

廖黎,樊荣,徐文俊,等. 酶解法提取川贝母组培物总生物碱[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):313-315.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.090

# 酶解法提取川贝母组培物总生物碱

廖黎<sup>1</sup>,樊荣<sup>1</sup>,徐文俊<sup>2</sup>,刘昆<sup>1</sup>,王跃华<sup>2</sup>

(1. 成都大学四川抗菌素工业研究所,四川成都 610106;2. 成都大学生物产业学院,四川成都 610106)

**摘要:**为了研究四川道地名贵药材川贝母及其组织培养物有效药用成分总生物碱的提取和含量测定方法,以及总生物碱含量的变化规律。利用纤维素酶解细胞壁中纤维素促进生物碱溶出原理,以酶解温度(A)、pH 值(B)、酶用量(C)和酶解时间(D)为影响因素进行总生物碱的酶解法正交提取试验,结合饱和  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  溶液浸渍和乙醇回流法提取生物碱;通过酸性染料比色法测定总生物碱含量。结果表明,总生物碱的酶解法最佳提取工艺为  $\text{A}_3\text{B}_3\text{C}_2\text{D}_1$ ,采用酶解法最佳提取工艺,川贝母及其组织培养物总生物碱提取得率分别提高 28.74%、42.86%,川贝母组培物的总生物碱含量超过川贝母 114.07%。酶解法提高了川贝母有效药用成分总生物碱的得率,经过研发得到的川贝母组织培养物总生物碱含量呈现快速增长规律,为以名贵道地药材川贝母的新药研发奠定了理论和应用基础。

**关键词:**川贝母;组培物;总生物碱;酶解法;正交试验

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0313-03

川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)是来源于百合科(Liliaceae)贝母属(*Fritillaria* L.)中多种植物的鳞茎,有悠久的历史,早在汉代《神农本草经》中就有记载,将其列为中品。按其功能一般分为浙贝母与川贝母两大类,浙贝母清热化痰、开郁散结;川贝母清热润肺、化痰止咳,用于肺热燥咳、阴虚劳嗽、干咳少痰、咯痰带血<sup>[1-3]</sup>。本研究以实验室培养的川贝母组培物为原料,以贝母素乙为对照品,探索在采用酸性染料比色法<sup>[4-6]</sup>前使用纤维素酶进行酶解,再采用饱和  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  溶液浸渍和乙醇回流浸提工艺提取总生物碱以及用酸性染料比色法测定提取物中总生物碱的含量。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

ESJ120-4 电子分析天平(沈阳龙腾电子仪器有限公司)、UV-1100 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)、HH-4 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)、DHG9141 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、KG22V11T1/222 西门子自动温控冰箱。

### 1.2 材料

川贝母组培物(成都大学生物产业学院组培实验室研发)、贝母素乙标准品(110751-200608,中国药品生物制品检定所)、纤维素酶(上海伯奥生物科技有限公司, >15 U/mg)、其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

收稿日期:2015-07-14

基金项目:2012 年成都市经济和信息化委员会资助科研项目;成都市科技计划(编号:12GGYB413SW-001)。

作者简介:廖黎(1987—),女,云南昆明人,研究实习员,主要从事天然药物与微生物研究。E-mail:aimarll@163.com。

通信作者:王跃华,教授,主要从事生药学研究。E-mail:1961689636@qq.com。

### 2.1 酸性染料比色法特征吸收波长测定

精确量取贝母素乙标准品 4 mL,置 60 mL 分液漏斗中,加水 2 mL,加 pH 值 5.0 缓冲液 2 mL,加溴麝香草酚兰试液 2 mL,再加一定量氯仿,萃取 2 次,使 2 次氯仿加入量与标准品溶液之和为 12 mL,充分摇匀,放置分层,将下层液经中速干燥滤纸滤过后移入 25 mL 容量瓶中,加氯仿至刻度,作测试液。以氯仿同法操作作为空白对照,用 UV-1100 紫外分光光度计,在 200~500 nm 波长范围内进行扫描<sup>[7]</sup>。得到图 1 酸性染料法测定贝母素乙吸光度与波长曲线图。

由图 1 可知,贝母素乙标准品在 411.1 nm 波长处有最大(特征)吸收峰,故选择 411 nm 作为测定贝母素乙的最大(特征)吸收波长。

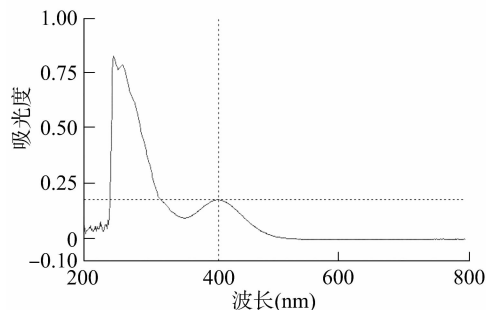


图1 酸性染料法测定贝母素乙特征吸收波长

### 2.2 酸性染料比色法绘制贝母素乙标准曲线

按表 1 进行加样操作,以氯仿同法操作作为空白对照,在 411 nm 波长处测定其  $D$  值。由表 2 进行微机数据处理得到回归方程: $D=0.040C+0.009$ ,相关系数  $r=0.9993$ ,贝母素乙在 2.08~6.24  $\mu\text{g/mL}$  线性关系良好(图 2)。

### 2.3 酶解法提取川贝母组培物样品总生物碱与含量测定<sup>[8-9]</sup>

酶解法提取川贝母组培物总生物碱:5 g 川贝母组培样品加 10 倍量水,用 HCl 调节 pH 值,按表 3 要求控制酶解温度、pH 值、纤维素酶加入量、酶解时间,酶解后用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  饱和

表 1 酸性染料比色法绘制贝母素乙标准曲线加样操作

项目	标准液编号					
	0	1	2	3	4	5
贝母素乙标准液(26.2 μg/mL)	0.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
贝母素乙显色浓度(μg/mL)	0.000	2.096	3.144	4.192	5.24	6.288
pH 值 5.0 磷酸缓冲液(mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
溴麝香草酚蓝试剂(mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
无水氯仿萃取	无水氯仿萃取 2 次,2 次加入量与标准品加入量之和为 12 mL					
无水氯仿定容	中速干燥滤纸滤,转入 25 mL 容量瓶中定容					

表 2 酸性染料比色法绘制贝母素乙标准曲线微机数据统计

项目	标准液编号					
	0	1	2	3	4	5
贝母素乙标准液(26.2 μg/mL)	0.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
贝母素乙显色浓度(μg/mL)	0.000	2.096	3.144	4.192	5.24	6.288
$D_{411\text{ nm}}$ 实测( $D$ 值)	0.000	0.091	0.136	0.182	0.219	0.260
由线性回归方程对应的 $D$ 值	0.009	0.093	0.135	0.177	0.219	0.261
线性回归方程斜率	0.040 0					
线性回归方程截矩	0.009 0					
试验相关性	0.999 2					
线性回归方程	$y = 0.040x + 0.009$					

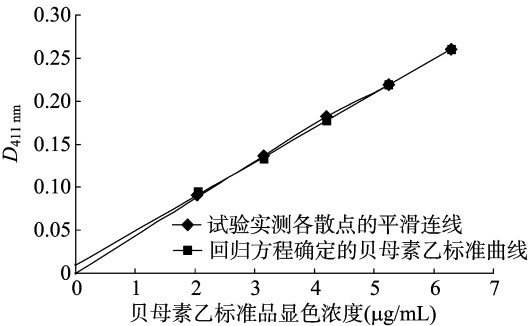


图2 酸性染料比色法定制贝母素乙标准曲线

表 3 酶解法提取川贝母组培物总生物碱的试验因素与水平

水平	因素			
	A:酶解温度(℃)	B:pH 值	C:酶用量(g/L)	D:酶解时间(h)
1	40	3.5	0.15	2.5
2	50	4.5	0.25	3.5
3	60	5.5	0.35	4.5

溶液浸渍 2 h、加入 75% 乙醇 100 mL,在 80 ℃ 水浴中回流浸提 4 h,抽滤。

样品总生物碱含量的测定:将提取液水浴蒸干后,用氯仿溶解残留物并移入 25 mL 容量瓶中,加氯仿至刻度。按照标准曲线加样方法,在 411 nm 波长处测定样品  $D$  值,代入标准曲线对应回归方程计算出川贝母组培物总生物碱的质量浓度。川贝母组培物总生物碱的含量,以质量百分率表示,按下式计算:

总生物碱含量 =  $[(D - 0.009) \times n] / (m \times 10^6 \times 0.040 0) \times 100\%$ 。

式中: $D$  为吸光度; $n$  为稀释倍数; $m$  为试样质量,g。

2.4 酶解法提取川贝母组培物总生物碱的正交试验

通过单因素试验,选定酶解温度(A)、pH 值(B)、酶用量

(C)和酶解时间(D)为提取总生物碱影响因素,选择 3 个水平,按表 3 控制条件进行正交提取试验<sup>[10-11]</sup>。

由表 4 可知:川贝母组培物总生物碱含量的最佳工艺的因素水平组合为  $A_3B_3C_2D_1$ ,根据各因素极差值的大小,可得出酶解温度(A)、pH 值(B)、酶用量(C)、酶解时间(D)4 个影响因素中,对总生物碱的提取结果影响大小次序是  $B > C > D > A$ 。

由于  $L_9(3^4)$  的 4 列都已放满因子,无第 1 类偏差,因此只能用第 2 类偏差  $S_{2e}$  作为误差检验各因子的显著性<sup>[12]</sup>,试验结果见方差分析表 5。

2.5 纤维素酶对川贝母及其组培物提取总生物碱的验证试验

将川贝母及其组培物分成加酶和不加酶处理组,加酶组按  $A_3B_3C_2D_1$  最佳酶法提取工艺进行酶解处理,每组采用饱和  $Ca(OH)_2$  溶液浸泡和乙醇回流浸提工艺进行 3 次平行试验,对每组提取物用酸性染料比色法测定其总生物碱含量,试验结果见表 6。

3 分析与讨论

3.1 正交试验结果分析

通过正交试验,采用酸性染料比色法测定用饱和  $Ca(OH)_2$  溶液浸泡和乙醇回流浸提工艺的川贝母组培物总生物碱的含量。由正交试验方差分析可知,pH 值和加酶量对正交试验影响达到显著水平,因此正交试验因素与水平设计合理,得到的  $A_3B_3C_2D_1$  为最佳提取工艺条件,即酶解温度为 60 ℃,酶解时间为 2.5 h,最适 pH 值为 5.5,加酶量为 0.25 g/L。

3.2 纤维素酶对川贝母及其组培物总生物碱提取得率的影响

从验证试验结果可知川贝母加纤维素酶比未加纤维素酶总生物碱得率平均高出 28.74%,川贝母组培物加纤维素酶

表 4 酶解法提取川贝母总生物碱 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验结果

试验编号	因素				川贝组培物总生物碱得率(%)		
	A	B	C	D	第 1 次	第 2 次	合计(y <sub>i</sub> )
1	1	1	1	1	0.09	0.08	0.17
2	1	2	2	2	0.22	0.23	0.45
3	1	3	3	3	0.16	0.15	0.31
4	2	1	2	3	0.12	0.13	0.25
5	2	2	3	1	0.16	0.17	0.33
6	2	3	1	2	0.17	0.18	0.35
7	3	1	3	2	0.13	0.14	0.27
8	3	2	1	3	0.13	0.14	0.27
9	3	3	2	1	0.26	0.28	0.54
K <sub>1j</sub>	0.93	0.69	0.79	1.04			
K <sub>2j</sub>	0.93	1.05	1.24	1.07			
K <sub>3j</sub>	1.08	1.20	0.91	0.83			
R <sup>2</sup>	2.896 2	3.018 6	2.989 8	2.915 4			
R <sup>2</sup> /(3m)(m=2)	0.482 7	0.503 1	0.498 3	0.485 9			
(∑y <sub>i</sub> ) <sup>2</sup> /(9m)(m=2)	0.480 2	0.480 2	0.480 2	0.480 2			
S <sub>j</sub> =R <sup>2</sup> /3m-(∑y <sub>i</sub> ) <sup>2</sup> /(9m)	0.002 5	0.022 9	0.018 1	0.005 7			
Se=(∑∑y <sub>ik</sub> <sup>2</sup> -CT)-(1/2∑y <sub>i</sub> <sup>2</sup> -CT)				0.017			

注:K<sub>1j</sub>、K<sub>2j</sub>、K<sub>3j</sub>分别是第j列中与水平1、2、3对应的数据y<sub>i</sub>之和(在重复m次试验或取样的情况下,y<sub>i</sub>表示同一号试验中m个数据的合计),m为重复试验或重复取样数。R<sub>j</sub><sup>2</sup>=K<sub>1j</sub><sup>2</sup>+K<sub>2j</sub><sup>2</sup>+K<sub>3j</sub><sup>2</sup>:第j列各水平对应的数据y<sub>i</sub>之和的平方。CT=(∑y<sub>i</sub>)<sup>2</sup>/(9m)(m=2);S<sub>j</sub>=R<sub>j</sub><sup>2</sup>/(3m)-CT;第j列的偏差平方。

表 5 酶解法提取川贝母总生物碱 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验结果方差分析

方差来源	差方和	自由度	均方和	F 值	显著性
酶解温度	0.002 5	2	0.001 3	0.66	
pH 值	0.023 0	2	0.011 5	6.09	*
酶用量	0.018 0	2	0.009 0	4.76	*
酶解时间	0.005 7	2	0.002 9	1.51	
误差	0.017 0	9	0.001 9		

注:F<sub>0.1</sub>(2,9)=3.01;F<sub>0.05</sub>(2,9)=4.26;F<sub>0.01</sub>(2,9)=8.02。

表 6 川贝母与川贝母组培物总生物碱提取是否加纤维素酶得率

平行试验 次数	川贝母总生物碱提取 是否加酶得率(%)		川贝母组培总生物碱提 取是否加酶得率(%)	
	未加酶	加酶	未加酶	加酶
1	0.086	0.112	0.14	0.2
2	0.078	0.103	0.18	0.26
3	0.090	0.112	0.17	0.24
得率平均值	0.085	0.109	0.163	0.233
加酶得率增长(%)	28.74		42.86	
组培得率增长(%)	未加酶增长率	92.91	加酶增长率	114.07

比未加纤维素酶总生物碱得率平均高出 42.86%。纤维素酶在川贝母总生物碱提取中通过降解并破坏植物纤维组织,促进有效成分的溶解,明显提高了有效成分总生物碱的得率。该提取工艺简单、操作方便,具有推广应用价值,可以考虑用于实际生产中。

3.3 川贝母组培物总生物碱含量变化规律分析

从验证试验结果可知:由成都大学生物产业学院研发的川贝母组培物,其总生物碱含量远远高出其川贝母本身的总生物碱含量,其加酶提取得率高出 114.07%。经过研发得到

的川贝母组培物总生物碱含量呈现快速增长规律,为以名贵地道药材川贝母的新药研发奠定了理论和应用基础。

参考文献:

[1] 王书军,高文远,于琳,等. 百合科贝母属药用植物分类研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(16):1609.

[2] 刘辉,陈士林,姚辉,等. 川贝母的资源学研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1645-1648.

[3] 江明殊,王跃华,刘涛,等. 多倍体川贝母脱毒苗的诱导[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):41-43.

[4] 王冲之,孙健. 贝母类药材生物碱及生物碱苷含量测定方法学研究[J]. 中国药杂志,2003,38(6):415-418.

[5] Cannell R J P. National products isolation[M]. New Jersey: Humanna Press,1998.

[6] 蒋爱芳,杨义芳,黄文武. 酸性染料比色法测定总生物碱的研究进展[J]. 中草药,2006(37):359-361.

[7] 李萍,曾令杰,李松林. 无紫外吸收的贝母总生物碱定量分析方法研究[J]. 中国药杂志,2002,37(8):614-617.

[8] 王艳红,吴晓民,郑友兰. 不同产地和采收期的平贝母总生物碱含量[J]. 中药材,2006,29(1):8-10.

[9] 王纯玉,何祖新,吴玉良. 不同商品规格川贝母总生物碱含量测定的方法[J]. 中国药业,2013,22(15):31-33.

[10] 张良,袁瑜,李玉锋,等. CO<sub>2</sub>超临界萃取川贝母游离生物碱工艺研究[J]. 西华大学学报,2008,27(1):39.

[11] 杨远娜. 渗滤法提取川贝母工艺的研究[J]. 中国实用医药,2012,7(1):16-17.

[12] 李春喜,姜丽娜,邵云. 生物统计学[M]. 3版. 北京:科学出版社,2005:91-128.