

文章编号: 0490-6756(2008)01-0209-05

# 野生和组培川贝母总生物碱含量的测定和定位研究

杨 杨, 姜 虹, 傅华龙, 兰利琼  
(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘 要:** 测定了组培川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)不同部位和生长状态下的总生物碱含量,并应用切片技术对生物碱进行组织化学定位,建立了石蜡切片观察生物碱分布的方法。结果表明,在市售川贝母、野生川贝母鳞茎和组培川贝母的不同部位中,组培的再生鳞茎总生物碱含量最高,带不定根的愈伤组织次之;在多种染色方法中,采用传统石蜡切片并用碘化铋钾定位生物碱效果较好;鳞茎中的生物碱主要分布于薄壁细胞内,愈伤组织中的生物碱则主要分布于细胞壁周围;野生川贝母鳞茎中生物碱分布同淀粉粒有一定关系,而在组培鳞茎和愈伤组织中这一关系并不明显。

**关键词:** 川贝母;生物碱;组织化学;石蜡切片;组织培养

**中图分类号:** Q946.88      **文献标识码:** A

## Determination and histochemical localization of alkaloids content in wild and tissue cultured *Fritillaria cirrhosa* D. Don

YANG Yang, JIANG Hong, FU Hua-Long, LAN Li-Qiong  
(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** The authors mensurate the total alkaloid content of tissue cultured *Fritillaria cirrhosa* D. Don in different parts and under different growing states, and apply slicing-up technology to histochemically localize the alkaloids, build an approach to observe alkaloids distribution with paraffin slices. The experiment result suggests that: the tissue cultured self-born bulb enjoys the most alkaloids among the tissue cultured different parts, followed by callus with adventitious roots; it is more effective to localize alkaloids with paraffin slices and bismuth potassium iodide; alkaloids of bulbs mainly distribute in parenchyma cells while alkaloids of callus mainly around the cell wall; there are relations between alkaloids distribution and starch grains in bulb of wild *Fritillaria cirrhosa* D. Don.

**Key words:** *Fritillaria cirrhosa* D. Don, alkaloid, histochemistry, paraffin slice, culture in vitro

## 1 引 言

川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)是有代表性的川产道地中药材之一。对其组培胚状体的研究已经开展<sup>[1]</sup>。川贝母有效成分主要为生物碱类和

皂苷类。因川贝母中已知结构的生物碱类成分的含量均很低且变化幅度较大,供含量测定用的指标性成分还需进一步研究<sup>[2]</sup>,故其总生物碱类或总皂苷类成分的含量测定就尤其受到重视,而且对生物碱在贝母鳞茎中的分布研究还未开展;生物碱同

收稿日期: 2007-04-15

作者简介: 杨杨(1983-),男,四川简阳人,硕士研究生,主要从事中草药的组织培养和有效成分的研究。E-mail: doubledy@sohu.com

通讯作者: 兰利琼。E-mail: llqcg@263.net

淀粉的关系的研究还需要深入<sup>[3]</sup>;组培川贝母不同生长状态下不同部位的总生物碱类成分含量,以及用组织化学方法进行川贝母生物碱定位均未见报道.本文对生物碱在野生和组培川贝母组织中的含量和分布定位进行了研究,为正确掌握组培川贝母合适的药用部位,保证药材质量以及资源保护提供科学依据.

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

实验用新鲜野生川贝母由成都恩威集团提供(采于康定),药品川贝母为市售一级川贝母,组培川贝母无菌鳞茎等为四川大学藻类学实验室继代培养,原始外植体取自四川省阿坝州若尔盖地区.取用 20d 生长良好的新鲜愈伤组织<sup>[4]</sup>和 40d 以上表面全部褐化的褐化愈伤组织.

### 2.2 总生物碱含量测定

样品经洗净选去培养基或泥沙,自然干燥后再置 60~62℃ 恒温箱内烘 8h 至恒重,研成细粉后存放于干燥器内备用.采用两相滴定法<sup>[5]</sup>加以修改测定总生物碱含量:取样品粉末 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,以 18% 氨水 2 mL 润湿 1 h,加乙酰-氯仿-乙醇(25:8:2.5)混合溶剂 30 mL,室温浸泡过夜<sup>[6]</sup>,精密吸取上清液 20 mL 置试管中,60℃ 水浴蒸干,准确加入 10 mL 氯仿使其完全溶解,再准确吸取 5 mL 至小分液漏斗中<sup>[7]</sup>,加 6 mL 氯仿,2 mL 缓冲液(0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢钾 25 mL, 0.2 mol/L 氢氧化钠 11.33 mL 混匀, pH = 5.0),用 0.001 mol/L 溴麝香草酚蓝溶液滴定,接近终点时,分出氯仿层,再加入新鲜氯仿 5 mL,滴定至水层略显黄色即为终点.按下式计算总生物碱(以西贝素计)的含量.

$$\text{总生物碱含量}\% = \frac{NVM \times \frac{10}{5}}{W} \times 100\%$$

$N$  为溴麝香草酚蓝溶液浓度(mol/L);  $V$  为消耗溴麝香草酚蓝溶液体积(L);  $M$  为西贝素分子量(429);  $W$  为样品取样量(g).

### 2.3 川贝母生物碱的组织化学定位

2.3.1 生物碱定位方法的确定 ①分别用碘化铋钾,硅钨酸和浓硫酸作为生物碱定位试剂;②分别用 FAA, FPA, 卡诺氏液和 FA 固定液(5 mL 福尔马林加 95 mL 70% 酒精)对样品固定不同时间;③采用徒手切片,传统石蜡切片和快速石蜡包埋切

片<sup>[8,9]</sup>等方法制作切片;④采用不同切片厚度;⑤分别使用明胶和梅氏蛋白粘剂粘片;⑥染色方法的选择:A. 直接用定位试剂处理切片;B. 切片经番红染色后定位试剂处理,再用固绿衬染;C. 切片经 PAS 染色后用定位试剂处理;⑦对照切片在脱水时用酒石酸酒精溶液处理或用酒石酸酒精溶液预处理 24 h.

2.3.2 生物碱的观察 切片处理完毕后用中性树脂封固,置显微镜下观察细胞结构和生物碱积累分布情况,并将碘化铋钾所处理的切片在 Olympus 显微镜下摄影.

## 3 结果

### 3.1 样品中总生物碱的含量

样品中总生物碱的含量测定情况见表 1.

表 1 样品中总生物碱的含量( $n=3$ )

Tab. 1 The content of total alkaloids of samples

样品	折干率 (%)	贝母类总生物碱含量 (%)	相对标准偏差 (%)
市售川贝	-	0.088	2.7
愈伤组织	10.49	0.146	1.4
带不定根的愈伤组织	11.60	0.177	3.2
褐化愈伤组织	5.86	0.110	2.4
带不定根的褐化愈伤组织	7.76	0.157	2.5
再生鳞茎	13.05	0.190	1.0
野生鳞茎	27.18	0.111	3.6

野生川贝母和组培川贝母各部分的总生物碱含量都较市售川贝母为高;组培川贝母总生物碱含量几乎都高于野生川贝母鳞茎;再生鳞茎的折干率和总生物碱含量是组培川贝母各部分中最高的,其总生物碱含量为野生鳞茎的 1.7 倍;组培川贝母各部分总生物碱含量从高到低的顺序为:再生鳞茎 > 带不定根的愈伤组织 > 带不定根的褐化愈伤组织 > 愈伤组织 > 褐化愈伤组织;褐化愈伤组织较正常愈伤组织总生物碱含量明显偏低.

### 3.2 生物碱定位方法

通过多种方法的比较确定最佳的切片方法为:川贝母材料经 FA 固定液固定 24 h,采用传统石蜡切片法处理,切片厚度 8~15  $\mu\text{m}$ ,明胶粘剂粘片,施以番红-碘化铋钾(据不同材料不同切片厚度处理时间为 60~150 s)-固绿染色.

### 3.3 生物碱分布情况

生物碱分布情况见图 1 和图 2.

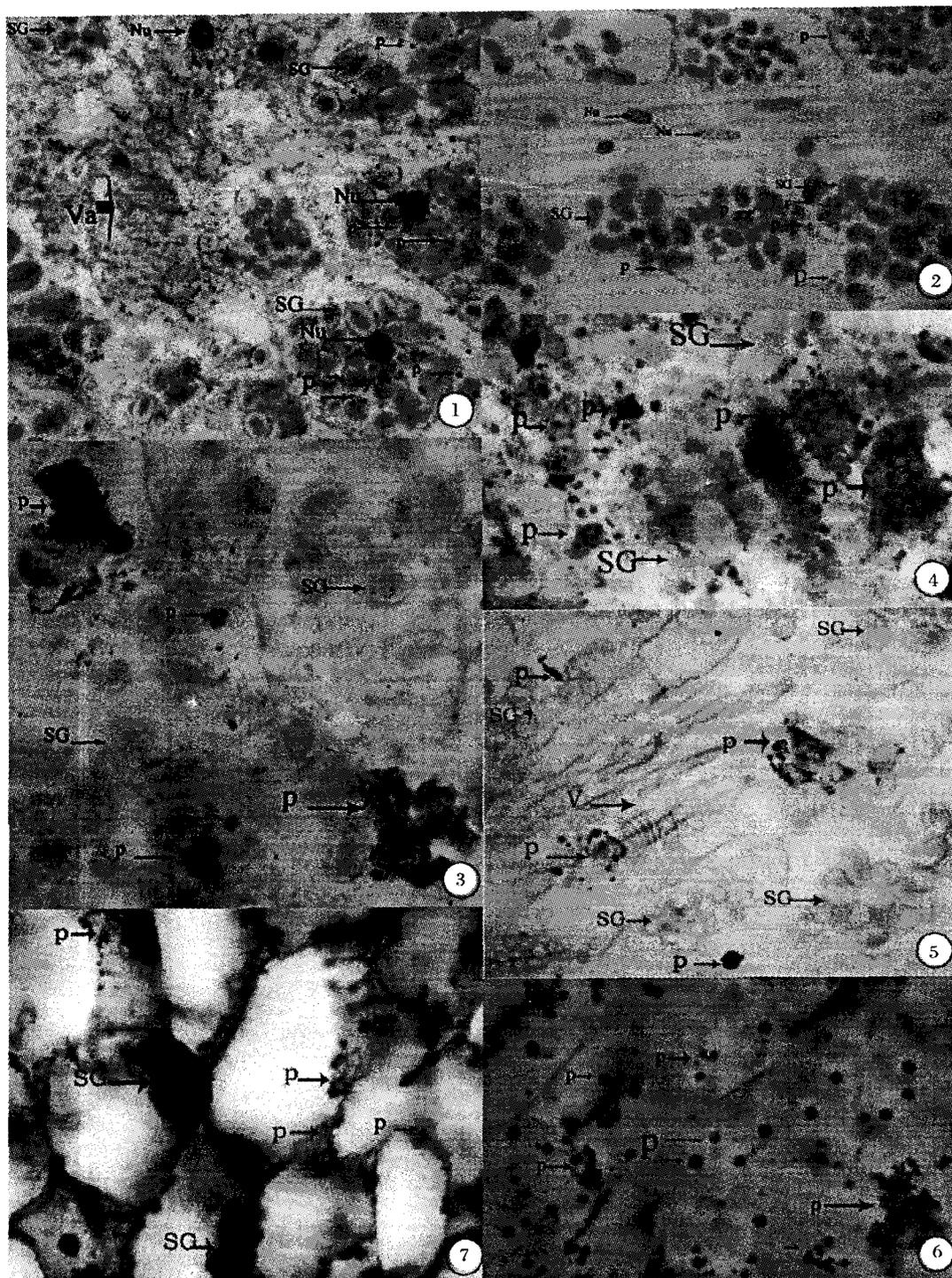


图 1 野生和组培川贝母的总生物碱组织化学定位

Fig. 1 Histochemical localization of alkaloids in wild and tissue cultured *Fritillaria cirrhosa* D. Don  
 SG. 淀粉粒; p. 生物碱沉淀; Nu. 细胞核; V. 导管; Va. 维管束。①野生川贝母鳞茎横切面, 示维管束和周围薄壁细胞以及黑色生物碱沉淀; ②野生川贝母鳞茎纵切面, 示维管束和周围薄壁细胞, 黑色生物碱沉淀分布在细胞壁周围; ③, ④组培川贝母鳞茎横切面, 示薄壁细胞内不定型生物碱沉淀呈淡黄至橘红色; ⑤野生川贝母鳞茎纵切面, 示导管和周围薄壁细胞的生物碱沉淀呈淡黄色; ⑥快速石蜡包埋的新鲜愈伤组织切片, 示淡黄至深黄色生物碱沉淀; ⑦褐色愈伤组织切片, 示细胞壁上积累的淡黄色生物碱沉淀。(①~⑦, ×40; ②, ⑤为 PAS 染色后同碘化铋钾反应, 其余都为番红-碘化铋钾-固绿染色)

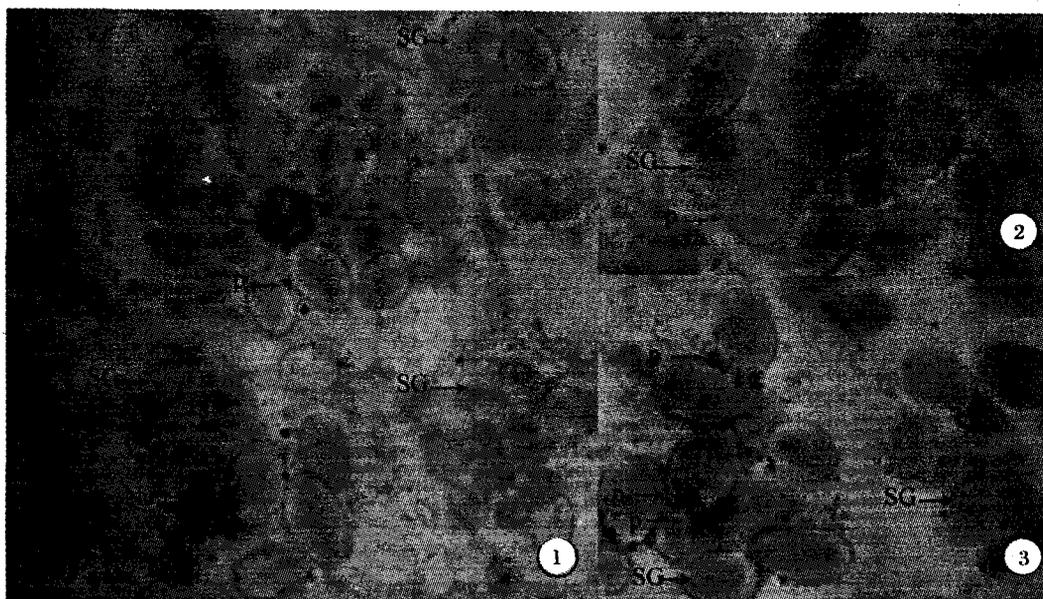


图 2 野生川贝母的生物碱分布同淀粉粒的关系

Fig. 2 The relation between alkaloids distribution and starch grain in wild *Fritillaria cirrhosa* D. Don  
SG. 淀粉粒; p. 生物碱沉淀; Nu. 细胞核. ①~③野生川贝母鳞茎横切面, 示生物碱与淀粉粒的形态和分布的关系.  
( $\times 40$ ; 均为番红-碘化铋钾-固绿染色)

(1)切片经碘化铋钾处理后,镜检发现野生鳞茎(图 1:1~2)和再生鳞茎的内层薄壁细胞含有较多的生物碱沉淀(图 1:3~4),个别导管腔以及筛管周围也有分布(图 1:5);新鲜愈伤组织几乎所有细胞都含有生物碱(图 1:6);褐化愈伤组织的生物碱主要分布在细胞壁上(图 1:7).经硅钨酸处理后的切片可观察到很淡的不规则雾状白色沉淀分布于薄壁细胞内,硫酸处理无明显沉淀且细胞结构被破坏.经酒石酸酒精溶液处理的对照切片,同碘化铋钾及硅钨酸反应皆为阴性.

(2)在野生川贝母鳞茎切片中观察到(图 2:1~3),含生物碱的薄壁细胞中淀粉粒多为广卵形和长圆形,形态较规则而且分布均匀而致密;生物碱较少或无的薄壁细胞里淀粉粒分布过于稀疏或密集,部分存在贝壳形和不规则圆形的淀粉粒;而在组培川贝母鳞茎和愈伤组织切片中,没有观察到生物碱同淀粉明显的消长关系(图 1:3~4).

## 4 讨论

### 4.1 总生物碱的含量

组培川贝母各部分的总生物碱含量都高于市售和野生川贝母鳞茎;再生鳞茎的折干率和总生物碱含量最高,带不定根的愈伤组织次之;不定根的诱导对愈伤组织积累干物质和生物碱有较明显的

作用,同时贝母不定根也有较高生物碱含量<sup>[10]</sup>;使用我们的定位方法(见 3.2 项)观察生物碱分布的情况同测定结果(见 3.1 项)相符合.因此在组织培养药用川贝母时,仍应该以培养再生鳞茎为主,同时有意识的诱导不定根的生成.这也说明了通过组织培养手段,快速繁殖川贝母鳞茎,加以开发并投放市场,对于缓解市场的供求矛盾,保护川贝母野生资源将起到积极作用.

### 4.2 生物碱定位方法

(1)川贝母生物碱同碘化铋钾生成淡橙黄色到橘红色的不定型沉淀(低倍镜下呈小黑点);同硅钨酸生成不明显的絮状沉淀难以清晰拍照;同硫酸无明显沉淀生成,且细胞被破坏.贝母类生物碱同碘化铋钾和硅钨酸生成沉淀的颜色同报道一致<sup>[11~13]</sup>.因此用碘化铋钾处理观察生物碱较理想,处理时间随不同材料不同厚度而调整在 60~150 s 之间可观察到较多生物碱沉淀且不影响细胞结构.

(2)材料用 FA 固定液固定的效果最好,避免了酸类物质对生物碱的影响.

(3)采用徒手切片配合滴染可以直观的看到整个染色过程,但产生的生物碱沉淀随染液流失较多,同时淀粉粒被碘化铋钾着色(蓝黑色)影响观察;用传统石蜡切片可清晰观察到各组织的细胞结

构和生物碱沉淀的分布情况;用快速石蜡包埋切片能观察到更多的生物碱沉淀但对细胞组织有不同程度的影响和破坏,不利于观察生物碱沉淀在细胞内的分布。

(4)愈伤组织和再生鳞茎需用 8~12  $\mu\text{m}$  的较薄切片,野生鳞茎则需用 12~15  $\mu\text{m}$  的切片有较好的染色效果。太薄产生沉淀较少,太厚淀粉粒影响观察。

(5)粘片剂影响小。

(6)PAS 染色后利于观察淀粉粒的形态但对生物碱沉淀有一定影响,可能是高碘酸氧化的作用;番红固绿衬染能减少碘化铋钾对淀粉粒着色的影响,细胞结构清晰,颜色对比明显,适宜于生物碱组织化学定位。

#### 4.3 生物碱积累分布

新鲜愈伤组织的生物碱分布在薄壁细胞内的细胞壁周围,而褐化愈伤组织的生物碱主要积累在细胞壁上,这同 JIH 德日阿帕利捷指出的:一般说来,植物生活组织中生物碱局部地分布于细胞液中,细胞死亡后则存在于细胞的其它部分,细胞壁能吸收生物碱<sup>[14]</sup>相符合。野生川贝母鳞茎生物碱产生机理和过程还有待研究,生物碱积累分布同淀粉数量及形态有一定的联系,用切片配合组织化学定位的方法进行这些方面的研究对于指导人工栽培和快速繁殖川贝母,提高川贝母药品质量有重要意义。

#### 参考文献:

[1] 李强,凌丽俐,傅华龙,等. 低温诱导对组培川贝母

胚状体成苗的影响[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2003, 40(2): 367.

- [2] 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.
- [3] 蔡朝晖,李萍,李会军,等. 蒲圻贝母组织培养鳞茎形成过程中生理生化变化研究[J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(4): 314.
- [4] 李玉峰,颜钊,唐琳,等. 浓蜜贝母的组织培养条件及不同时期生物碱积累的研究[J]. 中草药, 2002, 33(5): 458.
- [5] 张秀琴,沙世炎. 贝母中总生物碱的含量测定[J]. 中草药通讯, 1976, 2: 13.
- [6] 王化远,张安将,唐心曜,等. 瓦布贝母生物碱的分离与鉴定[J]. 华西医科大学报, 1996, 27(1): 100.
- [7] 王曙,徐小平,李涛. 川贝母与其他贝母类药材总生物碱和总皂苷的含量测定与比较[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 342.
- [8] 唐慕湘,赵伦华,曹书芬. 快速石蜡切片的制作新法[J]. 郧阳医学院学报, 2003, 05: 301.
- [9] 徐有坤,吴正荣,陈敬华,等. 微小标本快速石蜡包埋法[J]. 临床军医杂志, 2001, 29(3): 93.
- [10] 贾廷耀,丁惠宾,王仑山. 伊贝母组织培养中次生代谢产物的研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(1): 127.
- [11] 罗集鹏. 生药学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2001.
- [12] 徐祝封. 中药理化鉴定[M]. 北京:中国中医药出版社, 1997.
- [13] 肖培根. 新编中药志[M]. 化学工业出版社, 2002.
- [14] JIH 德日阿帕利捷. 植物显微化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社, 1960.

[责任编辑:白林含]