

反相高效液相色谱法测定长春花组织培养物中吲哚生物碱含量

赵 剑*, 朱蔚华, 吴蕴祺, 胡 秋

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 定量测定长春花组织培养物中的吲哚生物碱含量。方法: 用反相高效液相色谱法和紫外检测器测定了长春花组织培养物中吲哚生物碱的含量。分析柱: Nucleosil 5 C₁₈柱, 流动相: 甲醇—乙腈—0.025 mol·L⁻¹ 乙酸铵—三乙胺(15:40:45:0.1), 检测波长: 280 nm, 流速: 1 mL·min⁻¹。结果: 色胺、蛇根碱、阿吗碱、文多灵和长春质碱的回收率分别是 94.5%, 95.9%, 96.0%, 97.0% 和 98.2%; 平均日内精密度 RSD 均小于 2%, 日间精密度 RSD 均小于 3%。结论: 此法可有效分离和测定长春花组织培养物中吲哚生物碱含量, 为进行细胞工程生产长春花生物碱提供了准确、灵敏、可靠的分析方法。

关键词 高效液相色谱法; 长春花; 色胺; 蛇根碱; 阿吗碱; 文多灵; 长春质碱

国外长春花组织和细胞培养已经研究了多年, 尽管已经取得很大进展, 但至今仍仅限于中等规模的生物反应器生产, 且长春花生物碱的生物合成途径和调节尚不清楚。长春花悬浮培养细胞主要生产阿吗碱及蛇根碱, 愈伤组织和细胞还生产长春碱和长春新碱的前体文多灵和长春质碱。长春花培养细胞中还能合成其他生物碱, 这样给分离和测定工作带来了困难。有关组织培养物中的生物碱测定有薄层扫描法^[1]、放射免疫法^[2]和高效液相色谱法^[3-5]。高效液相色谱法国外应用较多, 但多用梯度洗脱, 在 254 nm 或 280 nm 紫外检测或荧光检测, 对仪器和设备要求较高, 我们用改进的提取分离法和四元流动相, 280 nm 单波长检测的高效液相色谱法, 获得了比较理想的结果, 检测方法准确、可靠、方便。

实 验 部 分

1 仪器和试剂

Shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪, SPD-6A 紫外检测器, C-R3A 微分仪。甲醇、乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为去离子水, 均经 G5 漏斗过滤、超声脱气后使用。阿吗碱为本所植化室林茂

研究员提供, 色胺为 Fluka 产品。文多灵、蛇根碱和盐酸长春质碱的标准品均由加拿大 Toronto University 的 Frank Dicosmo 博士惠赠。以上各个标准品的纯度均在 99.9% 以上。

2 色谱条件

色谱柱为 Nucleosil 5 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Phenomenex, USA), 检测波长 280 nm, 衰减 0.02AUFS, 流动相: 甲醇—乙腈—0.025 mol·L⁻¹ 乙酸铵—三乙胺(15:40:45:0.1), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温室温。

3 样品处理及提取

将组织或悬浮细胞的干燥样品研磨成粉末后过 40 目筛, 精密称取约 0.5 g, 置于具塞磨口三角瓶中, 用甲醇 50 mL 超声提取 1 h, 滤纸过滤, 再用甲醇 30 mL 超声 30 min, 过滤, 最后用甲醇 30 mL 清洗, 合并滤液和清洗液, 于 50℃ 减压蒸干, 残渣用 2.5% 硫酸溶液溶解, 加入等体积的乙酸乙酯提取 2 次, 弃去有机相, 将水相用氨水(28.5%)调 pH 值至大于 10, 再用等体积乙酸乙酯迅速提取 3 次, 合并乙酸乙酯提取液减压蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容至 1 mL, 超速离心或过 0.22 μm 微孔滤膜, 进行分析。

4 生物碱样品和标准品的薄层鉴定

将样品提取液和与标准品混合液点于 GF₂₅₄ 硅胶板上, 双向展开(1)乙酸乙酯—甲醇(3:1); (2)二氯甲烷—甲醇(9:1)。以 1% 硫酸铈铵的磷酸溶液喷洒显色。确证组织培养物中生物碱的存在。

收稿日期: 1999-03-10

* Tel: (010)63165195, Fax: (010)63165775,

E-mail: guoying@public.bta.net.cn

赵 剑 男, 31 岁, 博士研究生

朱蔚华 男, 67 岁, 研究员, 博士生导师

结 果

1 生物碱的色谱行为

在上述条件下,色胺、蛇根碱、文多灵、阿吗碱和长春质碱的色谱分离情况如图 1。各生物碱的保留时间分别为:色胺:7.1 min,文多灵:13.7 min,蛇根碱:15.8 min,阿吗碱:19.7 min,长春质碱:22 min。可见几种生物碱达到完全分离。

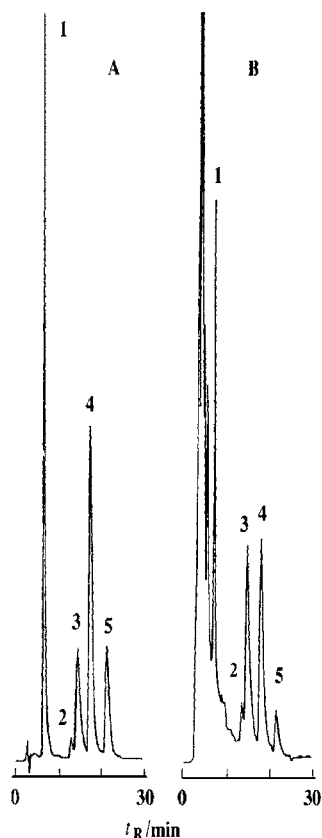


Fig 1 Chromatogram of standards (A) and sample (B) of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* separated by RP-HPLC. 1. Tryptamine; 2. Vindoline; 3. Serpentine; 4. Ajmalicine; 5. Catharanthine.

2 标准曲线制备

标准品溶液:精密称取文多灵、阿吗碱、长春质碱和蛇根碱和色胺各 2 mg,分别用甲醇溶解,并定容至 10 mL,配成标准品溶液。分别量取文多灵标准品溶液 250,400,500,600 和 700 μL ;蛇根碱标准品溶液 100,150,200,250,300 和 350 μL ,长春质碱标准品溶液 100,300,500,700 和 800 μL ,色胺标准品溶液 50,75,100,150 和 200 μL ,阿吗碱标准品溶液 25,50,75,100,200 和 300 μL ,于 1 mL 量瓶中定容,分别取 10 μL 进样。以峰面积和生物碱浓度进

行回归分析,得到 5 条回归曲线如表 1,根据信噪比实验确定检出限。

Tab 1 Calibration data of indole alkaloids ($n = 3$)

Alkaloid	Regression equation	Linear range / μg	γ	RSD /%
Catharanthine	$Y = 55694.16X - 1668.667$	0.1~2.0	0.9979	1.41
Serpentine	$Y = 43939.499X - 3414.24$	0.1~3.5	0.9996	1.51
Ajmalicine	$Y = 40717.75X - 1551.22$	0.05~2.5	0.9996	1.36
Vindoline	$Y = 10386.97X - 357.53$	0.5~2.5	0.9994	1.39
Tryptamine	$Y = 85157.143X - 1852.75$	0.05~1.4	0.9988	1.80

3 加样回收率测定

取同一批样品研磨过 40 目筛,精确称取 8 份 0.55 g 样品,其中 5 份分别加入阿吗碱、蛇根碱、长春质碱、文多灵和色胺各 0.2 mg,另 3 份为对照。按前面的方法提取和测定,计算回收率,结果如表 2。

Tab 2 Recoveries and precision of indole alkaloids ($n = 5$)

Alkaloid	Recovery / %	RSD of recoveries / %	RSD	
			Intra day / %	Inter day / %
Catharanthine	98.20 \pm 0.80	0.81	1.41	2.62
Serpentine	95.90 \pm 0.83	0.87	1.51	2.76
Ajmalicine	96.00 \pm 0.81	0.84	1.36	2.32
Vindoline	97.01 \pm 0.95	0.98	1.39	2.11
Tryptamine	94.50 \pm 0.87	0.92	1.80	2.89

4 精密度和稳定性检验

取标准品溶液,12 h 内连续测定 5 次,根据峰面积值计算 RSD 值($n = 5$),2 d 内间隔进样的 RSD 值($n = 5$)如表 2,说明样品在 2 d 内基本稳定。

5 长春花叶片组织和愈伤组织中生物碱的积累

取 3 个不同的盆栽长春花植株顶枝相同部位的叶片,50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,用于生物碱测定。分别由这 3 株长春花相同部位的叶片诱导而来的愈伤组织,在附加 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 吲哚乙酸(IAA) 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 激动素(KT) 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂的 MS 基本培养基上继代,在(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 暗处培养。在此培养基上继代第 4 次时取培养 30 d 的愈伤组织 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,称重,计算组织生长率,并按前述方法进行生物碱的提取测定,结果见表 3(标准偏差不超过 10%)。

由表 3 结果可见,长春花叶片和愈伤组织的生物碱含量有很大差别,叶片中含量较低的阿吗碱和

Tab 3 Alkaloids accumulation in different leaflets and callus tissues ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight)

Types of tissue		Growth rate / %	Ajmalicine	Serpentine	Vindoline	Catharanthine	Tryptamine
Leaf	P2	-	0.0479	0.1920	0.9634	0.0814	0.2901
	P3	-	0.0505	0.1718	0.7973	0.0629	0.1334
	P5	-	0.0752	0.2831	0.7458	0.0881	0.3102
Callus	P2	321.8	0.3270	0.4723	ND	0.0728	0.2321
	P3	317.0	0.2483	0.3070	ND	0.0410	0.1817
	P5	401.4	0.3815	0.5308	ND	0.0640	0.2083

$n = 3$; - : Growth rate is not tested; ND: Alkaloid content is not detectable.

蛇根碱在愈伤组织中含量较高,而原来叶片中含量较高的文多灵和长春质碱却下降到较低水平,在继代3次的愈伤组织中已检测不到文多灵。这和P. Morris的研究结果^[6]相似,反映了愈伤组织合成生物碱的特殊性。不同植株叶片来源的愈伤组织,其合成生物碱的能力不同,这可能是基因型的差异所致。比较3种植株的叶片和由它们而来的愈伤组织的各种生物碱含量可见,生物碱含量高的植株叶片,所形成的愈伤组织的生物碱含量也比较高。在相同的培养条件下,组织的基因型是决定组织合成阿吗碱的能力的主要因素。

6 长春花悬浮培养组织细胞合成蛇根碱和阿吗碱的动态

由白花长春花叶片在液体培养基($\text{MS} + 2,4\text{-D } 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + 3\% \text{ 蔗糖}$)中诱导形成悬浮组织系W3A。W3A在 $\text{MS} + 2,4\text{-D } 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{KT } 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + 3\% \text{ 蔗糖} + \text{维生素C } 250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基继代增殖,每隔2周继代1次。W3A生长和阿吗碱积累动态的培养基为 $\text{MS} + \text{萘乙酸(NAA)} 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{KT } 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + 5\% \text{ 蔗糖}$,于盛有100 mL培养基的250 mL三角瓶中,在暗处(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 旋转摇床上以 $130 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养,每隔5 d取材,组织吸干水分后称鲜重,然后 50°C 烘至恒重,称干重,按照前述方法提取测定。结果见图2。

由图2可见,长春花悬浮组织细胞系在生长期,鲜重增长可达接种量的5倍,干重则可增至4倍。延迟期和指数生长期的总时间基本为两周,此时阿吗碱的积累也达到较高值,阿吗碱的含量从接种时起逐渐增加,至20d组织细胞中的阿吗碱含量积累至最高($0.351 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重),随后开始下降。而蛇根碱的含量却在20d以后才达到最高值($0.589 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重),随后下降。所以两周的培养周期较合适。长春花悬浮培养细胞中检测不到文多灵,长春质碱的含量也很低。

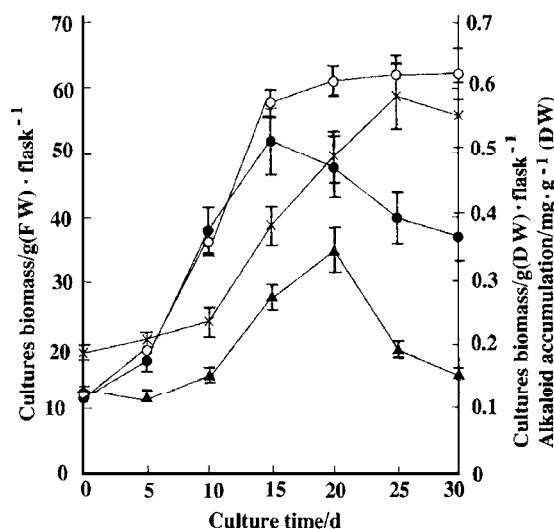


Fig 2 Kinetics of growth and accumulation of alkaloids in tissue line CRW3A of *Catharanthus roseus* in suspension culture. —○— Fresh weight (FW) of cultures; —●— Dry weight (DW) of cultures; —▲— Ajmalicine content; —×— Serpentine content.

讨 论

本文改进传统的长春花生物碱的提取方法,使生物碱的提取较完全、回收率较高,并建立了同时测定长春花培养组织细胞中5种主要生物碱的高效液相色谱法,使这些生物碱在等强度洗脱和单波长紫外检测下也能得到较好的分离和测定。为了建立此方法,我们曾比较了相同组分但不同配比的等强度流动相如甲醇—乙腈— $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵—三乙胺(0:50:50:0.1; 12:48:40:0.1; 15:45:40:0.1; 18:42:40:0.1; 10:50:40:0.2)等对长春花培养物组织细胞中的吲哚生物碱的分离结果,发现乙腈和 $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵的比例决定分离的效果,乙腈比例大有利于保持较好的峰形和缩短保留时间,乙酸铵溶液比例大则使保留时间滞后。 0.1% 三乙胺的加入适当地延长了生物碱的保留时间,使它们远离杂质峰,但 0.2% 三乙胺则使阿吗碱的保留时间超过30 min。由于阿吗碱、蛇根碱、长春质碱和文

多灵的结构和理化特性较相近,所以等强度流动相分离这些生物碱有难度,增加乙腈与水的比值可以缩短所有生物碱的保留时间同时有利于分离文多灵和蛇根碱,但阿吗碱和长春质碱的分离度则不理想;如降低乙腈与水的比值则可延迟生物碱的保留时间,有利于阿吗碱和长春质碱的分离,但对文多灵与蛇根碱的分离不理想。经分析比较,选取在分离度、峰形和适当的保留时间上都较好的 15:40:45:0.1 的配比值作为流动相,建立了本方法。用本法可准确、方便地测定阿吗碱、色胺、蛇根碱、长春质碱及文多灵的含量,在我们培养的愈伤组织和悬浮组织细胞的生物碱含量测定中均得到了验证。

致谢 加拿大 Toronto University 的 Frank Dicosmo 博士惠赠文多灵、蛇根碱和盐酸长春质碱标准品;本所植化室林茂研究员提供阿吗碱标准品。

References

- 1 Tam MN, Nikolova-Damyana B, Pyuskyuler B. Quantitative thin layer chromatography of indole alkaloids. *J Liq Chromatogr*, 1995, **18**:849
- 2 Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, *et al.* Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspensions culture of *Catharanthus roseus*. In: Barz W, Reinhard E, Zenk MH, eds. *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications*. Berlin: Springer, 1977. 27~44
- 3 Naaranlanti T, Nordstrom M, Hhuhtikangas A. Determination of Catharanthus alkaloids by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1987, **410**:488
- 4 Renaudin JP. Extraction and fluorimetric detection after high performance liquid chromatography of indole alkaloids from cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Physiol Veg*, 1985, **23**:381
- 5 Renaudin JN. Reversed phase high performance liquid chromatographic characteristics of indole alkaloids from cell suspensions of *Catharanthus roseus*. *J Chromatogr*, 1984, **291**:165
- 6 Morris P. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. III. Alkaloid metabolism in cultured leaf tissue and primary callus. *Planta Med*, 1986, **2**:127

DETERMINATION OF INDOLE ALKALOIDS IN *CATHARANTHUS ROSEUS* TISSUE AND CELL CULTURES BY RP-HPLC

Zhao Jian (Zhao J), Zhu Weihua (Zhu WH), Wu Yunqi (Wu YQ) and Hu Qiu (Hu Q)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT AIM: To determine the indole alkaloids tryptamine, serpentine, vindoline, ajmalicine and catharanthine in *Catharanthus roseus* tissue and cell cultures by RP-HPLC and UV detector. **METHODS:** These indole alkaloids were successfully separated on a Nucleosil 5 C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol — acetonitrile — 0.025 mol·L⁻¹ ammonium acetate — triethylamine (15:40:45:0.1) by UV detector at 280 nm. **RESULTS:** The average recoveries and equations of linear regression of tryptamine, serpentine, vindoline, ajmalicine and catharanthine were 94.5%, 95.9%, 97.0%, 96% and 98.2%, respectively, and $Y = 85157.143X - 1852.75$ ($\gamma = 0.9988$), $Y = 43939.499X - 3414.24$ ($\gamma = 0.9996$), $Y = 10386.97X - 357.53$ ($\gamma = 0.9994$), $Y = 40717.75X - 1551.22$ ($\gamma = 0.9996$), $Y = 5694.16X - 1668.667$ ($\gamma = 0.9979$), respectively. Intra and inter day precisions of these alkaloids were lower than 2% and 3% (RSD), respectively. **CONCLUSION:** A simple, rapid and sensitive method with good precision was established for the determination of these alkaloids in cell cultures of *Catharanthus roseus*.

KEY WORDS HPLC; *Catharanthus roseus*; tryptamine; serpentine; vindoline; ajmalicine; catharanthine