

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ РАУВОЛЬФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Подобраны условия разделения и разработан метод определения индольных алкалоидов на микроколоночном хроматографе «Милихром» с использованием колонки с силикагелем при градиентном режиме элюирования. Разработанный метод позволяет проводить в экстракте культуры тканей раувольфии одновременное количественное определение некоторых из них. Осуществлен анализ различных клеточных линий раувольфии. В культивируемых клетках обнаружено около 30 различных алкалоидов и определено содержание аймалицина, резерпина, вомиленина, аймалина и серпентина. Метод требует малого количества анализируемого образца, отличается высокой точностью и большой скоростью проведения анализа.

В СССР впервые в мире разработана и осваивается технология промышленного получения из биомассы культивируемых клеток раувольфии змеиной аймалина, используемого в медицине в качестве противоритмического средства. Это стало возможным в результате получения клеточных штаммов-сверхпродуцентов, накапливающих более 1% аймалина. По имеющимся сведениям, в том числе полученным в нашей лаборатории, культивируемые клетки раувольфии могут быть источником и других фармацевтически ценных алкалоидов, в частности, резерпина, аймалицина, серпентина, α -иохимбина и других [1, 2]. Для успешного получения штаммов-продуцентов, их биохимического изучения и проведения дальнейших работ по клеточной селекции требуется наличие экспресс-методов анализа алкалоидов в культивируемых клетках. Однако известные методы количественного определения индольных алкалоидов трудоемки и не позволяют проводить одновременного определения индивидуальных алкалоидов в суммарной алкалоидной фракции, полученной из клеток раувольфии [3—8].

Целью настоящей работы являлась разработка экспресс-метода определения аймалина, вомиленина, резерпина, аймалицина и серпентина в биомассе культивируемых клеток раувольфии. Нами были подобраны условия разделения указанных алкалоидов на микроколоночном хроматографе «Милихром» с использованием колонки с силикагелем. Применение градиентного режима элюирования (хлороформ (100—80%) -метанол (0—20%) -25%-ный аммиак (0,0—0,8%)) позволило получить полное разделение смеси алкалоидов (рисунок, а). При анализе выделенной и очищенной (по [9]) суммарной фракции алкалоидов из сухой биомассы культивируемых клеток раувольфии змеиной было

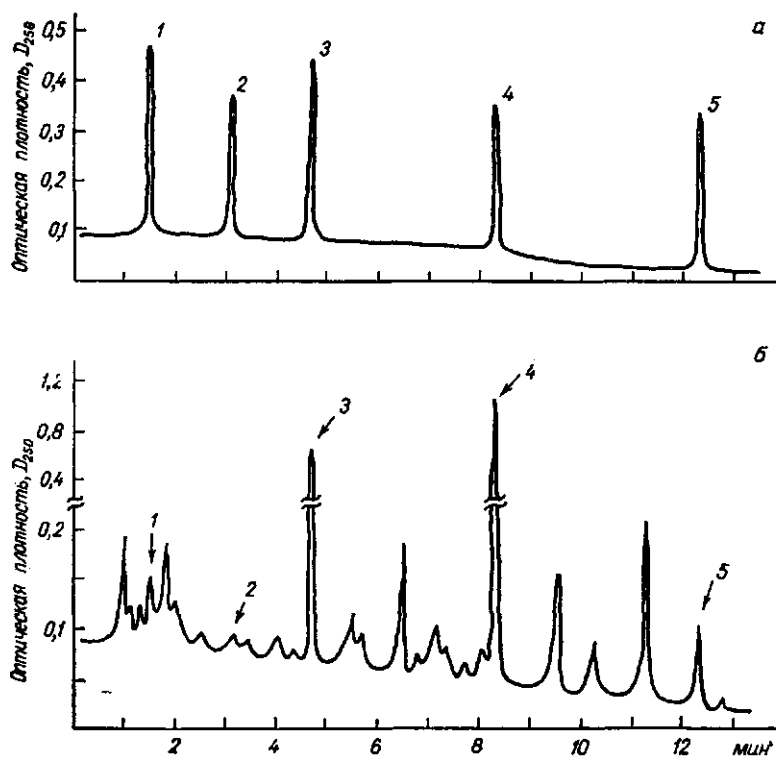
Содержание алкалоидов в различных клеточных линиях раувольфии,
% от сухой биомассы *

Alkaloid contents in various Rauwolfia cell lines, % of dry weight

№ линии	Аймалицин	Резерпин	Вомиленин	Аймалин	Серпентин
1	0,015 ±0,001	0,000	0,240 ±0,015	0,997 ±0,014	0,130 ±0,015
2	0,029 ±0,001	0,000	0,165 ±0,005	0,570 ±0,010	0,150 ±0,001
3	0,030 ±0,001	0,000	0,370 ±0,010	1,050 ±0,015	0,200 ±0,002
4	0,012 ±0,001	0,000	0,420 ±0,015	0,810 ±0,010	0,115 ±0,002
5	0,008 ±0,001	0,0010 ±0,0005	0,188 ±0,005	0,452 ±0,013	0,025 ±0,002

* В таблице приведены средняя арифметическая величина и ее ошибка.

обнаружено около 30 различных алкалоидов (рисунок, б), что значительно превосходит разрешающую способность при разделении в тонком слое силикагеля [1]. Методом добавления в анализируемый образец стандартных растворов алкалоидов в культуре тканей раувольфии нами были идентифицированы аймалицин, резерпин, вомиленин, аймалин и серпентин. Количественное их определение проводили по калибровочным графикам, построенным на основе соответствующих индивидуальных алкалоидов. Данным методом было определено содержание алкалоидов в различных клеточных линиях раувольфии (таблица).



Хроматограммы смеси алкалоидов (а) и экстракта культивируемых клеток раувольфии (б), полученные на микроколоночном хроматографе «Милихром»: 1 — аймалицин; 2 — резерпин; 3 — вомиленин; 4 — аймалин; 5 — серпентин. Колонка: силикагель С₆₀₀ (ЧСФР), 2×62 мм; скорость потока: 0,2 мл/мин; элюент: хлороформ (100—80 %) — метанол (0—20 %) — 25 %-ный, аммиак (0,0—0,8 %)

Chromatography analysis of alkaloids on microcolumn chromatograph «Milichrom»: 1 — ajmalicine, 2 — reserpine, 3 — vomilenine, 4 — ajmaline, 5 — serpentine. Column: silica-gel С₆₀₀ (CSFR), 2×62 mm; flow rate: 0.2 ml/min; mobile phase: chloroform (100—80 %); methanol (0—20 %), ammonia, 25 % (0.0—0.8 %). а — chromatogram of alkaloid mixture; б — chromatogram of Rauwolfia cultured cell extract

При этом ошибка измерения аймалина и вомиленина не превышает 5 %, что не уступает аналогичным показателям для известных методик [4, 5, 7], но значительно сокращается время и упрощается процедура проведения анализа. Определение в этих же образцах суммы индолиновых алкалоидов (по [9]) дало следующие результаты: № 1 — 1,14 %; № 2 — 0,61 %; № 3 — 1,15 %; № 4 — 0,90 %; № 5 — 0,52 %. Сравнение данных по содержанию аймалина и индолиновых алкалоидов показало, что на долю аймалина приходится в среднем 90 % суммы индолиновых алкалоидов. Это хорошо согласуется с аналогичными данными, полученными другими методами [1, 9].

Таким образом, разработанный метод хроматографического анализа алкалоидов на силикагеле при градиентном режиме элюирования позволяет проводить в экстракте культуры тканей раувольфии одновременное количественное определение аймалицина, резерпина, воми-

ленина, аймалина и серпентина. Метод требует небольшого количества анализируемого образца (1 мкл 0,5 %-ного раствора алкалоидов на одно определение), отличается высокой точностью и большой скоростью проведения анализа.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF INDOLE ALKALOIDS IN RAUWOLFIA CULTURED CELLS BY MICROCOLUMN CHROMATOGRAPHY

S. I. Gubar, E. P. Konstantinova, V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The separation conditions and method of indole alkaloid analysis on silica gel using gradient elution were elaborated by microcolumn chromatograph «Milichrom». The developed method permits carrying out simultaneous quantitative determination of ajmalicine, reserpine, vomilenine, ajmaline and serpentine in the tissue culture extract. Various Rauwolfia cell lines have been analyzed. About 30 different alkaloids were detected and contents of ajmalicine, reserpine, vomilenine, ajmaline and serpentine were measured in the cultured cells. The method requires a small amount of material to be analyzed (1 μ l of 0.5 % alkaloid solution for one measurement) and it is characterized by high precision and high rate of analysis.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаева Л. А., Шимолина Л. Л., Смирнова И. И. Химический состав культуры ткани *Rauwolfia serpentina Benth* // Растит. ресурсы.— 1988.— 24, № 4.— С. 579—584.
2. Kunakh V. A., Alkhimova E. G. *Rauwolfia serpentina* — *in vitro* culture and the production ajmaline // Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plants.— Berlin; Heidelberg: Springer, 1989.— V. 7.— P. 398—416.
3. Николаева Л. А., Воллосович А. Г., Позднякова Н. Н. Методы количественного определения алкалоидов в культуре ткани *Rauwolfia serpentina Benth* // Растит. ресурсы.— 1978.— 14, № 1.— С. 144—146.
4. Метод количественного определения алкалоида вомиленина в культуре ткани *Rauwolfia serpentina Benth* / Л. Л. Шимолина, Л. А. Николаева, Т. В. Астахова, С. А. Минина // Там же.— 1984.— 20, № 4.— С. 578—581.
5. Хроматофотокolorиметрическое определение индолиновых алкалоидов в культуре ткани *Rauwolfia serpentina* / Е. И. Молохова, Т. В. Астахова, Л. Л. Шимолина, С. А. Минина // Химия природ. соединений.— 1987.— № 6.— С. 918—919.
6. Исидоров В. А., Кириллина Е. Н. Разделение индолиновых оснований экстрактов культуры тканей раувольфии змеиной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Результаты и перспективы науч. исследований по биотехнологии и фармации: Тез. докл. Всесоюз. конф. (Ленинград, 29 июня — 1 июля 1989).— Л., 1989.— С. 99.
7. Нгуен Ким Кан, Николова И. Г., Николаева Л. А. Количественное определение алкалоидов в коре корней некоторых видов *Rauwolfia L.* методом тонкослойной хроматографии // Растит. ресурсы.— 1989.— 25, № 4.— С. 594—599.
8. Comparison between high-performance thin-layer chromatography-densitometry and high-performance liquid chromatography for the determination of ajmaline, reserpine and rescipamine in *Rauwolfia vomitoria* root bark / P. Duez, S. Chamart, M. Vanhaelen et al. // J. Chromatography.— 1986.— 356, N 3.— P. 334—340.
9. Метод количественно определения алкалоидов группы индолина в культуре ткани *Rauwolfia serpentina Benth* / А. Г. Воллосович, Л. А. Николаева, Н. Н. Позднякова, Т. Н. Пучинина // Растит. ресурсы.— 1977.— 13, № 1.— С. 127—132.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 18.12.89.