

文章编号 :1009-038X(2002)02-0179-04

薄层扫描法检测生物转化液中麻黄碱的含量

张 梁 , 石贵阳 , 董世建

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要 :在生物转化法生产麻黄碱研究过程中,建立了一种检测转化液中麻黄碱含量的方法——薄板层析双波长扫描法.该方法以硅胶 GF₂₅₄为吸附剂,以甲醇-浓氨水混合液(V(甲醇):V(浓氨水)=98:2)为展开剂,0.2%茚三酮丙酮溶液为显色剂,扫描波长 $\lambda_S=510\text{ nm}$, $\lambda_R=700\text{ nm}$.并运用该法考察了4株初筛菌株的转化能力.

关键词 :生物转化;麻黄碱;薄层扫描

中图分类号:Q 546

文献标识码:A

Determination of Ephedrine in Biotransformatic Mixture by TLC Scanning

ZHANG Liang , SHI Gui-yang , DONG Shi-jian

(The Key Laboratory of Industry Biotechnology ,Ministry of Education ,Southern Yangtze University ,Wuxi 214036 ,China)

Abstract :A method(dual-wave length TLC-scanning method)was established to determine ephedrine in biotransformatic mixture during the study on the production of ephedrine by biotransformation. Ephedrine was determined on silica gel GF₂₅₄ plate with methanol-ammonia water(98:2)as developing solvent. Color developing reagent was 0.2% ninhydrin (acetone solution) , and wave lengthes for scanning were $\lambda_S=510\text{ nm}$, $\lambda_R=700\text{ nm}$. The biotransformatic ability of four preliminary screened strains was detected with this method.

Key words :biotransformation ;ephedrine ;TLC scanning

麻黄碱属于芳香族氨基醇衍生物,为肾上腺素受体激动药,具有松弛平滑肌、收缩血管及中枢兴奋等作用.主要用于支气管哮喘、过敏性反应、鼻粘膜肿胀以及低血压等病的治疗^[1].从麻黄中提取麻黄碱是我国生产麻黄碱的主要途径.此外,也有报道用顶酵母发酵法生产^[2].国外常先用生物方法将苯甲醛转化为麻黄碱的前体苯基乙酰基甲醇(PAC),然后再用化学合成的方法生产麻黄碱^[3,4,5].在麻黄碱生产中,提取法需消耗大量的麻黄而对生态环境不利,化学合成法往往不能得到单一旋光体.生物转化法因转化率高,产物单一的特

点近年来较多地用于手性合成方面,利用生物转化法生产麻黄碱能较好地解决以上问题.在研究生物转化法生产麻黄素过程中,产物含量的检测是一个重要的环节.麻黄碱的测定方法很多,如非水法^[6]、银量法^[6]、中和法^[7]、比色法^[8]、薄层扫描法^[9,10]、高效液相色谱法等^[11~14].其中,非水法、银量法、容量法等主要为药典方法,处理过程繁琐,使用较少;比色法与滴定法由于转化液中成分复杂,对结果影响较大;高效液相色谱法对样品的分离精制要求高,且成本相对较高;薄层扫描法由于操作简单、样品用量少,现广泛应用于中药特定组分的定性和定

收稿日期 2001-12-06; 修订日期 2002-02-18.

基金项目:教育部青年骨干教师重点基金项目(教技司[2000]143)资助课题.

作者简介:张梁(1978-),男,江苏无锡人,发酵工程硕士研究生.

量分析. 作者根据实际情况, 在研究前期采用薄层扫描法检测转化液中产物的含量, 取得了较好的效果.

1 实验材料

1.1 菌种

Morganella morganii J-1 J-3 J-8 J-9, 作者所在实验室保存.

1.2 发酵培养基

葡萄糖 3.0% , 酵母膏 0.5% , 蛋白胨 2.5% , K_2HPO_4 0.3% , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% , NaCl 0.2% , 酵母营养盐 0.002% . 去离子水配制, NaOH 溶液调 pH 值为 7.0 , 0.1 MPa 灭菌 20 min.

1.3 转化前体

1-苯基-2-甲氨基丙酮(1-phenyl-2-methylamino-propanone, 简称 MAK), 作者所在实验室合成.

1.4 转化基质

0.5% MAK , 0.6 mg/mL NAD^+ , 0.2 mg/mL 葡萄糖脱氢酶, 5% 葡萄糖, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0).

1.5 仪器与试剂

岛津 CS-9301 型薄板扫描仪, 20 μ L 移液枪, 北京金花仪器厂产品; 60 型薄层层析硅胶 GF₂₅₄, 青岛海洋化工集团产品; 盐酸麻黄碱化学对照品, 中国药品生物制品检定所提供; 其它试剂均为分析纯.

2 实验方法

2.1 溶液配制

2.1.1 转化液制备 斜面菌种接入发酵培养基, 30 $^{\circ}C$ 150 r/min 培养活化 24 h, 再按 10% 接种量转接, 同样条件下培养 48 h. 培养结束后培养液 3 000 r/min 离心 30 min, 收集湿菌泥冷冻干燥制得冻干粉. 取菌体冻干粉 20 mg, 加 1 mL 转化基质, 150 r/min, 30 $^{\circ}C$ 反应 48 h, 反应后 7 000 r/min 离心 15 min 取上清液.

2.1.2 标准溶液配制 按计算量准确称取盐酸麻黄碱对照品, 溶于去离子水, 准确定容后备用.

2.2 测定条件

2.2.1 薄层条件 薄层板为薄层层析硅胶 GF₂₅₄ (60 型) 与 0.5% 的 CMC-Na 溶液按质量比为 1:3, 湿法铺板, 自然晾干, 100 $^{\circ}C$ 活化 30 min, 置干燥器备用. 展开剂为甲醇-浓氨水, 显色剂为 0.2% 的茚三酮丙酮溶液, 100 $^{\circ}C$ 显色.

2.2.2 扫描条件 采用双波长锯齿形扫描, 扫描

波长 $\lambda_S = 510$ nm $\lambda_R = 700$ nm, 狭缝尺寸为 0.4 mm $\times$ 0.4 mm, 灵敏度中等, 线性 SX=3.

2.2.3 展开剂配比确定 将盐酸麻黄碱对照品标准溶液 (0.5 mg/mL) 点 6 个点于薄板上, 每点 10 μ L. 晾干后用毛细管吸不同配比的展开液点于样点的中心, 展开剂 (甲醇: 浓氨水) 的体积比依次为 100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5. 借助毛细管的作用, 展开剂从圆心向外扩散, 样品也随着向外扩散, 直到展开剂展开的圆直径约 25 mm. 晾干后用显色剂显色, 结果见图 1.

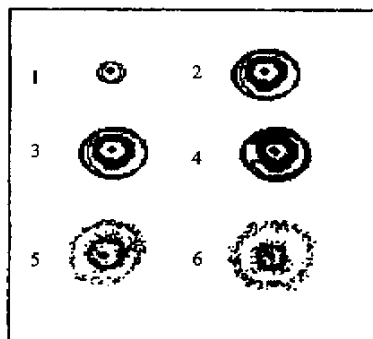


图 1 展开剂比对展开结果的影响

Fig. 1 The effects of different developing solvents on developing results

由图可见纯甲醇作展开剂展开后的色圈轮廓较小, 分离效果不理想. 甲醇与浓氨水体积比为 99:1, 98:2, 97:3 的展开剂展开后的轮廓基本相同, 甲醇与浓氨水体积比为 96:4 和 95:5 的展开剂展开后的轮廓较模糊. 说明氨水可以加大样品的扩散距离, 增加样品的分离效果, 但过大会使显色后的斑点不集中. 但借助点滴实验法无法准确得出展开剂的最佳配比. 将盐酸麻黄碱对照品标准溶液 (0.5 mg/mL) 点于薄板上, 分别用甲醇与浓氨水体积比为 99:1, 98:2, 97:3 的展开剂展开后, 晾干显色. 结果表明甲醇与浓氨水体积比为 98:2 的效果更好. 因此, 选择该展开剂作后续研究.

2.2.4 显色时间的确定 将 1 mg/mL 的盐酸麻黄碱对照品标准溶液各点 3 个点 (分别记为 1、2、3) 于 3 块层析板上, 每点 2 μ L, 展开, 分别在 100 $^{\circ}C$ 下显色 10, 15, 20 min. 显色后放置 10 min 后扫描, 记录峰面积 (结果见表 1). 可见显色时间过短, 显色不完全, 峰面积较小, 不利于定量. 15 min 和 20 min 的峰面积相近, 但观察到 20 min 的显色时间会使背景颜色较深, 因此确定显色时间为 15 min.

2.3 定性鉴别

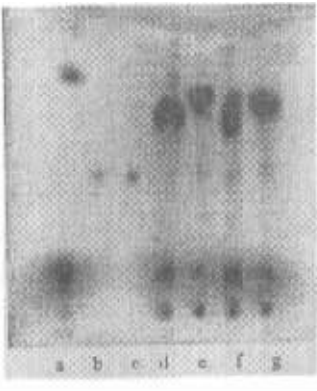
取 0.5 mg/mL 的对照品标准溶液 1 μ L 和 3 μ L 0.1% 的 MAK 溶液 5 μ L 及 4 株菌株的转化液各 10

μL ,点于同一薄层板上 ,置于已加入展开剂的层析缸中预饱和 15 min 后再展开 .展开后晾干 ,喷洒 0.2% 的茚三酮丙酮溶液 ,100 $^{\circ}\text{C}$ 显色 ,可观察到 J-3 , J-8 和 J-9 3 株菌株的转化液与对照品在相应位置上显相同斑点 (图 2) .

表 1 显色时间对相对峰面积的影响

Tab.1 The effect of color developing time on relative peak areas

t/min	1	2	3	平均
10	3136.068	3232.143	3148.280	3172.164
15	6852.975	6724.301	6789.575	6788.950
20	7299.475	7293.567	7310.505	7301.182



a. MAK b. 1 μL 对照品溶液 c. 3 μL 对照品溶液 d. J-1 e. J-9 f. J-8 g. J-3

图 2 薄板层析结果

Fig.2 Result of TLC

2.4 定量测定

2.4.1 标准曲线绘制 在同一块硅胶薄层板上分别点 0.5 mg/mL 的盐酸麻黄碱标准溶液 1、2、3、4、5 μL ,展开 ,显色 ,扫描测定峰面积积分值 .以峰面积积分值 Y 对点样量 $X(\mu\text{g})$ 作图 ,得标准曲线 (图 3) .求得回归方程为 :

$Y = 976.85X + 1382, R^2 = 0.9944$

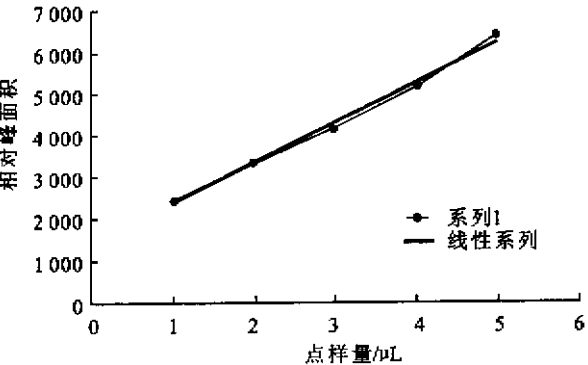


图 3 标准曲线

图 3 Standard curve

2.4.2 精密度试验 将盐酸麻黄碱对照品标准溶液 (1 mg/mL) 在同一薄板上点 5 个点 ,点样量均为 3 μL ,展开 ,显色 ,扫描 ,测定各点积分面积 ,求得板内的变异系数 $RSD = 1.0\%$,精密度较好 .

2.4.3 稳定性试验 将盐酸麻黄碱对照品标准溶液 (0.5 mg/mL) 2 μL 点于板上 ,展开 ,显色后立即扫描 ;然后每隔一定时间扫描一次 ,以峰面积为纵坐标 ,以时间为横坐标 ,得到褪色曲线 (图 4) ,由图 4 可以看出 ,显色后的斑点在 10 min 内会很快褪色 ,以后至少在 3 h 内稳定 .

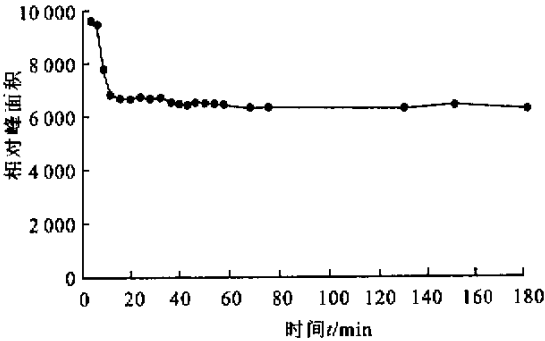


图 4 褪色曲线

Fig.4 Fading curve

2.4.4 回收率试验 将 NAD^+ 、葡萄糖脱氢酶灭活 ,再将菌株 J-8 按 2.1.1 所示步骤制备转化液 ,所得反应液成分与酶未灭活时的转化液相似 ,但不产生麻黄碱 .加入盐酸麻黄碱对照品 ,制成模拟转化液 (0.5 mg/mL) .将 0.5 mg/mL 的盐酸麻黄碱对照品标准溶液 1 μL 、3 μL 模拟转化液 2 μL ($n = 5$) 点于同一块层析板上 ,展开 ,显色 ,扫描 ,按外标两点法求得回收量 ,结果见表 2 .

表 2 回收率测定结果

Tab.2 Analysis of recovery

试品	加入量/ μg	相对峰面积	回收量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
标样 1	0.5	1774.70				
标样 2	1.5	5319.01				
样品 1	1.0	3465.72	0.977	97.7	98.9	2.2
样品 2	1.0	3476.83	0.980	98.0		
样品 3	1.0	3485.00	0.983	98.3		
样品 4	1.0	3642.21	1.027	102.7		
样品 5	1.0	3466.76	0.977	97.7		

2.4.5 转化液中麻黄碱定量检测 在同一块板上分别点上 J-3、J-8、J-9 3 株菌株的转化液 10 μL ,麻黄碱对照品标准溶液 (0.5 mg/mL) 1 μL 和 3 μL ,展开 ,显色 ,扫描测定峰面积 .结果为 :对照品标准

液1 μL 、3 μL 和转化液 J-3 J-8 J-9 扫描后的相对峰面积分别为 1793.71 ,5204.34 ,2269.38 ,2587.51 ,1576.08.

根据扫描结果对照标准曲线采用外标两点法计算得到 J-3 J-8 J-9 转化液中麻黄碱的质量浓度分别为 63.95 ,73.17 ,43.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3 结果与讨论

1)薄层的硅胶吸附剂不仅可以吸附环境中的水分,也能吸附其中的一些杂质,在展开时会影响样品分离,展开后的溶剂前沿常出现明显的污物带,最终在扫描定量时影响测定的灵敏度及线性范围,因此通常需将层析板进行预处理.方法是用甲醇先进行一次空白展开,展距要较长于样品展开时

的展距.
2)点样点直径控制在 5 mm 以内,避免多次点样,否则会降低分辨率和分离度.
3)层析缸中加入展开剂后,在展开前将层析板置层析缸中并垫高,使层析缸和层析板被展开剂饱和和数分钟后再展开,效果更好.
4)定量测定麻黄碱含量时,用茚三酮显色后应过 10 min 再扫描,一般能得到较满意的结果.
5)该法操作简便,精密度较好,根据扫描结果计算可得菌株 J-8 产量最高,与高效液相法结果一致.但是由于层析板系自制,板与板间的差别较大,因此该法适合于生物转化法生产麻黄碱的初期研究中菌株筛选时产量和酶活的相对评估,后续研究需要更精确的测定方法来提供保证.

参考文献：

[1] 卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典 1990 年版二部药典注释[M]. 北京 : 人民卫生出版社 ,1990.
[2] 彭司勋主编. 药物化学[M]. 北京 : 中国医药科技出版社 ,1999.
[3] TRIPATHI , CHANDRAKANT M A , SURESH C B. Production of L-phenylacetylcarbinol by fermentation[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 1997 ,84(6) :487 - 492.
[4] SHIN , HYOUN S R , PETER L. Production of L-phenylacetylcarbinol(L-PAC) from benzaldehyde using partially purified pyruvate decarboxylase(PDC) [J]. **Biotechnology and Bioengineering** ,1996 ,49(1) :52 - 62.
[5] 堀津浩章 ,大坪 也. L-エフェドリン中间体の制造法[P]. JP 9-234090. 1998 - 01 - 01.
[6] 卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典二部[M]. 北京 : 人民卫生出版社 ,1990.
[7] 卫生部药政局编. 中国医院制剂规范[M]. 北京 : 中国医药科技出版社 ,1995.
[8] 沈克温 ,王绪明. 实用药物分离鉴定手册[M]. 北京 : 人民军医出版社 ,1986. 500.
[9] 王艳 ,金斌. 咳舒颗粒质量标准研究[J]. 安徽中医学院学报 ,1999 ,18(2) :44 - 45.
[10] 吴新荣 ,苏如雄. 薄层扫描法测定盐酸麻黄碱合剂中盐酸麻黄碱含量[J]. 中国医院药学杂志 ,1998 ,18(1) :22.
[11] 那硕俐. 高效液相色谱法测定扑热麻黄胶囊中盐酸伪麻黄碱含量[J]. 中国医院药学杂志 ,2000 ,20(7) :433 - 434.
[12] SHAO G ,WU F. Quantitative Analysis of (l)-Ephedrine and (d)-Pseudoephedrine in Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection[J]. **Acta Pharmaceutica Sinica** ,1995 ,30(5) :384 - 389.
[13] 李光秀 ,郑荣庆. 麻黄及麻黄碱制剂中化学成分测定方法进展[J]. 中草药 ,1992 ,23(6) :322 - 324.
[14] 李延峰 ,王蕾. 麻黄及其复方制剂中麻黄碱含量测定方法进展[J]. 时珍国医国药 ,1999 ,10(4) :299 - 230.

(责任编辑 朱 明)

撤 地