

川贝母组培物的提取工艺优选

刘涛¹, 江明殊², 李思磊¹, 罗小伟¹, 游丽玲¹, 王晓蓉³, 王跃华^{1*}

(1. 成都大学生物产业学院, 成都 610106; 2. 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101;
3. 成都恩威投资集团有限公司, 成都 610200)

[摘要] 目的: 优选川贝母组培物的提取工艺。方法: 以总生物碱含量为指标, 通过单因素试验筛选提取方法, 采用正交试验考察乙醇体积分数、加醇量、提取时间及提取次数对川贝母组培物提取工艺的影响。运用紫外-可见分光光度计法测定总生物碱含量, 检测波长 415 nm。结果: 选择回流法提取川贝母组培物, 最佳工艺参数为加 6 倍量 85% 乙醇提取 2 次, 每次 1.5 h; 总生物碱提取量 0.197 g·g⁻¹。结论: 该工艺稳定可行, 可作为川贝母组培物提取物的制备工艺。

[关键词] 川贝母; 总生物碱; 提取工艺; 单因素试验; 正交试验; 紫外分光光度法

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0030-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080030

Optimization of Extraction Process of Fritillariae Cirrhosae Bulbus Tissue Culture Materials

LIU Tao¹, JIANG Ming-shu², LI Si-lei¹, LUO Xiao-wei¹,
YOU Li-ling¹, WANG Xiao-rong³, WANG Yue-hua^{1*}

(1. Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China;
2. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China;
3. Chengdu Enwei Investment (Group) Ltd. Corporation, Chengdu 610200, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Fritillariae Cirrhosae Bulbus tissue culture

[收稿日期] 20130807(009)

[基金项目] 成都市科技局高校院所应用成果转化项目(12GGYB413SW-001)

[第一作者] 刘涛, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中成药新药开发及再评价研究, Tel: 028-61302236, E-mail: liutao0578@sina.com

[通讯作者] * 王跃华, 教授, 从事生药生物技术培养研究, Tel: 028-61302236, E-mail: wangyaoehua888@yahoo.com.cn

分离、醇沉保留率分别为 92.01%, 72.79%。分别取等药材当量的水提样品、膜分离样品及醇沉样品, 按 2010 年版《中国药典》中方法测定出膏量分别为 5.66, 4.14, 2.48 g。

3 讨论

通过比较不同样品中黄芩苷保留量, 发现膜分离法优于醇沉法。而由出膏量的结果可知, 醇沉法的除杂效果较膜分离法好。观察各样品溶液的外观发现, 膜分离法和醇沉法处理后的样品均较水提取液澄清且沉淀少, 但醇沉、膜分离样品间澄清度无明显差异, 沉淀在观察期中亦无明显差别。综合分析, 膜分离法对样品的内在质量控制较醇沉法好, 同时

从生产安全性及经济性等方面考虑, 膜分离法较醇沉法优势明显, 但不能忽略膜分离法的除杂效果差于醇沉法的事实, 实际生产应用时需谨慎选择。

[参考文献]

- [1] 陈燕军, 冯青然. 常用精制方法在纯化中药制剂中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3): 56.
- [2] 徐南平, 邢卫红, 赵宜江. 无机膜分离技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 275.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283.

[责任编辑 全燕]

materials. **Method:** UV was adopted to determine the content of total alkaloids with detection wavelength at 415 nm. With the content of total alkaloids as index, extraction method was selected by single factor test, orthogonal design was used to investigate effects of the concentration and amount of ethanol, extraction time and frequency on extracting process. **Result:** Reflux method was selected to extract *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* tissue culture materials, optimal extracting process was as follows: extracted twice with 6 times the amount of 85% ethanol, 1.5 hours for each time; Extraction amount of total alkaloids was $0.197 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** This technology was stable and feasible, which could be as preparation process of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* tissue culture materials extract.

[**Key words**] *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; total alkaloids; extraction process; single factor test; orthogonal test; UV

川贝母主产于我国四川、西藏、云南等省区^[1],长期以来主要靠采挖野生药材为主,致使存在滥采滥挖现象,目前已被列入我国《野生药材资源保护条例》,亦被《中国珍稀濒危植物红皮书》确定为渐危种^[2-4]。川贝母在生长过程中对环境的温度、土质、气候等条件有特殊要求,采用生物技术生产川贝母可不受外界环境影响,通过筛选高产的川贝母细胞株系进行大规模悬浮培养,并对培养基和培养条件进行有效调控,可得到产率高、产量大、质量可控的优质中药原料。研究发现通过组织培养生产的鳞茎可有效保持原商品药材的有效成分,预示采用组培技术进行川贝鳞茎的器官培养可作为扩大川贝药用资源的有效途径。中药提取物是从中药产业中分化出来的新兴子产业,已成为中药国际化的重要亮点^[5]。目前以川贝母为主药或包含川贝母的中成药众多,川贝母提取物潜在需求十分巨大,故本实验采用正交试验优选川贝母提取工艺,为该药材的工业推广提供参考。

1 材料

BS-6KH型电子天平(上海友声衡器有限公司生产),FA2004型电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司)。西贝母碱(中国食品药品检定研究院,批号20110706),川贝组培物(自制),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取西贝母碱5 g,置于25 mL量瓶中,加三氯甲烷稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 mL,分别置于25 mL具塞试管中,加三氯甲烷至10.0 mL,各加水5 mL和0.05%溴甲酚绿缓冲液2 mL,密塞,剧烈振摇,转移至分液漏斗中,放置30 min,取三氯甲烷液,用干燥滤

纸滤过,取续滤液,以相应试剂为空白,于415 nm处测定吸光度(A),以A为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $A = 31.362C + 0.0161$ ($R^2 = 0.9962$)。

2.3 供试品溶液的制备 取提取液适量(折合约原药材5 g),于60~80℃水浴锅蒸干,加入浓氨液10 mL,浸润1 h,加三氯甲烷30 mL使溶解,精密量取该溶液25 mL,加水10 mL和0.05%溴甲酚绿缓冲液2 mL,密塞,剧烈振摇后转移至分液漏斗中,放置30 min,取三氯甲烷液,于6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,用干燥滤纸滤过,取续滤液,即得。

2.4 提取方式考察^[6-8] 称取药材20 g,粉碎成粗粉,加70%乙醇50 mL浸润0.5 h,装筒,浸渍48 h,缓缓渗漉至无生物碱反应。取药材20 g,粉碎成粗粉,加7倍量75%乙醇提取2次,每次1 h。分别按**2.3**项下方法制备供试品溶液,于415 nm处测定A,计算总生物碱质量分别为1.43, 2.04 mg,故选择回流法。

2.5 提取工艺优选^[9-10] 在预试验基础上,选择乙醇体积分数、加醇量、提取时间及提取次数为考察因素,川贝母总生物碱提取量为考察指标,称取川贝母组培物药材9份,每份20 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表1 川贝母提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 加醇量 /倍	C 提取数 /次	D 提取时间 /h
1	65	6	1	1.0
2	75	8	2	1.5
3	85	10	3	2.0

由直观分析可知,各因素对川贝母组培物总生物碱提取效果的影响顺序为 $A > B > D > C$ 。以C因素为误差项进行方差分析,结果显示各因素对提取

表 2 川贝母提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	总生物碱/mg
1	1	1	1	1	0.88
2	1	2	2	2	2.11
3	1	3	3	3	0.71
4	2	1	2	3	2.86
5	2	2	3	1	1.67
6	2	3	1	2	1.27
7	3	1	3	2	4.29
8	3	2	1	3	3.64
9	3	3	2	1	2.95
K_1	1.23	2.68	1.93	1.83	
K_2	1.93	2.47	2.64	2.56	
K_3	3.63	1.64	2.22	2.40	
R	2.40	1.04	0.71	0.73	

表 3 川贝母提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	S	F	P
A	9.09	2	4.54	10.42	>0.05
B	1.80	2	0.90	2.06	>0.05
C(误差)	0.76	2	0.38	1.00	
D	0.87	2	0.44	1.14	>0.05

注： $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

效果的影响均不显著,故确定最佳提取工艺 $A_3B_1C_2D_2$,即加 6 倍量 85% 乙醇提取 2 次,每次 1.5 h。取川贝组培物 3 份,每份 20 g,按优选的工艺条件提取,合并提取液,计算总生物碱质量分别为 3.89,4.01,3.92 mg,表明该工艺稳定可行。

3 讨论

按本文建立的总生物碱含量测定方法进行加样回收率试验,结果平均加样回收率 94.89% (RSD 3.15%),稳定性试验表明供试品溶液在 45 min 内稳定。川贝母镇咳、祛痰、平喘的药效部位为生物碱类成分,参照《中国药典》2010 年版“川贝母”项下方法,选择西贝母碱为指标性成分进行含量测定^[11]。

由于川贝母原药材资源匮乏,利用生物技术培养高产细胞株系,大规模进行细胞悬浮培养,通过不断改善植物细胞体外培养条件可大大提高药材细胞中次生代谢物的含量,还可通过向培养基

中添加药物合成的前体物质,经培养将其转化为目的化合物,从而增加有效成分含量,最终实现名贵中药材快速大规模生产药物的目的,本课题组经研究已获得了成熟的川贝组培物的培养技术,已申请了 3 项专利。

回流提取法具有周期短、操作便捷、提取效率高优点,较渗漉法优势明显,故选择回流法,但回流提取过程中应注意提取温度的控制,温度过高易出现糊化。川贝母组培物呈鳞茎状,预试验研究发现粉碎粒度对提取效果具有一定影响但不显著,故选择将药材粉碎成较大颗粒,以简化操作工序。

[参考文献]

- [1] 聂小忠. 对历版《中国药典》所载川贝品种的探讨[J]. 中国药房,2008,19(9):717.
- [2] 何先元. 贝母类药材资源分布及性状特点研究[J]. 中国药房,2009,20(6):479.
- [3] 杨惠莲,吴佳. 法定标准收载贝母类药材及其常见伪品概述[C]. 石家庄:成渝药学会学术年会论文集,2008:622.
- [4] 阎博华,丁红,丰芬,等. 不同基源川贝母研究进展[J]. 四川中医,2010,28(5):48.
- [5] 王智民,肖诗鹰,钱忠直. 加速中药标准提取物发展,推动中药现代化和国际化[J]. 中国中药杂志,2007,32(17):1830.
- [6] 蔡治纲,赵宏,毛晓敏,等. 川贝母提取工艺研究[J]. 江西中医学院学报,2005,17(1):46.
- [7] 余华,姜艳,李萍,等. 中药川贝母定量分析方法研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(8):572.
- [8] 陈萍,朱胤龙,韦强,等. 均匀设计法优选川贝母渗漉提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(3):12.
- [9] 蔡治纲,赵宏,毛晓敏,等. 川贝母提取工艺研究[J]. 江西中医学院学报,2005,17(1):46.
- [10] Li P, Zeng L J, Li S L, et al. The extraction of imperialine and im-perialine-3 beta-glucoside from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk and quantitative determination by HPLC-evaporative light scattering detection[J]. Phytochem Anal,2002,13(3):158.
- [11] 余世春,肖培根. 贝母属植物异甾体生物碱的存在及其分类学意义[J]. 植物分类学报,1992,30(5):450.

[责任编辑 仝燕]