

天山雪莲悬浮细胞培养物中紫丁香苷的分离及含量测定

陈日道^{1,2}, 邹建华¹, 贾景明^{2*}, 戴均贵^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 紫丁香苷为天山雪莲的主要活性成分之一, 本研究运用溶剂提取方法, 结合各种色谱手段对天山雪莲组织细胞培养物中的紫丁香苷进行分离纯化, 并根据现代谱学方法对其结构进行鉴定。同时采用高效液相色谱法建立了天山雪莲组织细胞培养物中紫丁香苷的含量测定方法, 该方法简便, 精密度、重现性良好, 结果准确可靠。这些研究为通过天山雪莲细胞悬浮培养大规模生产活性成分紫丁香苷奠定了基础。

关键词: 天山雪莲; 紫丁香苷; 细胞悬浮培养; RP-HPLC

中图分类号: R284.1; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 04-0436-04

Isolation and analysis of syringin in cell suspension cultures of *Saussurea involucrata*

CHEN Ri-dao^{1,2}, ZOU Jian-hua¹, JIA Jing-ming^{2*}, DAI Jun-gui^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Syringin is one of the main bioactive ingredients in *Saussurea involucrata*. In this study, various chromatographic techniques were employed to isolate and purify syringin in the polar extraction of cell suspension cultures of *S. involucrata*. The structure of syringin was characterized by the analysis of spectroscopic data. A quantitative analytical method for the content of syringin in cultures of *S. involucrata* was established with RP-HPLC. The method is convenient, accurate and reliable. All this results provided a basis for further studies on application of cell suspension cultures of *S. involucrata* for large-scale production of bioactive compound syringin.

Key words: *Saussurea involucrata*; syringin; cell suspension cultures; RP-HPLC

天山雪莲 (*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.), 又名新疆雪莲, 大苞雪莲, 雪莲花, 系菊科凤毛菊属 (*Saussurea* DC.) 多年生草本植物, 属国家二类珍稀植物。主产于新疆天山、昆仑山, 生长在雪线以上, 以全草或干燥地上部分入药, 系维吾尔族习用药材。具有补肾活血, 强筋骨, 营养神经, 调节异常体液的功效, 用于风湿性关节炎、关节疼痛、肺寒咳嗽、肾与小腹冷痛、白带过多等治疗^[1]。现代药理研究表明, 天山雪莲主要具有抗炎镇痛、抗癌、抗早孕、抗衰老及

抗疲劳等作用^[2]。

由于天山雪莲生境特异, 生长缓慢, 人工栽培困难, 加上长期以来对雪莲的掠夺性采挖, 野生天山雪莲资源已严重匮乏, 并处于濒危的境地, 难以满足日益增长的临床需要。植物组织细胞培养等生物技术手段的发展为解决这一问题提供了切实可行的途径, 国内外已有天山雪莲植株再生^[3]、固体愈伤培养^[4]、细胞悬浮培养^[5]和毛状根培养^[6]的报道。药理研究表明, 天山雪莲培养物与野生天山雪莲具有同样的抗炎、镇痛等作用^[7]。但目前对天山雪莲培养物中化学成分的系统研究较少, 本研究组对天山雪莲组织细胞培养物中的化学成分进行了系统的分离、分析工作, 获得 20 余个化合物 (将另文报道), 其中以紫丁香苷的得率最高 (约 0.3%)。

收稿日期: 2008-09-27.

基金项目: 教育部博士点专项基金 (20050023021); 教育部“新世纪优秀人才”支持计划资助项目 (NCET-06-0155).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165195, Fax: 86-10-63017757,
E-mail: jgdai@imm.ac.cn

紫丁香苷为野生天山雪莲的活性成分之一,最近有报道紫丁香苷具有抗炎镇痛^[8]、抗高血糖^[9]、抗抑郁^[10]、抗癌^[11]活性及保肝作用^[12],而天山雪莲野生药材中紫丁香苷的含量仅为 0.027%,远低于天山雪莲组织细胞培养物中的含量,因此,利用天山雪莲组织细胞培养生产紫丁香苷具有一定的前景。在分离得到紫丁香苷后,作者继而利用 RP-HPLC 建立了组织细胞培养物中紫丁香苷的含量测定方法,这些研究为深入研究天山雪莲组织细胞培养物中紫丁香苷的生物合成与调控以及大规模生产奠定了基础。

材料与方法

仪器与材料 核磁共振仪: INOVA-500 型核磁共振波谱仪。质谱仪: VGZAB-2F 型质谱仪。熔点测定仪: XT4A 型显微熔点测定仪 (温度未校正)。半制备型高效液相色谱仪: 岛津 LC-6AD 泵, 岛津 RID-10A 示差检测器, 威玛龙色谱数据工作站。含量测定用高效液相色谱仪: Agilent 1200 分析型高效液相系统 (G1311A 四元泵, G1325D 二极管阵列检测器, G1329A 标准型自动进样器, G1322A 真空脱气机, G1316A 柱温箱), Agilent LC 系统化学工作站。超声提取用 AUTO SCIENCE 10200A 型超声波清洗器。色谱用硅胶为青岛海洋化工厂产品。Amberlite XAD16 型大孔吸附树脂为美国 ROHMHAAS 公司产品。高效液相分析用乙腈为色谱纯, 提取分离用溶剂为分析纯, 水为双蒸水。

紫丁香苷对照品为自制, 面积归一化法检测纯度为 98% 以上。

色谱条件

紫丁香苷的分离纯化 色谱柱: YMC C₁₈ 柱 (250 mm × 10.0 mm ID, 5 μmol·L⁻¹); 流动相: 甲醇-水 (25 : 75, v/v); 流速: 2.0 mL·min⁻¹。

紫丁香苷的含量测定 色谱柱: GraceSmart C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μmol·L⁻¹); 流动相: 乙腈-水 (10 : 90, v/v); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 265 nm; 进样体积: 10 μL。

材料 天山雪莲愈伤组织为选用种子萌发后的无菌苗叶片经附加 3% 蔗糖的 MS^[13] + 0.5 mg·L⁻¹ α-萘乙酸 (α-naphthalene acetic acid, NAA) + 0.5 mg·L⁻¹ 6-苄基嘌呤 (6-benzyl aminopurine, 6-BA) + 0.2 mg·L⁻¹ 2, 4-D 培养基诱导产生。培养 1 年后在相同组成的液体培养基中悬浮培养, 每 10 d 继代 1 次, 3 至 4 代后建立起稳定的天山雪莲悬浮细胞培养体系, 用于进一步试验。

细胞悬浮培养 采用摇床旋转振荡培养, 避光进行。摇床转速: 110 r·min⁻¹。培养基组成: MS + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ 2, 4-D, 附加 3% 蔗糖, 灭菌前调 pH = 5.8。采用 500 mL 锥形瓶为培养容器, 培养基装量为 125 mL, 接种量为 50 g~60 g FW·L⁻¹。培养 12 d 收获, 减压抽滤分离培养细胞, 蒸馏水洗 3 遍, 55 °C 烘干至恒重。

含量测定溶液的制备

对照品储备溶液的制备 精密称取紫丁香苷对照品 4.9 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即为含紫丁香苷 0.098 mg·mL⁻¹ 的对照品储备溶液。

供试品溶液的制备 取天山雪莲干燥组织细胞培养物, 研细, 过 40 目筛, 精密称取细粉约 100.0 mg, 置于 10 mL 具塞试管中, 用 70% 甲醇 10 mL 超声提取 15 min, 用甲醇补足失重, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 滤膜, 备用。

结果

1 紫丁香苷的提取分离

天山雪莲干燥组织细胞培养物 1.4 kg 经 95% 乙醇浸泡 24 h 后, 回流提取 4 次, 每次 5 h, 减压回收溶剂至无醇味, 加适量水分散, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取。合并正丁醇部分, 减压回收溶剂, 得正丁醇部分浸膏 96.74 g。将正丁醇部分进行大孔树脂吸附, 0%、50%、80%、100% 乙醇梯度洗脱。合并 50% 乙醇洗脱部分并减压蒸干得 23.3 g 混合物, 混合物采用硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇系统洗脱, 合并氯仿: 甲醇 = 10 : 1 部分流分, 减压回收溶剂, 得紫丁香苷粗品约 4 g, 得率约为 0.3%。经甲醇重结晶、半制备 HPLC 纯化, 得紫丁香苷纯品, 供结构鉴定及含量测定对照品使用。

2 紫丁香苷的结构鉴定

无色针晶 (甲醇), mp 195~197 °C。FAB-MS: 395 [M + Na]⁺, 210 [M - glc + H]⁺, 193 [M - glc - OH + H]⁺。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ: 6.72 (2H, s, H-3, 5), 6.45 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-7), 6.32 (1H, dt, *J* = 16.2, 5.4 Hz, H-8), 4.96 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 4.10 (2H, dt, *J* = 5.4, 1.8 Hz, H-9), 3.76 (6H, s, 2×OCH₃), 3.00~3.59 (6H, m, glc H-2'~6')。 ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 152.7 (C-2, 6), 133.8 (C-7), 132.6 (C-4), 130.2 (C-8), 128.4 (C-1), 104.4 (C-3, 5), 102.5 (C-1'), 77.2 (C-5'), 76.5 (C-3'), 74.2 (C-2'), 69.9 (C-4'), 61.4 (C-6'), 60.9 (C-9), 56.3 (2×OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[14], 故鉴定为紫丁香苷。

3 紫丁香苷 HPLC 含量测定方法的建立

3.1 含量测定提取方法的确立

精密称取天山雪莲干燥组织细胞培养物适量, 采用 100 倍体积提取溶液, 尝试了不同浓度甲醇、不同提取时间, 并比较了静置过夜、热回流提取和超声波提取等提取方法对组织细胞培养物中紫丁香苷提取率的影响, 发现采用超声波提取法效果较佳, 紫丁香苷提取率高。进一步考察了不同甲醇浓度、不同超声提取时间对组织细胞培养物中紫丁香苷提取率的影响 (表 1), 发现超声提取 15 min 便能使培养物中的紫丁香苷提取完全, 采用 50% 甲醇超声提取提取率最高, 但提取液颜色较深, 提取杂质较多, 故选择 70% 甲醇为提取溶剂, 提取时间为 15 min。

Table 1 Ultrasonic extraction of syringin*

Solvent	Extraction ratio/%			
	5 min	15 min	30 min	45 min
100% MeOH	89.2	95.9	94.2	96.6
70% MeOH	91.8	99.8	99.7	99.9
50% MeOH	91.0	100.0	99.6	100.0

*Set the group of 45 minutes extraction as 100%

3.2 含量测定方法确证

3.2.1 标准曲线及线性范围 精密量取上述对照品储备液 0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成对照品溶液。按“色谱条件”项下紫丁香苷含量测定色谱条件测定, 记录紫丁香苷的峰面积。以峰面积值 (A) 为纵坐标, 对照品质量 ($m, \mu\text{g}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $A = 2\,235\,m + 0.970\,5$, 相关系数 $r = 0.999\,9$ 。结果表明, 紫丁香苷质量浓度在 $0.009\,8 \sim 0.392\,0\,\mu\text{g}$ 内线性关系良好。

3.2.2 精密度试验 吸取紫丁香苷对照品溶液 ($15.68\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 重复进样 5 次, 每次进样体积均为 $10\,\mu\text{L}$, 记录紫丁香苷峰面积值, 求得 RSD 为 0.15%, 结果表明精密度良好。

3.2.3 稳定性试验 将紫丁香苷对照品溶液 ($15.68\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 在室温下分别放置 0、1、4、8、12、24 h 后进样分析, 进样体积均为 $10\,\mu\text{L}$, 记录峰面积, 计算其 RSD 为 0.51% ($n = 2$), 表明对照品溶液在 24 h 内稳定。

3.2.4 重现性试验 精密称取天山雪莲干燥组织细胞培养物 100.0 mg, 共 6 份, 按“含量测定溶液的制备”项下供试品溶液的制备项所述方法制备供试品溶液, 按“色谱条件”项下紫丁香苷含量测定色谱条件测定, 依据峰面积数据计算样品中紫丁香苷的含量

及相对标准偏差。紫丁香苷的含量为 0.095%, RSD = 0.32%, 结果表明重现性良好。

3.2.5 加样回收率试验 精密称取已知紫丁香苷含量的天山雪莲干燥组织细胞培养物 6 份, 分别精密加入一定量的紫丁香苷对照品, 按“含量测定溶液的制备”项下供试品溶液的制备项所述方法制备供试品溶液, 按“色谱条件”项下紫丁香苷含量测定色谱条件测定, 计算回收率。紫丁香苷的平均回收率为 96.73%, RSD = 0.60% (表 2)。

Table 2 Recovery test of syringin ($n = 2$)

No.	Weighted /mg	Assay /mg	Added /mg	Found /mg	Recovery /%	Mean /%	RSD /%
1	100.3	0.095	0.098	0.199	97.36	96.73	0.60
2	99.9	0.095	0.098	0.200	96.38		
3	100.0	0.095	0.098	0.198	97.52		
4	102.5	0.097	0.098	0.202	96.58		
5	103.0	0.098	0.098	0.204	96.03		
6	101.4	0.096	0.098	0.201	96.49		

3.2.6 样品含量测定 精密称取天山雪莲干燥组织细胞培养物 100.0 mg, 按“含量测定溶液的制备”项下供试品溶液的制备项所述方法制备供试品溶液, 按“色谱条件”项下紫丁香苷含量测定色谱条件测定, 同法测定野生天山雪莲药材中紫丁香苷的含量, 结果分别为 0.095%, 0.027%。

在进行培养条件、碳源等因素对天山雪莲组织细胞培养物中紫丁香苷含量影响的研究后发现, 经初步条件优化后的天山雪莲组织细胞中紫丁香苷含量可达到 0.317%, 值得进一步深入系统研究。

讨论

利用植物细胞培养的方法生产活性次生代谢产物具有过程可控、无害无污染、培养周期短和可持续利用等特点。紫丁香苷为天山雪莲药材的主要活性成分之一, 具有抗炎镇痛、抗高血糖、抗抑郁、抗癌活性及保肝作用等多种药理活性。有文献^[6]报道采用毛状根培养的方法可使紫丁香苷的含量达到野生药材的 50 倍, 本实验采用细胞悬浮培养的方法可大量合成紫丁香苷, 从工业化应用的角度来看更具优势, 是一条可供选择、具有前景的途径。在细胞培养过程中添加目的产物合成的前体物质及诱导子等可以有效提高目的产物的产量, 本研究组经初步调控实验, 使天山雪莲培养细胞中的紫丁香苷含量由 0.095% 提高到 0.317%, 约为野生天山雪莲药材中紫丁香苷含量的 12 倍, 目前产量可达到 $61.8\,\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 并在筛选、调控过程中逐步增加, 显示出良好的前景。

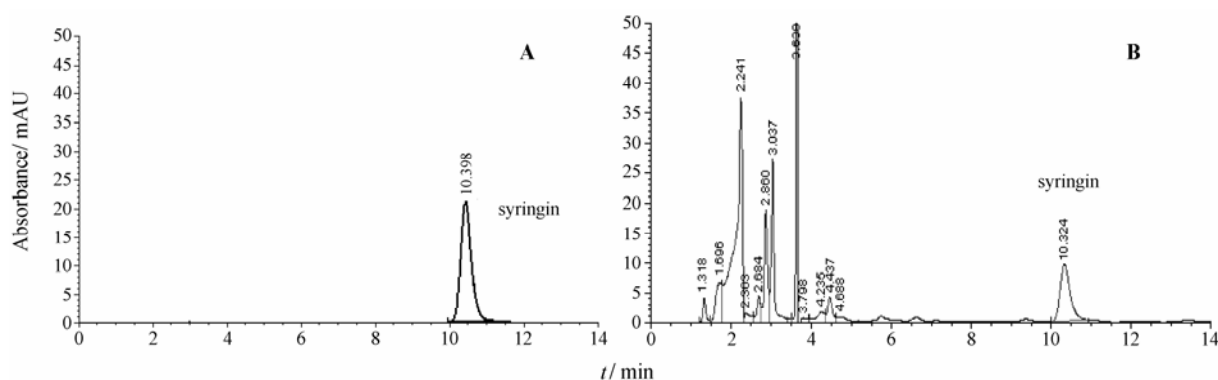


Figure 1 HPLC chromatogram standard of syringin (A) and cell cultures (B)

为了便于对细胞培养调控过程中紫丁香苷的含量进行检测,本研究在分离得到紫丁香苷的基础上建立了天山雪莲组织细胞培养物中紫丁香苷的 HPLC 含量测定方法。含量测定要求快速、准确,为避免提取溶剂及培养物中其他杂质对紫丁香苷含量测定的干扰,本研究对含量测定提取方法进行了考察,发现采用 70% 甲醇超声提取 15 min 效果最佳,该法具有提取率高和杂质较少的特点。

采用二极管阵列检测器对进样后的紫丁香苷对照品进行扫描,结果在 221 nm 和 265 nm 处有最大吸收,为避免末端吸收的干扰,并参考文献选择 265 nm 为检测波长。在优化含量测定色谱条件时,比较了甲醇-水 (15:85, v/v)、甲醇-乙腈-水 (10:5:85, v/v)、甲醇-乙腈-水 (10:3:87, v/v)、乙腈-水 (8:92, v/v) 4 种流动相下样品的色谱表现,为获得较好的分离度及适宜的保留时间,最终选择乙腈-水 (10:90, v/v) 为流动相,该条件下紫丁香苷的保留时间约为 10.3 min (图 1)。

本研究针对性地建立了天山雪莲组织细胞培养物中紫丁香苷的 RP-HPLC 含量测定方法,该方法灵敏度高,选择性强,特别是针对培养物的化学成分特点,优选了较好的紫丁香苷含量测定过程中的提取方法及 HPLC 分析流动相条件,方法可操作性强,含量测定准确、简便、快速。上述研究为下一步对组织细胞培养物中紫丁香苷含量进行调控以及采用细胞培养方法大规模生产紫丁香苷的质量控制奠定了基础。

References

- [1] State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China, Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [2] Yuan XF, Zhao B, Wang YC. Advances in studies on *Saussurea involucrata* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药),

2004, 35: 1424-1426.

- [3] Guo B, Gao M, Liu CZ. *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26: 261-265.
- [4] Zhao DX. Initial studies on tissue culture of snow lotus (*Saussurea involucrata*) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1997, 28: 682-684.
- [5] Wu LQ, Guo SX, Xiao PG. Cell suspension culture and flavonoids production in *Saussurea involucrata* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2005, 30: 965-968.
- [6] Fu CX, Zhao DX, Xue XF, et al. Transformation of *Saussurea involucrata* by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root induction and syringin production [J]. Process Biochem, 2005, 40: 3789-3794.
- [7] Jia JM, Wu CF, Liu W, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of the tissue culture of *Saussurea involucrata* [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28: 1612-1614.
- [8] Choi J, Shin KM, Park HJ, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin [J]. Planta Med, 2004, 70: 1027-1032.
- [9] Niu HS, Liu IM, Cheng JT, et al. Hypoglycemic effect of syringin from *Eleutherococcus senticosus* in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Planta Med, 2008, 74: 109-113.
- [10] Kurkin VA, Dubishchev AV, Ezhkov VN, et al. Antidepressant activity of some phytopharmaceuticals and phenylpropanoids [J]. Pharm Chem J, 2006, 40: 33-38.
- [11] Zhang W, Zhang WD, Zhang C, et al. Antitumor activities of extracts and compounds from the roots of *Daphne tangutica Maxim* [J]. Phytother Res, 2007, 21: 1113-1115.
- [12] Yang WJ, Qi XJ, Zheng Y, et al. Protecting effect of syringin on acute hepatic injury in mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2007, 19: 473-474.
- [13] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473-497.
- [14] Li Y, Guo SX, Wang CL, et al. Study on chemical constituents of *Saussurea involucrata* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 162-163.