

# 微生物发酵制备莽草酸的含量测定

沈国鹏<sup>1</sup>, 李莉<sup>1</sup>, 班春兰<sup>1</sup>, 吴鸣建<sup>1,2</sup>, 黄强<sup>1</sup>

(1. 郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省化学学会, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 由于微生物发酵法合成莽草酸的研究尚处于实验室研究阶段, 建立了微生物发酵制备莽草酸含量的测定方法。采用紫外可见分光光度法对莽草酸产生菌发酵液中莽草酸进行测定。检测波长 245 nm, 莽草酸标准溶液线性方程为:  $A=3.0844C-0.0048$ ,  $R^2=0.9999$ 。平均回收率为 100.04%, RSD 为 0.32%。方法简便、快速、准确, 且稳定性好, 适用于测定微生物发酵生产莽草酸的含量。

**关键词:** 微生物发酵; 莽草酸; 紫外-可见分光光度法

中图分类号: O 657.32 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)10—1111—04

## Determination of Shikimic Acid in the Production of Microbial Fermentation

SHEN Guo-peng<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, BAN Chun-lan<sup>1</sup>, WU Ming-jian<sup>1,2</sup>, HUANG Qiang<sup>1</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China; 2. Chemical Society of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The method for determination of shikimic acid in the production of microbial fermentation was established. Using ultraviolet-visible spectrophotometry for determination of shikimic acid in the fermented liquid of shikimic acid producing bacteria. The detection wavelength was 245 nm, Linear equation of shikimic acid standard solution was  $A=3.0844C-0.0048$  ( $R^2=0.9999$ ). The recovery was 96.7%~103.7% with average recovery of 100.04%, RSD was 0.32%. The method is simple, fast, stable and accurate, and suitable to determine the shikimic acid in the production of microbial fermentation.

**Keywords:** microbial fermentation, shikimic acid, ultraviolet-visible spectrophotometry

人禽流行性感胃一直严重危害着人类的健康, 仅在美国每年因流感住院的患者达 15 万人<sup>[1]</sup>。截止 2013 年 4 月 21 日, 中国全国人感染 H7N9 禽流感确诊病例达 104 例, 其中死亡 21 人<sup>[2]</sup>。莽草酸(结构见图 1)是化学合成中重要的化工原料, 具有抗炎镇

痛和抑制血栓形成的作用, 其本身及其衍生物在抗癌和抗病毒方面也有一定的作用<sup>[3-4]</sup>, 可作为一些化学合成制剂和药物中间体, 尤其是抗禽流感疫苗达菲的重要合成原料, 在食品和化学工业中有着广泛的应用<sup>[5-8]</sup>。莽草酸存在于木兰科常绿灌木莽草的干

收稿日期: 2013-05-14

作者简介: 沈国鹏(1962—), 男, 河南郑州人, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事精细化工、有机合成等研究。

E-mail: guopen@zzu.edu.cn

燥果实八角中,除此之外,莽草酸还广泛存在于微生物中。因此可以通过微生物发酵提取莽草酸<sup>[9-10]</sup>,到目前为止,国外有两项通过大肠杆菌、枯草杆菌生产莽草酸的专利<sup>[11-12]</sup>。目前唯一可对流感治疗有效的药物达菲产量受限,全球供应吃紧,其主要原因之一是因为生产达菲的原料莽草酸的短缺。

八角茴香中莽草酸含量的测定通常采用高效液相色谱法<sup>[13]</sup>,用该法测定八角提取物中莽草酸含量时,需要使用大量的有机试剂,会给环境带来污染以及对操作人员造成伤害。到目前为止,国际上利用微生物发酵法合成莽草酸的研究尚处于实验室研究阶段,孙晓宇等<sup>[14]</sup>利用羟基苯甲醛比色法测定了莽草酸的含量。作者利用了紫外-可见分光光度法测定了发酵液中莽草酸的含量,为生物发酵生产莽草酸的研究提供了便捷可靠的分析方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

莽草酸标准品;实验用水为去离子水;莽草酸产生菌菌种 自选;发酵培养基:自制。

TG-16 型高速离心机:巩义市予华仪器有限责任公司产品;WS70-1 型红外快速干燥箱:巩义市英峪予华仪器厂产品;FA2004 型电子分析天平:上海恒平科学仪器有限公司产品;WFZ UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计:尤尼柯上海仪器有限公司产品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 样品前处理** 取 50 mL 莽草酸产生菌发酵液用离心机以 12 000 r/min 转速离心 20 min,收集上清液,于 245 nm 测定吸光度。

**1.2.2 对照品与供试品溶液的配制** 对照品溶液准确称取红外烘干至恒重的莽草酸标准品 0.503 8 g,溶于蒸馏水中,然后定容至 100 mL,再从中取 12 mL 定容至 50 mL 容量瓶中。配制浓度为 0.012 1 mg/mL。

**供试品溶液** 取发酵液,经多次分析其莽草酸含量,取其平均质量浓度为 0.097 2 mg/mL。

**1.2.3 校准曲线的绘制** 准确称取对照品溶液 1、2、4、5、6、7、8、9、10 mL 分别置于 50 mL 容量瓶中,加蒸馏水稀释至定容刻度,摇匀。质量浓度为 0.024 2、0.048 4、0.096 7、0.120 9、0.145 1、0.169 3、0.193 5、0.241 8 mg/mL。用分光光度计在 245 nm 测样品的吸光度,绘制莽草酸标准曲线,列出线性回归方程。

## 2 结果与分析

### 2.1 校准曲线方程

根据测定结果选  $x$  轴为莽草酸浓度, $y$  轴为吸光度作图计算,回归线性方程为  $y=3.0844x-0.0048$ 。相关系数: $R^2=0.9999$  ( $n=8$ )。检出限(按  $S/N=3$  计)为 0.002 5 mg/mL,其线性范围为 0~0.3 mg/mL。表明在 245 nm 波长下,吸光度与莽草酸浓度有着显著的线性关系,可据此方程测定莽草酸(见图 1)。

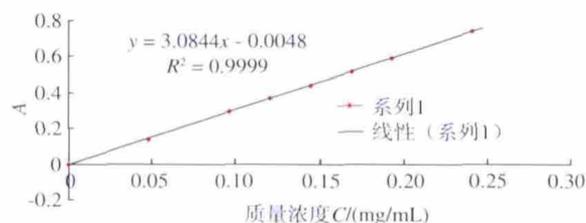


图 1 莽草酸的线性回归图

Fig. 1 Linear regression graph of shikimic acid

### 2.2 方法考察

**2.2.1 精密度及准确度实验** 准确移取供试品溶液进行精密度测定,测得值为 0.097 2、0.097 5、0.097 9、0.097 2、0.097 2、0.096 9、0.097 2 mg/mL。相对标准偏差 RSD 为 0.32% ( $n=7$ ),表明具有较高精密度,相对误差为 0.10%,表明具有较高的准确度。

**2.2.2 稳定性实验** 取发酵处理液,室温下放置 0、4、8、12、24、48 h 后进行测定,测得值为 0.104 0、0.103 7、0.103 4、0.102 7、0.102 1、0.101 1 mg/mL。相对标准偏差 RSD 为 1.06%,表明供试溶液室温放置 48 h 内稳定。

**2.2.3 加标回收率实验** 加标回收率是分析人员在样品测定时主要的质量控制方法。其大小不仅反映分析人员的操作技术水平,也反映出分析方法是否适用,以便及时的发现分析问题,确保数据的准确性和可靠性<sup>[15]</sup>。

其计算公式为:

$$\text{回收率} = \frac{(\text{加标试样测定值} - \text{试样测定值})}{\text{加标量}} \times 100\%$$

由此准确称取对照品 0.055 9、0.054 0、0.056 0、0.051 1、0.052 8、0.051 9、0.056 7 g 于烧杯中,用去离子水溶解并转入 50 mL 容量瓶中,分别加入经分析测定质量浓度为 0.128 2 mg/mL 的样品,用去离子水定容在 245 nm 波长处进行分析,测定结果

见表 1。

表 1 加标回收率

Table 1 Adding standard recovery

样品质量浓度/ (mg/mL)	加标试样测定 浓度/(mg/mL)	试样测定浓度/ (mg/mL)	回收率/ %
0.1282	0.0539	0.1801	96.7
0.1282	0.0515	0.1782	97.1
0.1282	0.0534	0.1821	100.9
0.1282	0.0482	0.1766	100.4
0.1282	0.0511	0.1795	100.4
0.1282	0.0482	0.1782	103.7
0.1282	0.0567	0.1853	101.1

测得回收率在 96.7%~103.7 %之间,平均回收率为 100.04%。说明该方法准确性较好,基本可以保证测量结果的可靠性。

### 2.3 发酵液中莽草酸的质量浓度的检测

按照上述检测方法测定一系列发酵液中莽草酸的质量浓度(4种产生菌发酵液),结果见表 2。

紫外-可见分光光度方法的最低检出限为

0.002 5 mg/mL,表 2 数据与标准样配置样分析结果基本一致,表明可以满足检测要求。

表 2 不同菌体发酵液中莽草酸的质量浓度

Table 2 Shikimic acid concent of different bacteria fermented liquid

菌种编号	吸光值	质量浓度/(mg/mL)
1	0.599	0.195 8
2	0.331	0.108 8
3	0.532	0.174 0
4	0.419	0.137 4

## 3 结 语

利用紫外-可见分光光度计对微生物发酵生产莽草酸含量的测定,莽草酸的线性方程为  $A=3.0844C-0.0048$ ,相关系数  $R^2=0.9999$ 。方法的精密度为 0.32%,准确度为 0.10%,测得加标回收率在 96.7%~103.7%之间,平均回收率为 100.04%,供试溶液室温放置 48 h 内稳定性良好,方法简便快捷,适于微生物发酵生产莽草酸含量的快速测定。

## 参考文献:

- [1] 向莉,李盾. 达菲的主要合成中间体莽草酸的获得的新进展[J]. 中国医药导报,2006,3(6):51-52.  
XIANG Li,LI Dun. New progress in the obtained of shikimic acid of Tamiflu main synthetic intermediate[J]. *Medicine Industry Information*,2006,3(6):51-52.(in Chinese)
- [2] 姚培硕. 全国报告 104 例 H7N9 禽流感病例 21 人死 13 人康复 [EB/OL]. 中国新闻网,[2013-04-22]. <http://news.qq.com/a/20130422/001494.htm>
- [3] 王祖磊,朱祥瑞. 八角茴香及其提取物莽草酸的应用进展[J]. 科技通报,2010,26(4):531-535.  
WANG Zu-lei,ZHU Xiang-ru. The progress in research on the use of Illicium werum hook.f. and its extract shikimic acid[J]. *Bulletin of Science and Technology*,2010,26(4):531-535.(in Chinese)
- [4] 顾小文,朱开梅. 莽草酸及其衍生物医学作用的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(6):1099-1101.  
GU Xiao-wen,ZHU Kai-mei. Research progress in the medical function of shilimic acid and its derivatives[J]. *Medical Recapitulate*,2013,19(6):1099-1101.(in Chinese)
- [5] Kramer Marco,Bongaerts Johannes,Bovenberg Roel,et al. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid[J]. *Metabolic Engineering*,2003,5(4):277-283.
- [6] Nobuhiro S,Takahiro A,Satoshi Y,et al. A practical synthesis of (-)-oseltamivir[J]. *Tetrahedron*,2009,65(16):3239-3245.
- [7] Federspiel M,Fischer R,Hennig M,et al. Industrial synthesis of the key precursor in the synthesis of the ant-influenza drug oseltamivir phosphate (Ro 64-0796/002.GS-4104-02): ethyl (3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate[J]. *Org Process Res Dev*,1999,3:266-274.
- [8] Becker M W,Chapman H H,Kelly D E,et al. Manufacture of cyclohexenecarboxylate esters and intermediates[P]. WO:9955664,1999-11-14.
- [9] 张军民,傅思武,石晓峰. 微生物代谢合成法在莽草酸及其衍生物中的应用[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(1):91-93.  
ZHANG Jun-min,FU Si-wu,SHI Xiao-feng. The application of microbial metabolic synthesis in shikimic acid and its derivatives[J]. *Chinese Journal of Microecology*,2013,25(1):91-93.

- [10] Saptarshi G, Yusuf C, Uttam C, et al. Production of shikimic acid[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30: 1425-1431.
- [11] Yurgis A V I, Elena G A, Boris M P, et al. Method for producing shikimic acid[P]. US Patent 6436664.2002-8-20.
- [12] Shiral M, Miyata R, Sasaki S, et al. Microorganism belonging to the genus citrobacter and process for producing shikimic acid[P]. EP 1092766A1, 2001-04-18.
- [13] 王晓强, 郭亚建, 杨春树. 高效液相法测定八角属部分植物果实中莽草酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(7): 447.  
WANG Xiao-qiang, GUO Ya-jian, YANG Chun-shu. Determination of shikimic acid in fruit of illiciaceae plants by HPLC with Diode-Array Detection[J]. *China Journal of Chinese Materta Medica*, 2001, 26(7): 447. (in Chinese)
- [14] 孙晓宇, 韩丽萍, 沈卫荣, 等. 莽草酸产生菌的筛选及发酵条件初步优化[J]. 陕西农业科学, 2010, 56(5): 33-35.  
SUN Xiao-yu, HAN Li-ping, SHEN Wei-rong, et al. Shikimic acid producing bacteria screening and preliminary optimization of fermentation conditions[J]. *Shanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 56(5): 33-35. (in Chinese)
- [15] 张虹. 加标回收率的测定和结果判定[J]. 石油与天然气化工, 2000, 29(1): 50-52.  
ZHANG Hong. Determination of standard addition recovery and the judgment of results[J]. *Chemical Engineering of oil & Gas*, 2000, 29(1): 50-52. (in Chinese)

## 科 技 信 息

### 新西兰公布 2013-2014 年沙门氏菌、李斯特菌、弯曲杆菌风险管理策略

据新西兰初级产业部消息, 8 月 13 日新西兰初级产业部(MPI)公布 2013-2014 年沙门氏菌、李斯特菌、弯曲杆菌风险管理策略, 策略提出 MPI 2013-2014 年食源性疾病总体目标为: 对重点致病菌实行有效的风险管理措施, 持续降低食源性致病菌致病率。

新西兰初级产业部 2013-2014 年沙门氏菌、李斯特菌、弯曲杆菌风险管理框架包括初步风险管理活动、制定风险管理措施、实施风险管理措施、监控及审查四个部分, 这包括:

1) 初步风险管理活动: MPI 对非伤寒沙门氏菌的六项主要风险来源(鸡蛋、禽肉、猪肉、谷物、芝麻花生可可加工的高脂食品、动物饲料)描述工作已经完成, 目前侧重于收集沙门氏菌数据, 确定沙门氏菌血清型及人类食源性疾病关系。MPI 对禽肉、牛肉、羊肉及内脏类食品中弯曲杆菌风险描述工作已经完成, 现阶段正在进行数据来源的审查及科学性评价工作。

2) 风险管理措施的制定: MPI 在风险管理过程中列举各种潜在风险管理方案, 依照标准选择可用性方案。在风险决策过程中鼓励利益相关方参与, 同时对最终决策给出充分依据。

3) 风险管理措施的实施: MPI 将在食品供应链中实施选定的风险管理措施, 并验证控制措施实施情况。

4) 监控及审查: MPI 将持续监控食品供应链中致病菌含量, 评估其中风险。结合审计报告及健康监测数据审查监管活动的有效性, 依据审查结果改进风险管理措施。

同时 MPI 将就风险管理过程与利益相关方进行连续性的风险交流, 并加强与国际相关机构的交流合作。

[信息来源] 食品伙伴网. 新西兰公布 2013-2014 年沙门氏菌、李斯特菌、弯曲杆菌风险管理策略 [EB/OL]. (2013-9-17). <http://news.foodmate.net/2013/09/243672.html>.

### 欧盟修订添加植物甾醇食品与配料的标签规定

7 月 26 日, 《欧盟官方公报》发布(EU)718/2013 号委员会条例, 修订关于添加植物甾醇、植物甾醇酯、植物甾醇烷醇、植物甾醇烷醇酯类的食品与食品配料标签规定的(EC)608/2004 号条例。该条例于发布之日起第 20 天起生效。

修订内容是将(EC)608/2004 号条例第 2 条第 3 点替换为“3. 标签应声明: 产品不适用于无需控制血胆固醇人士。” 2014 年 2 月 15 日之前上市的, 不符合本条例规定的添加有植物甾醇、植物甾醇配料, 则可继续销售直至库存清空。

[信息来源] WTO 检验检疫信息网. 欧盟修订添加植物甾醇食品与配料的标签规定 [EB/OL]. [2013-09-11]. <http://www.wtoicq.gov.cn/wto1/show.jsp?cid=261&aid=42477>.