

四种绿绒蒿属植物中总黄酮含量测定

舍莉萍^{1,2} 孙菁^{1*} 周玉碧¹ 孙胜男^{1,2} 赵庆帅^{1,2} 叶润蓉¹ 卢学峰¹ 彭敏¹

¹中国科学院西北高原生物研究所 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室 西宁 810008;

²中国科学院大学 北京 100049

摘要: 本文采用比色法测定了4种绿绒蒿属植物中总黄酮的含量,该方法线性关系良好($r^2 = 0.9990$) 平均回收率为101.56% 精密度和重复性试验 RSD 分别为2.94%和1.22% 表明本试验的重复性较好。结果显示总黄酮含量以五脉绿绒蒿中最高,全缘和红花绿绒蒿次之,总状绿绒蒿中最低,4种药材总黄酮含量的变化与其用途差异基本吻合,与藏医用药品种习惯较为相符。本实验结果可以为绿绒蒿属药用植物资源的深入研究和开发利用提供一定的理论依据。

关键词: 总黄酮; 比色法; 五脉绿绒蒿; 全缘绿绒蒿; 红花绿绒蒿; 总状绿绒蒿

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.020

Determination of Total Flavonoids in Four *Meconopsis* Species from Qinghai-Tibet Plateau

SHE Li-ping^{1,2} SUN Jing^{1*} ZHOU Yu-bi¹ SUN Sheng-nan^{1,2},
ZHAO Qing-shuai^{1,2} YE Run-rong¹ LU Xue-feng¹ PENG Min¹

¹Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In this paper, the contents of total flavonoids in four *Meconopsis* species collected from the Qinghai-Tibet plateau were determined by ultraviolet-visible spectrophotometer with colorimetric method. This method showed good linearity ($r^2 = 0.9990$). The average recovery of the method was 101.56%; the accuracy and repeatability of the method were confirmed by the precision and repetition tests with RSD = 2.94% and 1.34% respectively. The results showed that the total flavonoids content in *Meconopsis quintuplinervia* was the highest, which was a top-grade medicinal herb in accord with the traditional usage habit of Tibet. In addition, the results showed that there was a remarkable difference between *Meconopsis quintuplinervia* and the others which was analyzed by SPSS 20.0 with ANOVA method. The results presented in this study will provide a theoretical basis for the further studies of the medicinal herbs of *Meconopsis* species.

Key words: total flavonoids; colorimetric method; *Meconopsis quintuplinervia*; *Meconopsis integrifolia*; *Meconopsis horridula*; *Meconopsis punicea*.

绿绒蒿是罂粟科(Papaveraceae)绿绒蒿属(*Meconopsis* Vigg.)植物的统称,为多年生草本,系藏医药中著名的传统药用植物。我国有38种,主要分布于云南、四川、甘肃、青藏高原等地区^[1,2]。其中,17种为药用植物,《藏药志》中记载以五脉绿绒蒿(*Meconopsis quintuplinervia* Regel.)、全缘绿绒蒿[*M. integrifolia*(Maxim.) Franch.]、多刺绿绒蒿(*M. horridula* Hook. f. et Thoms.)、总状绿绒蒿[*M. horridula*

Hook. Thoms. var. *racemosa*(Maxim.) Prain]、红花绿绒蒿(*M. punicea* Maxim.)等最为常用^[2]。近年来对绿绒蒿属植物化学成分的研究表明,该属植物中含有生物碱、黄酮、挥发油、萜类等化学成分,其中又以生物碱类和黄酮类成分为该属植物主要活性成分,围绕这两类化合物的研究最为引人关注^[3-7]。现代药理学研究表明,绿绒蒿属植物具有抗疲劳、止泻、镇痛和保肝等作用^[8-10]。

黄酮类化合物(Flavonoids)是在植物中广泛存在的一类具有C6-C3-C6结构的天然化合物,是药用植物中的主要活性成分之一,具有抗炎抑菌、镇痛止咳及解热保肝等药理作用。近年来对绿绒蒿属植物

收稿日期: 2013-05-02 接受日期: 2013-10-21

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划(2010);中国科学院知识创新工程重要方向(KSCX2-EW-J-26); 国家科技支撑计划(2010BAK68B02)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6143523; E-mail: sunj@nwipb.cas.cn

黄酮类化合物的研究多集中于结构分析和鉴定^[3-7], 对于不同物种间总黄酮含量比较的研究则较少, 本文采用比色法^[8-10]测定了四种绿绒蒿属药用植物, 即五脉绿绒蒿、全缘绿绒蒿、总状绿绒蒿及红花绿绒蒿中总黄酮含量, 并对其含量差异进行了比较分析, 以期对绿绒蒿属药用植物资源的深入研究和开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

722S 型分光光度计(上海棱光); KQ5200DE 超声波清洗仪(江苏昆山); 优普 UPT-I-10T 型超纯水机(上海优普)。

1.2 试剂

芦丁对照品购自中国食品药品检定研究院(批

号 100080-200707); 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇等均为分析纯; 试验用水为超纯水(18.2 MΩ·cm)。

1.3 样品采集与预处理

试验用材料均采自青海省境内, 具体采集地点如表 1 所示。每一物种在同一采集地点, 至少采集 15~20 株植株个体, 株间距离至少 5 m, 然后混合。原植物标本经中科院西北高原生物研究所卢学峰副研究员鉴定为罂粟科绿绒蒿属五脉绿绒蒿(*M. quintuplinervia* Regel.)、全缘绿绒蒿[*M. integrifolia*(Maxim.) Franch.]、总状绿绒蒿[*M. horridula* Hook. Thoms. var. *racemosa*(Maxim.) Prain]及红花绿绒蒿(*M. punicea* Maxim.)。样品带回实验室后, 用纯水淋洗、阴干后粉碎, 过 100 目筛, 备用。

表 1 绿绒蒿样品采集地点

Table 1 Collecting sites of experimental samples

样品 Samples	五脉绿绒蒿 <i>M. quintuplinervia</i>	全缘绿绒蒿 <i>M. integrifolia</i>	总状绿绒蒿 <i>M. horridula</i>	红花绿绒蒿 <i>M. punicea</i>
采集地点 Sites	青海省贵德县 Guide county	青海省尖扎县 Jianzha county	青海省刚察县 Gangcha county	青海省达日县 Dari county

1.4 实验方法

1.4.1 总黄酮提取

精确称取样品 0.500 g 置于 100 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 75% 乙醇, 称重, 45 °C 下恒温超声 1 h (超声频率为 40 KHz), 放凉, 补足重量。过滤, 准确量取提取液 1 mL, 用 75% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶中, 待测。

1.4.2 标准曲线绘制

精密称取芦丁对照品 0.0070 g, 用 75% 乙醇溶液溶解, 定容至 100 mL, 即得浓度为 0.070 mg/mL 的对照品储备液。依次吸取对照品溶液 2、4、6、8、10 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用 75% 乙醇溶液稀释至刻度, 分别配制成浓度为 0.014、0.028、0.042、0.056、0.070 mg/mL 的系列标准工作溶液。

准确量取各浓度标准工作溶液 2.0 mL 置于 25 mL 容量瓶中, 加 1.0 mL 5% NaNO₂ 溶液, 摇匀, 静置 5 min; 加入 1.0 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液, 摇匀, 静置 6 min; 再加入 1.0 mL 40% NaOH 溶液, 用 75% 乙醇溶液定容至 25 mL 容量瓶中, 摇匀, 放置 15 min。以不加对照品的 75% 乙醇溶液同法作空白, 在波长 510 nm 处进行检测。以芦丁浓度为横坐标, 吸光度

值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 0.8929X - 0.0075$ ($r^2 = 0.9990$)。

1.4.3 精密度试验

准确量取芦丁浓度为 0.070 mg/mL 的标准工作溶液 2.0 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 按“1.4.2”项下方法进行检测, 平行测定 5 次, 计算 RSD 值。

1.4.4 重复性试验

取五脉绿绒蒿待测液 5 份, 分别按“1.4.2”项下方法进行检测, 以吸光度值计算 RSD 值。

1.4.5 回收率试验

取已知总黄酮含量的五脉绿绒蒿样品待测液 5 份, 每份 1.0 mL, 分别加入系列浓度的标准工作溶液 1.0 mL, 按“1.4.2”项下方法进行检测, 计算平均回收率。

1.4.6 样品测定

准确量取各样品待测溶液 2.0 mL 置于 25 mL 容量瓶中, 按“1.4.2”项方法进行测定, 每个样品平行测定 3 次, 根据标准曲线计算各样品中总黄酮含量。

1.4.7 数据处理

采用 SPSS20.0 软件对四种绿绒蒿植物中总黄酮含量进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

RSD 值分别为 2.94% 和 1.34%, 平均回收率为 101.56%。

2.1 方法学考察及样品含量测定

由表 2 和表 3 可以看出, 精密度和重复性试验

表 2 精密度和重复性试验 ($n = 5$)

Table 2 Results of precision and repeatability tests ($n = 5$)

精密度试验 Precision tests			重复性试验 Repeatability tests		
测定次数 Testing times	吸光度 A	RSD %	测定次数 Testing times	吸光度 A	RSD %
1	0.055		1	0.085	
2	0.055		2	0.084	
3	0.057	2.94	3	0.085	1.34
4	0.054		4	0.086	
5	0.058		5	0.087	

表 3 回收率试验 ($n = 5$)

Table 3 Recoveries of the developed method ($n = 5$)

序号 No.	含量 Content(mg)	加入量 Add(mg)	检测量 Tested(mg)	回收率 Recovery(%)	RSD(%)
1	0.130	0.014	0.298	99.8	
2	0.130	0.028	0.312	100.7	
3	0.130	0.042	0.327	102.1	1.49
4	0.130	0.056	0.341	101.4	
5	0.130	0.070	0.357	103.8	
平均回收率 Average Recovery(%)			101.5		

从表 4 中可以看出, 被测样品总黄酮含量以五脉绿绒蒿最高, 全缘、红花绿绒蒿次之, 总状绿绒蒿最低。数据处理结果显示, 五脉和总状绿绒蒿分别与其他三种样品之间差异极显著 ($P < 0.01$), 全缘与红花绿绒蒿之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 4 样品总黄酮含量测定结果 ($n = 3$)

Table 4 Contents of total flavonoids in the 4 investigated species ($n = 3$)

样品 Sample	总黄酮含量 Contents (mg/g)	均值 Mean (mg/g)
五脉绿绒蒿 <i>M. quintuplinervia</i>	0.1281	
	0.1295	0.1295 ± 0.0014 (A) *
	0.1309	
全缘绿绒蒿 <i>M. integrifolia</i>	0.0679	
	0.0679	0.0665 ± 0.0024 (B)
	0.0637	

总状绿绒蒿 <i>M. horridula</i>	0.0413	
	0.0371	0.0399 ± 0.0024 (C)
	0.0413	
红花绿绒蒿 <i>M. punicea</i>	0.0665	
	0.0707	0.0693 ± 0.0024 (B)
	0.0707	

* : ABC 分别表示显著性分析, 相同字母表示无显著差异 ($P > 0.05$), 不同字母表示有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

* : ABC indicated results of variance analysis, same letter indicated no significant difference ($P > 0.05$), different letters indicated extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.2 讨论

黄酮类化合物分子结构中若具有 3-羟基、5-羟基或邻二酚羟基, 则易与金属盐类如铝盐、锆盐、镉盐、镁盐等反应, 生成有色金属络合物, 这些络合物作用在光谱上能产生明显的变化, 吸收峰红移, 可用于定量法测定黄酮含量^[9, 10]。绿绒蒿属植物中已检测出的黄酮类化合物多为槲皮素、双氢槲皮素、木犀

草素等^[3,4]。故本实验以 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 作为显色体系, 芦丁为对照品, 采用比色法测定了四种绿绒蒿属植物总黄酮的含量, 平均回收率 101.56%。精密度和重复性试验 RSD 分别为 2.94% 和 1.34%, 表明本实验方法精密度高, 具有良好的准确性和重复性。

据藏药志记载, 总状绿绒蒿为藏药“才温”的代用品, 用于接骨、清热、止痛、活血化瘀; 治头伤、骨折、骨蒸、跌打损伤、胸背疼痛。五脉、全缘和红花绿绒蒿则统称“吾巴拉”, 根据花色不同进行区分。“吾巴拉”可清热解毒、利尿、消炎、止痛; 主治肺炎、肝炎、头痛、水肿、皮肤病、肝与肺的热症^[2]。由此可见, 这两类药材的用途和功效具有较大差别, 这与我们的差异性分析结果基本吻合。

现代药理研究表明, 黄酮类化合物多对血液、血管有活性作用, 其中槲皮素、木犀草素具抗菌、抗病毒作用^[9,10], 这与绿绒蒿属植物所具有的清热、解毒、消炎、止痛等功效相符合^[3,4]。藏医用药习惯多以五脉绿绒蒿作为藏药“吾巴拉”的上品, 全缘和红花绿绒蒿则以花色区分来分别加以利用^[2]。实验结果表明(见表4), 五脉绿绒蒿总黄酮含量比全缘和红花绿绒蒿的总黄酮含量高出一倍多, 且差异显著, 这说明以其为藏医用药上品是具有一定科学道理的。

参考文献

- 1 Liu SW(刘尚武). Flora Qinghaiica(青海植物志). Xining: Qinghai People's Republishing House, 1997. VolI 387-392.
- 2 Yang YC(杨永昌). Tibetan Medicine(藏药志). Xining: Qinghai people's Republic House, 1991. 294-295, 465-

467.

- 3 Yang M(杨苗), Shi XB(史小波), Min K(闵康), et al. The research advancement on chemical constituents and medicinal activity of the Genus *Meconopsis*. *Chin Tradit Pat Med* (中成药) 2010 32: 279-283.
- 4 Zhao JG(赵建刚), Guo M(郭玫). Research progress on Tibetan medicine—the Genus *Meconopsis*. *Chin J Inf TCM*(中国医药信息杂志) 2008 15: 106-107.
- 5 Guo SM(郭世民), Zhao Y(赵远), Wang SG(王曙光). Preliminary pharmacodynamical research on *Meconopsis horridula*. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*(云南中医药杂志) 2003 24: 25-27.
- 6 Fu Y(傅予), He ZZ(何芝州), Bai Y(白央), et al. Chemical constituents from *Meconopsis integravia*. *J Med Pharm Chin Minor*(中国民族医药杂志) 2010 2: 46-48.
- 7 Wu HF(吴海峰), Pan L(潘莉), Ding LS(丁立生), et al. Chemical constituents of a Tibetan medicine *Meconopsis quintuplinervia* Reget. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2007 19: 811-813.
- 8 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. VolI 30.
- 9 Zheng HS(郑杭生), Li JP(李计萍), Han W(韩炜), et al. Methodological examination points on the determination of total flavonoids content by UV-spectrophotometry. *Chin Tradit Pat Med*(中成药) 2008 20: 1364-1365.
- 10 Cao WG(曹伟国), Liu ZQ(刘志勤), Shao Y(邵云), et al. A progress in pharmacological research of flavonoids. *Acta Botan Boreali-Occidentalia Sin*(西北植物学报) 2003 23: 2241-2247.

(上接第 426 页)

- 17 Wang QW(王庆武), Lan YF(兰玉菲), An XR(安秀荣), et al. Comparative test of *Ganoderma lucidum* strains. *Edible Fungi*(食用菌) 2010 5: 25-27.
- 18 Lin XS(林兴生), Li KB(李开本), Chen TQ(陈体强), et al. A comparative study on the cultivation characteristics of 28 *Ganoderma lucidum* strains. *Acta Edulis Fungi*(食用菌学报) 2001 8(3): 45-49.

- 19 Xiao ZT(肖自添), Yan Y(阎轶), He HQ(何焕清), et al. Comparative study of twenty-eight *Ganoderma lucidum* strains. *Guangdong Agric Sci*(广东农业科学) 2009 9: 58-60.
- 20 Xiao ZT(肖自添), Tan ZY(谭志勇), Ye YC(叶耀程), et al. Comparative study on the yield of different *Ganoderma lucidum* strains. *Guangdong Agric Sci*(广东农业科学), 2010 10: 60-62.