

李德和,王君为,徐文雅,等. 类球红细菌中辅酶 Q₁₀ 含量的测定及其动态研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):298-301.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.088

类球红细菌中辅酶 Q₁₀ 含量的测定及其动态研究

李德和,王君为,徐文雅,郭丽冰,贾真,赵越

(广东药学院中药学院,广东广州 510006)

摘要:以液体培养为基础,建立高效液相色谱分析测定辅酶 Q₁₀ 含量的方法,测定类球红细菌中辅酶 Q₁₀ 的含量,进而测定在生长过程中单位质量的湿菌体中辅酶 Q₁₀ 含量的动态变化。结果显示,菌体中辅酶 Q₁₀ 的相对含量在对数期表现出增长趋势,并在稳定期趋于稳定,而在菌体衰亡期则表现出相对含量减少的趋势。在利用类球红细菌进行发酵生产辅酶 Q₁₀ 时,应在菌体生长的稳定期进行提取分离。

关键词:类球红细菌;辅酶 Q₁₀;高效液相色谱法;动态变化研究

中图分类号: Q552 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0298-03

类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)是一类原核生物,红细菌属,在自然界分布广泛,可在不同条件下进行光自养及光异养。菌体无毒且菌体中含有多种营养物质,尤其辅酶 Q、类胡萝卜素等抗氧化性物质含量较高^[1],因而被广泛应用于食品、保健品、化妆品等行业。辅酶 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀) 是一种脂溶性多烯醌类化合物,是细胞自身合成的天然抗氧化剂和细胞代谢激活剂。目前,CoQ₁₀ 的制备方法主要有 3 种,即动植物组织提取法、化学合成法和微生物发酵法。微生物发酵法合成的 CoQ₁₀ 成本低,无光学异构体,生物学活性高,临床应用效果好^[2-4]。其中日本首先实现 CoQ₁₀ 工业化生产,产量占全球的 90%,是 CoQ₁₀ 的主要生产国。

在医学上,目前 CoQ₁₀ 主要应用领域是心血管病临床方面^[5]。治疗坏血病、糖尿病、十二指肠溃疡和胃溃疡、坏死性牙周炎、病毒性肝炎、肺气肿、听觉障碍等也有一定疗效^[6-8]。近来还发现其对艾滋病也有辅助疗效,已开始二期临床试验^[9]。在食品^[10]、保健品行业,作为食品添加剂应用到饮料、糖果、糕点、乳酪、酸奶等食品生产中,因具大幅度改善人体细胞的用氧功能、提高人体免疫力、增强抗氧化性等功效而应用于保健食品中。在化妆品行业,由于 CoQ₁₀ 有清除氧自由基、延缓皮肤衰老、具有抗衰老功效而应用于化妆品中^[11]。

现代人们越来越注重健康,CoQ₁₀ 在医药、保健品等领域的广泛应用使得 CoQ₁₀ 作为保健食品、药品或者添加于保健食品、药品也越来越为人们所接受。CoQ₁₀ 的需求量也越来越大,产量高、周期短地获得 CoQ₁₀ 的生产方法是时代所需,而建立有效的测定方法以及确定从菌体中提取 CoQ₁₀ 的时期是微生物发酵获得 CoQ₁₀ 的一个至关重要的环节。光合细菌中辅酶 Q 含量明显高于其他生物组织,特别是类球红细菌,所以可作为极珍贵的辅酶 Q 来源。光合细菌的辅酶 Q 大部分为

CoQ₁₀。经查阅相关资料,近年来未见关于类球红细菌中 CoQ₁₀ 含量动态变化的报道,在利用类球红细菌发酵生产 CoQ₁₀ 的工艺中,关于在何时提取分离有一定的盲目性。本研究在建立高效液相色谱法分析菌体中 CoQ₁₀ 相对含量方法的同时,进一步分析了类球红细菌在生长过程中辅酶 Q₁₀ 相对含量的变化趋势,为今后利用类球红细菌发酵生产 CoQ₁₀ 的研究奠定基础,也为笔者所在课题组利用类球红细菌发酵六味地黄汤获得抗氧化药效更显著的保健品的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

岛津 UV-2450 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;BP211D 电子天平,德国 Sartorius 公司;AY120 电子天平,日本 Shimadzu 公司;MJ-78A 高压灭菌锅,美国 Stik 公司;SW-CJ-1FD 超净工作台,江苏省苏州安泰空气技术有限公司;RXZ 人工气候箱,浙江省宁波江南仪器厂;3-30K 离心机,德国 Sigma 公司;SK8200H 超声波清洗机,上海科导超声仪器有限公司;RV10 旋转蒸发仪,德国 IKA 公司;LC-20A 高效液相色谱仪,LC-solution lite 色谱工作站,SPD-M20A 紫外检测器,日本岛津公司;DIKMA platasil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,天津迪马公司。

酵母膏、蛋白胨为国产生物纯,其他所用试剂均为国产分析纯。甲醇为瑞典 Oceanpak 色谱纯,无水乙醇为天津科密欧色谱纯。辅酶 Q₁₀ 标准品(批号:140611-201204)购自中国食品药品检定研究院。类球红细菌(编号:1.2174)购自中国科学院微生物研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 液体菌液的培养 种子培养基配方:KH₂PO₄ 1.00 g, CaCl₂ 0.10 g, NaHCO₃ 3.00 g(过滤除菌), CH₃COONa 1.00 g, MgCl₂ 1.00 g, NH₄Cl 1.00 g, NaCl 1.00 g, 酵母膏 0.50 g, 蛋白胨 0.50 g, 丁二酸钠 1.00 g, 微量元素液 1.00 mL, 去离子水 1 000 mL。

发酵培养基配方:NH₄Cl 0.30 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.05 g, NaCl 0.40 g, KH₂PO₄ 1.00 g, Na₂CO₃ 0.5 g, MgCl₂ · 6 H₂O 0.20 g, 酵母膏 1.00 g, 微量元素液 10.00 mL, 去离子

收稿日期:2014-09-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:81374072)。

作者简介:李德和(1990—),男,江西瑞金人,硕士研究生,主要从事中药微生物代谢研究。E-mail:lear19900811@gmail.com。

通信作者:赵越,教授,硕士生导师,从事中药新剂型开发与研究。E-mail:zybmylk688@163.com。

水 1 000 mL。

微量元素液配方: Na_2EDTA 2.00 g, H_3BO_3 1.50 g, CuSO_4 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.20 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.45 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, 去离子水 1 000 mL。

菌液的扩大培养:按上述种子培养基配方配制 400 mL 种子培养基,于高压灭菌锅 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min,待培养基冷却至室温后,于超净工作台分装至 500 mL 具塞透明玻璃瓶中,再将实验室保留菌种按 20% 的接种量接入种子培养基中,培养 3 d 得到对数期菌液。

按上述发酵培养基配方配制 3 000 mL 发酵培养基,于高压灭菌锅 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min,待培养基冷却至室温后,于超净工作台分装至 3 个 1 000 mL 具塞透明玻璃瓶并按 5% 的接种量接入上述对数期菌液,获得 3 瓶 1 000 mL 的扩大菌液作为 3 个平行。扩大的菌液置于实验室人工气候箱培养 7 d,培养条件:温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、光照度 4 000 lx、湿度 60%。

1.2.2 菌体生长的监测 各瓶每 24 h 分别取 1 次样,利用紫外-可见分光光度计测定 660 nm 处吸光度,取平均值,由此判断菌体的生长情况。

1.2.3 样品的准备及相对含量计算 样品的制备:各瓶每 24 h 分别取 1 次样 50 mL,6 000 r/min 离心 10 min,弃上清获得湿菌体,菌体洗涤 2 次后称质量,取平均值获得菌体湿质量 m ,然后分别加入 10 mL 丙酮充分混匀,避光超声破碎辅助提取 15 min,离心收集上清,残渣重复 2 次,合并 3 次上清于旋转蒸发仪 50 $^{\circ}\text{C}$ 蒸干,加无水乙醇定容至 10 mL,得供试品。利用高效液相色谱仪进行含量测定,取其平均值获得供试品浓度 C 。 CoQ_{10} 的相对含量 ($\mu\text{g/g}$) = $10 C/m$,其中 C 为供试品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), m 为菌体湿质量 (g)。

2 结果与分析

2.1 菌体的生长趋势

从图 1 中可以发现菌体在培养后 1 d 处于延迟期,之后开始进入对数期并持续到培养后 3 d,以后进入稳定期一直持续到培养后 6 d,培养后 7 d 开始进入衰亡期。

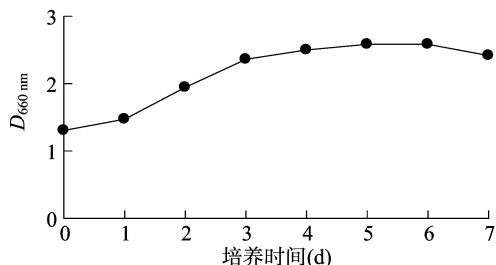


图1 类球红细菌的生长周期

2.2 菌体湿质量

各瓶每 24 h 分别取样 50 mL,6 000 r/min 离心 10 min,弃上清获得湿菌体,菌体洗涤 2 次后称质量,取平均值获得菌体湿质量(图 2)。

2.3 高效液相方法的确定

2.3.1 检测波长的选择 取 CoQ_{10} 标准品,利用紫外-可见分光光度计对其波长 200 ~ 800 nm 进行全波长扫描,取最大吸收波长为检测波长,测得 CoQ_{10} 在波长 275 nm 处有最大吸收,选为检测波长。

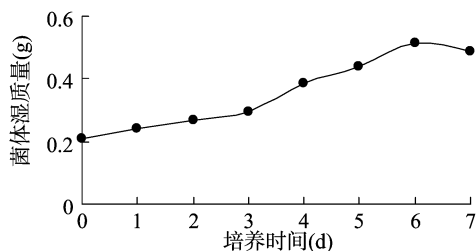


图2 类球红细菌湿质量的变化趋势

2.3.2 色谱条件 色谱柱 DIKMA Platisil ODS (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇:无水乙醇 = 20:80,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 10 μL ,流速 1 mL/min。

2.3.3 系统适用性 分别自动进样 CoQ_{10} 标准品 ($C = 150 \mu\text{g/mL}$)、样品、离心得到的上清液 10 μL 。由图 3、图 4 可见,标准品与样品出峰时间为 (16.944 \pm 0.112) min,理论塔板数按 CoQ_{10} 计不小于 5 000,分离度大于 1.5,拖尾因子在 0.95 ~ 1.05 之间。离心得到的上清液不含 CoQ_{10} (图 5)。

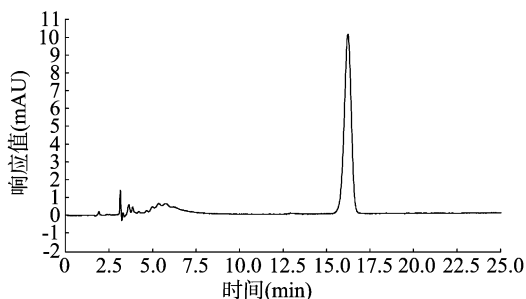


图3 CoQ_{10} 标准品色谱图

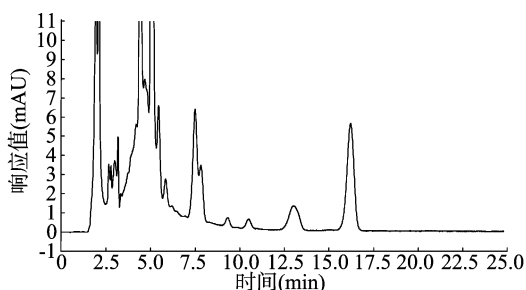


图4 样品色谱图

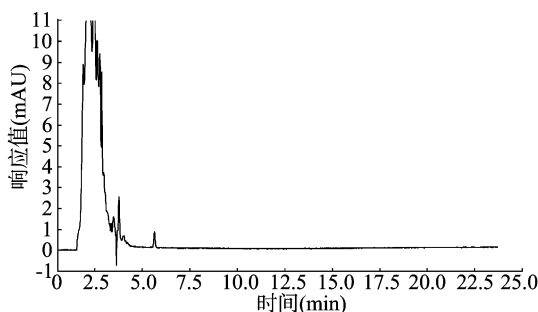


图5 上清液色谱图

2.3.4 标准品溶液的制备 精确称取 CoQ_{10} 标准品 1.50 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,摇匀得到 150.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品储备液。

2.3.5 供试品溶液的制备 “1.2”节所制溶液即为供试品溶液。

2.3.6 方法学考察 标准曲线的制备及线性范围的考察:精

切吸取 0.5、1.0、2.0、2.5、3.0 mL 的标准品储备液至 10 mL 容量瓶并用无水乙醇定容至刻度,摇匀分别得到 7.5、15.0、22.5、30.0、37.5、45.0、52.5 $\mu\text{g/mL}$ 标准品溶液。进样分析,以标准品峰面积 A 对标准品浓度 C ($\mu\text{g/mL}$) 作线性回归。从图 6 得, $A = 5\,447.6C - 3\,470.1$, $r^2 = 0.999\,9$ ($n = 6$),结果表明: CoQ_{10} 在 7.5 ~ 52.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性良好。

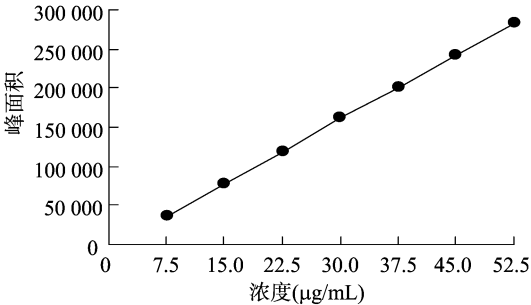


图6 CoQ_{10} 标准曲线

精密度试验:对标准品进行 6 次进样,得到峰面积 $RSD = 0.4\%$,说明该方法精密性好。

稳定性试验:对标准品分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样,得到峰面积 $RSD = 0.67\%$,说明标准品稳定性好。对供试品分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样,得到峰面积 $RSD = 0.55\%$,说明样品稳定性好。

重复性试验:同一时期同瓶菌液平行取样 6 次,同样处理,进样分析得到峰面积 $RSD = 1.71\%$,说明该方法重复性好。

加样回收率试验:取已知含量的同一批菌液 6 份,加入一定量的标准品,按照“2.2”节方法制备供试品溶液,分别进样 10 μL ,进行色谱分析,结果见表 1,平均回收率为 98.26%, RSD 为 1.37%。

表 1 加样回收率试验结果

序号	样品量 (μg)	加入量 (μg)	测定量 (μg)	回收率 (%)
1	30.22	30	59.36	97.13
2	30.22	30	59.14	96.41
3	30.22	30	60.11	99.62
4	30.22	30	59.58	97.87
5	30.22	30	60.12	99.68
6	30.22	30	59.88	98.86
平均值				98.26

注: $RSD = 1.37\%$ 。

2.4 样品 CoQ_{10} 相对含量的测定

由图 7 可见,类球红细菌中 CoQ_{10} 的相对含量在延迟期有一定增长趋势但趋势较不明显,而在对数期则不断地增加且增长趋势较明显,到菌体稳定期则达到最高并保持相对稳定,菌体进入衰亡期后菌体中 CoQ_{10} 相对含量表现出急剧下降的趋势。

3 结论与讨论

近年来,关于 CoQ_{10} 的提取方法有相关报道^[12-16],从各种组织或细胞提取 CoQ_{10} ,主要是利用超声破碎组织细胞以及利用酶法、反复冻融辅助破碎的方法进行破碎提取,进而利用有机溶剂进行提取。 CoQ_{10} 的测定方法主要有紫外分光光度法、高效液相色谱法、气相色谱法以及质谱的联用^[17-21]。

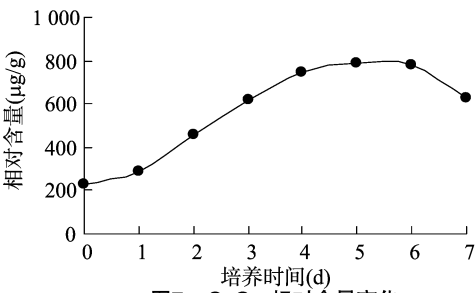


图7 CoQ_{10} 相对含量变化

本试验建立了测定类球红细菌中 CoQ_{10} 含量的高效液相色谱法,该法也可用于测定笔者所在课题组利用类球红细菌发酵六味地黄汤中的类球红细菌中的 CoQ_{10} 。通过对提取溶剂的选择与用量、超声提取时间、液相流动相的选择与配比的考察,发现三氯甲烷、苯、丙酮、乙醚、石油醚对 CoQ_{10} 都具有较好的提取效果,丙酮的提取效果最好,且相对于其他 4 种溶剂丙酮具有毒性小、无麻醉性等特点,所以本试验选用丙酮作为提取溶剂。通过对丙酮提取用量的考察发现,用量为 30 mL 超声 15 min 提取 3 次时提取效果最好。丙酮用量过多会导致试剂的浪费且提取效果反而有所下降,用量过少会导致因提取不完全而增加提取次数;超声时间过长会导致其中 CoQ_{10} 的结构遭到破坏,超声时间过短会因细胞破碎不完全而导致提取不完全;以上都会导致实际测定的 CoQ_{10} 含量不准确。根据 2010 版《中国药典》中相关规定,液相流动相选为甲醇和无水乙醇,流动相的配比根据《中国药典》选为甲醇:无水乙醇 = 50:50 时,出峰时间大于 60 min,所以使用了 30:70、20:80、10:90 等 3 个比例,发现 20:80 的配比峰形最好,且出峰时间在 16 min 左右,理论塔板数大于 5 000,分离度大于 1.5,拖尾因子在 0.95 ~ 1.05 之间。

本试验在建立高效液相色谱法测定类球红细菌中 CoQ_{10} 含量的基础上,同时测定了菌体中 CoQ_{10} 的相对含量在生长过程中的动态变化。结果表明,类球红细菌中 CoQ_{10} 相对含量在菌体延迟期增长不明显,在对数期不断增长且增长趋势明显,增长趋势在稳定期趋于平缓并达到相对含量的最大值,而在衰亡期则表现出下降的趋势。

本试验建立了简便有效且精准的测定类球红细菌中 CoQ_{10} 含量的方法,以及确定了 CoQ_{10} 在类球红细菌生长过程中相对含量的动态变化,确定了 CoQ_{10} 在菌体对数期末期至稳定期末期达到含量的最大值,这为利用类球红细菌发酵生产 CoQ_{10} 的研究奠定了基础,也为笔者所在课题组利用类球红细菌发酵六味地黄汤获得抗氧化效果更显著的保健品的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 杨威,柯崇榕,邵庆伟,等. 类球红细菌产辅酶 Q_{10} 发酵工艺的优化[J]. 食品与发酵工业,2013,39(2):75-79.
[2] 王青云,王发祥,钟士清. 微生物发酵法生产辅酶 Q_{10} 的研究进展[J]. 化学与生物工程,2006,23(8):11-13.
[3] Choi J H, Ryu Y W, Seo J H. Biotechnological production and applications of coenzyme Q_{10} [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(1):9-15.

兰 英,沈晓凤,严铸云,等. 不同地理种源丹参根系分泌物的 GC-MS 比较分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):301-305.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.089

不同地理种源丹参根系分泌物的 GC-MS 比较分析

兰 英,沈晓凤,严铸云,王 海,何冬梅,王苏琴,任 波,陈 新

(成都中医药大学中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地/
中药材标准化省部共建教育部重点实验室,四川成都 611137)

摘要:为了阐明丹参根系分泌行为与遗传和环境的关系,以不同地理(四川省、山东省、河南省)种源丹参组培苗和根段材料,分别进行无菌和沙土培养。并利用 GC-MS 技术对丹参根系分泌物进行组分分析,从组培和盆栽丹参根系分泌物中分别检测出 19 种、36 种物质,其中组培丹参根系分泌物以酚类、酯类为主。各种源丹参根系分泌物中有其特殊的成分,但所有分泌物中均含有十六烷棕榈酸、硬脂酸油醇酯、松油醇等,只是含量不同。土培条件下,根系分泌物中烃类、醇类、醛类在种类及含量上均有所增加,而酚类、酯类明显减少,尤其是酚类物质,增加 2 种酸类、2 种甾醇类和 1 种萘胺、2 种酰胺类组分,但未检出组培丹参根系分泌物中的 1 种酮类和 3 种脂肪胺类物质。研究表明,丹参根系分泌物的组成和相对含量受遗传和环境的影响,其中有机酸、甾醇类和酰胺类是环境胁迫下的主要分泌物,本研究结果将为提高丹参根际土壤养分高效利用提供一定参考。

关键词:丹参;根系分泌物;组培法;土培法;气相色谱-质谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0301-05

根系分泌物是植物与环境相互作用的媒介,在植物间、植

物与微生物间的相互作用中具重要的生态学意义^[1],其组成受遗传和环境的双重调控,在植物根系化感作用及根际营养调控中起着重要作用^[2-3]。研究表明三七^[4]、人参^[5]、西洋参^[6]、地黄^[7]、苍术^[8]等的根系分泌物具化感作用。丹参(*Salvia mihiorrhiza* Bge.)是多地栽培的药用植物,其中四川、河南、山东是丹参药材的道地产区^[9]。已有研究表明,丹参虽具广泛的土壤适应性,但不同产地丹参的有效成分和无机元素含量差异明显,并与遗传特性及土壤因子相关^[10-13]。本

收稿日期:2015-02-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173493)。

作者简介:兰 英,女,重庆人,硕士研究生,主要从事中药资源与开发利用研究。E-mail:m15882139601@163.com。

通信作者:严铸云,教授,博士生导师,主要从事道地药材品质形成与调控研究。E-mail:edtcmyan@126.com。

[4] Cluis C P, Burja A M, Martin V J. Current prospects for the production of coenzyme Q₁₀ in microbes[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(11): 514-521.

[5] Gaby A R. The role of coenzyme Q₁₀ in clinical medicine: part II: cardiovascular disease, hypertension, diabetes mellitus and infertility[J]. Alternative Medicine Review, 1996, 1(3): 168-175.

[6] Ghirlanda G, Oradei A, Manto A, et al. Evidence of plasma CoQ₁₀ - lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study[J]. Journal of Clinical Pharmacology, 1993, 33(3): 226-229.

[7] 贾静雪,薛 毅,吴仲寅. 辅酶 Q₁₀ 在实验性大鼠口腔溃疡愈合中的抗氧化作用[J]. 中华口腔医学杂志, 2013, 48(增刊 1): 64-67.

[8] 钱 雪,王祖巧,韩国平,等. 辅酶 Q₁₀ 的药理与应用[J]. 食品与药品 A, 2006, 8(1): 16-19.

[9] 张继忠,迟莉丽,沈亚领. 辅酶 Q₁₀ 的生产及在医学领域中的应用[J]. 上海应用技术学院学报:自然科学版, 2004, 4(4): 301-305.

[10] 马 菊,石 宁. 食品中应用辅酶 Q₁₀ 的研究进展[J]. 食品科技, 2009, 34(2): 18-21.

[11] 陶志杰,王改玲,李 妍. 辅酶 Q₁₀ 的制备及应用新进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(9): 9-11.

[12] 李聚海,岳田利,袁亚宏. 辅酶 Q₁₀ 超声波破碎法提取工艺条件

研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(5): 207-211.

[13] 朱志春,郑 毅,朱中南,等. 超声波破碎法提取辅酶 Q₁₀ 研究[J]. 海峡科学, 2012(2): 17-19.

[14] 吕春茂,李英华,安艳秋,等. 辅酶 Q₁₀ 几种提取工艺的优化研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 132-135.

[15] 邱卫华,刘 萍,钟桂芳,等. 粟酒裂殖酵母中辅酶 Q₁₀ 的提取和测定方法[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(11): 31-35.

[16] 李祖明,常 平,高丽萍,等. 酶法辅助超声波法提取类球红细菌辅酶 Q₁₀ 条件优化[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(1): 47-52.

[17] 李祖明,李 健,惠伯棣,等. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定类球红细菌红色素[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(8): 76-80.

[18] 张可君,张 媛. 探析反相高效液相色谱法测定注射用辅酶 Q₁₀ 冻干乳的含量[J]. 北方药学, 2014, 11(4): 12-13.

[19] 何小稳,黎 承,鲁燕妮,等. HPLC 辅助滴定法测定含辅酶 Q₁₀ 保健食品中过氧化值[J]. 中国热带医学, 2013, 13(2): 141-143.

[20] 王燕萍,戴晓健,李 亮,等. LC-MS/MS 法测定人血浆中的辅酶 Q₁₀ [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(12): 2251-2257.

[21] 夏书芹,许时婴. 吐温 80 增溶-紫外分光光度法测定辅酶 Q₁₀ 脂质体的载量及包封率[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 131-135.