

黄瑞香愈伤组织培养及其二次代谢产物的研究

李 银¹ 王凤林² 李书慧³ 吴立军³

(1 北京同仁堂股份有限公司科学研究所 北京 100079; 2 武警总医院; 3 沈阳药科大学)

摘要:目的 运用组织培养技术对黄瑞香的愈伤组织进行诱导,对其二次代谢产物的化学成分进行系统研究。**方法** 用组织和细胞培养技术进行愈伤组织培养,用制备高效液相、液-液萃取、硅胶柱层析、制备薄层层析法分离,波谱法鉴定结构。**结果** 从黄瑞香的二次代谢产物中分离得到了5个化合物单体,分别为瑞香酮、7-羟基香豆素、7-羟基8-O-β-D-葡萄糖香豆素、西瑞香素和丁香苷。**结论** 首次成功诱导得到了黄瑞香的愈伤组织,确定了其最佳诱导条件;首次从黄瑞香的二次代谢产物中分离得到了C6-C5-C6型化合物。

关键词:黄瑞香;组织培养;二次代谢产物;化学成分

中图分类号:R284.2

Study on callus culture of *D. giraldii* and its secondary metabolites

LI Yin¹, WANG Feng-lin², LI Shu-hui³, WU Li-jun³

(1 Scientific Research Institute, Beijing Tongrentang Limited Company, Beijing 10079; 2 General Hospital of Armed Police Forces, 3 Shenyang University of Pharmacy)

Abstract: Objective To induce *D. giraldii* callus by using plane tissue culture technique and to systematically study the chemical components of the *D. giraldii* cultured cells. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC), Gel column chromatography, liquid-liquid extraction, silica gel thin-layer chromatography were used to isolate the compositions and the spectrum was used to identify the structure of the compositions. **Results** Five compounds were isolated and identified as follows: daphneolone (I), umbelliferone (II), daphnetin-8-O-β-D-glucoside (III), daphnoretin (IV) and syringin (V). **Conclusion** It was the first time using plant cell culture technology to obtain *D. giraldii* callus and the best inductive condition was established. The C6-C5-C6 carbon skeleton components were isolated from *D. giraldii* culture cells for the first time.

Key words: *D. giraldii*; culture of callus; secondary metabolites; chemical constituents

我国中药应用历史悠久,但伴随着人类文明的进步,其生存环境遭受到了前所未有的破坏,中药用植物受到破坏的程度已经开始制约我国中药现代化的发展。植物组织和细胞培养技术作为保护中药资源的重要手段之一,对于自然资源有限、生长环境要求特殊、天然生长缓慢的中药资源的保护和开发发挥着重要作用。植物组织和细胞培养作为中药研究与开发的技术平台,既有助于实现中药生产标准化的建立,又能对较高经济价值的中药材二次开发,且

能丰富中药资源的基因和种子库,对我国中药现代化的实现起着推动作用。

中药祖师麻为瑞香科 (*Thymelaeaceae*) 瑞香属植物黄瑞香 (*Daphne giraldii* Nitsche) 的根皮和茎皮,具有“祛风除湿、止痛散瘀”之功效,主治“风湿痹痛、四肢麻木、头痛、胃痛及跌打损伤”等症^[1]。鉴于黄瑞香对其生长环境的要求较为苛刻,而且由于大量采挖,导致植物资源匮乏,祖师麻已被列为国家三级保护中药材。因此,我们拟利用组织和细胞培

养技术对该植物进行研究与开发。这一研究具有重大意义。

1 仪器与试剂

超净工作台:日本 PCC Technology 株式会社;暗室培养箱:日本 IWAKI GLASS 公司;光照培养箱:日本 IWAKI GLASS 公司;温度调节培养箱:Nippon Medical & Chemical Instrument 公司;高压灭菌锅:日本 TOMY 公司;核磁共振波谱仪:JEOL ECA-500 型核磁共振波谱仪;高效液相色谱仪:岛津高效液相色谱仪(LC-10ADvp 型泵、SPD-10Avp 型紫外检测器、RID-10A 型示差检测器、CTO-10ACvp 型柱温箱,色谱柱:MILLIPORE μ BONDASPHERE 5 μ m C₁₈ 100Å 19 × 150 mm)。

实验用各种生长激素均购于 SIGMA CHEMICAL 公司;蔗糖、琼脂粉、NH₄NO₃ 等试剂均购于日本和光纯药工业株式会社;硅胶柱色谱:WakoGDL-RC-200(和光纯药工业株式会社);Merck 60(和光纯药工业株式会社,9385);硅胶薄层色谱:MERCK KCaA20 cm × 20 cm KieselGDI 60 F₂₅₄, 25TLC Plates 20 cm × 20 cm Silica GDI 60 F₂₅₄;大孔吸附树脂:DI-AIONHP-20(NIPPON RENSUI CO.);试剂均为分析纯(和光纯药工业株式会社)。

原植物材料:野生黄瑞香,2003 年 9 月采于陕西秦岭。

2 方法

2.1 愈伤组织培养方法

选取具有较强生长力的黄瑞香嫩叶和茎作为实验材料,经过灭菌后将黄瑞香嫩叶和茎制成约 0.5 cm 长的外植体,平放在愈伤组织诱导培养基(CM、DK、D-N、D10-N)上,进行暗室培养,4 周继代 1 次。在相同的培养条件(D-N 琼脂培养基、pH 5.8、暗室、静止、每 4 周继代 1 次)下,考察了不同温度(10、20、25、30 °C)对黄瑞香愈伤组织的影响,经 16 周培养后,观察生长量的变化。

2.2 愈伤组织二次代谢产物的提取与分离

黄瑞香培养细胞(鲜重 564.24 g)经粉碎后,用甲醇提取,甲醇提取物回收至无醇味后,加入水,依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取,采用硅胶柱层析、薄层制备色谱、高效制备液相等多种色谱技术,共分离得到 5 个化合物。

3 结果

3.1 黄瑞香愈伤组织的最佳培养条件

培养基组分对愈伤组织诱导的形成有直接影

响,实验设计的 4 种培养基中,在不含 NH₄NO₃ 的培养基中诱导出了黄瑞香愈伤组织,表明 MS 培养基中的 NH₄NO₃ 不适合黄瑞香愈伤组织的诱导;高浓度的 2,4-二氯苯氧乙酸对细胞分裂速度无明显影响,且在继代培养中阻碍愈伤组织的生长。不同温度的愈伤组织未出现形态上的明显变化,但生长量有明显差别,实验结果表明,黄瑞香愈伤组织经继代培养 16 周后,10、20、25、30 °C 下的收获量分别为最初接种量的 2.1、5.2、10.4、2.1 倍,此与原植物自然生长环境相符,因此,确定 25 °C 为黄瑞香愈伤组织的最佳培养温度,在此温度下,细胞分裂速度最快,温度过高,褐化严重,细胞分裂速度减慢。本实验运用植物细胞培养技术首次建立了黄瑞香愈伤组织的培养条件。确定黄瑞香愈伤组织最佳诱导条件为:MS8 + 1 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 + 0.1 mg/L 激动素 + 3% 蔗糖 + 0.9% 琼脂粉 + 0.4% 硝酸钾;pH 5.8;培养温度:(25 ± 1) °C。愈伤组织形态:黄白色。

3.2 化合物结构鉴定

化合物 I:无色针晶(MeOH),254 nm 下可观察到暗斑,TLC 用 10% H₂SO₄ 显棕黄色,三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, $[\alpha]_D^{20}$ 为 +7.9° (c0.1062, MeOH), $[\alpha]_D^{20}$ +6.7° (c0.1680, CHCl₃)。该化合物的¹³C-NMR(δ)谱在 sp²杂化区可观察到 1 个酮羰基碳信号 199.5, 8 个芳碳信号 160.6、141.8、130.7、129.8、128.5、128.4、125.9、115.4, 其中 130.7、128.5、128.4、115.4 为重叠碳信号,提示该化合物存在部分对称结构。在 sp³杂化区可观察到 1 个连氧碳信号 67.3 和 3 个烷基碳信号 44.3、38.1、31.8。¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃, δ)谱在芳香区给出对位取代苯环质子信号 7.86(2H, d, J = 7.9 Hz), 6.87(2H, d, J = 7.9 Hz);还给出 5 个芳质子信号 7.15 ~ 7.30(5H, m), 在 HMQC 谱中分别与 2 个叠碳原子 128.4、128.5 和 125.9 的碳信号相关,推测结构中存在 1 个单取代苯环,且与 631.8 的亚甲基碳相连。经查阅文献,该化合物的氢谱数据与文献[2-3]中记载的 1-4-羟基苯基-3-羟基-5-苯基-1-戊酮(即 daphneolone)的氢谱数据基本一致,且实验测得化合物 I 的 $[\alpha]_D^{20}$ 为 +7.9° (c0.1062, MeOH), 与文献[2] daphneolone 的数据 $[\alpha]_D^{20}$ +9.0° (c1.01, MeOH) 相符,因此鉴定化合物 I 为 daphneolone。化合物 I 的 $[\alpha]_D^{20}$ +6.7° (c0.1680, CHCl₃) 与 S-(+)-3-羟基-1,5-二苯基-1-2 戊酮^[4] 的比旋光度

[α]_D + 34.4°比较,旋光方向相同,故鉴定3位碳原子的构型为S型。

化合物II:无色针晶(Acetone),365 nm下可观察到亮蓝色荧光,三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性。¹H-NMR(500MHz,CDCl₃, δ)谱可观察到一组香豆素3,4位特征质子信号7.64(1H,d,J = 9.7 Hz)、6.26(1H,d,J = 9.7 Hz)和一组苯环AMX耦合系统质子信号7.36(1H,d,J = 8.6 Hz)、6.79(1H,dd,J₁ = 8.6 Hz,J₂ = 2.6 Hz)、6.82(1H,d,J = 2.6 Hz)。推测该化合物为7-羟基香豆素或6-羟基香豆素。经与文献[4]对照,其核磁数据与文献中报道的7-羟基香豆素的核磁数据基本一致,故鉴定化合物II为7-羟基香豆素,即伞形花内酯。

化合物III:白色粉末,365 nm下可观察到黄绿色荧光,三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性,薄层酸水解检测到D-葡萄糖。¹H-NMR(500MHz,DMSO-d₆, δ)谱在芳香区给出1组香豆素3,4位特征质子信号6.23(1H,d,J = 9.5 Hz)和7.93(1H,d,J = 9.5 Hz),1组苯环AM耦合系统的质子信号7.31(1H,d,J = 8.6 Hz)和6.87(1H,d,J = 8.6 Hz);在饱和区3.0~5.2之间给出1组糖的质子信号,其端基质子为4.96(1H,d,J = 7.9 Hz),耦合常数表示葡萄糖为 β 构型。¹³C-NMR谱观察到15个碳信号,其中6个为葡萄糖的碳信号,9个sp²杂化碳信号。该化合物的碳氢核磁数据与文献[5]报道的7-羟基-8-O- β -D-葡萄糖香豆素的核磁数据基本一致,故鉴定化合物III为7-羟基-8-O- β -D-葡萄糖香豆素,即瑞香素-8-O- β -D-葡萄糖苷(daphnetin-8-O- β -D-glucoside)。

化合物IV:黄色粉末,365 nm下可观察到蓝色荧光,三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性。该化合物¹H-NMR(500MHz,DMSO-d₆, δ)谱给出8个芳质子,其中有1组香豆素特征的3,4位质子信号:8.03(1H,d,J = 9.4 Hz,H-4)、6.37(1H,d,J = 9.4 Hz,H-3);1组苯环AMX耦合系统质子信号:7.70(1H,d,J = 8.3 Hz,H-5)、7.10(1H,br.d,J = 8.3 Hz,H-6)、7.17(1H,br.s,H-8);3个孤立芳质子信号:7.87(1H,s,H-4)、7.20(1H,s,H-5)、6.86(1H,s,H-8);在饱和区观察到1个甲氧基质子信号3.81(3H,s)。结合¹³C-NMR谱给出19个碳信号,除了甲氧基外,剩下的18个碳信号均在sp²杂化区,可推测该化合物为双香豆素。经查阅文献[2,6],该化合物的碳氢数据与文献中报道的西瑞香素的碳氢数据基本一致,故鉴定化合物IV为西瑞香素(daphnoretin)。

化合物V:无色针晶(MeOH),254 nm下可观察

到暗斑,TLC用10% H₂SO₄显紫红色。¹H-NMR(500 MHz,CD₃OD, δ)谱在芳香区可观察到2个化学环境相同的芳质子信号6.75(2H,s),1组反式烯氢耦合质子信号6.54(1H,d,J = 16.0 Hz)、6.32(1H,dt,J = 16.0 Hz,5.7 Hz),在饱和区显示有2个化学环境相同的甲氧基质子信号3.85(6H,s)。¹³C-NMR(125MHz,CD₃OD, δ)谱显示有6个芳碳信号,1组糖的碳信号以及1个甲氧基碳信号,化合物的碳氢数据与文献[7]中报道的丁香苷的碳氢数据基本一致,故鉴定化合物V为丁香苷(syringin)。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科技出版社,1977:1739.
- [2] ZHUANG LG, SELIGMANN O, JURCLC K, et al. Inhaltsstoffe von *Daphne tangutica* [J]. *Planta Medica*, 1982,45(3):173.
- [3] SHIGEHUMI K, SHIGEKI H, KOJIRO W, et al. Daphneolone in roots of *Daphne odora* [J]. *Phytochemistry*, 1974, 13(10):2332.
- [4] MONIZ WB, PORANSKI CF, SOJKA SA. Carbon-13 C-DNP during photolysis of di-tert-butyl ketone in carbon tetrachloride[J]. *Organic Chemistry*, 1975,40(20):1775.
- [5] ULLAH N, AHMED S, MOHAMMAD P, et al. Chemical constituents of *Daphne oleoides* [J]. *Fitoterapia*, 1999, 70(2):214.
- [6] KREHER B, NESZMELYI A, WAGNER HT. A ricoumarin rhamnopyranoside from *Daphne mezereum* [J]. *Fitoterapia*, 1999, 70(2):214.
- [7] GRECA M D, FERRARA M, FIORENTINO A, et al. Antialgal compounds from *zantedeschia aethiopica*[J]. *Phytochemistry*, 1998,49(5):1299.
- [8] 高丽君,崔建华,刘风云,等. 植物次生代谢物的应用和开发[J]. *生物学通报*, 2004,39(7):15-17.
- [9] 于德泉,杨峻山. 分析化学手册:第七分册[M]. 北京:化学工业出版社,1999:858-862.
- [10] 刘 谦,张永清. 利用药用植物组织培养生产次生代谢产物的研究进展[J]. *齐鲁药事*, 2006,25(6):350.
- [11] 周光雄,杨永春,石建功. 祖师麻活性化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2007,31(7):555.
- [12] 周光雄,王国平,杨永春,等. 黄瑞香茎皮的化学成分研究[J]. *中草药*, 2006,38(3):327.
- [13] 谢 静. 生物技术与药用植物次生代谢产物[J]. *西南军医*, 2006,9(3):89.
- [14] 王梦亮,任振兴,黄登宇,等. 黄芩愈伤组织培养及黄芩苷合成调控的研究[J]. *中草药*, 2006,37(6):924.

(收稿日期:2007-09-27)