

文章编号: 1003-8701(2015)04-0098-03

半制备液相色谱法分离制备内生真菌 次级代谢产物条件优化

陈 珣, 杨 镇, 肖 军, 马晓颖, 龚 娜, 杨 涛*

(辽宁省农业科学院微生物工程中心, 沈阳 110161)

摘 要: 为了提高物质的制备量和分离度, 以流动相比比例作为主要考察对象, 在分析液相色谱法分离检测结果的基础上, 采用半制备液相色谱法对内生真菌次级代谢产物的制备条件进行了优化实验。最终确定梯度洗脱程序为: 0 ~ 10 min, 流动相(水: 甲醇)体积比: 90: 10; 15 ~ 50 min, 流动相(水: 甲醇)体积比: 85: 15; 50 ~ 60 min, 流动相(水: 甲醇)体积比: 20: 80。

关键词: 半制备液相色谱; 内生真菌; 次级代谢产物; 制备条件优化

中图分类号: S182

文献标识码: A

Optimization of onditions of Separation and Preparation of Endophytic Fungi Secondary Metabolites by Semi-Preparative Liquid Chromatography

CHEN Xun, YANG Zhen, XIAO Jun, MA Xiao-ying, GONG Na, YANG Tao*

(Research Center of Microbial Engineering, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China)

Abstract: In order to improve preparation quantity and separation degree, proportion of mobile phase was studied as the main object, the preparation condition of endophytic fungus secondary metabolites was optimized for semi-preparation HPLC based on the analyzing results of HPLC. The ideal gradient elution program was as follows: first mobile phase at the ration of water and methanol was 90: 10 for 0 to 10 min, second mobile phase at the ration of water and methanol was 85: 15 for 15 to 50 min, and the last mobile phase ration of water and methanol was 20: 80 for 50 to 60 min.

Key words: Semi-preparative liquid chromatography; Endophytic fungus; Secondary metabolites; Optimization of preparation conditions

植物内生真菌(plant endophytic fungi)是一种新型的微生物资源, 研究表明内生真菌通常会与其宿主植物相同或相似的生理活性物质^[1]。在 Stierle et al. 研究成果的引领下, 人们发现内生真菌的次级代谢产物可能是抑菌活性物质的重要来源^[2]。因此, 内生真菌次级代谢产物生物活性的研究已成为微生物资源开发的一个热点^[3]。

目前, 高效制备液相色谱法因其分辨率高、产品纯度高、产量高等特点, 已成为分离与纯化技术的主要手段, 尤其在天然产物活性成分的提取纯化研究方面应用广泛^[4-5]。文中利用半制备高

效液相色谱法分离纯化内生真菌次级代谢产物, 对半制备液相色谱条件进行了优化, 主要考察了流动相比比例这一因素, 并最终确定了半制备高效液相色谱法分离纯化内生真菌次级代谢产物的制备条件。

1 材料和方法

1.1 试验材料与试剂

1.1.1 样品来源

内生真菌由本实验室从银川野生芦苇根系中分离并保存。

1.1.2 供试培养基

PA 培养基配方: 马铃薯(去皮)200 g; 葡萄糖20 g; 水1000 mL; pH值正常。

1.1.3 试验试剂

甲醇(色谱纯), 购买于上海陆都化学试剂厂。

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 辽宁省科技攻关项目(2011215005)

作者简介: 陈 珣(1979-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物内生菌代谢产物研究。

通讯作者: 杨 涛, 男, 研究员, E-mail: smkxzx@sina.com

1.2 试验仪器设备

BSK2-HSQ3 恒温水浴振荡器(北京周华医疗器械厂),RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化有限公司),半制备液相色谱仪 Waters_2695_2489 (美国沃特世公司),制备柱为 Unitary C18 (250 mm×4.6 mm, 10μm),分析柱为 Unitary C18 (250 mm×4.6 mm, 5μm)。

1.3 方法

1.3.1 内生真菌的分离纯化

健康的野生芦苇样品采集后立即处理、洗净,然后将其根部切成小段,用 75% 酒精冲洗 3 min,无菌水冲洗后,用 0.1% 升汞溶液处理 2 min,然后用无菌水冲洗 3~5 次。将上述消毒过的根在无菌条件下分别切割成 0.5 cm 的小段,接种于孟加拉红平板培养基上。置于 28℃ 培养箱中培养 3~7 d 后,即可见样品切割过的边缘长出菌丝,经孟加拉红平板培养基反复分离、纯化。

将活化的内生真菌菌种接种于装有 10 mLPA 培养基的小三角瓶中,置于 28℃、200 r·min⁻¹ 的摇床培养 6 d,抽提菌丝体代谢物,将菌丝体代谢物中分别加入等体积的 20% 乙醇,浸提 24 h,漏斗过滤,滤液于 4℃ 冰箱保存。

1.3.2 分析液相色谱条件

色谱柱为 Unitary C18 (250 mm×4.6 mm, 5μm),流速为 1 mL/min,柱温 25℃,紫外检测波长 280 nm,进样量 10μL。梯度洗脱:流动相 A 为水,流动相 B 为甲醇。洗脱程序:(1)0~5 min, A 为 90%~90%, B 为 10%~10%; (2)5~30 min, A 为 90%~40%, B 为 10%~60%; (3)30~40 min, A 为 40%~40%, B 为 60%~60%。

1.3.3 半制备液相色谱条件

色谱柱为 Unitary C18 (250 mm×4.6 mm, 10μm),流速为 1 mL/min,柱温 25℃,紫外检测波长 280 nm,进样量 10μL。梯度洗脱:流动相 A 为水,流动相 B 为甲醇。

洗脱程序 1:0~10 min, A 为 90%~90%, B 为 10%~10%; 10~50 min, A 为 90%~50%, B 为 10%~50%; 50~60 min, A 为 50%~20%, B 为 50%~80%。

洗脱程序 2:0~10 min, A 为 90%~90%, B 为 10%~10%; 10~50 min, A 为 90%~40%, B 为 10%~60%; 50~60 min, A 为 40%~20%, B 为 60%~80%。

洗脱程序 3:0~10 min, A 为 90%~90%, B 为 10%~10%; 10~50 min, A 为 90%~60%, B 为

10%~40%; 50~60 min, A 为 60%~20%, B 为 40%~80%。

洗脱程序 4:0~10 min, A 为 90%~90%, B 为 10%~10%; 10~15 min, A 为 90%~85%, B 为 10%~15%; 15~50 min, A 为 85%~85%, B 为 15%~15%; 50~60 min, A 为 85%~20%, B 为 15%~80%。

2 结果与分析

2.1 分析液相色谱分析

分析液相以分析为目的,追求的是检测精度,样品承载量非常小,只需要分开即可,只需要知道含有哪些组分即可,不需要制备出单体。本实验分析液相采用色谱柱 Unitary C18 (250 mm×4.6 mm, 5μm),利用表 1 的梯度洗脱条件分析样品,初步确定色谱峰的个数。从图 1 可以发现,15 min 后分离度较好的色谱峰为 6 个,可以将其作为半制备液相色谱梯度条件筛选的主要考察对象。

表 1 分析液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
5	90	10
30	40	60
40	40	60

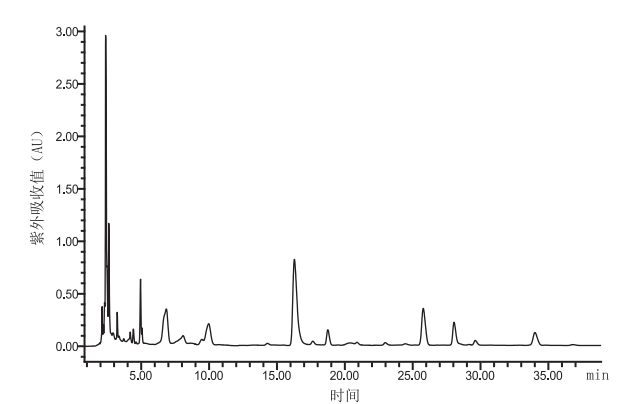


图 1 分析柱 Unitary C18 样品分析图

2.2 半制备液相色谱分析

制备色谱以分离纯化为目的,流速大、进样量大,目的是分离出各个组分得到单体。把制备的谱图(图 2)和分析的谱图(图 1)进行对比,即可发现,表 2 的梯度洗脱条件作为半制备液相的梯度洗脱条件得到的色谱峰比较完整,且分离度比较好,利于收集、制备单体。

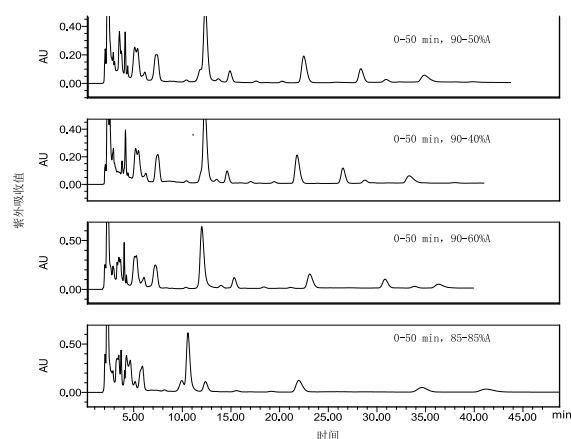


图2 不同梯度条件下色谱图

表2 半制备液相梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
10	90	10
15	85	15
50	85	15
60	20	80

3 结论与讨论

内生真菌是微生物生物多样性的一个重要组成部分^[6]。近年来的一些研究表明有些内生真菌次生代谢产物是生物毒素的主要来源,可以用于杀虫、杀菌,而对环境和人畜无害,为研制环保型抗虫害药剂提供了理想的原料。因此,更多的内生真菌次生代谢产物成为了人们研究的对象。

制备型高效液相色谱(HPLC)是在传统的分析型HPLC的基础上发展起来的一种高效分离纯化技术,具有产品纯度高、产率高、分离速度快等优点^[7]。制备型液相色谱的效能取决于分离速度、分离度和上样量,提高效能就要求在分离度 $R \geq 1.5$ 下具有较快的分离速度和较大的上样量。分离速度主要取决于流动相,半制备高效液相色谱

的流动相选择可以参考分析型HPLC的条件^[8]。本文将流动相比例作为主要考察对象,利用分析液相色谱初步筛选出内生真菌次级代谢产物分离度较好的6个色谱峰,作为半制备液相色谱的主要的考察对象。利用半制备高效液相色谱法对内生真菌次级代谢产物进行分离制备条件优化,最终确定半制备高效液相色谱法分离纯化内生真菌次级代谢产物的制备条件。本实验最终确定的梯度洗脱程序为:0~10 min,流动相(水:甲醇)体积比:90:10;15~50 min,流动相(水:甲醇)体积比:85:15;50~60 min,流动相(水:甲醇)体积比:20:80。在该条件下,可以得到分离度较高的色谱峰,也就是在此洗脱条件下可以制备出较纯的单体。

参考文献:

- [1] 申屠旭萍,陈列忠,俞晓平. 银杏内生真菌 No. 1028 代谢产物的抗真菌活性及其培养生物学特性[J]. 植物保护学报, 2007, 34(2): 147-152.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993(260): 214-216.
- [3] 邓祖军,曹理想,周世宁. 红树林内生真菌的分离及代谢产物生物活性的初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2010, 2(3): 100-104.
- [4] 于丽丽,刘巧,陈丹,等. 制备型高效液相色谱法在天然药物分离中的应用[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7): 1465-1467.
- [5] 简洁,黄建春,黄仁斌,等. 制备液相色谱分离制备玉郎伞查尔酮类化合物[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1313-1316.
- [6] 陆伟东,田雪莲,卯霞,等. 大叶黄杨内生真菌的分离及抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(35): 21704-21705, 21799.
- [7] 杨胜丹,余林春,付大友,等. 半制备高效液相色谱法分离纯化川木通中齐墩果酸[J]. 应用化工, 2011, 40(1): 173-175.
- [8] 吴炜,孙培冬,王建新,等. 半制备高效液相色谱分离纯化芦荟素和异芦荟素[J]. 光谱实验室, 2009, 2(25): 951-954.

(责任编辑:王昱)