

文章编号:1673-1689(2009)06-0858-04

土壤杆菌中辅酶 Q₁₀ 的提取工艺

田宝静, 李剑, 聂立影, 曹小丹, 李小强

(天津士力集团生物药品研究所, 天津 300402)

摘要: 研究了溶剂种类、浓度, 提取溶剂比例、提取次数、时间、温度, 萃取次数与温度, 以及柱纯化和重结晶等条件对提取农杆菌中辅酶 Q₁₀ 的影响; 进行了最佳工艺优化, 确立了生产工艺, 并进行了中试验证。结果表明, 最佳工艺条件为: 用 5 倍的体积分数 95% 的乙醇在 50 °C 浸提 2 遍, 每遍 1 h, 获得提取液; 提取液浓缩后经过提取液-甲醇-石油醚(三者体积比为 1:2:3) 的萃取体系室温萃取 3 遍, 浓缩石油醚相后经过 1 步硅胶层析柱纯化, 2 或 3 步乙醇重结晶。中试结果表明, 该工艺获得辅酶 Q₁₀ 的纯度 > 99%, 平均回收率 > 80%。

关键词: 辅酶 Q₁₀; 农杆菌; 提取工艺; 中试

中图分类号: Q 552

文献标识码: A

A Study on Technique for Extracting Coenzyme Q₁₀ from Agrobacterium

TIAN Bao-jing, LI Jian, NIE Li-ying, CAO Xiao-dan, LI Xiao-qi

(Institute of Biotech-Pharm in Tasly Groups, Tianjin 300402, China)

Abstract: The process parameters of extraction CoQ₁₀ from Agrobacterium were carefully investigated and then validated by pilot-scale test in this manuscript. The optimum process parameters were decided as follows: firstly, extracting twice (one hour each time) using 5X 95% ethanol at 50 °C followed by a concentrated step then extracting three times at room temperature using a extraction system ratio of 1:2:3 (concentrated solution: methanol: Petroleum ether) and finally concentrating Petroleum ether phase, through one step of Silica Gel-Alumina Column purification, two to three steps of recrystallization by ethanol to obtain the aim product. The pilot-scale test shown the process gives a purity of over 99%, percentage recovery over 80%.

Key words: Coenzyme Q₁₀, Agrobacterium, Extracting, industrial production

辅酶 Q₁₀ 品名为: 2-(3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-癸甲基-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-四十癸烯基)-5,6-二甲氧基-3-甲基-p-苯醌^[1]; 是一种黄色至橙黄色结晶性粉末, 无臭无味; 是人体不可缺少的参与代谢的重要活性物质。在医药方面, 辅酶 Q₁₀ 最常用于心血管系统疾病的预防和治疗^[2]; 另外对于病毒性肝炎等也有一定的疗效^[3]。动物

实验显示, 辅酶 Q₁₀ 具有增强小鼠免疫力的作用, 其作用机制可能与辅酶 Q₁₀ 能激活 NK 细胞、T 细胞、巨噬细胞功能及清除氧自由基、稳定膜电位等有关^[4]。辅酶 Q₁₀ 的制备方法主要有 3 种: 动植物提取法、微生物发酵法和化学合成法。目前微生物发酵法以其原料来源简单、放大容易等优点, 被认为是最有前景的生产辅酶 Q₁₀ 的方法。

收稿日期: 2008-12-10

作者简介: 田宝静(1978-), 女, 天津人, 助理研究员, 主要从事生物药品开发与研究。Email: tianbj@tasly.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 土壤杆菌(*Agrobacterium sp.*),由天津天士力集团有限公司生物药品研究所保藏。

1.1.2 试剂 标准品为 Sigma 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 旋转蒸发器,Agilent 1100 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司制。

1.1.4 培养基及培养条件 葡萄糖 38 g/L,蔗糖 40 g/L,玉米浆 40 g/L,硫酸铵 10 g/L, MgSO₄ 0.15 g/L, K₂HPO₄ 0.6 g/L, KH₂PO₄ 0.6 g/L; 控制 pH 7.6~7.8,溶氧率>20%; 30 °C 培养。

1.2 方 法

1.2.1 检测方法建立

色谱条件^[1]: Thermo ODS HYPERSIL (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-无水乙醇(体积比 1:1)为流动相,柱温 35 °C,检测波长为 275 nm。理论板数按辅酶 Q₁₀峰计算不低于 3 000。

标准曲线:取辅酶 Q₁₀标准品 20 mg,精密称定,加无水乙醇 40 mL,在 50 °C 水浴中振摇溶解,放冷后,移至 100 mL 的量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 20、15、10、5、3.2 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图峰面积。

发酵菌辅酶含量测定:准确量取发酵液 200 μL,转移到 1 mL 的离心管中。置于离心机中 13 200 r/min 离心 4 min,弃上清液,加入 1 mL 乙醇。超声破碎仪悬起沉降物,脱色摇床振荡 30 min。将乙醇浸提后的样品再以 13 200 r/min 离心 4 min,吸取上清液,0.22 μm 有机滤膜过滤,转入干净离心管中,HPLC 测定。

1.2.2 提取纯化

提取溶剂筛选:将发酵得到的发酵液,离心收集菌体,各称取 100 g 菌体,分别加入无水乙醇、无水乙醇石油醚(体积比 3:1)、石油醚、丙酮和乙酸乙酯各 1 L,50 °C 摇床振荡 2 h,离心分别收集上清液,再分别添加 1 L 溶剂到离心沉淀物中,50 °C 摇床振荡 2 h,离心分别收集上清液,按溶剂不同分别合并两次提取液,用旋转蒸发器减压浓缩至干,获得提取物,分别向每种提取物中加入无水乙醇,50 °C 溶解,HPLC 检测提取物中辅酶 Q₁₀的含量,计算提取得率。

提取溶剂体积分数:方法同上,称取 4 份菌体,每份 100 g,分别加入不同体积分数乙醇各 1 L,50 °C 摇床振荡 2 h,离心分别收集上清液,再分别添

加 1 L 不同体积分数乙醇到离心沉淀物中,50 °C 摇床振荡 2 h,离心分别收集上清液,按乙醇体积分数不同分别合并两次提取液,用旋转蒸发器减压浓缩至干,获得提取物,分别向每种提取物中加入无水乙醇,50 °C 溶出,HPLC 检测提取物中辅酶 Q₁₀的含量,计算提取得率。

提取溶剂比例和提取次数:方法同上,称取 3 份菌体,每份 100 g(约 100 mL),分别按照 3、5、8 倍体积加入体积分数 95%乙醇 300、500 和 800 mL,50 °C 摇床振荡 2 h,离心分别收集上清液,提取 3 次,HPLC 分别检测提取物中辅酶 Q₁₀的含量,计算提取得率。

提取时间与温度:方法同上,称取 4 份发酵菌体,每份 100 g,每份中加入体积分数 95%乙醇 500 mL,分别以 25、37、50、60 °C 为提取温度,每 30 min 取一次样,HPLC 检测提取液中辅酶 Q₁₀的含量,计算提取得率。

萃取次数与温度:各取 1 L 已知辅酶 Q₁₀含量的乙醇提取液 3 份,经旋转蒸发浓缩至约 1/20,加入 100 mL 甲醇和 150 mL 石油醚,分别置于室温、45 °C 和 60 °C 进行萃取,分别萃取 3 次,分别将石油醚用旋转蒸发器减压浓缩至干,分别加入无水乙醇,50 °C 溶解,HPLC 检测提取物中辅酶 Q₁₀的含量,计算萃取得率。

层析柱纯化:称取 2 g 萃取浓缩膏,加入 10 mL 石油醚稀释。将该溶液均匀加入预先装好的硅胶层析柱,以乙酸乙酯-石油醚展开剂(体积比 1:20)展开,收集全部红色(橙色)洗脱液,40 °C,0.09 MPa 减压蒸出溶剂。液体加入 30 mL 无水乙醇,析出橙黄色固体粉末;过滤,减压干燥,称质量和 HPLC 测定纯度,计算得率。

重结晶:称取 1 g 层析柱纯化所得固体粉末,40 °C 减压融化成为红色液体,强烈搅拌下加入 20 mL 无水乙醇,4 °C 静置 12 h,用 G4 型耐酸沙芯漏斗减压过滤得到黄色粉末,减压干燥,称质量和 HPLC 测定纯度,计算得率。如有需要,可按上述规程重复过程。

1.2.3 中试研究 以 3 批 5 t 高密度发酵菌体为材料,称取菌体质量,按照每千克菌体 5 L 的比例加入乙醇,50 °C 提取 1 h,收集提取液,再加入等量的乙醇提取一次,收集提取液,将提取液浓缩 1/20,以浓缩液-甲醇-石油醚(体积比 1:2:3)室温萃取,萃取 3 遍,收集体并石油醚相,浓缩成膏状,加入石油醚,硅胶层析柱层析,收集全部红色(橙色)洗脱液,减压蒸出溶剂,加入无水乙醇,进行重结晶 3 次,

HPLC 测定纯度,计算得率。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂筛选

辅酶 Q_{10} 的性质,在三氯甲烷、苯、丙酮、乙醚或石油醚中溶解,在乙醇中极微溶解,在甲醇和水中不溶解。根据以上性质,选择了无水乙醇、石油醚、丙酮和乙酸乙酯作为溶剂提取发酵菌体中的辅酶 Q_{10} 。图 1 结果显示,无水乙醇的收率最高,能获得高达 97.3% 的得率。虽然辅酶 Q_{10} 只是极微溶解在乙醇中,但是乙醇较其他几种溶剂对细胞的穿透力强,在提高提取溶剂比例的情况下,能获得高达 97.3% 的提取得率,而 5 种提取液中辅酶 Q_{10} 的纯度 HPLC 检测均为 20% 左右,因此确定乙醇作为提取溶剂。

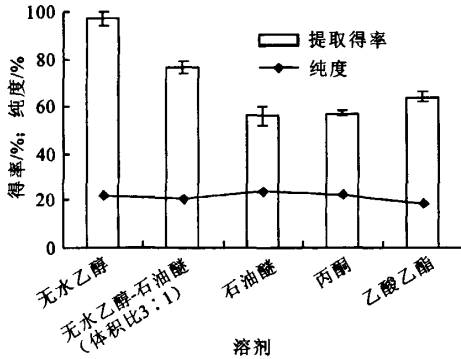


图 1 不同溶剂对辅酶 Q_{10} 提取得率的影响

Fig. 1 Effect of kind of solvent on extraction rate

2.2 提取溶剂体积分数

辅酶 Q_{10} 不溶于水,所以高体积分数的乙醇有利于得到高的提取得率。图 2 结果显示,无水乙醇的提取得率最高,达到 98.2%;体积分数 95% 的乙醇的提取得率也高达 95.7%,而体积分数 90% 和 85% 的乙醇的提取得率分别只有 81.2% 和 67.0%,HPLC 检测提取液浓度,随乙醇体积分数降低而降低,从生产成本的角度考虑,选择体积分数 95% 的乙醇作为提取溶剂。

2.3 提取溶剂比例和提取次数

从表 1 结果中可以看出,用 3 种提取溶剂比例,3 次提取发酵菌体后,提取得率分别是 98.3%、99.2% 和 100.4%。从大规模生产,溶剂使用量和回收消耗,以及提取次数与菌体处理量等多种角度考虑,选择用 5 倍体积的体积分数 95% 的乙醇提取两次的工艺。

2.4 提取时间与温度

从图 3 结果可以看出,温度影响提取得率的高

低,且提取得率随时间变化,当提取温度低于辅酶 Q_{10} 的熔点(25 °C 和 37 °C)时,提取得率在 3 h 内均低于提取温度等于或大于辅酶 Q_{10} 的熔点温度(50 °C 和 60 °C)时的提取。50 °C 条件下提取发酵菌体中的辅酶 Q_{10} 时,在 60 min 时达到最高,3 h 内基本保持不变;而 60 °C 提取时,在 60 min 达到最大提取得率后,随时间延长,提取得率逐渐变低。这可能跟辅酶 Q_{10} 具有热不稳定性有关,因此选择 50 °C 条件下用 5 倍体积的体积分数 95% 的乙醇提取发酵菌体中的辅酶 Q_{10} ,提取两遍,每次 1 h。

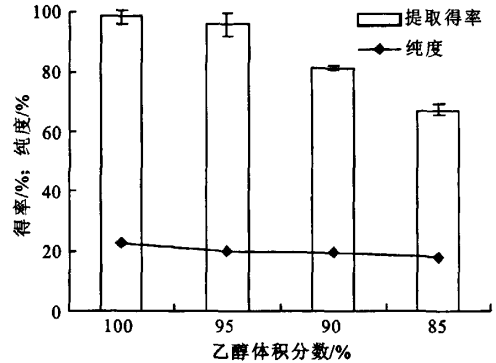


图 2 不同体积分数乙醇对辅酶 Q_{10} 提取得率的影响

Fig. 2 Effect of concentration of ethanol on extraction rate

表 1 不同乙醇比例和提取次数对辅酶 Q_{10} 提取得率的影响

Tab. 1 Effect of volume of ethanol & extraction times on extraction rate

溶剂比例	实测提取得率/%			
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	合计
3 倍	25.2	56.1	17.0	98.3
5 倍	77.3	21.1	0.8	99.2
8 倍	82.2	17.9	0.3	100.4

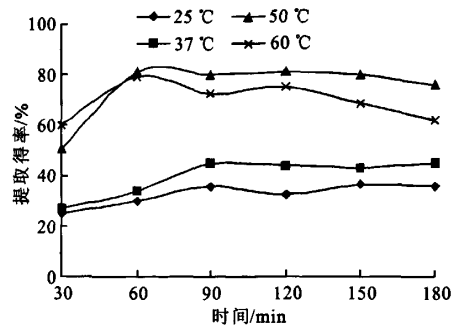


图 3 不同温度和时间对辅酶 Q_{10} 提取得率的影响

Fig. 3 Effect of temperature & time on extraction rate

2.5 萃取次数与温度

从图 4 结果中可以看出,室温萃取 3 遍相应的提取液,可以达到大于 95% 的萃取得率,计算绝对

得率为 90% 以上,而且 HPLC 检测纯度达到 85% ~ 90%,因此在此工艺里,选取室温,萃取 3 遍。然后旋转蒸发浓缩萃取液,得到萃取浓缩膏。

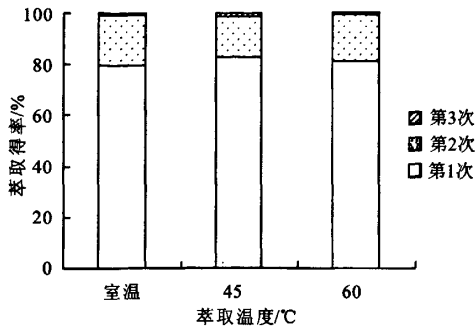


图 4 不同温度和萃取次数对辅酶 Q₁₀ 萃取得率的影响

Fig. 4 Effect of temperature & extraction times on extraction rate

2.6 柱纯化

经过柱纯化后,收集到的辅酶 Q₁₀ 经 HPLC 检测纯度达到 95% 左右,回收率达到 92%,而且去除了大部分胆固醇。

2.7 重结晶

经过 2 或 3 次重结晶后,得到的辅酶 Q₁₀ 的纯度达到 99%,各项指标达到药典要求;由于在该步骤中结晶母液可以回收移交到提取步骤,该步骤收

率可以确定为 100%。

2.8 中试研究

3 批中试研究参照小试工艺确定的参数进行,将小试工艺中的摇床振荡变为了反应器搅拌,将小试工艺中的离心步骤变为了微滤膜浓缩,以利于适应工业化生产的需要。结果显示,中试过程每批得到的产品纯度均大于 99%,计算所得收率大于 80%,与小试结果基本持平,证明该工艺适宜放大生产。

3 结 语

辅酶 Q₁₀ 是人体内细胞中的线粒体的电子传递系统的构成因子,除作为药物外,还用于保健食品或化妆品。在研究中选择易于培养且产量较高的土壤农杆菌进行发酵培养,提取其中的辅酶 Q₁₀,经研究得到适合该菌种的辅酶 Q₁₀ 提取工艺,经过体积分数 95% 的乙醇提取,再经过甲醇和石油醚相的萃取,后经正相柱纯化和重结晶,获得符合中国和日本药典的纯品,经过中试放大,能获得大于 80% 的得率,而且其中用到的甲醇、乙醇和石油醚均可以回收利用,降低了生产成本,适宜工业化生产。

参考文献(References):

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 3 部. 北京:化学工业出版社, 2005:653-654.
- [2] 刘丽. 辅酶 Q₁₀ 治疗心血管疾病的应用[J]. 中国实用医药, 2007, 2(25): 71.
Liu Li. The application of coenzyme Q₁₀ in treatment of cardiovascular diseases[J]. *China Practical Medicine*, 2007, 2(25): 71. (in Chinese)
- [3] 傅大干, 蔡方成, 张晓萍. 维生素 E 联合辅酶 Q₁₀ 对幼鼠丙戊酸肝毒性的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(6): 364-366.
FU Da-gan, CAI Fang-cheng, ZHANG Xiao-ping. Protection of Co-administration with Vitamin E and Coenzyme Q₁₀ to Valproate-Associated hepatotoxicity in infant rats[J]. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 2006, 21(6): 364-366. (in Chinese)
- [4] 徐彩菊, 孟佳, 傅剑云, 等. 辅酶 Q₁₀ 在免疫调节中的作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 222-224.
XU Cai-ju, MENG Jia, FU Jian-yun, et al. Effect of Coenzyme Q₁₀ in immunoregulation[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(2): 222-224. (in Chinese)

(责任编辑:秦和平)