

黄连细胞培养物中小檗碱的分离与鉴定

毛堂芬 颜 谦 方周伯 沈永珍

(贵州省农科院生物技术研究所 贵阳 550006)

摘 要 用黄连幼叶切块,接种在含 1.0~2.0mg/L 2,4-D 和 0.1mg/L KT 的 6,7-V 固体培养基上,诱导形成愈伤组织。选择较松散的愈伤组织转入液体悬浮培养,获得游离细胞和细胞聚集体。通过平板培养和细胞株的筛选,选择小檗碱含量较高的细胞株。经 35 次转代培养后,进行固体、液体培养,收集悬浮培养细胞进行化学提取和分离,获得黄色晶体,经 TLC、UV、IR、MS 鉴定分析为小檗碱,与天然植物提取分离的小檗碱具有相同的生理活性。

关键词 黄连,细胞培养,小檗碱,分离,鉴定

黄连(*Coptis chinensis* Franch)属毛茛科多年生草本植物。主要分布于川、黔、滇、鄂等省高寒阴暗潮湿的局部山区,为我国西南部著名的中药材。黄连根茎含多种生物碱,主要为小檗碱(Berberine),又名黄连素,具有抗菌、消炎、降压等作用,是中国、日本及东南亚国家常用的重要药物。由于黄连生长缓慢,生产栽培较困难,不易扩大普及,一般提取小檗碱的原料为三颗针(*Berberis soulieana* Schneid)、黄柏(*Phellodendron chinenses* Schneid)等野生植物资源。但这些原料的小檗碱含量低,原材料需求量大,加之长期只挖不栽,造成植物资源枯竭,使市场供应紧张。因此,利用黄连细胞培养物提取小檗碱具有重要意义。日本为了解决药源紧缺,曾对日本黄连(*Coptis japonica*)组织和细胞培养作了大量研究^[1~5]。我国在 80 年代以来,对中国黄连组织和细胞培养也进行了较系统的研究^[6~14],但从细胞培养物中分离和鉴定小檗碱,迄今尚未见到报道。

1 材料与方 法

1.1 愈伤组织的诱导及细胞悬浮培养

黄连(*Coptis chinensis*)采集于贵州省六枝、道真等地。用黄连幼叶经升汞消毒和无菌水冲洗后,将幼叶切块接种在含 1.0~2.0mg/L 2,4-D 和 0.1mg/L KT 的 6,7-V 固体培养基上,诱导形成愈伤组织。经 3~5 次继代后,选择较松散的愈伤组织转入不加琼脂的液体培养基内,置于 THZ-82 型恒温振荡器上进行悬浮培养,转速 100~120r/min,暗培养温度 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$,培养 15~20d 继代一次。

1.2 细胞株的筛选

选择细胞分散度大的悬浮培养瓶,用⁶⁰Co- γ 射线照射,照射剂量分别为 30、50、80Gy。剂量率 0.6014Gy/min。再用 300 μm 孔径的尼龙网滤取细胞悬浮液,检测和调整细胞容

贵州省科委资助项目。

本文于 1996 年 5 月 20 日收到。

度^[3,15]为 4×10^4 个/ml(含聚集体细胞)左右。平板培养基含 2.5mg/L NAA、0.1mg/L 6-BA(或 KT)、6.0mg/L L-酪氨酸及 0.8% 琼脂粉。当培养基冷至 35℃ 左右时,加入细胞悬浮液为平板培养基的 30% 左右,并迅速混合,倒入直径 7.5cm 的培养皿中,每个培养皿加入混合液为 12ml 左右,荡平、加盖;外加一套直径 9cm 的培养皿,皿底放一张灭菌后的滤纸,用无菌水浸湿,加外盖后用医用胶布密封。置于 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 的培养箱内进行暗培养。当培养到 55d 左右,长出直径达 0.1~0.5cm 的细胞团。选择色泽较黄和生长较快的细胞团^[15],转入试管斜面培养。经 2~3 次继代繁殖后,部分用于高速薄层扫描检测小檗碱含量^[14]。入选的细胞株经继代繁殖后,再用于液体悬浮培养,按上述方法经 3 次反复筛选。从 ^{60}Co - γ 射线照射 30Gy 的材料中,选择出小檗碱含量达 6.12% 的细胞系。

1.3 扩大培养

选用经 35 次继代培养的细胞系为扩大试验材料。用稍加调整的 6,7-V 液体培养基。培养基含 2.0mg/L NAA、0.05mg/L KT 及 6.0mg/L L-酪氨酸。每升培养基接种 45g 左右湿细胞,液体悬浮培养 23d 后,滤取细胞培养物,供提取分离鉴定样品。

1.4 提取和分离

用 0.5% H_2SO_4 浸渍黄连细胞培养物,共提取 3 次,每次 24h,合并酸性提取液。加浓 HCl 调至 pH1,再加溶液量 12% 左右的固体 NaCl,搅拌均匀,除去上层泡沫,静置析出黄色沉淀,滤取粗晶。再用热水溶解粗晶,加石灰乳调至 pH8.5~9,趁热过滤,待滤液冷却后加浓 HCl 调至 pH2~3,静置析出黄色晶体,滤取的晶体用蒸馏水冲洗至中性,70℃ 干燥。然后用乙醇重结晶获得黄色晶体,供鉴定样品。

1.5 测定方法

硅胶薄层用青岛海洋化工厂生产的硅胶 G 制板^[14],加 0.4% CMC-Na(羧甲基纤维素钠)溶液调制,用 PQB-II 型薄层自动铺板器(重庆新力电器实验厂)铺板,板厚 0.2mm。小檗碱标准品由贵阳制药厂提供。展开剂为正丁醇:冰醋酸:水 = 7:1:2。UV 用 Hitachi 200-10 型紫外光谱仪测定;IR 用 Shimadzu IR-435 型红外光谱仪测定,KBr 压片;MS 用 KyKyQP-1 000A 型质谱仪测定。抗菌活性测定采用管碟法,供试菌种为福氏痢疾杆菌 I (*Shigella flexneri* Castelland et Chalmers I) 和金黄色葡萄球菌 CATCC 259 237 (*Staphylococcus aureus* CATTC 259237),由贵阳医学院提供。

2 结果与讨论

2.1 薄层层析

供检晶体经薄层层析检查,在紫外光下检查呈现一个黄色斑点。处于与小檗碱标准品有相同的 R_f 值为 0.46。

2.2 波谱鉴定

$\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 230、266、351、430; $\text{UV}\lambda_{\text{min}}^{\text{EtOH}}$ nm: 250、305、380。从紫外光谱吸收峰特征显示此化合物具有原小檗碱类型生物碱的基本骨架^[3-5,16],与小檗碱标准品的紫外吸收光谱相同(图 1)。

$\text{IR}\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1 600(苯, C=C), 1 503(苯, C=C), 1 364、1 275(=C-O-), 1 230(=C-O-), 1 034(C-O-), 与小檗碱标准品测定数据相一致(图 2);与 Furuya^[4]、Yamada 等^[5]对日本黄

连细胞培养物中提取分离的小檗碱红外光谱测定结果相吻合。MS m/e (%): 337(5), 322(79), 321(100), 320(57), 307(28), 306(34), 304(26), 292(39), 278(65)。最大质荷比为 337。与小檗碱标准品(图 3)和文献值^[5]是一致的。

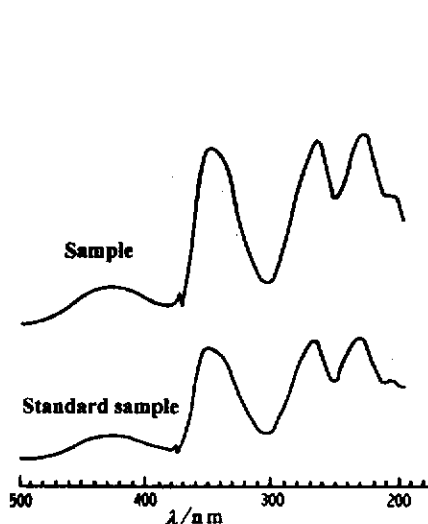


图 1 黄连细胞培养物中分离的小檗碱晶体紫外吸收光谱

Fig. 1 The ultraviolet spectrum of berberine crystal isolated from cell cultures of *Coptis chinensis*

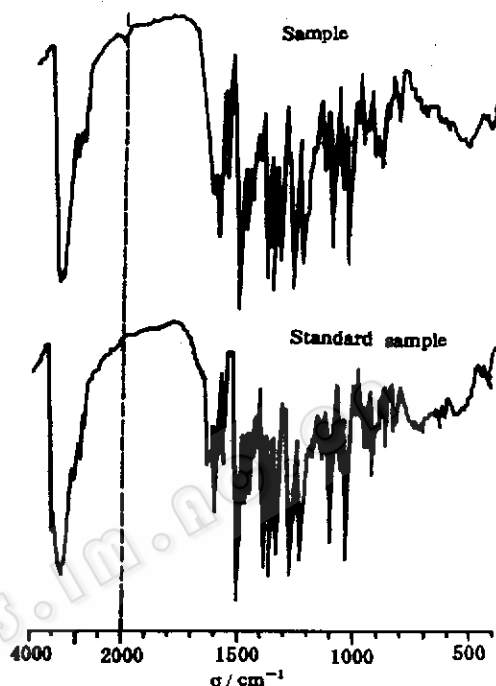
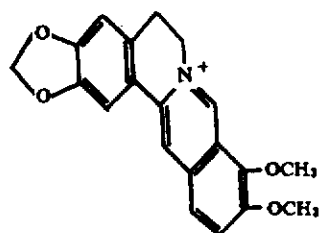


图 2 黄连细胞培养物中分离的小檗碱晶体红外吸收光谱

Fig. 2 The infrared spectrum of berberine crystal isolated from cell cultures of *Coptis chinensis*

通过 TLC、UV、IR、MS 鉴定分析,供检的黄色晶体与小檗碱标准品为同一物质。其结构式如下:



2.3 抗菌鉴定

抗菌鉴定结果(数据略)表明,供检样品在 100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度以上对福氏痢疾杆菌 I 有抑菌作用,500 $\mu\text{g/ml}$ 浓度以上对金黄色葡萄球菌 CATCC 259 237 有抑菌效果。并随着供检样品浓度的增加抑菌效果愈显著。小檗碱标准品与供检样品在同一浓度下,抑菌圈直径大小相似,无显著差异。证明供检样品与小檗碱标准品具有相同的抗菌活性。

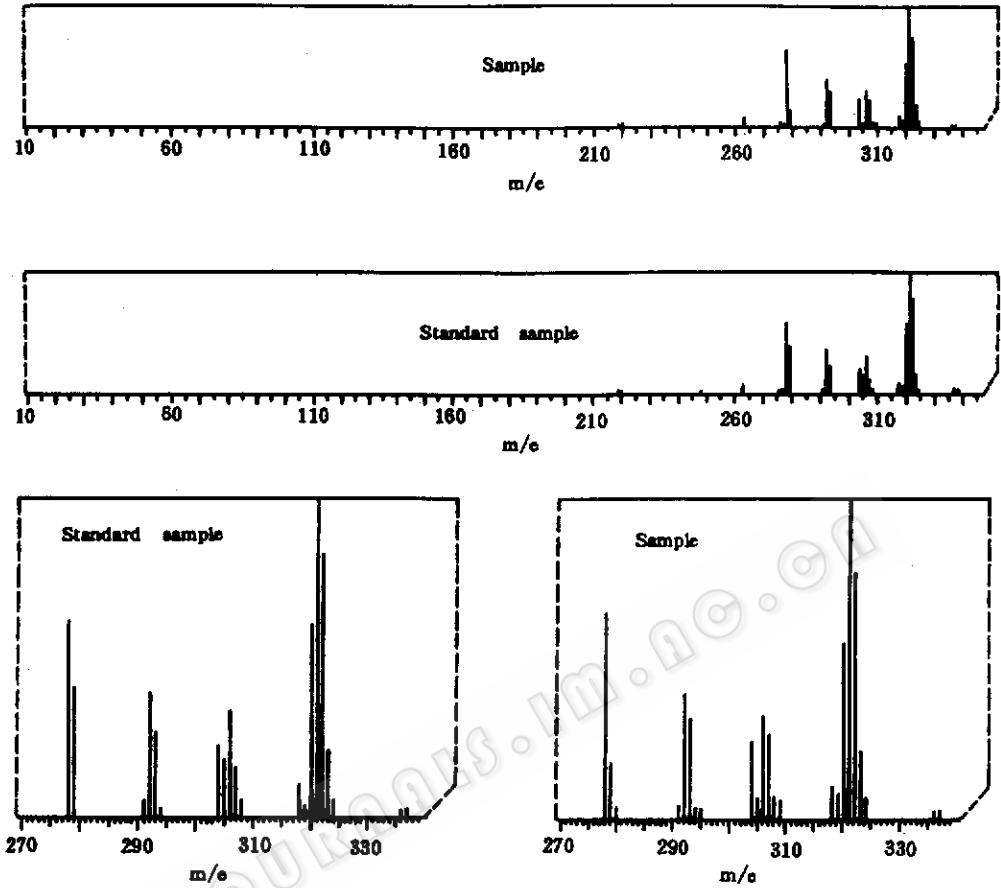


图3 黄连细胞培养物中分离的小檗碱质谱

Fig.3 The mass spectrum of berberine crystal isolated from cell cultures of *Coptis chinensis*

据文献报道^[16,17],黄连根茎的主要药效成分为小檗碱,5~35年生的家栽和野生黄连根茎小檗碱含量为3.7%~6.7%,其它生物碱仅含2.35%~3.80%。我们在黄连细胞培养的试验中^[13,14],通过23d悬浮培养细胞的小檗碱含量达3%~6%,相当于黄连根茎的含量。从黄连细胞培养物中提取分离的小檗碱,经波谱分析和抗菌鉴定,具有与天然植物中小檗碱相同的化合物结构和生理活性,这对应用于工业生产具有重要意义。

在黄连根茎中含药根碱0.3%左右,具有小檗碱相似的抗菌作用^[18]。在黄连细胞培养物中药根碱含量达1%左右,比原植物根茎含量增加2~3倍,这与侯嵩生等^[19]在九连小檗的细胞培养研究结果有类似的趋势。说明黄连在离体细胞培养条件下,各种生物碱组成比例发生了变化,其原因尚不清楚。而药根碱亲水性较强,在水中溶解度比小檗碱大,有助于用药和吸收,而天然植物中含量较少,这对综合开发黄连细胞培养物具有一定意义。

致谢 本院中心实验室乐俊明同志代测红外光谱,韩峰同志代测紫外光谱,贵州大学

化学系孟春渊同志代测质谱。在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1]山本久子,富林 毅. 生药学杂志(日), 1981, 35(1):1~8.
- [2]Ikuta A, Syono K, Furuya T. Phytochemistry, 1975, 14:1 209~1 210.
- [3]Sato F, Yamada Y. Phytochemistry, 1984, 23:281~285.
- [4]Furuya T, Syono K. Phytochemistry, 1972, 11:175.
- [5]Yamada Y, Sato F. Phytochemistry, 1981, 20:545~547.
- [6]丁葆祖, 杨静仪, 李晋川等. 中草药, 1984, 15(2):28~29.
- [7]丁葆祖, 杨静仪, 李晋川等. 中草药, 1987, 18(9):34~36.
- [8]胡之璧, 顾者琰, 黄炼栋等. 植物生理学通讯, 1988, (6):34~35.
- [9]芮和恺, 忻晓君, 顾慧芬等. 中药材, 1989, 12(5):12~13.
- [10]芮和恺, 忻晓君, 顾慧芬等. 中药材, 1990, 13(3):3~5.
- [11]方周伯, 卢 萍, 杨 斌等. 西南农业学报, 1989, 2(4):51~55.
- [12]方周伯, 黄凤英, 李淑久等. 西南农业学报, 1990, 3(3):13~18.
- [13]方周伯, 顾 谦, 黄凤英. 西南农业学报, 1992, 5(2):42~48.
- [14]毛堂芬, 顾 谦, 方周伯. 生物技术, 1994, 4(3):33~35.
- [15]中国科学院上海植物生理研究所细胞室编译. 植物组织和细胞培养, 上海:上海科学技术出版社, 1978, pp.38~47.
- [16]王宪楷, 杨培全, 陈新民. 药学报, 1964, 11(6):389~392.
- [17]庄 平, 黄明远. 中草药, 1994, 25(8):425~428.
- [18]方忻平, 王天志, 张 浩等. 中药材, 1989, 12(3):33~35.
- [19]国家医药管理局中草药情报中心站编. 植物药有效成分手册, 北京:人民卫生出版社, 1986, pp637~638.
- [20]侯嵩生, 李新明, 吴玉兰等. 植物学报, 1988, 30(1):62~65.

Isolation and Identification of Berberine from Cell Cultures of *Coptis chinensis*

Mao Tangfen Yan Qian Fang Zhoubo Shen Yongzhen

(Institute of Biotechnology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006)

Abstract The callus had been induced and formed by inoculating the pieces of cut young leaves of *Coptis chinensis* on 6.7-V solid medium containing 1.0~2.0mg/L of 2.4-D and 0.1mg/L of kinetin. The loose callus were choosed and transfered into fluid suspension culture, free cells and cell aggregate were obtained. Cell line with higher content of berberine had been selected out by plating technique and screening. After 35times of transferring, the selected cell line was cultured on solid and in liquied medium. The cells in fluid suspension culture had been collected, extracted and isolated with chemicals, a yellow crystal could be obtained. Identificated and analysed by TLC, UV, IR, MS, it was proved that the crystal was berberine, which possessed same structure and physiological activity with that from natural plant.

Key words *Coptis chinensis*, cell culture, berberine, isolation, identification