

# 组织培养川贝母化学成分和药理作用的研究

朱丹妮 蒋莹 陈婷 高山林<sup>1</sup>

(中药理论研究室; 遗传育种研究室)

**关键词** 暗紫贝母; 生物碱; 培养鳞茎; 止咳化痰

贝母为常用中药之一, 味苦、性寒, 有清热润肺, 化痰止咳、散结等功能, 用于痰热咳嗽、咯痰带血, 瘰癧疮疡肿毒。国内入药主要是川贝、浙贝、平贝和伊贝。《本草纲目拾遗》将川贝和浙贝明确分开, 谓川贝味甘而补, 虚寒咳嗽以川贝为宜, 可见川贝有其独特的药效。

暗紫贝母 (*Fritillaria unibracteata*) 是川贝中的真品和主要品种, 只能生长在海拔3500 m左右的高山地区, 目前人工栽培尚未成功, 仅靠野生资源供药用。由于资源短缺, 供需矛盾突出, 为扩大贝母的药用资源, 我校遗传育种研究室应用生物技术, 对暗紫贝母鳞茎器官培养技术进行了系统研究。本文报道组培川贝的总生物碱及微量元素的含量测定, 对组培川贝及野生川贝的化学成分及生物碱种类进行定性比较, 同时对组培川贝母的镇咳祛痰作用进行了实验研究。

## 1 实验材料

### 1.1 样品

组织培养川贝由本校遗传育种研究室提供; 野生川贝购自四川阿坝州红原县, 经本校生药学教研室鉴定为暗紫贝母。

### 1.2 仪器和试剂

722光栅分光光度计; pH S-2C精密pH计; PBQ-1型薄层自动铺板器; AA-670原子吸光/火焰发射分光光度计(配岛津PR-4记录仪); 实验所用试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

昆明种小鼠(本校动物房), 雌雄各半。体重18~22 g, 供安全性试验和镇咳试验; 20~25 g 供祛痰试验。

## 2 方法及结果

### 2.1 组培川贝化学成分研究

#### 2.1.1 化学成分预试

参照文献<sup>[1]</sup>进行化学成分预试, 结果表明组培川贝及野生川贝药材都可能含有生物碱、有机酸、皂甙、氨基酸等化学成分。

#### 2.1.2 贝母生物碱的定性分析

贝母样品于60℃干燥, 粉碎过60目筛, 取贝母适量, 加等量10%氨水碱化湿润, 用氯仿回流, 冷却后分出氯仿液, 用2.5%盐酸萃取三次, 每次10 ml, 加入20%氨水碱化至pH 10, 以氯仿萃取(10 ml×3), 合并氯仿液, 回收溶剂, 残渣用1~2 ml氯仿溶解, 点样, 薄层层析见图1, 图谱显示, 两种贝母具有相似的几种生物碱。

#### 2.1.3 酸性染料比色法测定组培川贝总生物碱含量

贝母碱在pH 5缓冲溶液条件下<sup>[2]</sup>, 与染料溴麝香草酚蓝或溴甲酚绿能形成黄色离子对, 可定量地被氯仿提出。本实验以贝母碱标准品为基准物, 用溴甲酚绿作染料, 在pH 5缓冲溶液条件下, 于410 nm进行比色测定<sup>[3]</sup>。标准溶液回归方程为 $y = -0.0224 + 1.8941x$  ( $r = 0.9991$ ,  $n = 5$ )

精称样品0.5 g, 加适量10%氨水碱化, 置

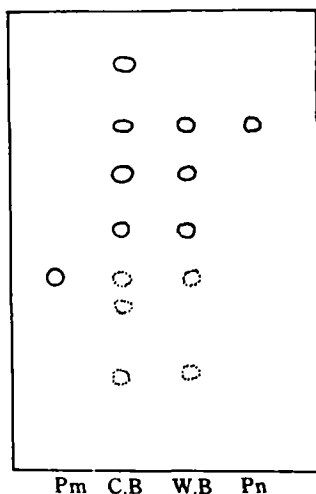


Fig 1. TLC of wild bulb (W. B) and cultured bulb (C. B) of *Fritillaria unibracteata*

Solvent: cyclohexane:ethyl acetate:diethylamin=6:4:1

Detection reagent: drangendorff; Pm: peimine; Pn: peiminine

索氏提取器中乙醚浸泡过夜,热回流3 h,回收乙醚,残渣用氯仿溶解,定量转移至10 ml 容量瓶中,吸取1~2 ml,移至60 ml 分液漏斗中,加氯仿至8 ml,pH5缓冲液2 ml,0.001 mol/L 溴甲酚绿2 ml,剧烈振摇1 min,静置15 min,氯仿层过干滤纸至10 ml 容量瓶中,水层用氯仿洗,合并氯仿液,定容,410 nm 测定吸收度,加样回收率平均为97.43%±4.85%(n=6),CV=0.85%。

本试验分别对不同生长时间,不同培养温度,不同激素配比、不同培养基组成、不同培养方法等各个试验的30多批组培川贝母样品进行了总生物碱含量测定,每个样品均取二次平行测定之均值,平行误差不超过5%,测定结果见表1。

从表1可见,除25℃培养条件下,因温度过高,对生物碱积累不利,总生物碱含量较低外,其他各组试验,组培川贝总生物碱含量均比野生川贝总生物碱含量高,最高的达到1.67倍,从总生物碱含量测定结果看,通过组织培养方法生产的川贝能有效地保持和提高其总生物碱的含量及药用价值。

#### 2.1.4 微量元素的测定

微量元素参与生物体中酶、激素和维生素的生理作用,对有机体的正常代谢和生存也有着重要意义。为了全面评价组培川贝的质量,对两种贝母的15种元素含量进行分析比较,结果见表2。

Tab 1. Comparison of alkaloid content of cultured bulb samples from different cultural experiments with that of wild bulb

Sample source		Content of alkaloid, %	Ratio
Medium Exp.	Ms	0.0447	1.11
	B <sub>5</sub>	0.0603	1.49
	SH	0.0446	1.11
	67-V	0.0498	1.23
Kinin-auxin Exp.	1	0.05144	1.27
	2	0.05255	1.30
	3	0.05097	1.26
	4	0.05190	1.29
	5	0.06734	1.67
	6	0.05796	1.43
	7	0.04866	1.21
	8	0.04942	1.23
Growth Curve Exp.	30d	0.06031	1.49
	40d	0.04905	1.22
	50d	0.05842	1.45
	60d	0.05790	1.44
	70d	0.05781	1.43
	80d	0.05163	1.28
Light-Tem. Exp.	15℃Light	0.05132	1.27
	15℃Dark	0.06326	1.57
	20℃Light	0.06685	1.66
	20℃Dark	0.06327	1.57
	25℃Light	0.02867	0.71
	25℃Dark	0.03495	0.87
Simplified Medium Exp.	ZC	0.04730	1.17
	KC	0.04469	1.11
	KB	0.05124	1.27
	ZB	0.06685	1.66
Cultural method Exp.	Solid CK	0.06685	1.66
	Rotation	0.05025	1.25
	Shake	0.06753	1.67
Wild Bulb		0.0403	1

Tab 2. Comparison of 15 elements content between wild bulb and cultured bulb of *Fritillaria unibracteata* (ppm)

Element	Wild bulb	Cultured bulb
Mn	12.52	136.17
Cu	1.95	1.47
Zn	13.19	70.58
Fe	55.70	129.68
Mg	235.68	774.71
Ca	105.51	819.87
Ni	2.51	2.50
Na	13.84	1513
K	8266	23930
Sr	—	0.17
Mo	0.068	1.586
Co	0.039	0.874
Cd	0.027	0.005
Pb	0.092	0.027
Cr	1.059	0.808

据报道,人体的必需元素有27种,其中常量元素11种,微量元素16种。对15种元素的测定结果表明,K,Na,Ca,Mg,Mn,Zn,Fe,Mo,Co的含量,组培川贝比野生川贝有较大的增加,而有害元素Pb,Cd的含量,则组培川贝比野生川贝有所降低。究其原因,可能在组培过程中,川贝鳞茎培养物吸收了培养基中对人体有益的一些必需元素,而有害元素的降低,则是由于继代次数的增加而不断稀释的缘故。

微量元素对人体机能具有协同和拮抗作用,目前这方面的作用正越来越受到人们的重视,组培川贝能使对人体有益的微量、常量元素的含量增加,这无疑对人体健康治病是有益的。

## 2.2 组培川贝镇咳祛痰的药理实验研究

### 2.2.1 毒性试验

小鼠ig组培川贝和野生川贝混悬液,8.0 g/kg为可能用的最大剂量,观察1 wk,小鼠一切活动正常,均未出现死亡。

### 2.2.2 祛痰试验

#### 2.2.2.1 酚红标准曲线的绘制

精密吸取不同浓度的酚红标准液1.00 ml于试管中,各加无水乙醇2 ml,摇匀,离心,取上

清液于722光栅分光光度计558 nm处测定吸收度,绘制标准曲线,求得回归方程为 $y = 0.06087x - 0.00414$  ( $r = 0.9999$ ,  $n = 5$ )。

#### 2.2.2.2 祛痰作用

采用酚红排泌法,稍加改进。取20~25 g小鼠若干,分四批进行,每批鼠雌雄兼用,随机分为三组(每组12~16只):生理盐水,组培川贝和商品川贝组。其中三批以3.0 g/kg (ig)剂量作时效曲线,分别在给药后30、60、120 min立即ip 0.25%酚红(0.2 ml/10 g)。以生理盐水作对照。各鼠均在给酚红后30 min处死,分离气管,用5%NaHCO<sub>3</sub>抽洗气管三次,每次0.5 ml,合并洗液,精密吸取上清液1 ml于离心管中,加无水乙醇2 ml,摇匀、离心,取上清液于722光栅分光光度计558 nm处测得吸收度,从标准曲线换算成浓度,求得排泌酚红的含量。结果表明,组培川贝和野生川贝均具有祛痰作用,给药60 min后为作用峰值,给药2 h后各药作用下降(见表3)。据上述结果,选时效曲线峰值时间60 min,按1.5 g/kg及3.0 g/kg给药,同上操作。结果表明,两种川贝的祛痰效果均随着剂量加大而增强(见表4)。

Tab 3. Comparison of cleaning away phlegm effect between wild bulb and cultured bulb (different time after ig)

Group	Content of phenol red, $\mu\text{g/ml}$ , $\bar{x} \pm s$					
	30 min	Index	60 min	Index	120 min	Index
Sanline	$0.47 \pm 0.19$	—	$0.46 \pm 0.22$	—	$0.34 \pm 0.12$	—
Cultured bulb	$0.48 \pm 0.30$	1.02	$0.88 \pm 0.42^{***}$	1.92	$0.46 \pm 0.20$	1.35
Wild bulb	$0.48 \pm 0.19$	1.02	$0.93 \pm 0.48^{***}$	2.04	$0.55 \pm 0.20^{***}$	1.63

\*\*\*  $P < 0.01$  vs sanline

Tab 4. Comparison of cleaning away effect between wild bulb and cultured bulb (different doses)

Group	Content of phenol red, $\mu\text{g/ml}$ , $\bar{x} \pm s$			
	1.5 g/kg	Index	3.0 g/kg	Index
Sanline	$0.49 \pm 0.28$	—	$0.46 \pm 0.22$	—
Cultured bulb	$0.70 \pm 0.34$	1.43	$0.88 \pm 0.42^{***}$	1.92
Wild bulb	$0.77 \pm 0.41$	1.56	$0.93 \pm 0.48^{***}$	2.04

\*\*\*  $P < 0.01$  vs sanline

### 2.2.3 镇咳试验

采用氨水引咳法,取18~22 g小鼠若干,分四批进行,每批鼠雌雄兼用,随机分为四组(每组12~14只):生理盐水、组培川贝、野生川贝和

磷酸可待因组,其中三批按3.0 g/kg (ig)剂量作时效曲线,分别在给药后30、60、120 min于玻璃钟罩内给30  $\mu\text{l}$ 氨水(25.0%~28.0%)引咳,以生理盐水及可待因60 mg/kg作对照,记录小鼠2 min内咳嗽次数。咳嗽以小鼠腹肌剧烈收缩,张口有时伴有咳嗽声为准。从小鼠2 min内咳嗽次数的结果可知,组培川贝和野生川贝均具有显著的镇咳作用,给药后30 min作用较强,各组止咳率大于50%,在60 min时两种川贝作用均已下降,但直至2 h药物仍有显著作

用,见表5。根据上述结果,选镇咳作用较强的时间30 min,按1.5 g/kg及3.0 g/kg给药,以生理盐水及可待因作对照,同上操作。结果表明,组

培川贝和野生川贝药材一样,止咳效果随剂量加大而增强(见表6)。

Tab 5. Comparison of relieving cough effect between wild bulb and cultured bulb (different time after ig)

Group	Times of cough in two minutes, $\bar{x} \pm s$					
	30 min	Ratio, %	60 min	Ratio, %	120 min	Ratio, %
Sanline	26 $\pm$ 7	—	23 $\pm$ 6	—	24 $\pm$ 5	—
Cultured bulb	11 $\pm$ 5***	58	14 $\pm$ 6***	39	18 $\pm$ 5***	25
Wild bulb	9 $\pm$ 2***	65	14 $\pm$ 4***	39	19 $\pm$ 4***	21
Codeine	8 $\pm$ 3***	69	11 $\pm$ 4***	52	14 $\pm$ 2***	42

\*\*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs sanline

Tab 6. Comparison of relieving cough effect between wild bulb and cultured bulb in different doses.  $\bar{x} \pm s$

Group	Dose	Times of cough in 2 min	Ratio, %	Dose	Times of cough in 2 min	Ratio, %
Sanline		23 $\pm$ 5			26 $\pm$ 7	
Cultured bulb	1.5 g/kg	14 $\pm$ 3***	39	3.0 g/kg	11 $\pm$ 5***	58
Wild bulb	1.5 g/kg	14 $\pm$ 2***	39	3.0 g/kg	9 $\pm$ 2***	65
Codeine	30 mg/kg	10 $\pm$ 3***	57	60 mg/kg	8 $\pm$ 3***	69

\*\*\* $P < 0.01$  vs sanline

### 3 结 论

组培川贝和商品药材川贝一样具有相同的化学成份和生物碱的种类,通过鳞茎组织培养能有效地保持和提高川贝的主要活性成分即总生物碱含量,并提高人体必需元素的含量,降低对人体有害元素的含量,组培川贝与野生川贝具有同样镇咳祛痰作用,两药毒性均较低,比较安全。实验表明,用组培川贝代替野生川贝供药

用是可能的,预示用组培技术进行川贝鳞茎的器官培养是扩大川贝药用资源的有效途径。

### 参 考 文 献

- 徐任生,陈仲良. 中草药有效成分提取与分离. 上海: 上海科学技术出版社, 1983; 10—12
- 张秀琴,沙世炎. 贝母中总生物碱的含量测定. 中草药通讯, 1976; (2): 13
- 李 萍,徐国钧,金蓉鸾等. 中药贝母类的研究XV. 21种贝母总生物碱含量测定. 中国药科大学学报, 1990; 21(5): 319

## Research on Chemical Components and Primary Pharmaceutical Actions of Cultured Bulb of *Fritillaria Unibracteata*

Zhu Danni, Jiang Ying, Chen Ting and Gao Shanlin

Institute of Traditional Chinese Pharmacy

Qualitative and quantitative analysis of alkaloids in cultured bulb of *Fritillaria unibracteata* were made respectively by TLC and acid dye colorimetry as compared with that in wild bulb. The content of microelements in cultured bulb also be determined. The results obtained indicated that the types of alkaloids in cultured bulb were similar to that in wild bulb, the contents of alkaloid and beneficial microelements in cultured bulb were higher than that in wild bulb, but harmful microelements were lower in cultured bulb. Furthermore, the actions of relieving cough and cleaning away phlegm of cultured bulb were compared with that of wild bulb. The results of primary pharmaceutical experiments showed that both bulbs have similar effects of relieving cough and cleaning away phlegm on mice. It is possible to use cultured bulb as a substitute for wild bulb for medicinal uses.

**Key words** *Fritillaria unibracteata*; Alkaloid; Cultured bulb; Relieving cough; Cleaning away phlegm