

组织培养暗紫贝母的药理作用

高山林 夏艳 谭丰苹

(中国药科大学, 南京 210038)

摘要: 以组织培养的暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia)为材料, 野生暗紫贝母为对照, 用不同溶剂提取, 得4个化学组分: 总生物碱部分、总皂甙部分、水溶性部分和脂溶性部分, 并以生药粉为阳性对照进行药效学试验。结果表明: 组培贝母与野生贝母有相似的止咳、祛痰作用; 总皂甙部分与总生物碱部分均为川贝有效活性成分, *t* 检验表明两者之间无显著性差异; 经 TLC 检查, 总生物碱部分与总皂甙部分无化学成分重叠。

关键词: 暗紫贝母; 生物碱; 皂甙; 止咳; 祛痰

中图分类号: Q943.1; S567.23⁺¹ 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2000)01-0004-05

The pharmacological action of cultured bulb of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia GAO Shan-lin, XIA Yan and TAN Feng-ping (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(1): 4~8

Abstract: The experiments of pharmacological action of cultured bulb of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia were compared with wild bulb as control. The materials of wild and cultured bulb were extracted with different solvents respectively. The obtained four extracts (total alkaloid, total saponin, water soluble compounds and fat soluble compounds) were used for pharmacological experiments as compared with crude drug powder. The results indicated that the bulbs from both origins have same pharmacological action in relieving cough and removing phlegm. Total alkaloid and total saponin are all active parts and no significant difference under *t* test, checking with TLC, no overlapping chemical compound is found.

Key words: *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia; alkaloid; saponin; relieving cough; removing phlegm

川贝是一种有较高应用价值的常用中药材, 具有松弛平滑肌、抗菌、止咳化痰及抑制血小板聚集等多重药效^[1~8]。

暗紫贝母 (*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia) 是川贝中的珍品和主要品种, 生长于海拔 3 000~4 000 m 山坡草丛或阴湿小灌木中, 资源严重减少, 人工栽培未获成功。被国家列入三级保护野生药材保护品种^[9]。为保护和开发这一珍贵的自然资源, 缓解供需矛盾, 对暗紫贝母鳞茎器官进行了组织培养。获得了大量组织培养暗紫贝母鳞茎材料。为了进一步考证组培暗紫贝母对野生暗紫贝母的可替代性, 本文对其止咳化痰的有效部位进行药理作用的研究。

1 材料与方 法

1.1 样品、试剂及供试动物

组培暗紫贝母由本室提供, 野生暗紫贝母购自

四川阿坝州红原县, 经生药学教研室鉴定。所用化学试剂均为分析纯。供试动物为昆明种小鼠, 由本校新药研究中心动物室提供, 雌雄各半, 体重 18~22 g 者, 供镇咳试验; 体重 20~25 g 者供祛痰试验。

1.2 样品提取流程

组培暗紫贝母和野生暗紫贝母均研成细粉, 过 100 目筛。暗紫贝母细粉及各化学提取部位均按生药量计, 用 0.7% CMC-Na 配成浓度 3g/20mL 的混悬液, 超声 30 min, 按流程图 1 提取各化学成分部位的成分。

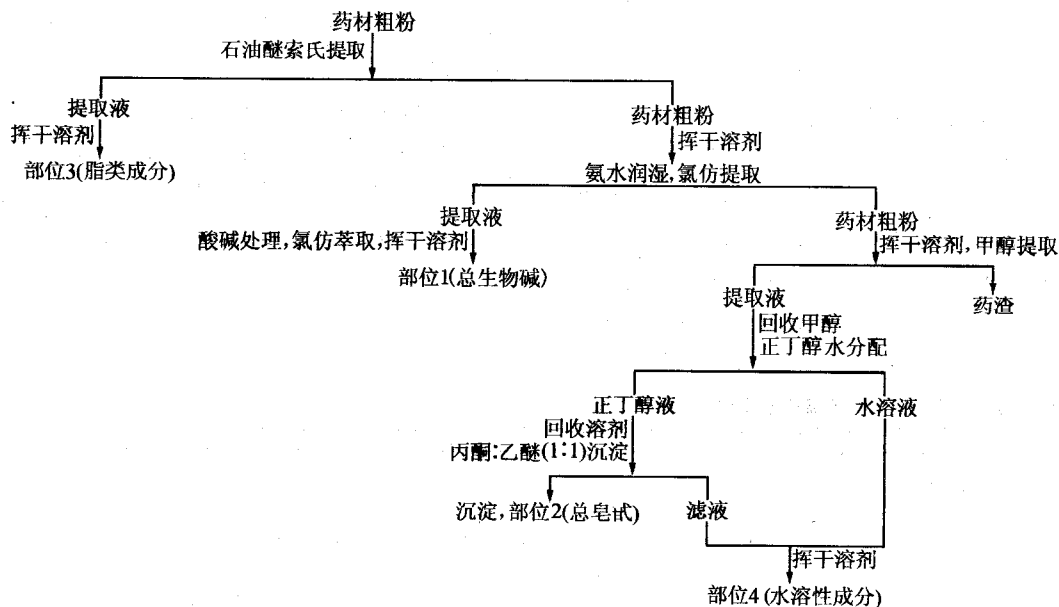
1.3 镇咳试验

参照文献^[9]采用改进的氨水引咳法, 取 18~22 g 小鼠 176 只, 随机分成 11 组(每组 16 只): 组培

收稿日期: 1999-07-09

基金项目: 国家中医药管理局重点课题(课题号: 995A3112)

作者简介: 高山林, 男, 1946 年生, 硕士, 教授, 长期从事药用植物遗传育种、细胞培养和脱病毒技术研究。



氯仿提取至生物碱反应阴性, 甲醇提取至 Liebermann 反应阳性

图1 暗紫贝母样品提取流程图

Fig. 1 Extracting flow chart of *Fritillaria unibracteata* sample

暗紫贝母和野生暗紫贝母的生药组、总生物碱组、总皂甙组、水溶性成分组、脂类成分组及 CMC-Na 阴性对照组, 均按 3 g/kg 剂量(生药量)灌胃给药, 给药后 1 h 分别将小鼠置于钟罩内, 用 0.5 mL 浓氨水(25%~28%)于沸水浴上蒸发引咳, 30 s 后迅速将小鼠转移至一大烧杯中, 记录小鼠 3 min 内的咳嗽次数。咳嗽以小鼠腹肌剧烈收缩, 张口有声为准。

1.4 祛痰试验

1.4.1 酚红标准曲线的绘制 准确称取酚红固体 500 mg, 用 5% NaHCO₃ 溶液配制成 C = 1 mg/mL 的母液, 将母液稀释不同的倍数, 得 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、3.0、5.0 μg/mL 一系列浓度的标准溶液。精密吸取不同浓度酚红标准液 1.00 mL 于试管中, 各加无水乙醇 2.00 mL, 摇匀, 离心, 取上清液于 722 光栅分光光度计波长 558 nm 处测定吸光度, 求得回归方程为: $A = 0.06136C - 0.00302$ (A: 吸光度, C: 酚红浓度, 单位 μg/mL), $r = 0.9994$ 。

1.4.2 方法 参照文献[9], 采用酚红排泄法, 取 20~25 g 小鼠分组, 组别、给药剂量及给药途径同镇咳试验。给药后 1 h, 立即腹腔注射 0.5% 酚红 0.2 mL/10g, 0.5 h 后将小鼠颈椎脱臼处死, 分离气管, 用 5% NaHCO₃ 溶液反复抽洗气管 3 次, 每次 0.5

mL, 合并洗出液, 精密吸取上清液 1.00 mL 于离心管, 加入无水乙醇 2.00 mL, 摇匀, 离心, 取上清液于 722 光栅分光光度计波长 558 nm 处测定吸光度, 由标准曲线求得酚红排泄量。

1.5 总生物碱和总皂甙部位的定性

1.5.1 样品制备 取总生物碱部位和总皂甙部位样品分别用氯仿、甲醇溶解配制制成 2 g/mL 的溶液, 供点样用。

1.5.2 生物碱的 TLC 定性 薄层板: 硅胶 G + 0.3% CMC-Na 湿法铺板, 厚 0.3 cm, 干燥后置 105℃ 烘箱活化 1 h。展开剂: 环己烷: 乙酸乙酯: 二乙胺 = 6:4:1。显色剂: 改良碘化铋钾。对照品: 浙贝甲素、浙贝乙素、西贝素, 由中国药品生物制品检定所提供。

1.5.3 总生物碱部分与总皂甙部分化学成分的 TLC 对比 薄层板: 硅胶 GF₂₅₄ + 0.3% CMC-Na 湿法铺板, 干燥后置 105℃ 烘箱活化 1 h。展开剂: a. 环己烷: 乙酸乙酯: 二乙胺 = 6:4:1; b. 乙酸乙酯: 氯仿: 甲醇 = 30:20:3; c. 正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:2 上层; d. 氯仿: 甲醇: 水 = 60:30:10 下层。显色剂: a、b 系统用改良碘化铋钾; c、d 系统先用紫外灯 254 nm 观察暗斑, 再用碘蒸气显色。

2 结 果

2.1 组培暗紫贝母的镇咳作用

组培暗紫贝母与野生暗紫贝母对氨水所致小鼠咳嗽的影响见表1,可以看出:组培与野生暗紫贝母的生药粉、总皂甙部分、总生物碱部分均有明显的镇咳作用,但水溶性成分和脂类成分无镇咳作用。组培与野生暗紫贝母的镇咳作用无显著性差异,组培

与野生暗紫贝母总皂甙部分与总生物碱部分相比,镇咳作用无显著差异;各对应成分之间相比也无显著性差异。

检验重现性:取18~22g小鼠50只,随机分为3组:CMC-Na(对照)组、总生物碱部分组及总皂甙部分组,重复以上操作。结果见表2;与CMC-Na对照组相比 $P_{\text{生物碱}} < 0.01$, $P_{\text{皂甙}} < 0.01$,进一步证明总生物碱部分及总皂甙部分具有明显的镇咳作用。

表1 组培暗紫贝母与野生暗紫贝母各提取部位对氨水所致小鼠咳嗽的影响
Table 1 Effects of extracts of cultured bulb and wild bulb of *Fritillaria unibracteata* on cough time in mice

组别 ¹⁾ Group	3 min 咳嗽次数 ²⁾ Cough times in 3 min ($X \pm SD$)	t 检验 t test			
		与对照相比 Compared with control	与生药组比 Compared with crude drug	对应部分比 Compared each other	3与2比 Compared 3 to 2
A	29.6 ± 11.8				
B 1	11.8 ± 5.4	<0.01		>0.05	
2	18.4 ± 6.2	<0.01	>0.05	>0.05	
3	15.5 ± 5.8	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05
4	20.9 ± 4.3	>0.05			
5	33.0 ± 9.7	>0.05			
C 1	9.6 ± 4.8	<0.01		>0.05	
2	14.3 ± 7.0	<0.01	>0.05	>0.05	
3	14.1 ± 6.8	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05
4	19.3 ± 9.3	>0.05			
5	30.9 ± 8.9	>0.05			

¹⁾A: CMC-Na(对照)组 control; B: 野生暗紫贝母 wild bulb; C: 组培暗紫贝母 cultured bulb; 1: 生药粉 drug powder; 2: 总生物碱 total alkaloid; 3: 总皂甙 total saponin; 4: 水溶性成分 water soluble compounds; 5: 脂类成分 fat soluble compounds. ²⁾ n = 11

表2 组培暗紫贝母与野生暗紫贝母的总碱部分与总甙部分有效性重现实验

Table 2 Repeated experiment in the effects of reducing cough times in cultured bulb and wild bulb of *Fritillaria unibracteata*

组别 ¹⁾ Group	咳嗽次数 ²⁾ Cough times	t 检验 t test
A	29.5 ± 5.5	<0.01
B1	15.4 ± 3.6	<0.01
B2	15.0 ± 3.5	<0.01
C1	12.7 ± 3.5	<0.01
C2	16.3 ± 3.7	<0.01

¹⁾A: CMC-Na(对照)组 CMC-Na control; B1: 野生暗紫贝母的总生物碱部分 total alkaloid in wild bulb; B2: 野生暗紫贝母的总皂甙部分 total saponin in wild bulb; C1: 组培暗紫贝母的总生物碱部分 total alkaloid in cultured bulb; C2: 组培暗紫贝母的总皂甙部分 total saponin in cultured bulb. ²⁾ n = 10

2.2 组培暗紫贝母的祛痰作用

组培暗紫贝母与野生暗紫贝母的水溶性成分和脂类成分对小鼠气管酚红分泌的影响见表3,各组分对小鼠气管酚红分泌的影响见表4,从表3及表4可以看出,组培与野生暗紫贝母的生药粉、总生物碱部

分及总皂甙部分均有明显的祛痰作用,水溶性成分和脂类成分无祛痰作用;组培与野生暗紫贝母的总生物碱部分及总皂甙部分与全生药相比无显著性差异,其总皂甙部分与总生物碱部分相比也无显著性差异;同时,组培与野生暗紫贝母的生药粉及其各对

表3 组培暗紫贝母与野生暗紫贝母的水溶性成分和脂类成分对小鼠气管酚红分泌的影响

Table 3 Effect of water soluble compounds and fat soluble compounds in cultured bulb and wild bulb of *Fritillaria unibracteata* on phlegm removal

组别 ¹⁾ Group	酚红分泌量($\mu\text{g}/\text{mL}$) ²⁾ Secreted phenol red $X \pm SD$	t 检验 t test
A	1.137 1 ± 0.259 5	
B 4	1.201 1 ± 0.300 9	>0.05
5	1.057 0 ± 0.261 0	>0.05
C 4	1.031 4 ± 0.179 0	>0.05
5	1.136 2 ± 0.234 7	>0.05

¹⁾A: CMC-Na(对照)组 control; B: 野生暗紫贝母 wild bulb; C: 组培暗紫贝母 cultured bulb; 4: 水溶性成分 water soluble compounds; 5: 脂溶类成分 fat soluble compounds. ²⁾ n = 11

表 4 组培暗紫贝母与野生暗紫贝母的总碱部分和总甙部分对小鼠气管酚红分泌的影响
Table 4 Effects of total alkaloid and total saponin in cultured bulb and wild bulb of *Fritillaria unibracteata* on phlegm removal

组别 ¹⁾ Group	酚红分泌量 ²⁾ Secreted phenol red ($\mu\text{g/mL}$), $\bar{X} \pm \text{SD}$	t 检验 t test			
		与对照相比 Compared with control	与生药组比 Compared with crude drug	对应部分比 Compared each other	3 与 2 比 Compared 3 to 2
A	0.952 2 \pm 0.294 8				
B 1	1.513 0 \pm 0.611 3	< 0.01		> 0.05	
2	1.385 6 \pm 0.383 4	< 0.01	> 0.05	> 0.05	
3	1.501 8 \pm 0.512 3	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05
C 1	1.376 1 \pm 0.435 7	< 0.01		> 0.05	
2	1.536 3 \pm 0.277 4	< 0.01	> 0.05	> 0.05	
3	1.355 2 \pm 0.449 8	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05

¹⁾A: CMC-Na (对照)组 control; B: 野生暗紫贝母 wild bulb; C: 组培暗紫贝母 cultured bulb; 1: 生药粉 crude drug powder; 2: 总生物碱 total alkaloid; 3: 总皂甙 total saponin. ²⁾ n = 11

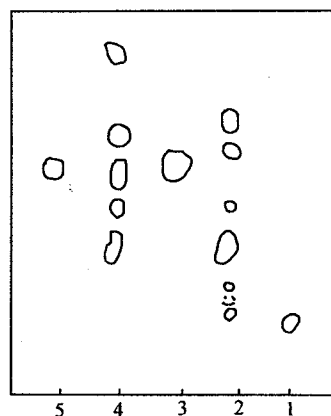
应化学成分之间也无显著性差异。

2.3 总生物碱和总皂甙部位的检定

生物碱的层析结果见图 2。总皂甙定性反应结果见表 5。总生物碱部分与总皂甙部分化学成分的 TLC 对比见层析图 3 中 A、B、C、D、E 和 F, 4 种展开剂系统下, 两类成分所显示斑点各不相同, 说明组培与野生暗紫贝母的总生物碱部位和总皂甙部位所含主要成分没有重叠。

4 讨 论

(1) 组培暗紫贝母与野生暗紫贝母的止咳祛痰作用试验显示两者无显著性差异, 进一步证明了组培暗紫贝母对野生暗紫贝母的可替代性, 预示用组培技术进行暗紫贝母鳞茎的器官培养将是扩大暗紫贝母药用资源的有效途径。



1. 浙贝甲素 peimine; 2. 野生暗紫贝母 wild bulb; 3. 浙贝乙素 peiminine; 4. 组培暗紫贝母 cultured bulb; 5. 西贝素 imperialine

图 2 暗紫贝母生物碱层析图
Fig. 2 TLC of alkaloid in *Fritillaria unibracteata* bulb

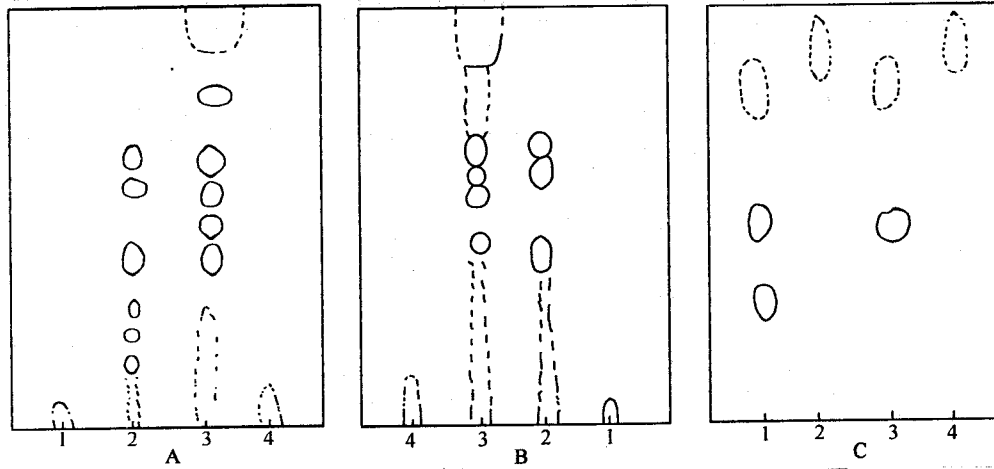
表 5 组培暗紫贝母与野生暗紫贝母总皂甙的定性反应
Table 5 The qualitative determination of total saponin in cultured bulb and wild bulb of *Fritillaria unibracteata*

样品 Samples	醋酐浓硫酸反应 Liebermann reaction	氯仿浓硫酸反应 Salkowshi's reaction	三氯化锑反应 Carr-Price reaction	泡沫反应 Foam reaction	溶血反应 Haemolysis reaction
野生样品 Wild bulb	污绿色 dark green	红色 red	粉紫色 light purple	阳性 positive	溶血 haemolysis
组培样品 Cultured bulb	污绿色 dark green	红色 red	粉紫色 light purple	阳性 positive	溶血 haemolysis

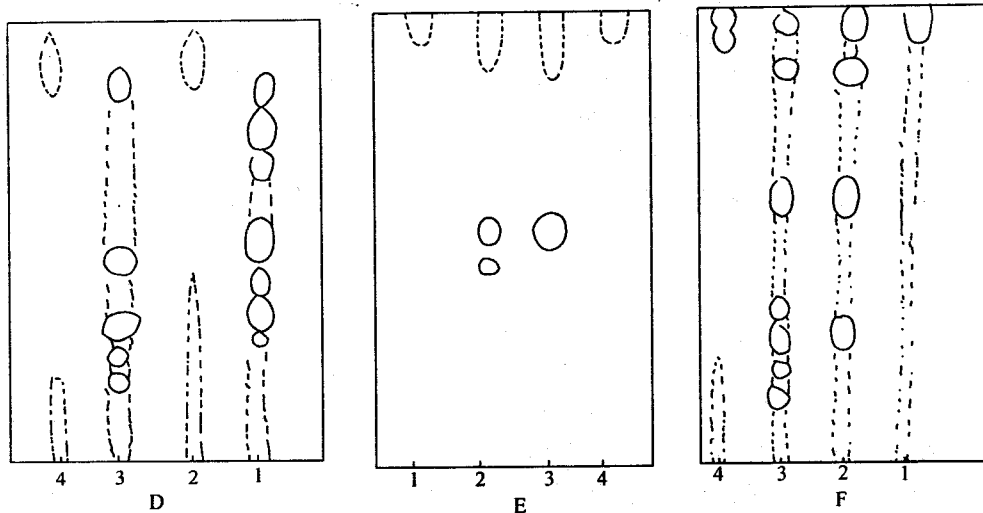
(2) 止咳试验表明总皂甙部分与总生物碱部分具有同样的止咳效果, 两者之间无显著性差异, 这与以往报道不同; 同样, 在祛痰试验中, 总生物碱部分也表现出与总皂甙部分一样的祛痰作用, 两者之间无显著性差异。为了检查总生物碱部位与总皂甙部位所含成分是否有交叉, 用 4 种展开剂系统进行 TLC 检查, 发现两类成分所显示斑点各不相同, 说明

两者所含主要成分没有重叠。提示总皂甙与总生物碱都是暗紫贝母止咳祛痰的有效成分, 在进行暗紫贝母质量监控时, 应当将总皂甙成分也考虑在内。

(3) 暗紫贝母总皂甙部分中, 该皂甙是萜类还是甾类? 哪一个皂甙单体为有效活性成分? 其量效关系如何? 这些问题都有待进一步研究。



A. 展开剂系统 a solvent system a; B. 展开剂系统 b solvent system b;
C. 展开剂系统 c, UV 254 nm 观察暗斑 solvent system c, observed under UV 254 nm



D. 碘蒸气显色 developed in I steam; E. 展开剂系统 d, UV 254 nm 观察暗斑 solvent system d, observed under UV 254 nm;
F. 碘蒸气显色 developed in I steam

1. 总皂甙(组培) total saponin in cultured bulb; 2. 总生物碱(组培) total alkaloid in cultured bulb;
3. 总生物碱(野生) total alkaloid in wild bulb; 4. 总皂甙(野生) total saponin in wild bulb

图3 总生物碱和总皂甙部位 TLC 检定

Fig. 3 Identification of total alkaloid and total saponin by TLC

参考文献

- [1] 朱丹妮, 蒋莹, 陈婷, 等. 组织培养川贝母化学成分和药理作用的研究[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(2): 118~121.
- [2] 熊玮, 郭小玲, 何嘉良. 湖北贝母药理作用的初步研究[J]. 中草药, 1986, 17(8): 19~22.
- [3] 姚丽娜. 湖北贝母、鄂北贝母、紫花鄂北贝母生物总碱对呼吸系统的药理作用[J]. 同济医科大学学报, 1993, 22(1): 47~49.
- [4] 李萍, 李晖, 徐国钧. 贝母中药的镇咳祛痰作用研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(6): 360~362.
- [5] 季晖, 李萍, 姚力, 等. 蒲贝酮碱的镇咳作用研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(2): 95~97.
- [6] 钱伯初, 许衡钧. 浙贝母碱和去氢浙贝母碱的镇咳作用[J]. 药学学报, 1985, 20(4): 306.
- [7] 赵浩如, 肖灿鹏, 李萍, 等. 中药贝母几种主要成分的体外抗菌活性[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(3): 188~189.
- [8] 陆泽乃, 陆阳, 徐佩娟, 等. 中药贝母中水溶性成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(7): 420~422.
- [9] 杜少芬. 川贝母、平贝母有效性的比较[J]. 中国新药与临床药理, 1996, 7(2): 45~47.

(责任编辑: 许定发)