

薄层扫描法测定微生物发酵转化液中熊果苷含量

陈思名, 梁静娟, 庞宗文, 农磊

(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005)

摘要: 目的: 建立薄层扫描法测定微生物发酵转化液中熊果苷含量的方法。方法: 微生物发酵转化液经过滤浓缩制备, 以乙酸乙酯-乙酸-水 ($V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{乙酸}}:V_{\text{水}}=3.1:1:1$) 为展开剂, 检测波长 570 nm。结果: 熊果苷在 2~6 μg 范围内线性良好, 相关系数 $r=0.9976$ 。结论: 本法快捷、简便、准确, 可用于微生物发酵转化液中熊果苷含量的测定。

关键词: 熊果苷; 发酵转化; 薄层扫描

中图分类号: TQ460.7⁺2; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)05-0076-03

Analysis of Arbutin in Microbe Fermentation Solution by Thin Layer Chromatography

CHEN Si-ming, LIANG Jing-juan, PAND Zong-wen, NONG Lei

(College of Life science and technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Objective: To establish a method for determination of the content of arbutin in microbe conversion solution by Thin-Layer chromatography. Methods: The microbe conversion solution was filtrated and condensed. The developing solvent was a mixture of ethyl acetate, acetic acid and water (3.1:1:1, v/v/v). The detection wavelength was set at 570 nm. Results: The calibration curve was Linear in the range of 2 μg ~6 μg with r value of 0.9976. Conclusions: The method was quick, simple and accurate for the determination of content of arbutin.

Key words: arbutin, microbe conversion, thin layer chromatography

熊果苷(Arbutin), 即 4-羟基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷, 最初是由熊果等植物中分离的一种苷类化合物, 它是氢醌(对苯二酚)的葡萄糖苷。熊果苷具有镇咳、祛痰、抗炎、抗菌等生理活性^[1], 因而被用作镇咳药物和尿道消毒剂等使用。熊果苷除具有多种药理作用外, 还是人黑色素细胞中酪氨酸酶的抑制剂, 可以减少黑色素的生成, 因此熊果苷是一种安全高效的美白剂。熊果苷的主要制备方法有: 天然产物提取法, 植物组织培养法, 化学合成法和酶转化法^[2]。而酶转化法作为一种较新的熊果苷生产技术, 具有原料较简单, 合成效率高, 生产更符合环保要求的优点, 发展前景乐观。酶转化法主要以糖基转移酶或糖苷酶作为催化剂, 加入合成熊果苷所需的底物: 氢醌和糖, 通过转糖基反应或逆水解反应合成熊果苷, 而这些酶的主要来源是微生物。

目前, 用于测定熊果苷含量的方法有: 高效液相色谱法^[3]、毛细管气相色谱法^[4]、红外光谱法^[5], 这些方法需要昂贵的设备, 耗时长, 不适合于高通量筛选

的测定。本文叙述了用薄层扫描法测定微生物发酵转化液中熊果苷含量的方法。通过微生物发酵得到转化所需的酶, 往发酵液中加入酶反应底物(氢醌和糖), 经酶催化得熊果苷, 转化液于硅胶板上展开、显色、扫描测定, 可测定熊果苷的含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: CS-9301PC 型双波长薄层扫描仪; 层析板: 羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G, 用薄层制板器制成厚度为 0.5 mm 的 10 cm \times 20 cm 薄层板, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 活化 0.5 h, 置干燥器中备用。

试剂: 水为双蒸水, 其它试剂均为分析纯, 熊果苷对照品由湖北襄西化学工业有限公司提供。

菌种: 米曲霉, 由本课题组分离保存。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的配制

精密称取熊果苷对照品 1.00 g, 用双蒸水稀释定容至 10 mL, 配制成 10% 的熊果苷储备液, 再分别吸取 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL 和 2.5 mL 的 10% 熊果苷储备液置于 50 mL 容量瓶中, 用双蒸水稀释并

收稿日期: 2007-02-07

作者简介: 陈思名, 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物

通讯作者: 梁静娟, 副教授, 主要研究方向为微生物酶学和微生物药物

定容至 50 mL, 配制成 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 和 0.6% 浓度的熊果苷对照品溶液。

1.2.2 阴性对照溶液的制备

将氢醌与麦芽糖混合溶于醋酸钠缓冲液中得到阴性对照液。

1.2.3 样品溶液的制备

将米曲霉接种于发酵培养基(麸皮 2%, 花生麸 2%, 淀粉 3%) 中, 于 30 °C、160 r/min 振荡培养 3 d。称取氢醌和麦芽糖, 用 pH 5.0 的醋酸钠缓冲液溶解, 再加入米曲霉发酵液, 在 37 °C 下转化 5 d, 得到含熊果苷的发酵转化液。转化液经离心除去菌体, 再用旋转蒸发器将转化液减压浓缩 3 倍, 得到样品溶液。

1.2.4 薄层扫描条件与层析条件

采用双波长锯齿形反射法, 按照薄层色谱法(中国药典 2000 年版一部附录 VI B 薄层扫描法) 进行扫描, $S_x=1$, $\lambda_s=570$ nm 为测定波长, $\lambda_R=700$ nm 为参比波长。测量转化液样品的吸收度积分值与对照品吸收度积分值, 按外标两点法计算即得熊果苷含量。展开剂: 乙酸乙酯-乙酸-水 ($V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{乙酸}}:V_{\text{水}}=3.1:1:1$); 显色剂: 10% 硫酸-甲醇 ($V_{10\% \text{硫酸}}:V_{\text{甲醇}}=1:2$), 105 °C 烘 5 min 显色。

2 结果与分析

2.1 扫描测定波长的确定

吸取 1 μL 对照品溶液、1 μL 样品溶液、1 μL 阴性对照品点于 10×20 cm 的硅胶 G 薄层板上, 展开, 在 400~700 nm 的波长范围内对熊果苷斑点进行光谱扫描以确定最大吸收波长, 结果样品与对照品均在 570 nm 处有最大吸收, 而无阴性干扰。因此选定 570 nm 为检测波长。

2.2 熊果苷的定性分析

取一定量的样品溶液、熊果苷对照品溶液和阴性对照品溶液点于同一薄层板上, 展开, 显色, 结果样品在对照品相同 Rf 值处出现相同斑点, 而阴性对照在相应处无斑点。

2.3 标准曲线的考察试验

用微量进样器精密量取 0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 和 0.6% 浓度的熊果苷对照品溶液各 1 μL , 点样于同一硅胶 G 板上, 按上述方法进行层析并扫描测定, 结果见表 1。以点样量(μg) 为横坐标, 斑点峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线。结果点样量在 2.0~6.0 μg 间呈良好线性关系。回归方程为: $Y=217.58X+400.03$, $r=0.9976$ 。

表 1 熊果苷对照品标准曲线试验数据

Table 1 Data of reference substance's calibration curve

点样体积/ μL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
点样量/ μg	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
斑点面积值	634.39	830.86	1028.50	1267.64	1503.92

2.4 精密度的考察试验

用微量进样器精密量取 0.6% 的熊果苷对照品液 1.0 μL , 点于硅胶 G 薄层板上, 在同一块硅胶 G 薄层板同时重复点 5 个样; 另用微量进样器精密量取 0.4% 的熊果苷对照品液 1.0 μL , 分别点于 5 块硅胶 G 薄层板上, 按上述方法进行层析并扫描测定, 结果见表 2, 结果同板及异板的 RSD 分别为 0.97% 和 2.88%, 表明精密度较好。

表 2 精密度试验结果 (n=5)

Table 2 Test results of precision

	1	2	3	4	5	平均值	RSD%
同板	1457.3	1446.2	1443.1	1476.4	1441.7	1452.9	0.97
异板	948.59	923.43	972.63	914.15	907.83	933.33	2.88

2.5 稳定性的考察试验

用微量进样器精密量取 0.5% 的对照品液 1.0 μL 、发酵转化液 3.0 μL , 点于同一块硅胶 G 薄层板上, 按上述条件展开, 每隔 1 h 扫描测定斑点面积值, 结果表明, 在 5 h 内对照品和发酵转化液斑点面积值基本保持稳定, 对照品的峰面积的相对标准偏差 (RSD)(n=5) 为 1.24%, 试验样品的 RSD(n=5) 为 2.09%, 表明方法的稳定性较好, 测定结果见表 3。

表 3 薄层扫描测定时间稳定性考察

Table 3 Test results of stabilization

时间(h)	0	1	2	3
对照品	1269.97	1243.63	1280.16	1279.23
试验样品	920.18	939.78	900.27	925.71
时间(h)	4	5	X	RSD%
对照品	1258.98	1248.00	1263.33	1.24
试验样品	909.75	953.03	924.79	2.09

2.6 发酵转化液样品重现性的考察试验

用微量进样器精密量取不同体积的同一批发酵转化液 5 份, 浓度为 0.2% 和 0.6% 的熊果苷对照品溶液各 1 μL , 分别点于同一块硅胶 G 薄层板上, 按上述条件展开, 扫描测定, 按外标二点法计算熊果苷含量, 其含量的相对标准偏差 (RSD)(n=5) 为 2.51%, 表明方法的重现性较好。结果见表 4。

表 4 发酵转化液样品重现性试验结果 (n=5)

编号	发酵转化液量(μL)	测得熊果苷量(μg)	熊果苷含量($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	2.0	2.0517	1.0251
2	2.5	2.6640	1.0656
3	3.0	3.2681	1.0894
4	3.6	3.9153	1.0876
5	4.5	4.8721	1.0827
X($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			1.0701
RSD(%)			2.51

2.7 加样回收率试验考察

用微量进样器精密量取已测知含量的同一批发酵转化液样品(平均含量为 $1.007 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 5 份,用微量进样器各精密加入 $1.0 \mu\text{L}$ $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的熊果苷对照品溶液,混匀作为供试品溶液,分别按上述方法点样、展开、显色、扫描测定,回收率结果见表 5。

表 5 加样回收率试验结果 (n=5)

取样量/ μL	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2	2.014	2	3.8073	94.85		
2.5	2.518	2	4.2656	94.42		
3	3.021	2	4.7257	94.12	94.35	2.35
3.5	3.523	2	5.373	97.28		
4	4.028	2	5.4905	91.08		

2.8 样品测定的考察

按方法中的测定方法,对 10 批发酵转化液进行含量测定。用微量进样器精密量取发酵转化液样品 $2.0 \mu\text{L}$,浓度为 0.2%和 0.6%的熊果苷对照品溶液各 $1 \mu\text{L}$,按上述方法点样,展开,显色,扫描测定,以外标二点法计算发酵转化液中熊果苷的含量,结果见表 6。

表 6 样品测定结果 (n=2)

编号	样品量/ μL	熊果苷($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)		平均值 X/ $(\mu\text{g}/\mu\text{L})$	RSD/%
		1	2		
1	2	1.3289	1.2833	1.3061	2.47
2	2	1.0656	1.1292	1.0974	4.10
3	2	1.1834	1.2252	1.2043	1.74
4	2	1.8009	1.8227	1.8118	0.85
5	2	2.7397	2.7473	2.7435	0.20
6	2	1.1998	1.1306	1.1652	4.20
7	2	2.2548	2.3328	2.2938	2.40
8	2	1.0603	1.0583	1.0593	0.13
9	2	1.2375	1.2285	1.2330	0.52
10	2	2.6654	2.6726	2.6620	0.28

3 结论

从实验知本方法的线性范围、精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验均良好,它们的平均相对偏差均 $<3.0\%$,能满足发酵转化液中熊果苷含量测定的要求,为进一步研究发酵条件及转化条件对熊果苷产量的影响等方面的研究提供了科学快速的测定方法。

参考文献

- [1] 王亚芳,周宇辉,张建军.熊果苷镇咳、祛痰及平喘的药效学研究[J].中草药,2003,34(8):739
- [2] 周烽,卢定强,韦萍.熊果苷的制备方法研究[J].精细与专用化学品,2005,13(1):11
- [3] 黄少嫦,黄百芬,陈青俊等.应用高效液相色谱法测定化妆品中熊果苷的含量[J].香料香精化妆品,2002,(1):13
- [4] 周桦,吴晓芳,张晓炜等.毛细管气相色谱法测定化妆品中熊果苷[J].中国公共卫生,2002,18(5):584
- [5] 艾克蕙,梁今明,曾春莲等.红外光谱法测定祛斑膏霜中熊果苷的含量和稳定性[J].日用化学工业,1999年(2):45