)

摘 要: 采用刺囊毛霉 AS3.3450 对甘草次酸进行微生物转化, 生成的主产物经分析鉴定是 7 β -羟基甘草次酸。采用高效液相色谱方法, 以 C18-ODS 为色谱柱, 甲醇-0.03%三氟乙酸水溶液(梯度洗脱)为流动相, 检测波长为:254 nm, 测得在 160 r/min、27°C 的转化条件下, 底物加量为 130 mg/L, 转化时间为 9 d 时, 主产物得率最高为 712 mg/g 甘草次酸, 且在选定色谱条件下 7 β -羟基甘草次酸的线性范围良好, 平均加样回收率为 98.1%, 平均标准偏差(RSD)为 2.37%。

关键词: 高效液相色谱, 微生物转化, 甘草次酸, 7 β -羟基甘草次酸

Determination of 7 β -hydroxyglycyrrhetic Acid in Microbial Transformation of Glycyrrhetic Acid by *Mucor spinosus* by HPLC

MA Jing¹ XIN Xiu-Lan^{1,2*} YUAN Qi-Peng¹ WU Zhi-Ming² LI Xiao-Yan²

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

(2. Biotechnology Application Center, Beijing Vocational College of Science and Technology, Beijing 100029)

Abstract: The major product of microbial transformation of glycyrrhetic acid by *Mucor spinosus* AS3.3450 has been identified as 7 β -hydroxyglycyrrhetic acid on the basis of its spectral data. 7 β -hydroxyglycyrrhetic acid was directly determined by HPLC. Methanol and ultra pure water containing 0.03% trifluoroacetic acid was used as the mobile phase on C₁₈ column, the UV detection wavelength was 254 nm. The maximum transformation rate observed was 712 mg 7 β -hydroxyglycyrrhetic acid/g glycyrrhetic acid on day 9 under 27°C, 160 r/min and substrate at a concentration of 130 mg/L. Results show that the content of 7 β -hydroxyglycyrrhetic acid indicates a good linearity under these conditions with a average recovery of 98.1% and a RSD of 2.37%.

Keywords: HPLC, Microbial transformation, Glycyrrhetic acid, 7 β -hydroxyglycyrrhetic acid

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)属于豆科植物。在我国西部、俄罗斯及欧洲分布较多。自古以

来, 甘草在很多国家广为药用^[1]。甘草性平味甘, 具有和中缓急、润肺、解毒、祛痰、止咳、通经脉、

利气血、调和诸药等功效,为临床广泛应用^[2]。

甘草次酸是甘草的主要成分之一,具有抗炎、抗溃疡、抗过敏、降血脂、镇咳、平喘、祛痰等主要作用。此外,甘草次酸还有提高内耳听力抗缺氧、抗乙酰胆碱脂酶、抗心律失常的作用,并具有抗 HIV 活性^[3]。但长期服用该药可引起类醛固酮增多症,其特征是钠潴留、钾排泄增多,从而导致水肿、高血压、四肢瘫痪和低血钾症等^[4]。甘草次酸还能引起动物甲状腺中度抑制,有降低基础代谢率的作用。为了降低以上副作用以及改善甘草次酸的溶解性、吸收性等,对甘草次酸进行有效的化学修饰和结构改造是非常有必要的。用微生物系统对天然药物进行生物转化从而对其结构进行修饰,以获得更有意义产物的报道^[5-8]很多,并逐渐成为天然药物的一大研究热点。国内外利用微生物系统对甘草次酸进行化学修饰和结构改造的并不多见,辛秀兰^[9]等多型孢毛霉(AS3.3443)对甘草次酸进行了微生物转化研究。本文利用刺囊毛霉对甘草次酸进行微生物转化且用高效液相色谱法对主产物进行含量测定,这类报道在国内文献中未出现过。

1 材料与方法

1.1 菌种

刺囊毛霉 AS3.3450(*Mucor spinosus* AS3.3450)购自中国科学院微生物所中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。

1.2 培养基

土豆培养基:土豆浸取液 1.0 L;葡萄糖 20.0 g;自然 pH 值;取去皮土豆 200 g,切成小块,加水 1.0 L 煮沸 30 min,滤去土豆块,将滤液补足 1.0 L。空白培养基:不加刺囊毛霉的土豆培养基。

1.3 主要仪器设备

AR2140 型分析天平(奥豪斯);LABOROTA4000 旋转蒸发仪(Heidolph);Agilent1100 高效液相色谱仪;DRX-500 型核磁共振光谱仪(Bruker)。

1.4 培养方法

从试管斜面将菌体接入装有土豆培养基的三角瓶中,在 160 r/min、27℃ 的条件下振荡培养 2 d 后,加入一定量的甘草次酸,在同样条件下继续培养 7 d。

1.5 发酵液处理方法

培养结束后,将发酵液真空过滤,滤液用 10% 的盐酸调节 pH 值到 3,然后用等体积的乙酸乙酯萃

取 3 次,合并乙酸乙酯萃取液,在 50℃ 条件下真空旋转蒸发除去溶剂,残渣用甲醇溶解,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,待检。

1.6 分析方法

处理后发酵液样品进行 HPLC 检测分析, HPLC 色谱条件为检测波长, 254 nm; 流速, 1.0 mL/min; 柱温, 25℃; 进样量, 10 μL; 平衡时间, 9 min; 流动相 A 为 0.03% 三氟乙酸水溶液, 流动相 B 为甲醇。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 HPLC 的梯度洗脱条件 Table 1 The gradient program of HPLC		
Time (min)	A %	B %
0	35	65
25	30	70
40	20	80
55	10	90
65	0	100
70	0	100

1.7 7β-羟基甘草次酸标准品溶液的制备

精密称取 7β-羟基甘草次酸对照品 1.5 mg, 溶于 1.5 mL 甲醇中, 摇匀, 配制成 1 mg/mL 的 7β-羟基甘草次酸标准品溶液。

2 结果与讨论

2.1 刺囊毛霉 AS3.3450 对甘草次酸转化的主产物结构鉴定

2.1.1 刺囊毛霉转化甘草次酸结果: 按培养方法培养, 加入底物质量浓度为 50 mg/L, 且设空白对照, 加相同量底物至空白培养基(以便考察土豆培养基对甘草次酸有无转化, 排除培养基的干扰)。培养结束, 发酵液经处理后, 用 HPLC 进行检测分析。转化结果如图 1 和 2。

图 1 为甘草次酸在土豆培养基中反应 7 d 的 HPLC 图, 图 2 为甘草次酸在刺囊毛霉菌悬液中转化 7 d 的 HPLC 图, 经比较得知, 土豆培养基与甘草次酸不发生化学反应, 图 2 中主产物 1 以及产物 2、3、4 等的产生是由于刺囊毛霉本身的酶对甘草次酸的作用所致。

2.1.2 主产物的结构鉴定: 扩大培养 300 mg 底物, 转化 7 d 结束, 发酵液经处理后, 采用吸附柱层析初步分离转化产物。吸附剂是 200 目~300 目硅胶, 吸附规格为 25 mm×400 mm, 用 50 g 硅胶装柱, 分别用 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 体积比的 MeOH 和 CHCl₃

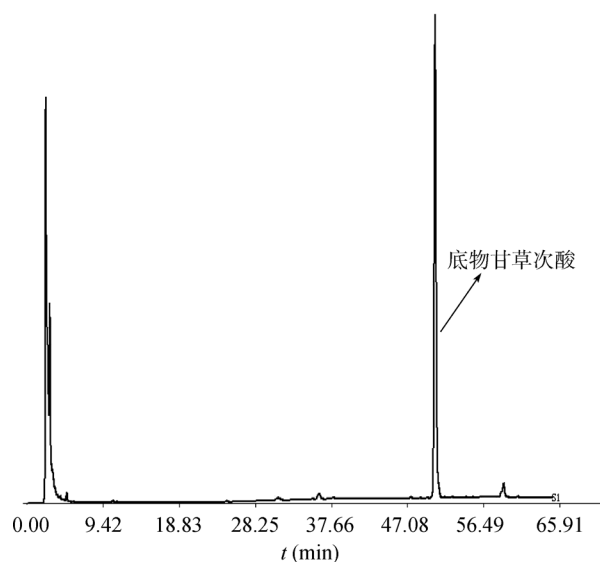


图1 甘草次酸在土豆培养基中的 HPLC (空白对照)
Fig. 1 HPLC chromatograms of glycyrrhetic acid

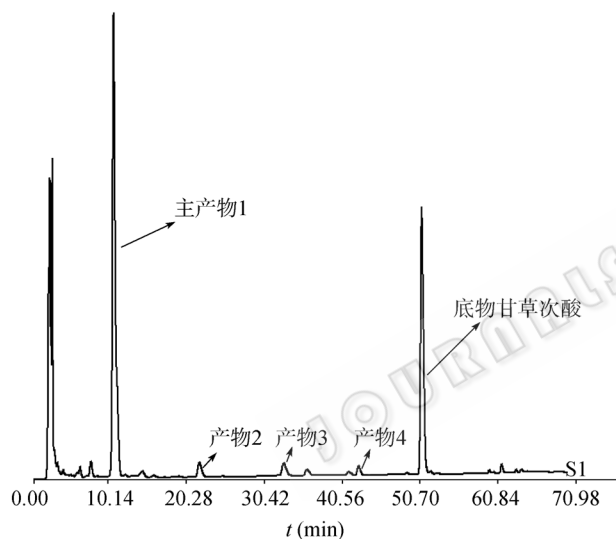


图2 刺囊毛霉 AS3.3450 对甘草次酸转化产物的 HPLC
Fig. 2 HPLC chromatograms of biotransferred products

洗脱液梯度洗脱而分离转化产物, 每 100 mL 收集一个流分。通过 HPLC 检测分析, 合并第 1 个流分和第 2 个流分, 用半制备 HPLC 制备了 130.8 mg 主产物。

对制得的主产物进行质谱测定及核磁共振 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) 检测。

主产物的波谱数据如下:

ESI-MS: $m/z=485.3[\text{M-H}]^-(\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_5:485.3)$; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): $\delta=0.80(3\text{H}, \text{s}, \text{Me})$, $0.84(3\text{H}, \text{s}, \text{Me})$, $1.01(3\text{H}, \text{s}, \text{Me})$, $1.14(6\text{H}, \text{s}, 2\text{Me})$, $1.22(3\text{H}, \text{s}, \text{Me})$, $1.44(3\text{H}, \text{s}, \text{Me})$, $3.23(1\text{H}, \text{dd}, J=6.0, 10.5\text{Hz}, \text{H}-3)$, $4.06(1\text{H}, \text{dd}, J=5.0, 11.0\text{Hz}, \text{H}-7)$, $5.75(1\text{H}, \text{s}, \text{H}-12)$ 。

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3): $\delta: 38.8\text{t}(\text{C}-1)$, $27.3\text{t}(\text{C}-$

$2)$, $78.6\text{d}(\text{C}-3)$, $38.9\text{s}(\text{C}-4)$, $51.7\text{d}(\text{C}-5)$, $28.9\text{t}(\text{C}-6)$, $72.6\text{d}(\text{C}-7)$, $50.5\text{s}(\text{C}-8)$, $61.9\text{d}(\text{C}-9)$, $37.1\text{s}(\text{C}-10)$, $199.4\text{s}(\text{C}-11)$, $128.6\text{d}(\text{C}-12)$, $169.2\text{s}(\text{C}-13)$, $44.6\text{s}(\text{C}-14)$, $30.1\text{t}(\text{C}-15)$, $26.7\text{t}(\text{C}-16)$, $31.8\text{s}(\text{C}-17)$, $48.9\text{d}(\text{C}-18)$, $41.1\text{t}(\text{C}-19)$, $43.8\text{s}(\text{C}-20)$, $30.9\text{t}(\text{C}-21)$, $37.6\text{t}(\text{C}-22)$, $28.1\text{q}(\text{C}-23)$, $15.6\text{q}(\text{C}-24)$, $16.0\text{q}(\text{C}-25)$, $12.2\text{q}(\text{C}-26)$, $23.7\text{q}(\text{C}-27)$, $28.4\text{q}(\text{C}-28)$, $28.5\text{q}(\text{C}-29)$, $181.0\text{s}(\text{C}-30)$ 。

主产物的质谱、氢谱、碳谱谱图与文献[9]中报道一致, 因此可判定主产物为 7 β -羟基甘草次酸。

占纪勋^[10]等采用刺囊毛霉 AS3.3450 对天麻素进行微生物转化, 得到 1 个产物 *p*-羟基苯甲基乙醇。马晓驰^[11]等利用刺囊毛霉 AS3.3450 对姜黄二酮微生物转化, 并进行动态研究, 发现姜黄二酮的特定位点上发生了羟基化反应。可知, 刺囊毛霉 AS3.3450 具有羟基化酶的活性, 能够对一些天然药物进行羟基化的结构修饰。利用这一特点可以选择性的对天然药物进行结构性的修饰, 进一步研究特定的药物代谢反应。

刺囊毛霉 AS3.3450 微生物转化甘草次酸同时产生了产物 2、3、4 等, 说明刺囊毛霉具有除羟基化酶之外的其他酶活性, 但在本实验的培养转化条件下转化率较低。确定刺囊毛霉 AS3.3450 的其他酶活性和如何提高其他产物的转化率这些问题都有待于进一步研究。

2.2 标准曲线的制备

取 7 β -羟基甘草次酸对照品溶液, 分别以 1 μL 、2 μL 、3 μL 、4 μL 、5 μL 、6 μL 、7 μL 、8 μL 、9 μL 、10 μL 、11 μL 、12 μL 、13 μL 、14 μL 、15 μL 、16 μL 、17 μL 、18 μL 、19 μL 、20 μL 进样。按 1.6 中的色谱条件进行检测, 将峰面积同对应的对照品的质量进行回归确定标准曲线。以对照品量($\text{C}/\mu\text{g}$)为横坐标, 测定的峰面积积分值($\text{A}/\text{mAU}\cdot\text{min}$)为纵坐标, 绘制标准曲线。经统计学计算, 得回归方程: $A=767.11C+130.36$, $R^2=0.9995$, 7 β -羟基甘草次酸在 1 μg ~20 μg 范围内有良好的线性关系。

2.3 精密度和加样回收率实验

取已知 7 β -羟基甘草次酸含量的样品定量加入 7 β -羟基甘草次酸对照品溶液, 采用 1.6 中色谱条件进行测定。每个样品重复 3 次, 实验结果见表 2。

2.4 稳定性实验

取一份待检样品, 在室温下放置 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 按 1.6 中色谱条件进行测定, 结果见表 3。

表 2 回收率测定(n=3) Table 2 Recovery of the sample (n=3)						
次序 Sequence	背景 (mg/mL) Background	添加 (mg/mL) Adding	测出 (mg/mL) Result	回收率 (%) Recovery	平均回收率 (%) Average recovery	RSD (%)
1	1.12	1.00	2.06	97.1	98.1	2.37
2	1.18	1.00	2.16	99.1		
3	1.16	1.00	2.12	98.1		

表 3 甘草次酸样品溶液的稳定性 Table 3 The stability of a sample						
时间 Time(h)	0	2	4	8	12	24
峰面积 Peak value	9059	9100	9000	9121	9026	9135

从表 3 中可以看出, 甘草次酸样品溶液在室温条件下放置 24 h, 其峰面积基本不变, RSD 为 0.6%, 说明它在室温, 24 h 下稳定。

2.5 不同转化时间下 7β-羟基甘草次酸的含量测定

在装有 300 mL 无菌培养基的三角瓶中加入质量浓度为 130 mg/L 的甘草次酸, 转化 14 d。每天在无菌条件下从发酵液中取 20 mL 菌悬液。样品经处理后, 用 HPLC 检测分析, 进而推算主产物的含量, 结果如图 3。

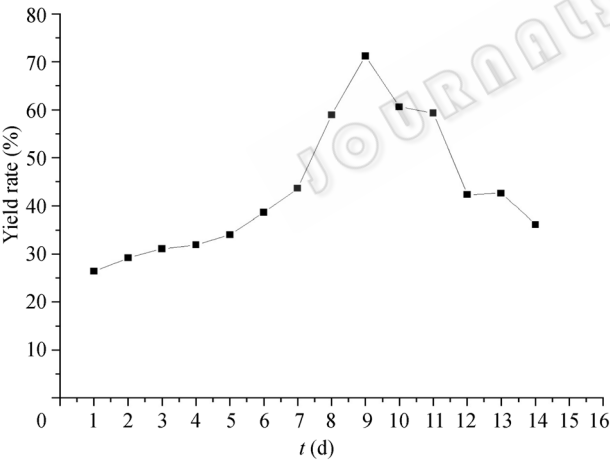


图 3 转化时间对转化产物得率的影响
Fig. 3 Time course in biotransformation of glycyrrhetic acid by *M. spinosus* AS3.3450

由图 3 可以看出, 转化时间对产物 7β-羟基甘草次酸的得率影响很大。随着转化时间的增加, 7β-羟基甘草次酸的得率明显呈上升趋势, 转化第 9 天时, 得率最高达到 712 mg/g 甘草次酸。第 9 天后得率有所下降, 可能由于其它转化产物产生而导致。辛秀兰^[9]等用多型孢毛霉(AS3.3443)微生物转化甘草次酸的产物之一也是 7β-羟基甘草次酸, 但产率仅为

26.8%。可说明刺囊毛霉(AS3.3450)羟基化酶对甘草次酸转化的活性要比多型孢毛霉(AS3.3443)高。

3 结论

刺囊毛霉 AS3.3450 能转化甘草次酸形成主产物 7β-羟基甘草次酸, 在转化条件为 160 r/min, 培养温度 27℃, 底物加量为 130 mg/L 时, 转化第 9 天得率最高为 712 mg/g 甘草次酸。实验证明, 该 HPLC 方法简便可行, 可对刺囊毛霉 AS3.3450 微生物转化甘草次酸生成的主产物进行质量控制。

参 考 文 献

[1] 王 赓. 甘草次酸及其衍生物的研究与应用. 辽宁化工, 2006, 35(6): 347–352.

[2] 谢世荣, 赵 洁, 刘 琳, 等. 甘草次酸的研究与展望. 大连大学学报, 2005, 26(4): 85–88.

[3] 谢 辉. 18β-甘草次酸的研究进展. 中成药, 2002, 24(9): 712–713.

[4] 李 斌, 江 涛, 万升标, 等. 甘草次酸的化学修饰和结构改造研究进展. 精细化工, 2006, 23(7): 643–648.

[5] 占纪勋, 钟建江, 戴均贵, 等. 红豆杉愈伤组织中紫杉烷类成分 sinenxan A 的微生物转化研究. 药学报, 2003, 38(7): 555–558.

[6] 黄海华, 崔洪霞, 钟大放, 等. 利用微生物转化模型研究苯丙哌林的代谢产物. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(4): 297–301.

[7] 周庆礼, 黄艳凤, 韩英素, 等. 微生物转化法生产香兰素. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 18–20.

[8] 刘 磊, 孙 璐, 黄海华, 等. 蔡普生的微生物转化. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(5): 369–372.

[9] XIN Xiulan, LIU Yufeng, YE Min, *et al.* Microbial Transformation of Glycyrrhetic Acid by *Mucor Polymorphosporus*. *Planta Medica*, 2006, 72: 156–161.

[10] ZHAN Jixun, GUO Hongzhu, DAI Jungui, *et al.* Bio-transformation of Gastrodin by *Mucor spinosus*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2001, 10(4): 187–189.

[11] MA Xiaochi, YE Min, WU Lijun, *et al.* Microbial transformation of curdione by *Mucor spinosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38: 367–371.