**学号：1328001046**

**Hubei University of Chinese Medicine**



**博士学位论文**

**DOCTOR DISSERTATION**

**藏药材“欧贝”类绿绒蒿“清肝热、肺热” 功效与活性化学物质相关性研究**

**Relative Research of Hepatoprotection and Lung Injury Protection Effects with Active Components of *Meconopsis***

**研** 究 生 姓 **名：黄艳菲**

**指导教师姓名、职称：黄必胜 教授**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **学** | **科、专** | **业 名** | **称：中药学** |
| **研** | **究** | **方** | **向：中药资源及其品质研究** |
| **培** | **养** | **类** | **型：学术学位** |

**湖北中医药大学**

**2016 年 5 月 30 日**

**湖北中医药大学学位论文原创性声明**

本人声明： 所呈交的学位论文是在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得湖北中医药大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中作了明确的说明。本人完全意识到本声明 的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的声明**

本人完全了解湖北中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，即： 学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部份内容，可以采用复印、缩印或其他手段保留学位论文； 学校可以根据国家或湖北省有关部门的规定送交学位论文。同意《中国优秀博硕士论文全文数据库出版章程》的内容。同意授权中国科学技术信息研究所将本人学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》。

（保密论文在解密后遵守此规定）

论文作者签名： 导师签名： 年 月

目 录

[摘 要](#_Toc686641688) 4

[Abstract](#_Toc686641689) 6

[缩略词表](#_Toc686641690) 9

[前 言](#_Toc686641691) 13

[第一章 藏药材绿绒蒿的Th药鉴别研究](#_Toc686641692) 14

**[1](#_Toc686641693)** [材料与方法](#_Toc686641693) 14

**[1.1](#_Toc686641694)** [材料与试剂](#_Toc686641694) 14

**[1.2](#_Toc686641695)** [仪器设备](#_Toc686641695) 14

**[2](#_Toc686641696)** [方法与结果](#_Toc686641696) 14

**[2.1](#_Toc686641697)** [电镜观察方法](#_Toc686641697) 14

**[2.2](#_Toc686641698)** [显微样品制备](#_Toc686641698) 14

**[2.3](#_Toc686641699)** [鉴别研究](#_Toc686641699) 15

**[3.4](#_Toc686641700)** [显微鉴别](#_Toc686641700)**[[14]](#_Toc686641700)** 16

[3.5 花粉形态观察（测量了大约20粒外形饱满，发育较好的花粉粒）全缘叶绿绒蒿：形态为近球形或球形，表面具刺和刺状雕纹，刺末端](#_Toc686641701) 21

**[3](#_Toc686641702)** [讨论](#_Toc686641702) 21

[第二章 大孔树脂富集纯化藏药材全缘叶绿绒蒿总黄酮的工艺研究](#_Toc686641703) 23

**[1](#_Toc686641704)** [仪器与材料](#_Toc686641704) 23

**[2](#_Toc686641705)** [方法与结果](#_Toc686641705) 23

**[2.1](#_Toc686641706)** [大孔树脂预处理](#_Toc686641706) 23

**[2.2](#_Toc686641707)** [上样液的制备](#_Toc686641707) 23

**[2.3](#_Toc686641708)** [全缘叶绿绒蒿植株提取物中总黄酮含量的测定](#_Toc686641708) 23

**[2.4](#_Toc686641709)** [大孔吸附树脂型号的筛选](#_Toc686641709) 23

**[2.5](#_Toc686641710)****[D101](#_Toc686641710)**[型树脂吸附全缘叶绿绒蒿总黄酮的影响因素](#_Toc686641710) 25

**[2.6](#_Toc686641711)** [验证试验](#_Toc686641711) 26

**[3](#_Toc686641712)** [讨论](#_Toc686641712) 27

[第三章 三种不同花色绿绒蒿花和植株抗氧化活性和“清肝热、肺热”功 效研究](#_Toc686641713) 27

[第一节 三种不同花色绿绒蒿花的醇提取物和植株总黄酮体外抗氧化作 用研究](#_Toc686641714) 27

**[1](#_Toc686641715)** [材料与方法](#_Toc686641715) 28

**[1.1](#_Toc686641716)** [材料与试剂](#_Toc686641716) 28

**[1.2](#_Toc686641717)** [仪器](#_Toc686641717) 28

**[1.3](#_Toc686641718)** [样品制备方法](#_Toc686641718) 28

**[1.4](#_Toc686641719)** [酚类化合物的含量的定量测定](#_Toc686641719) 28

**[1.5](#_Toc686641720)** [样品抗氧化能力](#_Toc686641720) 28

**[2](#_Toc686641721)** [结果与分析](#_Toc686641721) 29

[2.1 酚类化合物的含量测定定量测定](#_Toc686641722) 29

**[2.2](#_Toc686641723)** [总抗氧化能力](#_Toc686641723) 29

**[2.3](#_Toc686641724)****[DPPH](#_Toc686641724)**[自由基清除能力](#_Toc686641724) 29

**[2.4](#_Toc686641725)****[ABTS](#_Toc686641725)**[自由基清除能力](#_Toc686641725) 31

**[2.5](#_Toc686641726)** [抑制超氧阴离子自由基能力](#_Toc686641726) 32

**[3](#_Toc686641727)** [讨论](#_Toc686641727) 32

[第二节 三种不同花色绿绒蒿花的醇提物对](#_Toc686641728)**[LPS](#_Toc686641728)**[诱导](#_Toc686641728)**[RAW264.7](#_Toc686641728)**[细胞炎症作用的比较研究](#_Toc686641728) 32

**[1](#_Toc686641729)** [材料与方法](#_Toc686641729) 32

**[1.1](#_Toc686641730)** [药品和试剂](#_Toc686641730) 32

**[1.2](#_Toc686641731)** [试验细胞](#_Toc686641731) 32

**[1.3](#_Toc686641732)** [仪器](#_Toc686641732) 32

**[1.4](#_Toc686641733)** [三种绿绒蒿花提取物的制备](#_Toc686641733) 32

**[1.5](#_Toc686641734)** [细胞活性试验](#_Toc686641734) 33

[1.6 三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641735)**[LPS](#_Toc686641735)**[诱导的](#_Toc686641735)**[RAW264.7](#_Toc686641735)**[细胞释放](#_Toc686641735)**[NO](#_Toc686641735)**[的影响采用Griess法测定NO的含量。细胞以1×10](#_Toc686641735)[5](#_Toc686641735)[个/mL的浓度接种于](#_Toc686641735) 33

**[1.7](#_Toc686641736)** [三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641736)**[LPS](#_Toc686641736)**[诱导的](#_Toc686641736)**[RAW264.7](#_Toc686641736)**[细胞分泌](#_Toc686641736)**[TNF-α、IL-6、IL-10](#_Toc686641736)**[的影响](#_Toc686641736) 33

**[1.8](#_Toc686641737)** [三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641737)**[LPS](#_Toc686641737)**[诱导的](#_Toc686641737)**[RAW264.7](#_Toc686641737)**[细胞](#_Toc686641737)**[Caspase 3/7](#_Toc686641737)**[表达的影响](#_Toc686641737) 33

[1.9 三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641738)**[LPS](#_Toc686641738)**[诱导的](#_Toc686641738)**[RAW264.7](#_Toc686641738)**[细胞产生](#_Toc686641738)**[ROS](#_Toc686641738)**[的影响细胞以1×10](#_Toc686641738)[5](#_Toc686641738)[个/mL的浓度接种于96孔培养板中，孵育24 h。试验](#_Toc686641738) 33

**[2](#_Toc686641739)** [结果与分析](#_Toc686641739) 33

**[2.1](#_Toc686641740)** [细胞活性试验](#_Toc686641740) 33

[2.2 三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641741)**[LPS](#_Toc686641741)**[诱导的](#_Toc686641741)**[RAW264.7](#_Toc686641741)**[细胞释放](#_Toc686641741)**[NO](#_Toc686641741)**[的影响由图3-3可知，空白组与模型组（LPS）比较，NO产生的量呈极显著](#_Toc686641741) 33

**[2.3](#_Toc686641742)** [三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641742)**[LPS](#_Toc686641742)**[诱导的](#_Toc686641742)**[RAW264.7](#_Toc686641742)**[细胞分泌TNF-α、](#_Toc686641742)**[IL-6、IL-10](#_Toc686641742)**[的影响](#_Toc686641742) 34

**[2.4](#_Toc686641743)** [三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641743)**[LPS](#_Toc686641743)**[诱导的](#_Toc686641743)**[RAW264.7](#_Toc686641743)**[细胞](#_Toc686641743)**[Caspase 3/7](#_Toc686641743)**[表达的影响](#_Toc686641743) 34

[2.5 三种绿绒蒿花醇提取物对](#_Toc686641744)**[LPS](#_Toc686641744)**[诱导的](#_Toc686641744)**[RAW264.7](#_Toc686641744)**[细胞产生](#_Toc686641744)**[ROS](#_Toc686641744)**[的影响在LPS的刺激下，模型组的ROS显著升高，在三种绿绒蒿提取物的作](#_Toc686641744) 34

**[3](#_Toc686641745)** [讨论](#_Toc686641745) 34

[第三节 三种不同花色绿绒蒿植株总黄酮对小鼠肝损伤保护作用的比较 研究](#_Toc686641746) 36

**[1](#_Toc686641747)** [材料与方法](#_Toc686641747) 36

**[1.1](#_Toc686641748)** [实验动物与试剂](#_Toc686641748) 36

**[1.2](#_Toc686641749)** [仪器](#_Toc686641749) 36

**[1.3](#_Toc686641750)** [模型制备及分组](#_Toc686641750) 36

**[1.4](#_Toc686641751)** [指标测定](#_Toc686641751) 36

**[1.5](#_Toc686641752)** [肝组织病理形态学观察](#_Toc686641752) 36

**[1.6](#_Toc686641753)** [统计方法](#_Toc686641753) 36

**[2](#_Toc686641754)** [结果与分析](#_Toc686641754) 37

**[2.1](#_Toc686641755)** [三种绿绒蒿植株总黄酮对](#_Toc686641755)**[Con A](#_Toc686641755)**[诱导肝损伤小鼠血清](#_Toc686641755)**[ALT](#_Toc686641755)**[、](#_Toc686641755)**[AST](#_Toc686641755)**[、](#_Toc686641755)**[LDH](#_Toc686641755)**[的影响](#_Toc686641755) 37

**[2.2](#_Toc686641756)** [三种绿绒蒿植株总黄酮对](#_Toc686641756)**[Con A](#_Toc686641756)**[诱导肝损伤小鼠肝组织中](#_Toc686641756)**[SOD](#_Toc686641756)**[、GSH、](#_Toc686641756) 38

**[2.3](#_Toc686641757)****[HE](#_Toc686641757)**[染色结果](#_Toc686641757) 39

**[3](#_Toc686641758)** [讨论](#_Toc686641758) 42

[第四节 三种不同花色绿绒蒿提取物对脂多糖致小鼠肺损伤的作用](#_Toc686641759) 43

**[1](#_Toc686641760)** [材料与方法](#_Toc686641760) 43

**[1.1](#_Toc686641761)** [实验动物、试剂与材料](#_Toc686641761) 43

**[1.2](#_Toc686641762)** [仪器](#_Toc686641762) 43

**[1.3](#_Toc686641763)** [模型制备及分组](#_Toc686641763) 43

**[1.4](#_Toc686641764)** [肺组织病理形态学观察](#_Toc686641764) 43

**[1.5](#_Toc686641765)** [肺湿](#_Toc686641765)**[/](#_Toc686641765)**[干重比值（](#_Toc686641765)**[W/D](#_Toc686641765)**[）测定](#_Toc686641765) 43

**[1.6](#_Toc686641766)** [指标测定](#_Toc686641766) 43

**[1.7](#_Toc686641767)** [统计方法](#_Toc686641767) 44

**[2](#_Toc686641768)** [结果与分析](#_Toc686641768) 44

**[2.1](#_Toc686641769)****[HE](#_Toc686641769)** [染色结果](#_Toc686641769) 44

**[2.2](#_Toc686641770)** [肺](#_Toc686641770)**[W/D](#_Toc686641770)**[比值的改变](#_Toc686641770) 45

**[2.3](#_Toc686641771)** [三种绿绒蒿提取物对](#_Toc686641771)**[LPS](#_Toc686641771)**[诱导的脂多糖肺损伤小鼠血清中](#_Toc686641771)**[TNF-α、IL-1β、IL-6](#_Toc686641771)**[的影响](#_Toc686641771) 45

**[2.4](#_Toc686641772)** [三种绿绒蒿提取物对](#_Toc686641772)**[LPS](#_Toc686641772)**[诱导的脂多糖肺损伤小鼠肺组织中SOD、](#_Toc686641772) 47

[第四章 高速逆流色谱法分离纯化藏药材全缘叶绿绒蒿花的黄酮类成分](#_Toc686641773) 50

**[2.1](#_Toc686641774)** [样品制备](#_Toc686641774) 50

**[2.2](#_Toc686641775)** [分配系数的确定](#_Toc686641775) 50

**[2.3](#_Toc686641776)** [溶剂体系及样品溶液的制备](#_Toc686641776) 50

**[2.4](#_Toc686641777)****[HSCCC](#_Toc686641777)**[分离制备](#_Toc686641777) 50

**[2.5](#_Toc686641778)****[UPLC](#_Toc686641778)**[分析及结构鉴定](#_Toc686641778) 50

**[3](#_Toc686641779)** [结果与分析](#_Toc686641779) 51

**[3.1](#_Toc686641780)****[UPLC](#_Toc686641780)**[条件选择](#_Toc686641780) 51

**[3.2](#_Toc686641781)** [溶剂系统的选择和分离条件的优化](#_Toc686641781) 51

**[3.3](#_Toc686641782)****[HSCCC](#_Toc686641782)**[分离](#_Toc686641782) 52

**[3.4](#_Toc686641783)** [结构鉴定](#_Toc686641783) 53

**[4](#_Toc686641784)** [讨论](#_Toc686641784) 53

[第五章 全缘叶绿绒蒿谱效关系及质量评价研究](#_Toc686641785) 61

[第一节 全缘叶绿绒蒿抗氧化作用的谱效关系研究](#_Toc686641786) 61

**[1](#_Toc686641787)** [仪器与材料](#_Toc686641787) 61

**[2](#_Toc686641788)** [方法与结果](#_Toc686641788) 63

**[2.1](#_Toc686641789)** [供试品溶液的制备](#_Toc686641789) 63

**[2.2](#_Toc686641790)** [对照品溶液的制备](#_Toc686641790) 63

**[2.3](#_Toc686641791)** [全缘叶绿绒蒿植株总黄酮](#_Toc686641791)**[UPLC](#_Toc686641791)**[指纹图谱的建立](#_Toc686641791) 63

**[2.4](#_Toc686641792)** [全缘叶绿绒蒿植株总黄酮体外抗氧化活性比较研究](#_Toc686641792) 64

**[2.5](#_Toc686641793)** [谱效学研究与药效物质筛选](#_Toc686641793) 66

**[2.6](#_Toc686641794)** [全缘叶绿绒蒿总黄酮主要化学成分鉴定](#_Toc686641794) 84

**[3](#_Toc686641795)** [讨论](#_Toc686641795) 90

[第二节](#_Toc686641796) **[UPLC](#_Toc686641796)**[法测定全缘叶绿绒蒿花主要成分的含量](#_Toc686641796) 91

**[1](#_Toc686641797)** [仪器与试药](#_Toc686641797) 91

**[2](#_Toc686641798)** [方法与结果](#_Toc686641798) 94

**[2.1](#_Toc686641799)** [色谱条件](#_Toc686641799) 94

**[2.2](#_Toc686641800)** [对照品溶液的制备](#_Toc686641800) 94

**[2.3](#_Toc686641801)** [供试品溶液的制备](#_Toc686641801) 94

**[2.4](#_Toc686641802)** [标准曲线绘制](#_Toc686641802) 94

**[2.5](#_Toc686641803)** [精密度试验](#_Toc686641803) 95

**[2.6](#_Toc686641804)** [重复性试验](#_Toc686641804) 95

**[2.7](#_Toc686641805)** [稳定性试验](#_Toc686641805) 95

**[2.8](#_Toc686641806)** [回收率试验](#_Toc686641806) 95

**[2.9](#_Toc686641807)** [样品测定](#_Toc686641807) 96

**[3](#_Toc686641808)** [讨论](#_Toc686641808) 96

[结语](#_Toc686641809) 97

**[1](#_Toc686641810)** [结语](#_Toc686641810) 97

**[2](#_Toc686641811)** [下一步工作打算](#_Toc686641811) 98

[参考文献](#_Toc686641812) 98

[附录](#_Toc686641813) 101

[参考文献](#_Toc686641814) 108

[附图](#_Toc686641815) 111

[博士研究Th期间获得的成果](#_Toc686641816) 125

摘 要

**研究背景和目的**

藏药材“欧贝”类绿绒蒿是罂粟科Papaveraceae绿绒蒿属*Meconopsis*多种植物的花，是在藏族地区具有悠久的使用历史和广泛应用的藏民族药材。据统计，约有120种藏药制剂使用绿绒蒿类药材入药。由于藏医临床根据藏医药典籍，仅以绿绒蒿植物的花入药，但花产量极低，野生资源不足；并且藏医“清肝热、肺热”主要只以紫色或蓝紫色花入药，黄色花和红色花不用或少用；另外，药材的过度采挖，使用面窄，导致绿绒蒿属一些关键药用物种已处于濒危状态；同时，绿绒蒿生长在海拔3000～5000米的高山草甸、高山灌丛、流石滩等脆弱生态环境中，生长期短，野生植物资源珍稀，仅以产量极低的花入药，造成了该类植物的资源巨大浪费，但是以植珠同等入药又无确切依据和科学实验数据支撑。因此，开展野生绿绒蒿属药用植物资源的研究，为部分资源丰富的绿绒蒿物种植珠及不同花色的物种同等入药提供依据，以期解决仅以产量极低的紫色或蓝色花入药的困境，对避免藏医临床用量最大的“清肝热、肺热”的“欧贝”类紫色或蓝紫色花的绿绒蒿野生植物资源濒临灭绝，保障绿绒蒿药材和藏药经典成方制剂中绿绒蒿配伍的有效供给具有重要意义。

黄色花的全缘叶绿绒蒿*Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch、红色花的红花绿绒蒿*M. punicea* Maxim和蓝紫色花的川西绿绒蒿*M. henrici* Bur. et Franch为藏药经典巨著《月王药诊》、《四部医典》和《晶珠本草》等记载的多基源药材“欧贝”类绿绒蒿的三个来源物种，本课题通过比较三种不同花色的绿绒蒿植株对肝损伤和肺损伤的活性、不同花色的绿绒蒿花对炎症细胞的活性、花和植株提取物体外抗氧化活性研究，筛选出抗氧化活性最强、对肝损伤和炎症细胞作用效果较好的、目前野生植物资源较丰富的全缘叶绿绒蒿进行深入研究；利用UPLC-MS/MS技术、HSCCC技术对全缘叶绿绒蒿的主要化学成分进行研究，采用谱-效关系法初步确定活性指纹图谱中各色谱峰与抗氧化作用的相关性，确立活性

I

物质，揭示全缘叶绿绒蒿的活性化学成分。**方法与结果**

**1. 藏药材绿绒蒿的生药鉴别研究**

采用原植物和药材性状比较，光镜（OM）法观察根、花葶、叶、花的内部组织结构显微特征，扫描电镜（SEM）法观察花粉粒形态对三种绿绒蒿进行鉴别。结果表明：（1）原植物和性状特征可根据花颜色不同或植株大小区分；（2）显微组织结构特征可根据根的木质化程度和叶的主脉维管束差异鉴别；（3）粉末特征以花粉囊内壁细胞的特征差异最为明显；（4）花粉粒表面特征：全缘叶绿绒蒿和红花绿绒蒿的花粉粒为球形或近球形，无萌发孔，全缘叶绿绒蒿花粉粒上的刺状突起较红花绿绒蒿钝，红花绿绒蒿花粉粒表面比全缘叶绿绒蒿平滑；川西绿绒蒿花粉粒类型为3孔沟，表面具刺状雕纹。因此，三种绿绒蒿的原植物、性状、内部显微组织结构、粉末特征、花粉粒表面特征等区别明显，可为藏医临床常用的三种绿绒蒿药材的鉴别提供参考依据。

**2. 大孔树脂富集纯化藏药材全缘叶绿绒蒿总黄酮的工艺研究**

以总黄酮含量为考察指标，对AB-8、D101、HPD450和HPD600 4种大孔树脂富集纯化全缘叶绿绒蒿植株总黄酮的吸附和解吸性能进行评价。

D101树脂纯化全缘叶绿绒蒿植株总黄酮的最佳条件为：上样质量浓度

0.30 g生药/mL，洗脱液体积流量为3 BV/h，最佳吸附容量为51.2 mL/g，以4 BV蒸馏水洗脱去除杂质后，换用50%乙醇4 BV洗脱。经过D101大孔吸附树脂富集和纯化后，全缘叶绿绒蒿总黄酮的纯度由2.47%上升至

33.83%，回收率为91.35%。所建立的D101大孔吸附树脂富集和纯化全缘叶绿绒蒿总黄酮的方法简单可行，可为绿绒蒿植株提取物的活性对比研究提供实验基础。

**3. 三种不同花色绿绒蒿花和植株抗氧化活性和“清肝热、肺热”功效研究**

**3.1三种不同花色绿绒蒿花的醇提物和植株总黄酮体外抗氧化作用研究**

II

采用紫外分光光度法测定三种绿绒蒿花的提取物和植株（不带花）总黄酮中的总多酚和总黄酮含量，测定三种绿绒蒿花70%乙醇提取物和三种绿绒蒿植株总黄酮对DPPH自由基和ABTS自由基的清除能力、总抗氧化能力和抑制超氧阴离子自由基能力，以比较研究三种不同花色绿绒蒿花70%乙醇提取物和绿绒蒿植株总黄酮的体外抗氧化作用。结果表明，全缘叶绿绒蒿花的70%乙醇提取物和全缘叶绿绒蒿植株的总多酚、总黄酮含量最高，总抗氧化能力、DPPH自由基清除能力、ABTS自由基清除能力均最强；川西绿绒蒿植株总黄酮抑制超氧阴离子自由基的能力最强；三种不同花色绿绒蒿花70%乙醇提取物具有促进产生超氧阴离子自由基生成的作用。全缘叶绿绒蒿花的醇提取物和植株提取物对多种自由基具有很强的清除作用，在氧化应激方面疾病的治疗有很好的应用前景，为绿绒蒿植株提取物代替花入药提供科学依据。

**3.2三种不同花色绿绒蒿花的醇提取物对LPS诱导RAW264.7细胞炎症作用的比较研究**

比较三种不同花色绿绒蒿花的醇提取物对LPS诱导RAW264.7细胞炎症作用的差异。采用1μg/mL LPS诱导RAW264.7细胞炎症，CCK-8法检测细胞活性，Griess法测定NO的含量，ELISA法测定细胞分泌的TNF-α、IL-6、IL-10含量，荧光酶标仪检测细胞Caspase 3/7表达，DCFH-DA法测定细胞内ROS水平。当花的醇提取物浓度小于50μg/mL时，三种绿绒蒿花醇提取物对细胞无明显毒性作用，超过该浓度则有一定的细胞毒性；三种绿绒蒿花的醇提取物对NO的生成有促进作用；高浓度的三种绿绒蒿花的醇提取物对细胞分泌的TNF-α有一定的抑制作用；低浓度的全缘叶绿绒蒿花醇提取物（20μg/mL）能显著抑制IL-6的生成，低浓度的红花绿绒蒿花的醇提取物对IL-6有一定的抑制作用，高浓度的川西绿绒蒿花醇提取物（200μg/mL）对IL-6有显著的抑制作用；低浓度的三种绿绒蒿花醇提取物（20μg/mL）对IL-10有显著的促进作用；三种绿绒蒿花醇的提取物对LPS致炎的RAW264.7细胞Caspase 3/7的表达有抑制作用；三种绿绒蒿花的醇提取物均能显著降低炎症细胞产生的ROS，以全缘叶绿

III

绒蒿花醇提取物的作用效果最好。结果表明，三种不同颜色绿绒蒿花的醇提取物均对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症有一定的抑制作用，其中全缘叶绿绒蒿花的醇提取物对细胞炎症导致的氧化应激反应抑制效果最好，为三种花色绿绒蒿能否等同入药提供科学依据。

**3.3三种不同花色绿绒蒿植株总黄酮对小鼠肝损伤保护作用的比较研究**

比较三种不同花色绿绒蒿植株总黄酮对小鼠肝损伤的改善作用，初步证明不同花色绿绒蒿植株总黄酮可等同入药用于肝病治疗。采用刀豆蛋白

A构建小鼠肝损伤模型，两种剂量（0.1、0.3 g/kg）给药，连续6天，试验结束后，检测血清中谷丙转氨酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）含量；检测肝组织中超氧化物歧化酶（SOD）、还原型谷胱甘肽（GSH）、过氧化氢酶（CAT）、丙二醛（MDA）的活力或含量；观察肝组织HE染色的变化。结果表明，三种绿绒蒿植株总黄酮能显著降低血清中ALT、AST、LDH水平（*P*<0.05或*P*<0.01），升高肝组织中SOD活性，降低MDA含量，但对组织中GSH、CAT作用效果不明显；川西绿绒蒿植株总黄酮能改善肝组织的病理学改变。三种绿绒蒿植株总黄酮都有一定的肝保护作用，紫色花的川西绿绒蒿对肝损伤的保护作用效果最好，全缘叶绿绒蒿对SOD活性升高最明显，可有效缓解因肝损伤导致的氧化应激。

**3.4三种不同花色绿绒蒿提取物对脂多糖致小鼠肺损伤的作用**

比较三种不同花色绿绒蒿提取物对小鼠肺损伤的作用。用吸入脂多糖

（LPS）的方法构建小鼠肺损伤模型，采用肺组织HE染色评价小鼠肺部炎症，肺湿/干重比值（W/D）评价肺组织的水肿程度，ELISA法测定血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平，检测肺组织中SOD、MDA和MPO含量。结果表明，红花绿绒蒿提取物对LPS引起的急性肺炎而导致的病理形态改变具有显著的改善作用；与正常对照组相比，LPS组W/D比值显著升高，但三种绿绒蒿提取物并不能明显降低肺损伤小鼠肺的W/D比值；三种绿绒蒿提取物能不同程度降低血清中TNF-α含量和升高肺组织中SOD活性，但对血清中IL-1β、IL-6和肺组织中MDA、MPO含量无明显影响。结果表明，

IV

红花绿绒蒿对小鼠肺损伤有一定的保护作用，全缘叶绿绒蒿和川西绿绒蒿 的作用效果不明显。因此，藏医较少使用绿绒蒿药材用于肺部疾病的治疗 有一定科学依据。

4. **高速逆流色谱法分离纯化藏药材全缘叶绿绒蒿花的黄酮类成分**应用高速逆流色谱（HSCCC）法分离制备全缘叶绿绒蒿花中的黄酮类

成分，初步阐明全缘叶绿绒蒿花的化学成分组成。以乙酸乙酯/正丁醇/水（2∶3∶5, v/v/v）为溶剂系统，循环水浴温度35℃，UV检测波长254 nm，转速900 r/min，正转，流速2.0 mL/min。从600 mg粗提物中分离得到60 mg槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷（1），40 mg槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]

（2），11 mg槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄

糖苷]（3），16 mg槲皮素-3-*O*-[6'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]（4），纯度分别为98%、95%、90%、92%，所得化合物经MS 和

NMR确认结构式。4个化合物均首次从全缘叶绿绒蒿分离得到，其中3 和

4为新发现的乙酰化槲皮素苷。

**5. 全缘叶绿绒蒿谱效关系及质量评价研究**

**5.1全缘叶绿绒蒿抗氧化作用的谱效关系研究**

探讨全缘叶绿绒蒿植株总黄酮的抗氧化作用与其UPLC指纹图谱间的谱-效关系，初步阐明其活性物质基础。采用UPLC法获取全缘叶绿绒蒿植株总黄酮的指纹图谱，应用紫外分光光度法检测全缘叶绿绒蒿植株总黄酮对DPPH自由基和ABTS自由基清除能力、总抗氧化能力、抑制超氧阴离子自由基能力进行测定，利用主成分分析和灰色关联度分析法对色谱-抗氧化能力数据进行相关分析，采用UPLC-MS/MS分析全缘叶绿绒蒿植株总黄酮的主要化学成分。结果从UPLC指纹图谱中共提取出29个能够标示全缘叶绿绒蒿植株总黄酮的共有峰，通过主成分分析选出DPPH自由基清除能力和抑制超氧阴离子自由基能力两个指标的数据与29个共有峰进行关联，

将关联度大于0.7的共有峰初步认为是全缘叶绿绒蒿植株总黄酮抗氧化的主要活性成分，认为全缘叶绿绒蒿植株总黄酮抗氧化作用为多个化合物

V

协同作用的结果。通过UPLC-MS/MS分析得知全缘叶绿绒蒿植株总黄酮提取物中主要化合物为槲皮素的糖苷，另含有少量生物碱。

**5.2 UPLC法测定全缘叶绿绒蒿花的主要成分的含量**

通过建立同时测定全缘叶绿绒蒿花中槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷（RS1）、槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]（RS2）和异槲皮苷（RS3）的UPLC法，以评价全缘叶绿绒蒿花药材。色谱条件参照前期UPLC分离全缘叶绿绒蒿花提取物已建立的色谱条件。ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱（2.1×100 mm, 1.8

μm），柱温35℃，流速300μL/min，进样量2μL，检测波长范围210～

400 nm，流动相：乙腈（A）～0.1%冰醋酸水（B），等度洗脱，0～10 min，

16%A. 结果表明，RS1、RS2和RS3分别在0.02504～0.5008 mg/mL

(*R*2=1.0000)、0.02502～0.5004 mg/mL(*R*2=0.9999)、0.006275～0.2008

mg/mL（*R*2=0.9998）呈良好线性关系；平均回收率分别为103.39%、102.13%、

**90.36** %，RSD%均小于2.83%。该方法简单、快速、准确，可作为全缘叶绿绒蒿花的主要化学成分含量测定的方法。结果表明，在所采集的样品中，全缘叶绿绒蒿花的主要成分含量与产地、海拔、采收月份均有关系，以小金县和马尔康县海拔较高地区5～6月份采集的全缘叶绿绒蒿花品质较好。**结论**

1. 花的颜色、植株大小、根的差异、花粉囊内壁细胞差异、花粉粒特征可作为三种绿绒蒿的生药鉴定依据。

2. 川西绿绒蒿的植株有很好的肝损伤保护作用，可建议将植株与花等同入药治疗肝病。黄色花的全缘叶绿绒蒿花和植株都有很强的抗氧化活性，对动物肝损伤也有很好的保护作用，建议将其花和植株与蓝紫色花的 川西绿绒蒿等同入药。

3. 首次采用HSCCC法对全缘叶绿绒蒿花提取物的主要化学成分进行分离纯化，从中得到4个化合物，均为首次从全缘叶绿绒蒿中得到，有2个化合物为新发现的化合物。

4. 首次采用谱-效关系研究全缘叶绿绒蒿的抗氧化活性成分，发现其

VI

主要活性成分为槲皮素糖苷，并且全缘叶绿绒蒿植株与花中有相似的成分 组成。

5. 首次采用UPLC法评价藏药材全缘叶绿绒蒿花，在川西高原以小金县和马尔康县海拔较高地区的花品质更优。

关键词：全缘叶绿绒蒿；红花绿绒蒿；川西绿绒蒿；HSCCC；谱效关

系

VII

Relative Research of Hepatoprotection and Lung Injury

Protection Effects with Active Components of *Meconopsis*

Speciality: Traditional Chinese Pharmacy Author: YanFei Huang

Tutor: BiSheng Huang, Yuan Liu

Abstract

**Objectives:**

The flower from several species of *Meconopsis* belong to Papaveraceae are valuable plants used as traditional Tibetan medicine (TTM) named *oubei*, and widely used in Tibetan area. According to statistics, *oubei* was used in more than 120 Tibetan medicine preparations. For Tibetan doctor, the regularity of herb medicine followed by medicinal literature, only flower was used as *oubei*, however, the low production of flower could not guarantee the supply. Another, only purple or blue flower *Meconopsis* was used as medicine to treat hepatitis and pneumonia, the other color flower was not used or used less, and over collecting and low usage resulted in many species of *Meconopsis* was endangered. Moreover, *Meconopsis* distributed in the fragile ecological environment of alpine meadow, alpine brushes and alpine screes, wild plant resources are rare, so many plants would be wasted if only flower was used. Therefore, resource studies of *Meconopsis* to demonstrate the rationality of different flower color *Meconopsis* exhibited similar pharmacological effect, then to alleviate the resource scarce of purple or blue flower *Meconopsis*. These researches have important

VIII

Implications for *Meconopsis* resources protection for its reasonable exploitation and utilization.

*Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch, *M. punicea* Maxim and *M. henrici* Bur et Franch were the original of TTM recorded in Tibetan ancient medicinal literature (*Yue Wang Yao Zhen*, *Si Bu Yi Dian* and *Jing Zhu Ben Cao*). The project was based on the distinction effect of hepatoprotection, pneumonia protection, inflammatory cells and antioxidant activity of *Meconopsis* plant and flower, then screening out *M. integrifolia* which exhibited strong antioxidant activity, hepatoprotective effect and well inhibitory effect on inflammatory cells to further study. Ulraperformance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography were used for study the active components. Spectrum-effect relationship of *M. integrifolia* between antioxidant activity and UPLC fingerprints was analyze to elucidate effective substance.

**Methods and Results:**

**1. Pharmacognostical** study on Tibetan Medical Species of

***Meconopsis***

To identify the common Tibetan medical species of *Meconopsis*. The plant morphology and crude drug were observed; microscopic characteristics of root, scape, leaf and flower were observed by optical microscopy; The pollen was observed by scanning electron microscopy. (1) Original plant and crude drug characteristics could be identified by their flower color. (2) Microscopic characteristics could be distinguished by the level of lignifications of root, and difference of vascular. (3) Powder characteristics could be identified by the difference of endothecium. (4) The pollen of *M.*

IX

*Integrifolia* and *M. punicea* was spherical, nonaperturate, the difference of them was that the spines of *M. punicea* was more sharper than that of others and the surface of it was much smoother than that of *M. integrifolia*. The pollen of *M. henrici* was tricolpate, and the surface with speculate glyphs. And the distinction of microscopic characteristics of three species of *Meconopsis* was also obvious. The differences of microscopic characteristics of common Tibetan medical species were obvious, which provided basis for their quality evaluation.

**2. Enrichment and purification of total flavonoids from *Meconopsis integrifolia* by macroporous adsorption resins**

A method for enrichment and purification of total flavonoids from *M. integrifolia* by macroporous adsorption resins. Four macroporous resins AB-8, D101, HPD450, HPD600 were chosen with static and dynamic adsorption and desorption experiments to optimize the technical parameters. D101 macroporous resin was good for enrichment and purification of total flavonoids. The optimal condition was sample concentration 0.30 g/mL, elution flow rate 3 BV/h, adsorption capacity 51.2 mL/g, sample was first eluted with

4 BV of water, then with 3 BV 50% ethanol. The purity of total flavonoids was increase from 2.47% to 33.83%. This method that D101 macroporous resin enrichment and purification of total flavonoids from *M. integrifolia* was simple and stabile for total flavonoids from *M. integrifolia*.

***3.* Antioxidant activity, hepatoprotection and lung injury protection effects of flowers and plants from 3 species of *Meconopsis***

**3.1 *In vitro* antioxidant activity profiling of aqueous ethanol**

X

**Extract of *Meconopsis* flower and total flavonoids of *Meconopsis***

**plant**

The aqueous ethanol extract of *Meconopsis* flower and total flavonoids of *Meconopsis* plant, were comparative study for their *in vitro* antioxidant. Total phenolics and flavonoids were determined by spectrophotometric techniques. *In vitro* antioxidant and radical scavenging profiling was determined through: Total antioxidant capacity, radical scavenging effects by DPPH and ABTS methods and super oxide radical scavenging effects. *M. integrifolia* had the highest contents in phenolics and flavonoids and the highest antioxidant activity. *M. henrici* had the highest super oxide radical scavenging effects. Aqueous ethanol extract of 3 species of *Meconopsis* flower could promote producing super oxide radical. The flower and plant of *M. integrifolia* exhibited excellent *in vitro* antioxidant activity.

***3.2* Anti-inflammation of aqueous ethanol extract from *Meconopsis***

**Flower in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 macrophages** Comparative study the difference between aqueous ethanol

Extract from 3 species of *Meconopsis* flower. Inflammatory RAW264.7 macrophages was stimulated by lipopolysaccharide (LPS), CC-K assay was performed to measure the cell viability, griess assay was used to measure the released nitric oxide (NO), ELISA was applied to detect TNF-α, IL-6 and IL-10, the change of Caspase 3/7 was observed by fluorescence microplate, DCFH-DA was applied to detect ROS. Aqueous ethanol extract from 3 species of *Meconopsis* flower showed no cytotoxicity on RAW264.7 macrophages at the concentrations of 5, 20, 50μg/mL (*P*> 0.5). Aqueous ethanol extract from *Meconopsis* flower exhibited non inhibitory effects of NO. In

XI

High concentration level (50, 200μg/mL), Aqueous ethanol extract from *Meconopsis* flower showed inhibitory effect on TNF-α. The secretion of IL-6 statistically inhibited by 20, 50μg/mL extract from *M. integrifolia* and 50, 200μg/mL extract from *M. henrici*. In the concentration of 20μg/mL of aqueous ethanol extract from *Meconopsis* flower could increase the secretion of IL-10. Aqueous ethanol extract from *Meconopsis* flower promoted proliferation of RAW264.7 macrophages stimulated by LPS. Aqueous ethanol extract from *Meconopsis* flower showed excellent antioxidant activity that reduced the production of ROS in RAW264.7 macrophages induced by LPS. Aqueous ethanol extract from 3 species of *Meconopsis* flower exhibited anti-inflammation effects, and extract from *M. integrifolia* flower showed the best effect of reducing the ROS production.

**3.3 *In* vivo hepatoprotective effect of total flavonoids of**

***Meconopsis* plant**

This study aims to compare the hepatoprotective effects of total flavonoids of 3 species of *Meconopsis* plant *in vivo*. Mice with Con A-induced liver injury were used to assess the hepatoprotective effect *in vivo*. The level or activity of glutamate pyruvate transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactic dehydrogenase (LDH) in the blood serum and superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), catalase (CAT) and malonaldehyde (MDA) in the liver of the mice were assayed. The pathological changes of liver tissue were examined by HE. In the mice with Con A-induced liver injury, the groups treated with total flavonoids of 3 pecies of *Meconopsis* plant showed lower levels of ALT, AST, LDH and MDA, and increase SOD. Total flavonoids of 3 species of *Meconopsis* plant

XII

Exhibited excellent hepatoprotective effect *in vivo*, *M. henrici*

Showed the best hepatoprotective effect in 3 species of *Meconopsis*,

*M. integrifolia* had the better effect to increase SOD.

**3.4 The effect of aqueous ethanol extract from *Meconopsis* on lung injury induced by lipopolysaccharide**

To investigate the effects of aqueous ethanol extract from 3 species of *Meconopsis* in LPS-induced acute lung injury in mice. Acute lung injury mice model were developed by LPS intratracheal instillation. The pathological changes of lung tissue were examined by HE. Ratio of wet/dry lung weight (W/D) was used to evaluate edema degrees of lung tissue. ELISA was applied to detecte TNF-α, IL-1β, IL-6, superoxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in lung tissue of the mice were assayed. Pretreatment with *M. punicea* extract could attenuate histopathologic changes induced by LPS. In LPS group, W/D ratio were obviously increased (*P*<0.05), but there was not significant differences among model groups and sample groups. Aqueous ethanol extract from 3 species of *Meconopsis* could reduce the levels of TNF-αand increase the levels of SOD. *M. punicea* extract showed protective effect on lung injury in mice.

**4. Separation and purification of four flavonol diglucosides from the flower of *Meconopsis integrifolia* by high-speed counter- current chromatography**

Flavonoids are the main components of *M. integrifolia*, which is a traditional Tibetan medicine. However, traditional chromatography separation requires large quantity of raw *M. integrifolia* and it is very time-consuming. Herein, we applied high-speed counter-current chromatography (HSCCC)

XIII

In the separation and purification of flavonoids from ethanol extract of *M. integrifolia* flower. EtOAc/*n*-BuOH/H2O (2∶3∶5, v/v/v) was selected as the optimum solvent system to purify the flavonoids from 600 mg crud extract. Bath temperature was 35℃, detection wavelength was 254 nm, the apparatus was rotated at 900 r/min, at a flow rate of 2.0 mL/min. Four components were separation and purification, namely quercetin-3-*O*-β-D-glucopyrannosy-(1→6) -β-D-glucopyranoside (compound 1, 60 mg), quercetin-3-*O*-[2'''-*O*-acetyl-β-D-glucopyran-

Osyl-(1→6) -β-D-glucopyranoside] (compound 2, 40 mg), quercetin- 3-*O*-[3'''-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→6) -β-D-glucopyranosi- de] (compound 3, 11 mg) and quercetin-3-*O*-[6'''-*O*-acetyl-β-D-glu- copyranosyl-(1→6) -β-D-glucopyranoside] (compound 4, 16 mg).

Among the four compounds, compound 3 and 4 were new discovered acetylated flavonol diglucosides. After the HSCCC separation, the purities of the four flavonol diglucosides were 98%, 95%, 90% and 92%, respectively. The structures of them were identified by MS and NMR spectra.

**5. Study of spectrum-effect relationship and quality evaluation of *M. integrifolia***

**5.1 Spectrum-effect relationship on antioxidant activity effects of *M. integrifolia***

The spectrum-effect relationship on antioxidant activity effect of *M. integrifolia* was established based on ulra-performance liquid chromatography, aims to reveal the material basis of *M. integrifolia*. The fingerprints of total flavonoids of *M. integrifolia* were established by UPLC, and the antioxidant activity effects were evaluated by the scavenging

XIV

Of DPPH, ABTS, total antioxidant capacity and super oxide radical scavenging effect. The relationship of characteristic absorption band of fingerprints with the pharmacological action was calculated by principle component analysis (PCA) and grey relation analysis (GRA). Twenty night common peaks in the fingerprints were obtained. Based on the result of PCA, DPPH radical scavenging and super oxide radical scavenging activity were elected to related with twenty night common peaks, while correlation bigger than 0.7, we concluded that they were the antioxidant activity components of *M. integrifolia*. Antioxidant activity effect of *M. integrifolia* was related to synergistic effect of many components. Analysis by UPLC-MS/MS, we knew that quercetin glycoside were the main components of total flavonoids of *M. integrifolia*, and also with little alkaloid.

***5.2* UPLC determination of active components in flower of *M. integrifolia***

To determine the quercetin-3-*O*-β-D-glucopyrannosy-(1→6) -β-D-glucopyranoside (RS1), quercetin3-*O*-[2'''-*O*-acetyl-β-D-gluc- opyranosyl-(1→6) - (1→6) -β-D-glucopyranoside] (RS2) and isoque- rcitrin (RS3) in flower of *M.* *integrifolia* by UPLC. The chromatographic process was according to the method had established before. Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (100×2.1 mm, 1.8μm) was used. The mobile phase was consisted of A (acetonitrile) and B (0.1% acetic acid solution), which was used as the mobile phase in isocratic elution mode as follow: 0–10 min, 16% A. The flow rate was set at 300μL/min, the column temperature was 35 C, and the sample injection volume was 2μL. The spectra from 210 nm to 400 nm were recorded. The standard curves of three active constituents

XV

Showed a good linearity in 0.02504–0.5008 mg/mL (*R*2=1.0000), 0.02502–0.5004 mg/mL (*R*2=0.9999), 0.006275–0.2008 mg/mL

(*R*2=0.9998). The average recoveries were 103.39%, 102.13%, 90.36%, RSD<2.83%. The assay demonstrated that this method is simple and has adequate accuracy to measure active components in flower of *M. integrifolia*.

**Conclusion:**

1. *M. integrifolia*, *M. punicea* and *M. henrici* could identify by their flower color, plant size, the difference of root, the difference of endothecium and pollen.

2. *M. henrici* plant exhibited excellent hepatoprotective effect, so it is to suggest that *M. henrici* could be use as *oubei* equivalent with its flower. *M.* integrifolia showed the best effect of antioxidant activity, an also exhibited good hepatoprotective effect, so it is to suggest that *M. integrifolia* could be use as *oubei* equivalent with *M. henrici* plant and its flower.

3. HSCCC was applied to separation and purification of flavonoids from the ethanol extract of *M. integrifolia* flower. Among the four compounds, all of them were found in *M. integrifolia* for the first time, and compound 3 and 4 were new discovered acetylated flavonol diglucosides.

4. The spectrum-effect relationship on antioxidant activity effect of *M. integrifolia* based on ulra-performance liquid chromatography was study, we found that quercetin glycoside were the main components of total flavonoids of *M. integrifolia*, *M. integrifolia* plant has similar components with its flower.

5. Ultra performance liquid chromatography was used to determine the main compounds of *M. integrifolia* flower, the

XVI

Results showed that *M. integrifolia* distributed in high altitude in Xiaojin and Maerkang county had better quality.

Key words: *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch; *M. punicea* Maxim; *M. henrici* Bur. et Franch; HSCCC; Spectrum-effect relationship

XVII

# 缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文简称 | 英文全称 | 中文全称 |
| ABTS | 2,2′-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline  -6-sulfonate) | 2,2′-联氮双（3-乙基苯并噻唑啉  -6-磺酸）二铵盐 |
| ALT | Alanine transaminase | 谷丙转氨酶 |
| AST | Aspartate ttansaminase | 天冬氨酸氨基转移酶 |
| BHT | 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol | 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 |
| CAT | Catalase | 过氧化氢酶 |
| CID | Collision-induced dissociation | 撞诱导解离 |
| Con A | Concanavalin A | 刀豆蛋白 A |
| COSY(1H-1H) | 1H-1H correlated spectroscopy | 氢-氢位移相关谱 |
| DEPT | Distortionless enhancement by  Polarization transfer | 无畸变极化转移增益实验 |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium | 细胞培养基 |
| DMSO | Dimethyl sulphoxide | 二甲基亚砜 |
| DPPH | α，α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl | 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 |
| FRAP | Ferric reducing antioxidant power | 亚铁还原能力实验 |
| GRA | Grey relational analysis | 灰色关联度分析 |
| GSH | Reduced glutathione | 还原型谷胱甘肽 |
| HMBC | 1H detected heteronuclear multiple boan  correlation | 1H 检测的异核多键相关实验 |
| HSCCC | High-speed counter-current  chromatography | 高速逆流色谱 |
| HSQC | 1H detected heteronuclear single  Quantum coherence | 1H 检测的异核单量子相干实验 |
| IL-10 | Interleukin-10 | 白细胞介素-10 |
| IL-1β | Interleukin-1β | 白细胞介素-1β |
| IL-6 | Interleukin-6 | 白细胞介素-6 |
| LDH | Lactate dehydrogenase | 乳酸脱氢酶 |
| LPS | Lipopolysaccharides | 脂多糖 |
| MDA | Malondialdehyde | 丙二醛 |
| MHFE | *M. henrici* flower extract | 川西绿绒蒿花提取物 |

XVIII

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| MHTF | *M. henrici* total flavonoids | 川西绿绒蒿植株总黄酮 |
| MIFE | *M. integrifolia* flower extract | 全缘叶绿绒蒿花提取物 |
| MITF | *M. integrifolia* total flavonoids | 全缘叶绿绒蒿植株总黄酮 |
| MPFE | *M. punicea* flower extract | 红花绿绒蒿花提取物 |
| MPO | Myeloperoxidase | 髓过氧化物酶 |
| MPTF | *M. punicea* total flavonoids | 红花绿绒蒿植株总黄酮 |
| NMR | Nuclear magnetic resonance | 核磁共振 |
| OS | Oxidative stress | 氧化应激 |
| PCA | Principal component analysis | 主成分分析 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| SOD | Superoxyde dismutase | 超氧化物歧化酶 |
| SOR | Super oxide radical | 超氧阴离子自由基 |
| TAC | Total antioxidant capacity | 总抗氧化能力 |
| TIC | Total ion chromatography | 总离子流图 |
| TNF-α | Tumor necrosis factor α | 肿瘤坏死因子 |
| TPTZ | 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine | 2,4,6-三-(2-吡啶基)-1,3,5-三嗪 |
| UPLC | Ultra performance liquid  chromatography | 超高效液相色谱 |
| UPLC-MS | Ultra performance liquid  Chromatography-Mass spectrometry | 超高效液相色谱质谱联用 |

XIX

前 言

绿绒蒿属*Meconopsis*属于罂粟科Papaveraceae，包括绿绒蒿亚属Subg. *Meconopsis*和具盘绿绒蒿亚属Subg. *Discogyne* Tayl.，共有54个种，西欧产1种，其余53种分布于中国——喜马拉雅地区的3000～5000米的高山草甸、高山灌丛或流石滩上，中国、印度、尼泊尔、巴基斯坦等国均有分布，我国有38种，主要分布于西南部西藏、云南、四川、青海、甘肃、陕西等省区[1-2]。绿绒蒿因全株长满绒毛或刚毛而得名；生长周期短（大雪融化之时的5月～大雪再次封山的10月），野生植物资源珍稀。绿绒篙以其花大、色泽艳丽、姿态优美而著称，具有很高的观赏性，已成为享誉海内外的珍稀高山花卉，被誉为“高山牡丹”和“高山花卉的明珠”；欧洲人推崇为“世界名花”。本属植物虽然不做中药材使用，但部分品种在传统藏医药中却有着悠久的应用历史。红花绿绒蒿为中国特有种，为国家二级重点保护野生植物。

“欧贝”类绿绒蒿为藏医临床大量使用、多基源、品种不清的藏药材，在藏族地区具有悠久的使用历史和广泛的应用。成书于公元八世纪的藏医古籍《月王药诊》中记载了“欧贝”、“刺儿恩”、“木琼”、“阿夏择哦”等均为绿绒蒿属植物。《晶珠本草》记载：花类药材绿绒蒿（藏药名：欧贝）清肝热、肺热，并能治热邪引起的喉阻塞；生于高山阴坡，根单一，状如防风叶；先端圆，淡绿色，被小毛，花状如藏金盏，荚果状如半个空心金刚，种子小，黑色，多粒，味甘涩，气味芳香；由于花的颜色不同分为四种，白花绿绒蒿治培根病、龙的合并病，蓝花绿绒蒿清热，治赤巴病，红花绿绒蒿治血分病，黄花绿绒蒿治培根病[3]。藏医经典巨著《四部医典》记载绿绒蒿一般都不以全草入药，而以花入药，效果尤好。与其他药材作为复方一起使用，如二十五味绿绒蒿丸、二十五味松石丸、毛瓣绿绒蒿八味方、红花七味方、竹黄安乐方等120个经典藏药复方制剂都在使用绿绒蒿类药材[4-5]；2002年国家药品监督管理局颁布的《国家中成药标准汇编》内科肝胆分册中，多种疏肝、利胆的中藏药标准中，均含有绿绒蒿；1995年《部颁标准・藏药分册》收载绿绒蒿药材标准，标准编号 为

1

WS3-BC-0098-95，明确指出绿绒蒿药材为全缘叶绿绒蒿、五脉绿绒蒿和长叶绿绒蒿；收载藏成药处方中有31个处方中使用绿绒蒿，但是只有6个处方中明确应用的是多刺绿绒蒿、2个处方中明确应用的五脉绿绒蒿，其他无明确规定。《藏药志》记载各地藏医所用绿绒蒿的原植物为五脉绿绒蒿*Meconapsis quintuplinervia* Regel、红花绿绒蒿*M. punicea* Maxim、全缘叶绿绒蒿*M. integrifolia* (Maxim.) Franch、尼泊尔绿绒蒿*M. napaulensis* DC. Prodr和毛瓣绿绒蒿*M. torquata* Prain in Ann[6]。《中华本草・藏药卷》收载的绿绒蒿属药材有毛瓣绿绒蒿、全缘绿绒蒿、红花绿绒蒿和单叶绿绒蒿*M. simplicifolia* (D. Don) Walp[7]。《现代中药学大辞典》收载的绿绒蒿药材为全缘叶绿绒蒿[8]。《新修晶珠本草》记载白花绿绒蒿来源于白花绿绒蒿*M. argemonantha* Prain in Bull、黄花类绿绒蒿、红花类绿绒蒿、紫花类和蓝花类的绿绒蒿[9]。通过在四川藏区地区医疗机构走访发现，当地藏医主要根据当地绿绒蒿生长的品种而选择入药， 以花的颜色分类，而不具体到某一植物种。

四川藏医临床主要使用紫色或蓝紫色花的绿绒蒿用于治疗肝病，很少使用其他花色绿绒蒿，并且很少用于肺部疾病的治疗，这与藏药本草的记载有所出入。同时，“欧贝”类绿绒蒿入药的植物种基源不清、药材质量标准粗浅、无法做到所涉及藏成药的质量可控，生物活性物质不明确，功效不够确切，无从保障临床疗效。另外，紫色或蓝紫色花的“欧贝”类绿绒蒿野生植物资源濒临灭绝，已经无法满足藏医临床大量配方入药的需求以及保障藏医临床独特疗效，亟待在保护现有珍稀野生植物资源的前提下，寻找缓解该藏药用植物的资源。因此，诸多科学问题亟待解决，主要问题如下：（1）藏医临床用量最大的“清肺热、肝热”的“欧贝”类紫色或蓝紫色花的绿绒蒿野生植物资源濒临灭绝，花的产量极低，可持续性原料供给如何实现？（2）现代藏医认为紫色或蓝紫色花的绿绒蒿的花入药，用于“清肺热、肝热”的科学依据是什么？（3）黄色花和红色花的绿绒蒿的花与紫色或蓝紫色花的绿绒蒿的花的药效是相近或如藏医认为药效并不一致？（4）同颜色花的全植株是否可以与花同等入药？（5）绿绒蒿药

2

材的药效物质基础是什么？

因此，提出科学假说：绿绒蒿的全植株可与花同等入药，非紫色或蓝紫色的花的绿绒蒿具有相近或不一致功效。（1）如果试验结果确实表明：花的颜色不同或者绿绒蒿的全植株与花，动物实验结果比较接近或基本一致，建议藏医临床把黄色花和红色花的绿绒蒿与蓝色或蓝紫花的绿绒蒿同等或替代入药，有效利用黄色花和红色花的绿绒蒿野生植物资源尚可的现状，期待缓解目前蓝色或蓝紫花绿绒蒿野生植物资源已经濒临灭绝的困境；

（2）如果试验结果确实表明：花的颜色不同或者绿绒蒿的全植株与花，药效完全不同，验证了藏医药“色性”理论的科学性，指导藏医临床配药 和建议农业大规模种植蓝色或蓝紫花绿绒蒿，以缓解蓝色或蓝紫花绿绒蒿野生植物资源的溃乏，并且已经无法保障120个经典藏成方的原料供给的残酷现实。

基于以上科学问题，本课题拟采用现代药理学和化学成分分析方法，初步研究不同花色的全缘叶绿绒蒿、红花绿绒蒿和川西绿绒蒿对小鼠肝损伤、肺损伤、体外细胞炎症作用和体外抗氧化作用；通过不同花色绿绒蒿之间的药效差异，筛选出对肝损伤效果较好、体外抗氧化活性最强、野生植物资源较丰富的绿绒蒿品种进行活性成分分析；采用高速逆流色谱法制备活性成分单体，采用谱-效关系法探讨绿绒蒿的生物活性物质基础，采用超高效液相色谱法评价绿绒蒿的药材质量。通过本课题的实施，期待为濒危珍稀、多基源藏药材“欧贝”类绿绒蒿花色不同与“清肝热、肺热”功效相关性系列研究打下坚实的基础，为科学、合理、综合利用“欧贝”类绿绒蒿藏药材，保障藏医临床用药的安全、有效、质量可控、原料药材的可持续性供给提供科学依据。

3

# 第一章 藏药材绿绒蒿的Th药鉴别研究

目前，部颁藏药标准仅收载了全缘叶绿绒蒿、五脉绿绒蒿和长叶绿绒蒿的性状和全缘叶绿绒蒿根、五脉绿绒蒿和长叶绿绒蒿茎的组织切片和粉末鉴别；刘炳仑[10]曾报道了我国罂粟科植物的花粉形态，描述了绿绒蒿属花粉13种和2变种，但只对部分种进行了扫描电镜观察，未对红花绿绒蒿和川西绿绒蒿进行扫描电镜观察。通过观察原植物和药材性状、内部组织结构、粉末等方式，对药材的形态、组织、细胞和细胞后含物等特征进行鉴别，是药材鉴别的重要手段[11]；植物的花粉粒形态结构不易受环境因素影响，特征稳定，反映了植物类群间的演变规律，可为植物的种属分类提供科学依据[12-13]。药材的基源鉴别是中药、民族药开发和研究的基础，准确无误的药材基源能获得可靠的实验数据，最终保障成药的质量和临床疗效。任何现代鉴定方法的基础均为原植物鉴别，经过原植物准确鉴定后可为后期准确、简便的现代中药学鉴定方法如分子鉴定技术和光谱鉴定技术提供样本基础。因此，本研究拟采用光镜（OM）法和扫描电镜（SEM）法对全缘叶绿绒蒿*M. integrifolia*、红花绿绒蒿*M. punicea*和川西绿绒蒿*M. henrici*的原植物和药材性状，根、花葶、叶、花的内部组织结构，花粉末特征，花粉粒表面结构进行观察，以期为藏医临床常用三种绿绒蒿的鉴别提供科学资料。

### **1** 材料与方法

#### **1.1** 材料与试剂

全缘叶绿绒蒿，2014年6月21日采于四川省康定县雅家埂（海拔4000

m）；红花绿绒蒿，2014年6月23日采于四川省红原县月亮湾（海拔3600

m）；川西绿绒蒿2013年7月6日、2014年6月20日采于四川省马尔康

县梦笔山（海拔4200 m）和四川省康定县折多山（海拔4300 m），经罗达尚教授和西南民族大学民族医药研究院刘圆教授鉴定为罂粟 科

（Papaveraceae）绿绒蒿属（*Meconopsis*）植物全缘叶绿绒蒿*M. integrifolia* (Maxim.) Franch、红花绿绒蒿*M. punicea* Maxim和川西绿绒蒿*M. henrici* Bur. et Franch。

4

水合氯醛试液、稀甘油、0.5%番红、0.25%固绿、FAA固定液。

#### **1.2** 仪器设备

OLYMPUS BX41光学显微镜（日本OLYMPUS公司）、SM-6510LV型扫描电镜和JEC-1600 Auto Fire Coater镀膜器（日本JEOL公司）。

### **2** 方法与结果

#### **2.1** 电镜观察方法

将干燥后的花药用双面胶粘于样品台上，然后用铂金（Pd-Au）直接镀膜，置于扫描电镜下观察，拍照。

#### **2.2** 显微样品制备

横切面制片：新鲜药材经FAA固定后，按常规石蜡切片法切片，番红

-固绿法染色，加拿大树脂胶封片，制成永久装片。显微镜下观察，显微成像系统成像。

粉末制片：取干燥样品，粉碎，过80目筛，水合氯醛试液和稀甘油试液装片。显微镜下观察，显微成像系统成像。

#### **2.3** 鉴别研究

2.3.1原植物

**全缘叶绿绒蒿：**草本，全株高30～80 cm，被金黄色长柔毛。主根粗约0.5～1 cm，具纤维状细根和侧根。茎粗壮，具纵向条纹。叶基生，呈莲座状，基部有较多宿存的叶基，并且密被长柔毛；叶倒披针形或匙形，全缘，被毛，长约6～25 cm，宽1～3 cm，基部渐狭，具3条明显纵脉。花生于茎生叶腋内，4～6朵；花葶长约20～40 cm；花瓣倒卵形，被刚毛，长约5～6 cm，宽3～4 cm，黄色；花丝线形，长约1.5～2 cm，淡黄色；花药卵形，长约1mm；子房卵圆形或椭圆形，密被金黄色柔毛；花柱短，柱头头状。花果期为5月～8月。见图1-1。

5

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 全缘叶绿绒蒿  *M. integrifolia* | 红花绿绒蒿  *M. punicea* | 川西绿绒蒿  *M. henrici* |
| A |  |  |  |
| B |  |  |  |
| C |  |  |  |

A.原植物，B.腊叶标本，C. Th药特征图1-1三种绿绒蒿原植物图和药材图

A. Original palnts, B. Herbarium, C. Crude drugs

Figure 1-1 Features of original palnts and crude drugs of three species of

*Meconopsis*

6

**红花绿绒蒿：**草本，全株高30～60 cm。根须状。叶基生，呈莲座状，基部被金黄色长柔毛；叶倒披针形，全缘，被毛，长约6～20 cm，宽约1～

3 cm，基部渐狭，具3条明显纵脉。花单生，基生花葶，2～8朵；花葶长约15～45 cm，被刚毛；花萼卵形，具有棕色柔毛；花瓣红色，长椭圆形，长约4～7 cm，宽约1～2 cm；花丝线形，短，约0.5～1 cm；花药呈卷曲条形，有纵棱，2～3 mm；子房椭圆形，密被黄色刚毛，柱头短。花果期为6月～8月。见图1-1。

**川西绿绒蒿：**草本，全株高20～40 cm。主根3～10 cm，圆锥形。叶基生，呈莲座状；叶倒披针形，边缘全缘或具不规则圆齿，被毛，长约3～12 cm，宽约0.5～1.5 cm，基部渐狭。花单生于基生花葶，1～5朵；花葶长约10～30 cm，被黄色刚毛；花萼卵形，被黄色刚毛；花瓣紫色，倒卵形，长约2～4 cm，宽约1～3 cm；花丝丝状，长约0.5～1 cm，紫色或浅紫色；花药长圆形，长约1 mm，黄色；子房长椭圆形，无毛或被刚毛，柱头明显，长约5～7 mm。花果期为6月～8月。见图1-1。

3.3.1药材性状

**全缘叶绿绒蒿：**主根圆锥形，长约5～10 cm，直径0.5～1 cm，表面呈棕色，质硬，不易折断，有纵皱纹。茎圆柱形，中空，被毛，表面呈棕黄色，具有明显的纵条纹，不易折断。叶基生，多皱缩，被毛，具3条明显纵脉；基部渐狭延展成翅，并密被金黄色柔毛。花瓣呈黄色，卷曲， 长2～5 cm，宽1～2 cm；花丝黄褐色；子房卵圆形或椭圆形，密被金黄色柔毛；花柱短。见图1-1。

**红花绿绒蒿：**根须状。花葶圆柱形，长15～45 cm，表面呈浅黄色或浅黄绿色，被毛，较全缘叶绿绒蒿更细。叶基生，多皱缩，展平后呈倒披 针形，被毛，具3条明显纵脉；基部渐狭延展成翅，密被棕色柔毛。花瓣卷曲，呈深紫色或褐色，长2～4 cm，宽1～2 cm，花丝黄棕色，花药呈卷曲条形，有纵棱，子房椭圆形，密被黄色刚毛，柱头短。见图1-1。

**川西绿绒蒿：**主根圆锥形，长约3～10 cm，表面呈褐色，直径3 mm～

7 mm，质地较脆，易被折断，有纵皱纹。花葶细圆柱形，长10～20 cm，

7

表面呈绿色或褐色，质脆，易折断。叶基生，多皱缩，展平后呈倒披针形， 被毛，可见1条明显主脉。花瓣深紫色，卷曲；花丝紫色或浅紫色，子房长椭圆形，无毛或被刚毛，柱头明显。见图1-1。

#### **3.4** 显微鉴别**[14]**

3.4.1根横切面

**全缘叶绿绒蒿**：横切面为椭圆形。木栓层细胞2～4层，木栓细胞中偶见草酸钙结晶；皮层薄壁细胞5～8列，呈类圆形或不规则形，内皮层不明显；维管束外韧型；韧皮部较宽；形成层明显，波浪状；木质部宽广， 占根横切面约四分之三，导管从中心向周边形成辐射状，木质部薄壁细胞 间有裂隙，细胞轮廓不清，木薄壁细胞中可见草酸钙结晶；木质部射线明 显。见图1-2。

**红花绿绒蒿**：横切面为类圆形。木栓层细胞2～4层；皮层薄壁细胞7～10列，呈类圆形或不规则形；维管束外韧型；韧皮部较宽；形成层明显，波浪状；木质部宽广，导管成群分布于木质部中，木质部薄壁细胞间无裂隙，细胞轮廓清晰可见草酸钙结晶；可见根迹维管束；射线不明显。见图1-2。

**川西绿绒蒿**：横切面为类圆形。木栓层为2～6层，细胞扁。皮层狭窄，皮层薄壁细胞3～5层，细胞扁，呈切向延长。韧皮部较窄，形成层不明显。木质部宽广，占根横切面约五分之四，导管数个成群，稀疏散在 排列于木质部中，木质部薄壁细胞裂隙大，细胞轮廓不清晰，木薄壁细胞中可见草酸钙结晶；射线不明显。见图1-2。

8

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 全缘叶绿绒蒿  *M. integrifolia* | 红花绿绒蒿  *M. punicea* | 川西绿绒蒿  *M. henrici* |
| A |  |  |  |
| B |  |  |  |
| C |  |  |  |

A. 根横切面轮廓图；B. 根横切面详图；C. 草酸钙结晶详图

1.木栓层；2.皮层；3.维管束；4.木射线；5.韧皮部；6.形成层；7.木质部；

8.草酸钙针晶；9.草酸钙簇晶图1-2三种绿绒蒿根的横切面图

A. Outline, B. Detail, C. Calcium oxalate crystal

1. Cork layer, 2. Cortex, 3. Vascular bundle, 4. Xylem rays, 5. Phloem, 6.

Cambium, 7. Xylem, 8. Calcium oxalate needle crystal, 9. Calcium oxalate clustered crystal

Figure 1-2 Transverse sections of root of tree species of*Meconopsis*

3.4.2花葶横切面

**全缘叶绿绒蒿**：横切面为近圆形。表皮细胞1列，类方形，排列紧密，多见多细胞非腺毛。皮层较窄，由类圆形和多角形薄壁细胞组成，靠

9

近表皮的细胞靠近韧皮部有数列径向排列的细胞较大，裂隙大，可见紫色 内含物和草酸钙方晶。外韧维管束数十个，排列成整齐的环；韧皮部较宽， 由韧皮薄壁细胞和筛管组成，细胞排列紧密，形成层明显，导管成群，木 薄壁细胞较多。髓部宽广，裂隙大，射线不明显，薄壁细胞可见草酸钙结 晶。见图1-3。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 全缘叶绿绒蒿  *M. integrifolia* | 红花绿绒蒿  *M. punicea* | 川西绿绒蒿  *M. henrici* |
| A |  |  |  |
| B |  |  |  |
| C |  |  |  |
| D |  |  |  |

A.花葶横切面轮廓图；B.花葶横切面细节图；C.红色内含物细节图；D.草酸钙结晶细节图

1.表皮；2.皮层；3.维管束；4.髓部；5.非腺毛；6.腺毛；7.紫色或红色内含物；

8.草酸钙针晶；9。草酸钙簇晶

10

图1-3 三种绿绒蒿的花葶横切面图

A. Outline, B. Detail, C. Brown indusion, D. Calcium oxalate crystal

1. Epidermis, 2. Cortex, 3. Vascular bundle, 4. Pith, 5. Non-glandular hair,

6. Glandular hair, 7. Purple and brown inclusion, 8. Calcium oxalate needle crystal, 9. Calcium oxalate clustered crystal

Figure 1-3 Transverse sections of scape of tree species of*Meconopsis*

**红花绿绒蒿**：横切面为近圆形。表皮细胞1列，类方形，排列紧密，多见多细胞非腺毛；腺毛由多细胞组成，排成2～4层。皮层狭窄，细胞轮廓不明显，裂隙大。外韧维管束数十个，排列成整齐的环；韧皮部较宽， 形成层明显；木质部较窄，导管成群排列。髓部宽广，细胞萎缩，裂隙大， 射线不明显，薄壁细胞可见草酸钙结晶。见图1-3。

**川西绿绒蒿**：横切面为近圆形。表皮细胞1列，类方形，排列紧密，多见多细胞非腺毛。皮层窄，有裂隙，皮层薄壁细胞中偶见红色内含物和 草酸钙方晶。外韧维管束数个，排列成整齐的环；韧皮部较宽，细胞排列 紧密，形成层明显，导管成群。髓部宽广，有裂隙，髓部薄壁细胞大，类 圆形或多角形，射线不明显，薄壁细胞可见草酸钙结晶。见图1-3。

3.4.3叶横切面

**全缘叶绿绒蒿**：异面叶。上下表皮均为1列细胞，上、下表皮偶见多细胞非腺毛。栅栏组织细胞和海绵组织细胞分化不明显，具有较大的细胞间隙。主脉上下表皮有1列类圆形细胞，维管束扇形或近圆形，数个排列在中脉两侧并延伸至叶片边缘；韧皮部在背茎面，细胞排列紧密；木质部在向茎面，木质部导管聚集成群，排列较整齐。维管束上下整齐排列着皮层薄壁细胞，并与上下表皮联接。叶柄为月牙形。表皮为1～2列类圆形细胞，外被多细胞组成的非腺毛。皮层宽广，两个维管束相隔处有较大的裂隙。维管束6～8排列形成半圆形，韧皮细胞排列紧密；导管成群排列整齐。维管束周围环绕的薄壁细胞向上下两端延伸至上下表皮。见图1-4。

11

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 全缘叶绿绒蒿  *M. integrifolia* | 红花绿绒蒿  *M. punicea* | 川西绿绒蒿  *M. henrici* |
| A |  |  |  |
| B |  |  |  |
| C |  |  |  |

A.主脉横切面；B.叶横切面；C.叶柄横切面

1.上表皮；2.下表皮；3.栅栏组织；4.海绵组织；5.维管束；6.薄壁组织；7.非腺毛图1-4三种绿绒蒿叶的横切面

A. Midrib, B. Blade, C. Petiole

1. Upper epidermis, 2. Lower epidermis, 3. Palisade tissue, 4. Spongy parenchyma, 5. Vascular bundle, 6. Parenchymatous tissue, 7. Non-glandular

hair

Figure 1-4 Transverse sections of leaf of tree species of*Meconopsis*

12

**红花绿绒蒿**：异面叶。上下表皮均为1列细胞，上、下表皮偶见多

细胞非腺毛。栅栏组织细胞1列，细胞稀疏，细胞轮廓不清晰；海绵组织细胞疏松，具有较大的细胞间隙。以中脉维管束为中心，两侧各有数个扇形或近圆形维管束延伸至叶片边缘；木质部导管小，聚集成群。维管束上下有数列薄壁细胞，并与上下表皮联接。叶柄表皮为1～2列类圆形或类方形细胞。皮层宽广，皮层与表皮之间有裂隙。维管束3～5个排列成半圆形，形成层明显；导管成群排列整齐。叶柄内薄壁细胞大，不规则形。 见图1-4。

**川西绿绒蒿**：异面叶。上下表皮均为1列细胞，上、下表皮偶见多

细胞非腺毛。栅栏组织细胞1列，细胞较稀疏；海绵组织细胞轮廓不清晰，细胞间隙大。主脉维管束小，韧皮薄壁细胞由韧皮部延伸至叶面下表皮。以中脉维管束为中心，两侧各有数个扇形或近圆形维管束延伸至叶片边缘。 叶柄表皮为1列类圆形或不规则形细胞。维管束3～5个排列成半圆形，形成层明显；导管成群排列整齐。叶柄内薄壁细胞大，不规则形，可见草酸钙方晶。见图1-4。

3.4.4花粉末特征[15]

**全缘叶绿绒蒿**：黄色。花粉粒众多，黄色，球形，外壁具刺状突起，无萌发孔。非腺毛由多细胞组成，多分枝，分枝细胞尖。导管，一个或数个结合，以螺纹导管多见。花粉囊内壁细胞多见，细胞呈星形网状增厚。草酸钙方晶散在。见图1-5。

**红花绿绒蒿**：红棕色。非腺毛由单细胞组成，分枝少见。花粉囊内壁细胞呈网状或条状不规则增厚。可见淀粉粒。见图1-5。

**川西绿绒蒿**：紫色。花粉粒多见，扁圆形。非腺毛由单细胞组成，分枝少见。网纹导管可见。花粉囊内壁细胞呈条状增厚。见图1-5。

13



A.全缘叶绿绒蒿；B.红花绿绒蒿；C.川西绿绒蒿

1.花粉粒；2.草酸钙结晶；3.花粉囊内壁细胞；4.花冠表皮细胞；5.螺纹导管；

6.非腺毛；7.淀粉粒；8.孔纹导管图1-5三种绿绒蒿的花粉末图

*A. M. integrifolia*, B. *M. punicea*, C. *M. henrici*

1. Pollen, 2. Calcium oxalate crystal, 3. Endothecium, 4. Corolla epidermis,

5. Spiral vessel, 6. Non-glandular hair, 7. Starch, 8. Pitted vessel Figure 1-5 Powder of flower of tree species of *Meconopsis*

#### 3.5 花粉形态观察（测量了大约20粒外形饱满，发育较好的花粉粒）全缘叶绿绒蒿：形态为近球形或球形，表面具刺和刺状雕纹，刺末端

较钝，雕纹明显；花粉粒大小为（27.3～39.7）×（31.8～38.6）μm或直径为33.5～35.2μm；无萌发孔。

**红花绿绒蒿：**与全缘叶绿绒蒿相似，不同点为：表面具刺和雕纹，刺 末端尖，雕纹不明显；花粉粒大小为（29.3～34.7）×（29.3～34.5）μm或直径为32μm；无萌发孔。

**川西绿绒蒿：**形态与以上两种差异很大，为扁球形，表明具刺状雕纹 和小孔；花粉粒大小为(18.7～21.3)×(18.0～21.3)μm或直径为19.7～

20.0μm；花粉粒类型为3孔沟，孔沟内具瘤状凸起。三种绿绒蒿的花粉粒形态及表面纹饰见图1-6。

14



### **3** 讨论

a. 全缘叶绿绒蒿，b. 红花绿绒蒿，c. 川西绿绒蒿图1-6三种绿绒蒿的花粉粒外部形态图

A. *M. integrifolia*, B. *M. punicea*, C. *M. henrici*

Figure 1-6 Pollen of tree species of*Meconopsis*

本试验通过对三种绿绒蒿的多方面鉴别，比较三种绿绒蒿的特征差异。三种绿绒蒿原植物和药材性状的区别在于花的颜色和植株大小，全缘叶绿绒蒿植株较高大，红花绿绒蒿次之，川西绿绒蒿最小。三种绿绒蒿根的显微特征有很大区别：红花绿绒蒿根的木质化程度最高，全缘叶绿绒蒿次之，川西绿绒蒿最低。通过三种绿绒蒿叶的横切面观察发现，三种绿绒蒿叶的主脉差别较大；全缘叶绿绒蒿的主脉维管束最大，红花绿绒蒿次之，川西绿绒蒿的主脉维管束则最小，并且只有川西绿绒蒿的栅栏组织通过了主脉。

三种绿绒蒿的花粉末特征中，特征差异最明显的为花粉囊内壁细胞的 特征，因此可通过粉末中的花粉囊内壁细胞区别三种绿绒蒿的花粉末。

三种绿绒蒿的花粉粒各自特征明显，光镜由于放大倍数不足，不能呈

15

现立体效果，所观察到的三种绿绒蒿的花粉粒均为圆形，特征不明显，并 且也无法看清花粉粒表面的刺突和萌发孔沟。因此，采用扫描电镜法能更 容易区分绿绒蒿的花粉粒。

本研究为藏医临床常用三种常用的绿绒蒿药材的原植物鉴别、性状鉴别、显微鉴别、粉末鉴别和孢粉学鉴别等提供了科学依据。

16

# 第二章 大孔树脂富集纯化藏药材全缘叶绿绒蒿总黄酮的工艺研究

有文献报道，绿绒蒿属植物的化学成分主要为生物碱和黄酮，目前已从绿绒蒿属植物中得到10种类型40多种生物碱以及20多种黄酮类化合物[16]。现代研究表明，全缘叶绿绒蒿植株70%乙醇提取物含有较高含量的多酚和黄酮类化合物，具有肝损伤保护作用[17]。五脉绿绒蒿植株总黄酮提取物对实验性肝损伤和肝纤维化具有保护作用，而生物碱则无明显保肝作 用[18-19]。由此，可以认为黄酮类化合物为绿绒蒿药材肝保护作用的主要有 效成分之一。作为植物类药物，绿绒蒿提取物成分多而复杂，因此，根据绿绒蒿的有效组分总黄酮的性质，采用大孔吸附树脂法[20]，富集和纯化绿绒蒿植株总黄酮，以降低收率、提高有效成分的相对含量。本试验采用大 孔吸附树脂法，建立富集纯化全缘叶绿绒蒿植株（不含花）总黄酮（*M. integrifolia* total flavonoids, MITF）的工艺，为后续对比研究三种不同花色绿绒蒿植株总黄酮的体外抗氧化活性、对肝损伤的保护作用研究提供试验基础。

### **1** 仪器与材料

普析TU-1950紫外分光光度计（北京普析公司）；METTLER AE240型电子天平（梅特勒-托利多（上海）有限公司）；IKA RV10旋转蒸发仪（德国IKA公司）；PHS-3型实验室PH计（上海今迈仪器仪表公司）。

芦丁（中国药品生物制品检定所，批号：100080-200707）；大孔吸附树脂AB-8、D101、HPD450、HPD600；无水氯化铝、95%乙醇为分析纯。

全缘叶绿绒蒿于2015年7月4日采自四川省甘孜藏族自治州康定县

折多山，海拔4300 m，将植株于花分开干燥，后续实验中绿绒蒿植株均表示不含花的植株部分。

### **2** 方法与结果

#### **2.1** 大孔树脂预处理

大孔树脂预处理参考文献[21]的处理方法。将新大孔树脂用95%乙醇浸泡过夜后，湿法装柱，用95%乙醇洗脱至洗脱液与水1∶5混合不呈白色浑浊，然后用蒸馏水洗脱至洗脱液无醇味，再分别用5%盐酸和5%氢氧化

17

钠洗脱，并浸泡3 h，然后用去离子水洗脱至中性，备用。

#### **2.2** 上样液的制备

取全缘叶绿绒蒿植株粉末适量，加8倍量体积分数70%的乙醇热回流提取3次，每次1.5 h，提取液过滤，合并滤液，45℃减压回收至无醇

味，加蒸馏水定容至含生药2.5 g/mL，储存备用。实验根据具体情况调整样品溶液质量浓度。

#### **2.3** 全缘叶绿绒蒿植株提取物中总黄酮含量的测定

2.3.1对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品10.20 mg，加70%乙醇定容至50 mL，得0.204

mg/mL芦丁对照品溶液。

2.3.2线性关系考察

显色方法参考参考郑媛媛等[22]所建立的方法。精密移取芦丁对照品溶 液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL分别置于10 mL具塞比色管中，加1%AlCl3 2.5 mL显色，加70%乙醇使反应体系体积为5.0 mL，摇匀，放置

10 min后于415 nm处测定吸光度值。以70%乙醇替代芦丁对照品溶液，按上述方法加试剂得空白溶液。以吸光度值为纵坐标，质量浓度为横坐标进行线性回归，得回归方程*y*=5.5854*x*+0.0389，*R*2=0.9994。

2.3.3样品含量测定

吸取样品溶液适量于10 mL比色管中，加入1%AlCl3溶液2.5 mL，加

70%乙醇使反应体系为5.0 mL，按“2.3.2”项下方法测定吸光度，并计算总黄酮含量。

#### **2.4** 大孔吸附树脂型号的筛选

2.4.1静态吸附性能比较

分别精密称取已处理好的4种大孔树脂，每份相当于相应干树脂0.5 g，置50 mL锥形瓶中，准确加入吸附原液20 mL（0.25 g生药/mL），不时振摇，放置12 h后，测定上清液中总黄酮浓度。结果见表2-1。试验结果表明，4种大孔树脂对MITF都有较好的吸附作用。

18

表 2-1 4种大孔树脂静态饱和吸附量

Table 2-1 Static saturation adsorption of four kinds of resins

|  | 总黄酮质量浓度/(mg/mL) | |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 树脂种类 |  |  | 饱和吸附量/(mg/g) |
|  | 吸附前 | 吸附后 |  |
| AB-8 | 1.205 | 0.008 | 47.90 |
| D101 | 1.205 | 0.017 | 47.53 |
| HPD450 | 1.205 | 0.024 | 47.24 |
| HPD600 | 1.205 | 0.021 | 47.35 |

2.4.2静态解吸性能比较

将静态吸附后的4种树脂滤出，吸干表面水分，置于50 mL容量瓶中，准确加入70%乙醇20 mL，不间断振摇，静置24 h，吸取上清液，测定MITF的质量浓度，结果见表2-2。试验结果表明，D101型树脂的解吸能力最强。结合静态吸附结果，综合饱和吸附量和解吸率两项指标，选择D101型树脂富集纯化MITF。

表 2-2 4种树脂静态解吸量

Table 2-2 Static saturation desorption of four kinds of resins

| 树脂种类 | 解吸液总黄酮质量浓度/(mg/mL) | 解吸量/(mg/g) | 解吸率 |
| --- | --- | --- | --- |
| AB-8 | 1.089 | 43.56 | 90.94% |
| D101 | 1.157 | 46.28 | 97.37% |
| HPD450 | 1.103 | 44.13 | 93.42% |
| HPD600 | 1.075 | 42.98 | 90.77% |

#### **2.5** **D101**型树脂吸附全缘叶绿绒蒿总黄酮的影响因素

称取已处理好D101湿树脂10 g吸干表面水分，相当于干树脂2.5 g），

湿法装柱（柱规格50 cm×2 cm），取适量体积药液按不同药液浓度、洗脱体积流量、洗脱溶媒和洗脱剂用量进行考察。上样后以4 BV蒸馏水洗脱后，再用洗脱溶剂洗脱，收集洗脱液，测定MITF含量，计算比吸附量。

2.5.1药液质量浓度对树脂吸附效果的影响

固定体积流量4 BV/h，上样量40 mL，考察药液质量浓度（生药）分

19

别为0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 g/mL时的比吸附量，结果见表2-3。试验结果表明，当药液质量浓度为0.30 g生药/mL时，比吸附量与0.35

g/mL差异不大，故药液质量浓度控制在0.30 g生药/mL较好。

表 2-3 总黄酮质量浓度与比吸附量的关系

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 药液浓度/（g/mL） | 总黄酮质量浓度/（mg/mL） | 比吸附量/（mg/g） |
| 0.15 | 0.42 | 8.46 |
| 0.20 | 0.68 | 13.54 |
| 0.25 | 0.75 | 15.05 |
| 0.30 | 1.17 | 23.50 |
| 0.35 | 1.18 | 23.57 |

Table 2-3 Relationship between concentration of total flavonoids and comparative mass of adsorption

2.5.2洗脱液体积流量对树脂吸附效果的影响

固定药液质量浓度0.30 g生药/mL时，考察洗脱液体积流量为1、2、

3、4、5 BV/h 5个水平的比吸附量，结果见表2-4。由结果可知，总黄酮的富集能力由洗脱液体积流量的增加而降低，说明速度慢有利于目标成分 的吸附，但速度慢会导致时间成本的增加，因此，综合考虑洗脱液体积流 量和吸附总黄酮的比吸附量，选择最佳体积流量为3 BV/h。

表 2-4 洗脱液体积流量与比吸附量的关系

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 洗脱液体积流量/（BV/h） | 总黄酮质量浓度/（mg/mL） | 比吸附量/（mg/g） |
| 1 | 1.27 | 25.43 |
| 2 | 1.27 | 25.43 |
| 3 | 1.24 | 24.79 |
| 4 | 1.17 | 23.50 |
| 5 | 1.09 | 21.78 |

Table 2-4 Relationship between eluent velocity and comparative mass of adsorption

2.5.3 D101树脂对总黄酮动态吸附性能的影响

配制质量浓度0.30 g生药/mL的样品溶液320 mL，加入已处理好的

20

柱子中，以3 BV/h的体积流量洗脱，每8 mL收集1个流分，测定各洗脱液流份中总黄酮的质量浓度，绘制总黄酮在D101树脂上的动态吸附曲线，结果见图2-1。从图中可以看出，D101型树脂吸附128 mL质量浓度0.30

g生药/mL的MITF未出现明显泄露现象，即1 g干D101树脂的吸附容量为51.2 mL，相当于生药15.36 g，考虑实际应用，将上样体积修正为130 mL。



图2-1 D101树脂对总黄酮的动态吸附曲线

Figure 2-1 Dynamic adsorption curve of total flavonoids on column packed with D101 resin

2.5.4洗脱溶媒的考察

量取质量浓度为0.30 g生药/mL的样品溶液120 mL，加入已处理好的D101树脂柱中（湿树脂10 g），以3 BV/h的流速吸附，吸附完毕后，依次用蒸馏水，体积分数为30%、50%、70%、90%的乙醇洗脱（每个浓度洗脱剂用量为4 BV），1个柱体积收集1个流份，测定各流份中MITF的质量浓度，绘制洗脱曲线，结果见图2-2。试验结果表明，总黄酮主要集中在30%～50%乙醇洗脱部分，故选择50%乙醇作为洗脱溶液。

21



图2-2 不同体积分数乙醇对总黄酮洗脱效果的影响

Figure 2-2 Eluting efficiency of different concentrations of ethanol solution to total flavonoids

2.5.5洗脱剂用量的考察

量取质量浓度为0.30 g生药/mL的样品溶液130 mL，加入已处理好的D101树脂柱中（湿树脂10 g），以3 BV/h的流速吸附，吸附完毕后，先用4 BV蒸馏水洗脱，继以200 mL体积分数50%的乙醇进行洗脱，每个柱体积收集为1个流份，分别测定各个流份中MITF的质量浓度，结果见图2-3。结果显示，以体积分数50%的乙醇作为洗脱溶液，总黄酮解吸峰集中，无明显拖尾，4 BV 50%乙醇已基本将总黄酮洗脱完全，故选择溶剂洗脱用量为4 BV。

22



图2-3 D101树脂对总黄酮的动态解吸曲线

Figure 2-3 Dynamic desorption curve of total flavonoids on column packed with D101 resin

最后确定MITF最佳富集纯化工艺为：上样质量浓度0.30 g生药/mL，洗脱液体积流量为3 BV/h，最佳吸附容量为51.2 mL/g，以4 BV蒸馏水洗脱去除杂质后，换用50%乙醇4 BV洗脱。

#### **2.6** 验证试验

量取质量浓度为0.30 g生药/mL MITF样品溶液2份，每份130 mL，其中一份按优化的工艺条件上柱洗脱，收集50%乙醇洗脱液，将该份洗脱液与另一份药液减压回收溶剂，冻干，称2份浸膏的质量，并测定上柱前后MITF样品中总黄酮的含量，重复3次，结果见表2-5。从结果得知，经过大孔树脂的富集纯化，MITF的总黄酮质量分数由2.47%上升至33.83%，可见D101大孔树脂可有效去除MITF中的杂质，可用于MITF的富集纯化。

表2-5 D101大孔树脂对MITF的纯化（*n*=3）

Table 2-5 Purification of MITF with macroporous adsorption resin(*n*=3)

| 样品名称 | 总固物/g | 总黄酮的量/mg | 总黄酮纯度/% | 总黄酮收率/% |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 上柱前提取物 | 7.5 | 185.15 | 2.47% | / |
| 纯化后提取物 | 0.5 | 169.14 | 33.83% | 91.35% |

23

### **3** 讨论

植物药成分复杂，有效成分（黄酮、生物碱、皂苷、香豆素、蛋白质 等）与无效成分（如纤维素、木栓、角质、色素等）同时存在，需通过富 集纯化的方式提高有效成分的含量、去除无效成分，从而提高药效。目前， 富集纯化总黄酮的方法主要有液-液萃取法、聚酰胺柱色谱法、大孔吸附树脂法、超临界流体二氧化碳萃取法、溶剂气浮分离技术、超滤法等。虽然方法较多，但从富集纯化效率、经济实用考虑，大孔吸附树脂法要优于其他方法。液-液萃取简单易行，但成本较高，需要大量有机试剂，污染环境；聚酰胺柱色谱上样量小，效率较低；超临界流体二氧化碳萃取法设 备大，成本较高，不利于广泛使用；溶剂气浮分离技术、超滤法工艺简单、成本低廉，但仪器设备成本较高，并且超滤法可能由于可溶性蛋白质、多 糖、鞣质等大分子物质的堵塞而增加过滤难度[23-24]。大孔吸附树脂法成本低、上样量大、回收率高，常以含水乙醇为洗脱溶剂，避免环境污染和浪费溶剂，尽管耗时较长，但仍是目前富集纯化总黄酮的主要方法[25-26]。

酸性化合物在酸性溶液中有利于大孔树脂的吸附。黄酮类化合物为多酚羟基化合物，呈弱酸性，样品溶液呈弱酸性有利于MITF在大孔树脂上的吸附。试验测得全缘叶绿绒蒿提取物质量浓度为0.25 g生药/mL的药液的PH值为4.8，呈弱酸性。但在考察不同PH值对D101树脂吸附总黄酮的影响时，发现随着PH值的增大，药液颜色明显加深，对总黄酮含量的测定产生了较大影响，不利于与数据的准确测定，因此，以原药液PH值进行富集纯化。

由于提取物不同极性物质多，在水中的溶解度各不相同，特别是植物 叶中的叶绿素，极易形成不容物，堵塞柱子，因此，上样前可通过抽滤或 离心出去叶绿素等杂质。

D101型大孔吸附树脂对MITF有良好的吸附及解析性能，能有效富集和纯化MITF，可为进一步研究绿绒蒿植株肝保护作用的有效成分提供试验数据和科学依据。

24

# 第三章 三种不同花色绿绒蒿花和植株抗氧化活性和“清肝热、肺热”功 效研究

在翻译藏医药经典著作时，为了便于交流，译者尽可能采用中医名称翻译，无法采用中医名称时，则以藏文音译名翻译。故《晶珠本草》中记载的“欧贝”类绿绒蒿“清肝热、肺热”功效当与中医名称相一致。藏医临床将绿绒蒿制剂用于治疗肝热、肝肿大、肝硬化和肝胃淤血疼痛等新旧肝病。目前，根据中医药理论所建立的实验动物模型有限，多数中药药理学实验依旧采用西药药理学所建立的实验动物模型。因此，本部分试验以小鼠肝损伤、肺损伤为模型，初步比较研究三种不同花色绿绒蒿植株提取物对肝、肺损伤的作用效果，以初步表征其“清肝热、肺热”功效；以炎症细胞模型研究绿绒蒿花提取物的作用效果；由于肝损伤与氧化应激关系密切，以体外抗氧化试验评价绿绒蒿花和植株提取物的体外抗氧化活性。

## 第一节 三种不同花色绿绒蒿花的醇提取物和植株总黄酮体外抗氧化作 用研究

机体在正常生理状态下，活性氧（Reactive oxygen species, ROS）的生成与清除处于动态平衡状态，当由于外源性或内源性刺激使机体产生大量的活性氧自由基，同时当机体产生的抗氧化物质不足时，使机体的氧化/抗氧化作用失衡，使机体处于氧化应激（Oxidative stress, OS）状态，使蛋白质、糖类、核酸等发生氧化损伤[27]。现代研究表明，炎症与氧化应激关系密切，当病原体入侵机体后，儿茶酚胺增加释放，发生自氧化，产生大量的氧自由基；或者再灌注期使中性粒细胞耗氧量增加，产生大量自由基。总之，体内氧化/抗氧化作用失衡后，导致中性粒细胞炎性浸润，蛋白酶分泌增加，产生大量氧化中间产物，导致氧化应激。慢性病毒性肝炎、慢性支气管炎、胃炎等多种感染性疾病都能使机体处于氧化应激状态， 因此，治疗这些疾病的同时要抗氧化应激，维持机体活性氧平衡有利于炎

25

症疾病的治疗。因此，本研究通过比较三种绿绒蒿花和植株提取物抗氧化 作用的差异，以期为藏药材“欧贝”类绿绒蒿的科学、合理用药提供科学 依据。

### **1** 材料与方法

#### **1.1** 材料与试剂

芦丁（批号：100080-201408，中国食品药品检定研究院）；没食子酸

（批号：MUST-13040103）购于四川成都曼斯特生物科技有限公司；福林-酚试剂（北京Solarbio科技有限公司，1N）；α，α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl（DPPH，悌希爱（上海）化成工业发展有限公司）；2,6-Di-tert-butyl-p-cresol（BHT，成都市科龙化工试剂厂）；2,4,6-Tri(2-pyridyl) -1,3,5-triazine（TPTZ，北京百灵威科技有限公司）；抗坏血酸（Vc，广东光华科技股份有限公司）；2, 2′-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)（ABTS，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；AlCl3、Na2CO3、过硫酸钾、FeCl3、HCl、

FeSO4、醋酸钠、冰醋酸为国产分析纯；水为蒸馏水；抗超氧阴离子（Super oxide radical, SOR）试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

全缘叶绿绒蒿*M. integrifolia*于2014年6月21日采自四川省康定县雅家埂、2015年7月4日采自四川省康定县折多山；红花绿绒蒿*M. punicea* 2014年6月23日采自四川省红原县月亮湾；川西绿绒蒿*M.*

*henrici*于2014年6月21日、2015年7月4日采自四川省康定县折多山。

#### **1.2** 仪器

TU-1950紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；Telstar LyoQuest冷冻干燥机（西班牙Telstar公司）；IKA RV10旋转蒸发仪（德国IKA公司）；METTLER AE240型电子天平（梅特勒-托利多（上海）有限公司）；W201B恒温水浴锅（上海申顺生物科技有限公司）。

#### **1.3** 样品制备方法

将采集的新鲜绿绒蒿植株和花分开，于50℃烘箱中分别烘干，烘干的植株和花用打粉机分别粉碎，过2号筛，得备用药材粉末。称取花样

26

品粉末约4.00 g，植株样品粉末约300 g，按固液比1∶10加入体积分数

70%乙醇（v/v），热回流提取3次，过滤，合并滤液，用旋转蒸发仪减压回收溶液（45℃）。绿绒蒿的花醇提取物残渣用少量水溶解，移出，冷冻干燥成干浸膏，保存于4℃冰箱中备用；绿绒蒿植株提取物按前期优化的大孔树脂富集纯化总黄酮的方法处理样品，所得溶液减压回收溶剂后， 残渣用少量水溶解，移出，冷冻干燥成干浸膏，得全缘叶绿绒蒿植株总黄酮（MITF）、红花绿绒蒿植株总黄酮（*M. punicea* total flavonoids, MPTF）、川西绿绒蒿植株总黄酮（*M. henrici* total flavonoids, MHTF）和全缘叶绿绒蒿花提取物（*M. integrifolia* flower extract, MIFE）、红花绿绒蒿花提取物（*M. punicea* flower extract, MPFE）、川西绿绒蒿花提取物（*M. henrici* flower extract, MHFE）保存于4℃冰箱中备用。

精密称取样品粉末100 mg，70%乙醇（v/v）复溶，制成2 mg/mL待测样品溶液，保存于4℃冰箱中备用。

#### **1.4** 酚类化合物的含量的定量测定

1.4.1总多酚

样品中的总多酚含量采用Folin-Ciocalteu法进行测定，方法参考房祥军等[28]的方法，略作修改。于10 mL离心管中加入不同浓度样品溶液适量，福林-酚溶液（浓度为1N）1.5 mL和10%Na2CO3溶液2.0 mL，补适量H2O使反应体系体积为5.0 mL，25℃避光反应1 h，反应结束后于771 nm处测定吸光度值。总多酚含量以没食子酸计，以mg没食子酸/g干提取物表示。

1.4.2总黄酮

样品中的总黄酮含量参考郑媛媛等[22]所建立的方法，并做适当修改。 于10 mL离心管中加入不同浓度样品溶液适量，1%AlCl3溶液2.5 mL，加

70%乙醇使反应体系体积为5.0 mL，25℃反应10 min，反应结束后于415

nm处测定吸光度值，以70%乙醇溶液取代样品溶液作为对照。总黄酮含量以芦丁计，以mg芦丁/g干提取物表示。

27

#### **1.5** 样品抗氧化能力

1.5.1总抗氧化能力

绿绒蒿样品的总抗氧化能力测定方法参考Benzie等[29]建立的FRAP法。TPTZ工作液由10 mmol/L TPTZ、pH3.6醋酸盐缓冲液和20 mmol/LFeCl3溶液按10∶1∶1组成。将待测样品溶液稀释成适当浓度，取待测样品溶液1.5 mL和TPTZ工作液1.5 mL于比色管，混合后于37℃反应20 min，测定593 nm处吸光度值。以FeSO4作标准曲线，计算总抗氧化能力。由于Fe3+-TPTZ可被还原物质还原为Fe2+-TPTZ形式的蓝色物质，检测蓝色物质的生成的量可以反映样品溶液的还原能力，即总抗氧化能力[29-30]，以μg

（FeSO4）/μg（提取物）表示。

1.5.2 DPPH自由基清除试验

绿绒蒿样品的DPPH自由基清除能力测定方法参考Zhou G等[17]的方法。于比色管中加入不同浓度样品溶液（2μg/mL～200μg/mL）0.4 mL和0.0071 mmol/L DPPH无水乙醇溶液2.6 mL，37℃避光反应1 h, 517 nm处测定吸光度值。以70%乙醇代替样品溶液作为空白，以无水乙醇代替样品和DPPH溶液作为空白对照，以Vc和BHT为阳性对照，清除率按下式计算。

清除率 = [𝐴s−𝐴i ] × 100% (1)

𝐴s−𝐴0

式中*A*s为空白，即70%乙醇加DPPH溶液的吸光度；*A*i为不同浓度样品溶液和DPPH溶液反应后的吸光度；*A*0为空白对照的吸光度。

1.5.3 ABTS自由基清除率试验

ABTS自由基清除能力的测定方法参考Zhou G等[17]的方法。ABTS用水溶解制成7 mmol/L，过硫酸钾用水溶解成2.45 mmol/L，将等体积的两种溶液混合，在室温中避光反应16 h后，用80%乙醇稀释，当用紫外分光光度计测得其734 nm处吸光度为0.700±0.005时，得ABTS工作液。于比色管中加入不同浓度样品溶液0.4 mL和ABTS工作液2.6 mL，37℃避光反应30 min后734 nm处测定吸光度值。以70%乙醇代替样品溶液作为

28

空白，以70%乙醇代替样品和ABTS溶液作为空白对照，以Vc和BHT为阳性对照，清除率按方程（1）计算。

1.5.4抑制超氧阴离子自由基试验

绿绒蒿提取物清除超氧阴离子自由能力采用“抗超氧阴离子自由基及产生超氧阴离子自由基试剂盒”进行测定。取2.0 mg/mL样品溶液5 mL，将乙醇在45℃下旋干，残渣用5 mL水溶解，得待测样品溶液，按试剂盒说明书操作步骤进行试验。

### **2** 结果与分析

#### 2.1 酚类化合物的含量测定定量测定

现代研究表明，来源于植物提取物的多酚类化合物和黄酮类化合物具有抗氧化活性，多酚与黄酮含量与提取物的抗氧化能力有很大关系[31-32]。三种绿绒蒿的总多酚、总黄酮含量以及总抗氧化能力见表3-1。

绿绒蒿提取物中总多酚含量测定采用Folin-Ciocalteau法，以没食子酸标定总多酚含量。没食子酸标准曲线方程为*y*=34.289*x*+0.0254

（*R*2=0.9997），没食子酸储备液浓度50.1μg/mL，在2.004～50.1μg之间呈良好线性关系。三种绿绒蒿的花和植株提取物中总多酚含量在72.33 mg/g～394.27 mg/g之间，含量最高的为MITF, MPFE中总多酚含量最低。绿绒蒿总黄酮含量以芦丁计，芦丁标准曲线方程为*y*=6.2143*x*-0.037

（*R*2=0.9996），芦丁储备液浓度200μg/mL，在20～120μg之间呈良好线性关系。三种绿绒蒿的花和植株提取物中总黄酮含量在9.81 mg/g～

319.73 mg/g之间，含量最高的为MIFE, MPFE中总黄酮含量最低。

29

表3-1 三种绿绒蒿提取物的总多酚含量、总黄酮含量及总抗氧化能力

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品名称 | 总多酚含量（mg/g） | 总黄酮含量（mg/g） | 总 抗 氧 化 能 力 （ μg  FeSO4/μg 提取物） |
| MIFE | 239.00±10.18 | 319.73±1.28 | 0.494±0.010 |
| MPFE | 72.33±0.68 | 9.81±0.1 | 0.183±0.002 |
| MHFE | 127.31±1.81 | 22.46±0.15 | 0.303±0.006 |
| MITF | 394.27±15.11 | 305.57±8.14 | 1.147±0.013 |
| MPTF | 231.03±2.77 | 73.49±2.88 | 0.727±0.014 |
| MHTF | 219.82±1.11 | 108.26±1.76 | 0.548±0.014 |

Table 3-1 Contents of total phenolics, total flavonoids and total antioxidant capacity of the extract from three species of *Meconopsis*

#### **2.2** 总抗氧化能力

绿绒蒿提取物的总抗氧化能力（Total antioxidant capacity, TAC）采用亚铁还原能力实验（Ferric reducing antioxidant power, FRAP）法评价。FPAP法是在酸性条件下抗氧化物还原Fe3+-TPTZ形成蓝色物质，在593 nm有最大吸收[29-30]，以生成FeSO的浓度表示抗氧化活性，生成的FeSO4越多，表示抗氧化能力越强。FeSO4储备液浓度为2.78 mg/mL，标准曲线方程为*y*=0.0374*x*+0.1822（*R*2=0.9999），在1.7375～27.8μg/mL之间呈良好线性关系。三种绿绒蒿总抗氧化能力见表3-1。结果显示，总抗氧化能力以MITF最强，抗氧化能力较弱的为MPFE。

4

#### **2.3** **DPPH**自由基清除能力

DPPH法是一种评价自由基清除能力广泛而简单的方法，能用于溶于乙醇水溶液样品的测定[33]。三种绿绒蒿对DPPH自由基的清除能力见表3-2。从DPPH自由基清除能力的IC50值计算结果来看，MITF清除DPPH自由

基的能力最强（IC50 33.73μg/mL），MPFE清除能力最弱（IC50 224.8μg/mL），三种绿绒蒿植株提取物和MIFE的清除能力强于BHT（IC50 155.3μg/mL），弱于Vc(IC50 18.21μg/mL)，MPFE和MHFE的清除DPPH能力较弱。

30

从表3-3可以看出，DPPH清除能力与绿绒蒿中总多酚和总黄酮含量有显著相关性，*R*分别为-0.943和-0.714。

表3-2 三种绿绒蒿提取物抗氧化能力比较结果

Table 3-2 Results of antioxidant capacity of three species of*Meconopsis*

| 样品编号 | IC50/DPPH(μg  /mL) | IC50/ABTS(μg  /mL) | 抑制超氧阴离子自由基  （U/g） | 产生超氧阴离子自由基  （U/g） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| MIFE | 53.34 | 69.84 | / | 214.53 |
| MPFE | 224.80 | 137.70 | / | 127.33 |
| MHFE | 170.00 | 115.70 | / | 273.84 |
| MITF | 33.73 | 14.39 | 102.36 | / |
| MPTF | 52.28 | 26.77 | 100.17 | / |
| MHTF | 68.08 | 30.91 | 123.14 | / |
| VC | 18.21 | 16.64 |  |  |
| BHT | 155.3 | 16.77 |  |  |

表3-3 总多酚、总黄酮含量与抗氧化能力的相关性

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | TAC | IC50/DPPH | IC50/ABTS | SOR |
| Folyphenols | 0.829 | -0.943 | -0.829 | 0.314 |
| Flavonoids | 0.600 | -0.714 | -0.600 | 0.257 |

Table 3-3 Correlation coefficients for relationships between antioxidant assays and levels of polyphenols and flavonoids

表3-4 抗氧化指标之间的相关性

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | TAC | IC50/DPPH | IC50/ABTS | SOR |
| TAC | 1.000 |  |  |  |
| DPPH | -0.943 | 1.000 |  |  |
| ABTS | -1.000 | 0.943 | 1.000 |  |
| SOR | 0.657 | -0.429 | -0.657 | 1.000 |

Table 3-4 Correlation coefficients for relationships between antioxidant assays

31

#### **2.4** **ABTS**自由基清除能力

ABTS法是另一种常用的人工合成自由基，用于测定抗氧化能力，适用于极性和非极性化合物，反应时间较DPPH法短，是使用最多的方法之一[34-35]. ABTS自由基清除试验表明，三种绿绒蒿提取物中清除能力最强的

为MITF

IC50 14.39μg/mL），清除能力最弱的为MPFE

IC50 137.7μg/mL)，

三种绿绒蒿提取物清除ABTS自由基能力除了MITF外，其他均弱于VC

（16.64μg/mL）和BHT（16.77μg/mL）。

相关分析表明，ABTS自由基清除与绿绒蒿醇提物中总多酚和总黄酮含量有显著相关性（*R*=-0.829和-0.600）；各抗氧化指标之间，ABTS清除能力与TAC（*R*=-0.943）和DPPH清除能力（*R*=0.943）之间有极显著相关性，与超氧阴离子自由基清除能力相关性较低（*R*=-0.657）。

#### **2.5** 抑制超氧阴离子自由基能力

超氧阴离子自由基（O2・）是生物体内的活性氧代谢产生的物质，经一系列反应后生产氧化性很强的羟基自由基（OH·），可引发过氧化反应，发生氧化损伤[36]。从表3-2的结果可以看出，三种绿绒蒿的花有促进超氧阴离子自由基产生的作用，以MHFE促进超氧阴离子产生的作用最强；三种绿绒蒿植株提取物具有抑制超氧阴离子自由基作用，以MHTF的抑制超氧阴离子的作用最强。

-

### **3** 讨论

现代研究表明，ROS与炎症免疫过程相关，过量的ROS使机体处于氧化应激状态。病肝肝组织中过剩的ROS可能来源于肝细胞线粒体呼吸链复合体利用电子传递生成ATP、细胞色素P4502E1（CYPEP2E1）和过氧化物酶体（peroxisome）的诱导引起代偿性脂肪酸氧化，过剩的铁和过氧化氢反应生成OH·也可能是肝病氧化应激的原因之一，过量的ROS通过多种途径与细胞因子共同作用而引起不同程度的肝损伤[37-38]。因此，抗氧化活 性物质的研究在肝病药物的开发利用中有重要意义。

目前，体外抗氧化能力的测定方法根据酶是否参与分为酶法和非酶法， 根据反应机理不同可分为：提供氢为机理的方法、提供电子为机理的方法

32

或二者兼有的方法；根据抗氧化原理分为抑制脂质的氧化氧化降解、清除自由基、抑制促氧化剂和还原能力等几个方面。尽管抗氧化能力测定方法很多，但由于生物系统中有多个抗氧化系统（酶系统和蛋白质等大分子、维生素等小分子、激素等系统），各个系统之间的相互联系和工作原理尚不清楚，因此很难采用合理有效的方法综合评价抗氧化能力。另外，生物体内的多种自由基具有不同的化学和物理特征，在不同系统表现不同机制或是同一系统中表现多重机制。植物药提取物成分复杂，为多成分的协同作用的结果，其抗氧化作用无法用单一的机制解释，真实反映物质的抗氧化能力还需要更深入的研究[39]。本试验选取不同两种机制的四种方法：清除自由基能力和还原能力测定法评价绿绒蒿总黄酮提取物的抗氧化能力， 所采用的清除DPPH能力、清除ABTS能力为人工合成自由基，与超氧阴离子清除能力同属以清除自由基为基础的方法，FRAP法为测定还原能力的方法。

试验结果表明，三种绿绒蒿的花和植株提取物都有很强的抗氧化作用， 植株提取物经大孔树脂富集纯化后，总黄酮、总多酚含量明显高于花醇提取物，体外抗氧化能力也明显高于花的提取物。《晶珠本草》记载，绿绒蒿为花类药材，以花入药，具有“清肝热、清肺热”作用，但本试验结果表明：绿绒蒿植株提取物经纯化处理后，能够得到比花醇提取物更强的活性；建议将富集纯化后的绿绒蒿植株提取物与花提取物等同入药，综合利用珍稀的“欧贝”类绿绒蒿药材，部分缓解该类药材已经无法保障120个经典藏成方的原料供给的残酷现实。

33

## 第二节 三种不同花色绿绒蒿花的醇提物对**LPS**诱导**RAW264.7**细胞炎症作用的比较研究

绿绒蒿的花资源较少，虽然以花入药，但目前对于绿绒蒿的花类药材的研究主要以绿绒蒿植株进行研究[40-43]，有关绿绒蒿花有效成分及药理活性研究报道极少，尚不明确不同颜色的绿绒蒿花对“清肝热、肺热”的效果如何以及不同花色间的作用效果差异。现代研究表明，活性氧自由基引发的氧化应激是多种肝病发病的共同病理基础，氧化应激在病毒性肝炎、肝纤维化和脂肪肝等肝病中有着不可忽视的作用；炎症是机体对各种致炎因子及致炎因子引发的损伤而产生的防御性反应；氧化应激可以引起炎症， 炎症也可以引起氧化应激[44-48]。前期研究表明，全缘叶绿绒蒿、红花绿绒蒿和川西绿绒蒿的花中具有较高含量的多酚类和黄酮类化合物，具有很好的体外抗氧化活性。因此，本试验以LPS诱导的RAW264.7炎症细胞为模型，研究三种不同颜色绿绒蒿的花醇提取物对细胞炎症的影响，为绿绒蒿花的合理用药及进一步研究其作用机制提供科学数据。

### **1** 材料与方法

#### **1.1** 药品和试剂

Gibco胎牛血清（Gibco公司，美国）；DMEM培养基（Gibco公司，美国）；0.25% Trypsin-EDTA（Gibco公司，美国）；CCK-8(Cell Counting Kit-8, Dojindo公司，日本)；Human TNF-αELISA Kit、IL-6 ELISA Kit、IL-10 ELISA Kit(BD OptEIA)；Griess Reagent System(NO)(Promega, 美国)；Lipopolysaccharides(LPS, Sigma公司)；Caspase 3/7(Promega, 美国)；2′，7′-Dichlorofluorescin diacetate（Sigma公司）；一次性无菌移液管（Corning）；96孔板/6孔板/培养瓶/冻存管等耗材（Corning）；0.25% Trypsin-EDTA（Gibco公司，美国）。

全缘叶绿绒蒿*M. integrifolia*花于2014年6月21日采自四川省康定县雅家埂、红花绿绒蒿*M. punicea*花于2014年6月23日采自四川省红原县月亮湾、川西绿绒蒿*M. henrici*花2014年6月21日采自四川省

34

康定县。

#### **1.2** 试验细胞

RAW264.7小鼠单核巨噬细胞白血病细胞（复旦IBS细胞中心，上海）培养于含有10%胎牛血清的DMEM培养基中，置于37℃、5% CO2饱和湿度的培养箱中。

#### **1.3** 仪器

酶标仪（EL×800, BioTek, 美国）；VWR（Thermo, USA）；离心机（Sigma，美国）；微量移液器（Enppendorf, 德国）；超纯水仪（Millipore, 美国）；电子天平（Sartorius, 德国）；高压灭菌锅（ALP，日本）；涡旋振荡器

（Scientific Industries, 美国）。

#### **1.4** 三种绿绒蒿花提取物的制备

将新鲜采集的绿绒蒿花于50℃烘箱中烘干，烘干后用打粉机粉碎，过2号筛，得药材粉末。称取药材样品粉末4～5 g，加入20倍体积70%

乙醇，超声（45 kHz, 300 w）提取3次，每次30 min。合并3次滤液，减压回收乙醇，得浓缩液，将浓缩液置于-80℃冰箱过夜后，冷冻干燥。得MIFE干浸膏1500 mg，得率30.0%；得MPFE干浸膏1480 mg，得率29.6%；得MHFE干浸膏880 mg，得率22.0%。

#### **1.5** 细胞活性试验

采用CCK-8法检测三种绿绒蒿花提取物对RAW264.7细胞的作用。细胞用含胎牛血清的培养液稀释成1×105个/mL，接种于96孔培养板中。将细胞分成2组，加LPS（1μg/mL）组和不加LPS组。孵育24 h后，向每孔加入终浓度为5、20、50、200和500μg/mL的药物溶液。继续孵育24 h后，每孔加入CCK-8试剂10μL，于培养箱中孵育3 h后，测定450

nm处吸光度。试验重复5次。

#### 1.6 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞释放**NO**的影响采用Griess法测定NO的含量。细胞以1×105个/mL的浓度接种于

96孔培养板中。分为空白对照组、LPS组和药物组。孵育24 h后，向LPS组和药物组每孔加入终浓度为5、20、50、200和500μg/mL的药物溶液，

35

加入终浓度为1μg/mL的LPS刺激（空白对照组加入等体积的培养基）。孵育24 h后，加入与上清液等体积的Griess试剂，孵育10 min后，540

nm处测定吸光度值，计算上清液中NO含量。

#### **1.7** 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞分泌**TNF-α、IL-6、IL-10**的影响

细胞因子的测定采用ELISA法。试验分为5组，空白对照组、LPS组和药物低、中、高剂量（20、50和200μg/mL）组。将细胞浓度调整为1×105个/mL，加入96孔培养板中，每孔200μL，每组5个复孔。空白对照组正常培养，LPS组和药物组分别加入终质量浓度为1μg/mL LPS和20、50和200μg/mL绿绒蒿花提取物培养。孵育24 h后，采用ELISA法，按试剂盒说明操作，测定上清液中的TNF-α、IL-6、IL-10含量。

#### **1.8** 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞**Caspase 3/7**表达的影响

细胞以1×105个/mL的浓度接种于96孔培养板中，孵育24 h。试验分为5组，空白对照组、LPS组和药物低、中、高剂量（20、50和200μg/mL）组。空白对照组正常培养，LPS组和药物组分别加入终质量浓度为1μg/mL LPS和20、50和200μg/mL绿绒蒿花提取物培养。继续孵育24 h后，加入5μM caspase抑制剂AC-DEVD-CHO，培养10 min后，加入caspase 3/7溶液100μL/孔，室温培养1 h后用荧光酶标仪进行检测，发射光波长490

nm，检测光波长525 nm。

#### 1.9 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞产生**ROS**的影响细胞以1×105个/mL的浓度接种于96孔培养板中，孵育24 h。试验

分为7组，空白对照组、LPS组和5个不同浓度的药物组。空白对照组正

常培养，LPS组和药物组分别加入终质量浓度为1μg/mL LPS和5、20、50、200和500μg/mL绿绒蒿花提取物培养。继续孵育24 h后，向每孔中加入DCFH-DA探针（10μL,0.1 mM），于37℃培养2 h。用荧光酶标仪进行检测，检测每孔在488 nm激发，525 nm发射处的荧光。

36

### **2** 结果与分析

#### **2.1** 细胞活性试验

在细胞培养液中加入1μg/mL LPS后，三种绿绒蒿的花醇提取物对细胞活性的影响见图3-1。由图可知，5～50μg/mL MIFE对LPS干预条件下对RAW264.7细胞没有明显毒性作用；5μg/mL MPFE对LPS干预条件下对RAW264.7细胞没有明显毒性作用；5～20μg/mL MHFE对LPS干预条件下对RAW264.7细胞没有明显毒性作用。在正常培养条件下，三种绿绒蒿的花醇提取物对细胞活性的影响见图3-2。由图可知，5～50μg/mL三种绿绒蒿花的醇提取物对正常培养条件下RAW264.7细胞没有明显毒性作用。



图3-1三种绿绒蒿花醇提取物对于LPS干预的细胞活性的影响（*n*=5，*x*±*s*；与LPS组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）



Figure 3-1 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* flower on cell viability by LPS induced RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*；compared with LPS group, \* meant *P*<0.05，\*\* meant *P*<0.01)

图3-2三种绿绒蒿花醇提取物对正常培养条件下细胞活性的影响（*n*=5，*x*±*s*；与空白组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-2 Effects of ethanol extract of three species of*Meconopsis* flower

37

On cell viability of RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*; compared with normal group,

\* meant *P*<0.05, \*\* meant *P*<0.01)

#### 2.2 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞释放**NO**的影响由图3-3可知，空白组与模型组（LPS）比较，NO产生的量呈极显著

差异，说明LPS能明显诱导RAW264.7细胞释放NO。试验结果表明，MIFE无明显抑制作用，随着提取物浓度增加，并不能降低NO含量，只能保持NO含量处于LPS诱导产生的水平；MPFE随着浓度增加，能增加RAW264.7细胞释放NO的含量，但促进NO的释放不呈剂量依赖关系；MHFE随着浓度增加，能增加RAW264.7细胞释放NO的含量，随剂量增大，NO浓度升高。



图3-3三种绿绒蒿花醇提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞释放NO的影响（*n*=5,*x*±*s*；与LPS组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-3 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* flower on NO production by LPS induced RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*；compared with LPS group, \* meant *P*<0.05，\*\* meant *P*<0.01)

#### **2.3** 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞分泌TNF-α、**IL-6、IL-10**的影响

1μg/mL LPS可诱导RAW264.7细胞分泌TNF-α、IL-6和IL-10，与正常组比较有统计学意义。MIFE（50μg/mL）、高浓度（200μg/mL）对细胞分泌的TNF-α有一定的抑制作用；低浓度的MIFE（20μg/mL）能显著抑制IL-6的生成，但随着浓度的增大，抑制能力减弱，高浓度（200μg/mL）则无抑制作用；低浓度提取物（20μg/mL）有利于促进抗炎因子IL-10的生成，中、高浓度则对IL-10的抑制或生成无明显作用。MHFE低浓度

38

（20μg/mL）对细胞分泌的TNF-α有促进作用，中、高浓度有一定抑制作用；MHFE对IL-6的生成有抑制作用，呈一定的剂量依赖关系；低浓度MHFE（20μg/mL）对细胞产生的抗炎因子IL-10有促进作用，随着浓度增大，不利于IL-10的生成，高浓度对IL-10的生成有抑制作用。结果见图3-4、3-5、3-6。



图3-4 三种绿绒蒿花醇提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞分泌TNF-α的影响（*n*=5,*x*

±*s*；与LPS组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-4 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* flower on TNF-α production by LPS induced RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*；compared with LPS group, \* meant *P*<0.05，\*\* meant *P*<0.01)



图 3-5 三种绿绒蒿花醇提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 IL-6 的影响（*n*=5,*x*

±*s*；与 LPS 组比较，\*表示 *P*<0.05，\*\*表示 *P*<0.01）

Figure 3-5 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* flower on IL-6 production by LPS induced RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*；compared with LPS group, \* meant *P*<0.05，\*\* meant *P*<0.01)

39



图3-6 三种绿绒蒿花醇提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞分泌IL-10的影响（*n*=5,*x*

±*s*；与LPS组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-6 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* flower on IL-10 production by LPS induced RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*；compared with LPS group, \* meant *P*<0.05，\*\* meant *P*<0.01)

#### **2.4** 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞**Caspase 3/7**表达的影响

从试验结果可以看出，三种绿绒蒿的花醇提取物对LPS致炎的

RAW264.7细胞Caspase 3/7的表达有抑制作用，这种抑制作用随着三种绿绒蒿花醇提取物的浓度增大而减小。结果见图3-7。



图3-7 三种绿绒蒿花醇提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞Caspase 3/7表达的影响

（*n*=5,*x*±*s*；与LPS组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-7 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* flower on Caspase 3/7 production by LPS induced RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*; compared with LPS group, \* meant *P*<0.05, \*\* meant *P*<0.01)

40

#### 2.5 三种绿绒蒿花醇提取物对**LPS**诱导的**RAW264.7**细胞产生**ROS**的影响在LPS的刺激下，模型组的ROS显著升高，在三种绿绒蒿提取物的作

用下，低浓度的提取物（5μg/mL）就能将细胞产生的ROS降至正常值，随着药物浓度的增大，ROS的值变化不大。其中以MIFE对ROS的清除能力最稳定，MPFE随着浓度的增大，细胞中ROS的产量有所升高。结果见图3-8。



图3-8 三种绿绒蒿的花醇提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞产Th ROS的影响（*n*=5,*x*

±*s*；与LPS组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-8 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* flower on ROS production by LPS induced RAW 264.7 ( *n*=5,*x*±*s*；compared with LPS group, \* meant *P*<0.05，\*\* meant *P*<0.01)

### **3** 讨论

肝病根据其发病机制分为病毒性肝病、脂肪肝性肝病、药物性肝病、肝纤维化、肝癌等，发病机制非常复杂，但氧自由基引起的氧化损伤是发病的重要原因之一，而采用天然抗氧化药物用于肝病的治疗是目前的研究热点[37]。由于绿绒蒿药材完全为野生植物资源，因生长环境恶劣的限制，人工目前无法规模化种植，资源濒临灭绝；尤其是花的产量极低，在高原海拔3000～5000米的夏季每年能够采到绿绒蒿类植物花的产量非常有限，无法满足动物药效试验，因此本研究通过细胞炎症模型研究，以期用少量的样品而得到研究结果。

试验结果表明：三种不同颜色绿绒花醇提取物在较低浓度下（低于50

μg/mL）对细胞没有明显的毒性作用；随着浓度升高，细胞毒作用明显。

41

文献研究表明，植物源性的多种黄酮类化合物具有直接的抗菌活性和协同抗生素抗耐药活性[49]，而绿绒蒿的花醇提取物的细胞毒作用与花中所含的黄酮类成分是否有关还有待进一步研究。

NO是具有介导细胞炎症作用的神经递质和特殊自由基，致炎物质可增加NO的合成和释放，从而增强其他致炎因子的活性，加重炎症反应以及诱导其他细胞因子的生成[50-51]。但同时NO也是活化巨噬细胞分泌的一种非特异性成分，具有杀灭或抑制病原微生物的作用。低含量的NO在通常情况下没有细胞毒作用，在TNF或LPS等物质的刺激下，NO含量显著升高，将增加巨噬细胞的细胞毒作用[52-53]。从试验结果可以看出，三种绿绒 蒿花提取物具有一定促进细胞NO生成的作用，无法通过降低NO水平发挥抗炎作用，但其可通过促进NO的分泌激发巨噬细胞的细胞毒作用。

当机体发生炎症反应时，首先分泌TNF-α，激活其他细胞因子产生级联反应，可直接反应炎症的强度[54]；IL-6通过减弱中性粒细胞的活性以促进炎症介质产生，从而使炎症反应进程加快[55]；IL-10是公认的抗炎细胞因子，可阻断TNF-α、IL-6等细胞因子的生成，是重要的抗内毒素致炎作用靶点[56]。在对炎症因子作用方面，MIFE在低浓度下能显著抑制炎症介质IL-6的生成和促进抗炎细胞因子IL-10的生成，但对肿瘤坏死因子TNF-α的抑制作用不明显。

在多细胞生物体内，为了维护内环境稳定，调控机体发育，细胞会由 一系列调控基因控制引发主动死亡的过程为细胞凋亡，又叫细胞程序性死 亡。细胞凋亡以蛋白酶Caspases介导蛋白裂解起作用，分为上游和下游级联反应。Caspases 3/7位于级联反应的下游，被上游启动子激活后，可作用与特异性底物使细胞凋亡[57-58]。实验结果提示，三种不同颜色绿绒 花醇提取物对Caspase 3/7的活化有显著的抑制作用，说明三种不同颜色绿绒花醇提取物能显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞凋亡，提示低浓度的样品溶液能够对细胞存活具有保护作用。

LPS能破坏体内活性氧（ROS）的平衡，使活性氧等自由基大量产生，导致机体损伤。另外，研究表明，ROS在生物体生命进程中扮演着重要角

42

色，ROS可作为第二信使调节与机体内细胞凋亡和坏死有关的信号转导通路，并且与缺氧病理学疾病有密切关系[59-60]。三种不同颜色绿绒花醇提取物都有较强的抗氧化作用，试验结果表明：三种不同颜色绿绒花醇提取物对炎症细胞中的ROS有极显著的抑制作用，可有效保护细胞不受氧化损伤，对细胞起保护作用。

试验结果表明，三种不同颜色绿绒花醇提取物中均对LPS诱导的

RAW264.7细胞炎症有一定的抑制作用，其中MIFE对细胞炎症导致的氧化应激反应抑制效果最好；本试验结果没有得出紫色或者蓝紫色花的活性作 用优于黄色花和红色花绿绒蒿的结论。

43

## 第三节 三种不同花色绿绒蒿植株总黄酮对小鼠肝损伤保护作用的比较 研究

《晶珠本草》记载，三种花色绿绒蒿的花均可作为“欧贝”类绿绒蒿药材，用于肝病和肺病的治疗，但三种花色绿绒蒿活性成分的差异及药效的差异还未得到阐明，等同入药缺乏科学依据。现代研究表明，绿绒蒿植 株总黄酮对实验动物肝损伤具有保护作用，而不同花色绿绒蒿植株总黄酮对实验室动物肝损伤的保护作用间的差异还未见报道，它们的作用效果是否有差异、差异多大都需进一步研究。因此，本试验在前期采用大孔树脂富集纯化绿绒蒿植株总黄酮的基础上，以三种花色绿绒蒿植株总黄酮为试验药物，对小鼠的肝损伤保护作用进行比较研究，为三种绿绒蒿能否等同入药以及研究绿绒蒿的药理活性与活性成分间的谱-效关系提供科学依据和奠定实验基础。

### **1** 材料与方法

#### **1.1** 实验动物与试剂

昆明小鼠，SPF级，体重18～22 g，雄性，由四川省中医药科学院实验动物中心提供，生产许可证编号：SCXK（川）2013-19。

刀豆蛋白A（Concanavalin A, Con A, 美国Sigma公司）；水飞蓟宾胶囊（天津天士力圣特制药有限公司）；谷丙转氨酶（Alanine transaminase, ALT）测试盒、天冬氨酸氨基转移酶（Aspartate

tansaminase，AST）测试盒、超氧化物歧化酶（Superoxyde dismutase，

SOD）测试盒、乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase, LDH）测试盒、还原型谷胱甘肽（Reduced glutathione, GSH）测试盒、过氧化氢酶（Catalase，

CAT）测试盒、丙二醛（Malondialdehyde, MDA）测试盒（南京建成生物工程研究所）；苏木素染液（进口分装苏木色精，成都科龙化工试剂厂提供，批号090220，haris方法配置）；伊红染液（进口分装署红Y，成都科龙化工试剂厂提供，批号090220，配置成0.25%水溶液）。

MITF、MPTF和MHTF按第二章优化的大孔树脂富集纯化总黄酮工艺制

44

备。

#### **1.2** 仪器

VARIOSKAN FLASH酶标仪（美国Thermo Scientific公司）；METTLER

AE240型电子天平（梅特勒-托利多（上海）有限公司）；TGL-16高速冷冻离心机（四川蜀科仪器有限公司），TSJ-Q型全自动封闭式组织脱水机（常州中威电子仪器厂）；BMJ-III型包埋机（常州中威电子仪器厂）；轮转式切片机（德国LEICA）；CX31光学显微镜（日本OLYMPUS）。

#### **1.3** 模型制备及分组

动物模型的建立参考刘悦晖等[61]的方法。雄性昆明小鼠90只，适应

性喂养1周后随机分成9组：空白对照组、模型组、MITF 0.1 g/kg组、

MITF 0.3 g/kg组、MPTF 0.1 g/kg组、MPTF 0.3 g/kg组、MHTF 0.1 g/kg组、MHTF 0.3 g/kg组、水飞蓟宾0.1 g/kg组。从试验第一天起，除空白对照组和模型组灌胃蒸馏水，其他各组每天灌胃给药，连续6天，末次给药后半小时除空白对照组外其他各组注射Con A，剂量18 mg/kg，按

10 mL/kg给药。

造模8 h后，麻醉后眼眶取血，分离血清，4℃保存备用；颈椎脱臼处死，解剖取肝脏，肝脏最大叶浸泡于福尔马林固定，用于病理切片，剩 下的部分，称重，加入适量预冷生理盐水，制成10%匀浆，4℃3500 r/min离心10 min，取上清液，4℃保存备用。

#### **1.4** 指标测定

取小鼠血清，按试剂盒方法测定ALT、AST、LDH；取小鼠肝脏匀浆液，按试剂盒方法测定SOD、GSH、CAT和MDA。

#### **1.5** 肝组织病理形态学观察

取肝脏中央整个纵切面，梯度乙醇脱水，TO生物制片透明剂透明，石蜡包埋、切片，HE染色，显微镜下观察，计数整个切面炎细胞或坏死灶，计量肝细胞肿胀面积比，用T检验统计比较各组差异。

#### **1.6** 统计方法

采用SPSS软件对数据进行处理，结果以*x*±*s*表示，组间比较采用 T

45

检验，*P*<0.05具有统计学意义。

### **2** 结果与分析

#### **2.1** 三种绿绒蒿植株总黄酮对**Con A**诱导肝损伤小鼠血清**ALT**、**AST**、**LDH**的影响

与空白对照组比较，模型组小鼠血清中ALT、AST含量显著升高

（*P*<0.01），与模型组比较，MITF、MPTF、MHTF高低剂量组及水飞蓟宾组均能使ALT含量显著降低（*P*<0.01）。MITF、MPTF、MHTF高低剂量组和水飞蓟宾组均能显著降低AST含量（*P*<0.05或*P*<0.01），说明三种不同花色绿绒蒿提取物与上市药物水飞蓟宾具有相似或更好的效果。与空白对照组 比较，模型组小鼠血清中LDH的含量无明显变化，但三种绿绒蒿植株总黄酮高剂量组和MITF低剂量组能显著降低血清中LDH（*P*<0.05或*P*<0.01），与阳性对照药相比具有更好或相似的作用效果。结果见图3-9～3-11，

Ⅰ～Ⅸ分别代表空白对照组、模型组、MITF高剂量组、MPTF高剂量组、

MHTF高剂量组、MITF低剂量组、MPTF低剂量组、MHTF低剂量组和阳性药对照组。

ALT

\*\*

\*\*

\*\*

\*\*

\*\*

\*\*

\*\*

0.3

0.2

ALT (U/L)

0.1

0.0

ⅠⅡⅢⅣⅤⅥⅦⅧⅨ

图3-9三种绿绒蒿植株总黄酮对Con A肝损伤小鼠血清ALT的影响（*n*=10，*x*±*s*；与模型组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-9 Effects of total flavonoids of three species of *Meconopsis* plant

46

\*

\*

\*\*

\*

\*

\*

\*\*

On levels of serum ALT in Con A induced liver injury ( *n*=5,*x*±*s*; compared with model group, \* meant *P*<0.05, \*\* meant *P*<0.01)

AST

0.15

0.10

0.05

AST (U/L)

0.00

ⅠⅡⅢⅣⅤⅥⅦⅧⅨ

图3-10三种绿绒蒿植株总黄酮对Con A肝损伤小鼠血清AST的影响（*n*=10,*x*±*s*；与模型组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-10 Effects of total flavonoids of three species of *Meconopsis* plant on levels of serum AST in Con A induced liver injury ( *n*=5,*x*±*s*; compared with model group, \* meant *P*<0.05, \*\* meant *P*<0.01)

LDH

\*\*

\*

\*\*

\*\*

2400

1600

LDH (U/L)

800

0

ⅠⅡⅢⅣⅤⅥⅦⅧⅨ

47

图3-11三种绿绒蒿植株总黄酮对Con A肝损伤小鼠血清LDH的影响（*n*=10,*x*±*s*；与模型组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01）

Figure 3-11 Effects of total flavonoids of three species of *Meconopsis* plant on levels of serum LDH in Con A induced liver injury ( *n*=5,*x*±*s*; compared with model group, \* meant *P*<0.05, \*\* meant *P*<0.01)

#### **2.2** 三种绿绒蒿植株总黄酮对**Con A**诱导肝损伤小鼠肝组织中**SOD**、GSH、

**CAT和MDA含量的影响**

与空白对照组相比，Con A组的肝组织中SOD含量呈显著差异。与模型组比较，三种绿绒蒿植株总黄酮和水飞蓟宾均能不同程度升高肝组织中

SOD水平，低剂量组药品的升高程度高于高剂量组，以MITF 0.1 g/kg 组

SOD升高最显著（*P*<0.05）。与空白对照组相比，Con A组的肝组织中GSH含量无显著差异，并且药物组及对照药物水飞蓟宾均不能使肝组织中GSH含量显著升高或降低。与空白对照组相比，Con A组的肝组织中CAT含量无显著差异，MPTF和MHTF能升高肝组织中CAT含量，MITF 0.1 g/kg能使小鼠肝组织中CAT显著升高。与空白对照组相比，Con A组的肝组织中

MDA含量差异显著；与模型组相比，三种绿绒蒿植株总黄酮（MPTF 0.3 g/kg除外）均能使小鼠肝组织中MDA含量显著降低（*P*<0.05），并呈一定量效关系，以MITF降低MDA的效果最好。结果见表3-5。

48

表3-5 三种绿绒蒿植株总黄酮对Con A肝损伤小鼠肝脏SOD、GSH、CAT和MDA的影响

（*n*=10,*x*±*s*）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分组 | 剂量  （g/kg） | SOD（U/mgprot） | GSH（mgGSH/gprot） | CAT（U/mgprot） | MDA  （nmol/mgprot） |
| 空白 | / | 105.00±5.03 | 4.55±1.40 | 5.16±0.43 | 9.39±1.47 |
| Con A | / | 89.45±10.35 | 4.78±0.70 | 5.29±0.21 | 11.21±0.83 |
| MITF | 0.3 | 113.93±14.14 | 4.37±0.92 | 4.65±0.71 | 5.18±0.84\*\* |
| MPTF | 0.3 | 101.77±10.00 | 3.92±0.78 | 5.25±0.66 | 8.78±3..53 |
| MHTF | 0.3 | 98.43±11.76 | 4.89±1.10 | 5.55±0.47 | 6.08±1.85\*\* |
| MITF | 0.1 | 132.46±26.25\* | 4.10±1.01 | 5.77±0.38\* | 6.04±1.41\*\* |
| MPTF | 0.1 | 105.39±11.64 | 4.77±0.97 | 5.92±0.86 | 7.02±1.90\*\* |
| MHTF | 0.1 | 118.12±24.08 | 4.60±1.03 | 5.05±0.46 | 6.87±1.19\*\* |
| 水飞蓟宾 | 0.1 | 111.48±22.45 | 4.98±0.63 | 5.46±0.97 | 6.37±1.43\*\* |

Table 3-5 Effects of total flavonoids of three species of *Meconopsis* plant on levels of hepatic homogenate SOD, GSH, CAT, MDA in Con A induced liver injury (*n*=10,*x*±*s*)

注：与模型组比较，\*表示 *P*<0.05，\*\*表示 *P*<0.01

#### **2.3** **HE**染色结果

镜下见空白对照组小鼠肝脏由肝包膜、肝实质和间质购成，肝包膜光滑完整，未见增生及炎细胞浸润，肝实质肝小叶结构整齐，小叶内可偶见少量淋巴细胞浸润灶及少量肿胀肝细胞，间质内汇管区可偶见少量淋巴细胞浸润，肝窦未见扩张充血；模型对照组与空白对照组比较，可见炎细胞及坏死灶明显增多，并散在分布在肝小叶内，炎细胞主要以中性粒细胞、 巨噬细胞及淋巴细胞为主，肿胀肝细胞面积显著增宽，部分肝脏并可见肝窦扩张充血。给药组MHTF高剂量组（0.3 g/kg）与模型组比较，炎细胞浸润灶可见显著减少，肝细胞坏死程度也明显减轻（*P*<0.01），但肝细胞肿胀面积未见明显减少；MITF、MPTF高剂量组（0.3 g/kg）、MHTF低剂量组（0.1 g/kg）与模型组比较，也可减少炎细胞浸润灶和减轻肝细胞坏

49

死程度（*P*<0.05），同时肝细胞肿胀面积较模型组有显著缩小。MPTF低剂量组和阳性药对照组肝细胞肿胀面积较模型组也有显著缩小。结果见图3-12、表3-6。













|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 空白对照组 HE 40× | 模型对照组 HE 40× | MITF 高剂量组 HE 40× |
| MPTF 高剂量组 HE 40× | MHTF 高剂量组 HE 40× | MITF 低剂量组 HE 40× |
| MPTF 低剂量组 HE 40× | MHTF 低剂量组 HE 40× | 水飞蓟宾组 HE 40× |



图3-12 三种绿绒蒿植株总黄酮对小鼠急性肝损伤病理改变的影响

Figure 3-12 Effects of total flavonoids of three species of *Meconopsis* plant on hepatic tissue pathological changes in Con A induced liver injury

50

表3-6三种绿绒蒿植株总黄酮对Con A引起小鼠急性肝损伤的影响（*n*=10,*x*±*s*）Table 3-6 Effects of total flavonoids of three species of *Meconopsis* plant in Con A induced liver injury

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量（g/kg） | 病变  炎细胞浸润灶（个） | 肝细胞肿胀面积比（%） |
| 空白 | / | 3.67±3.39\*\* | 7.50±9.35\*\* |
| Con A | / | 35.80±10.63 | 23.33±2.58 |
| MITF | 0.3 | 23.25±4.11\* | 11.40±8.20\*\* |
| MPTF | 0.3 | 23.00±5.89\* | 10.00±7.75\*\* |
| MHTF | 0.3 | 15.20±6.14\*\* | 19.00±8.22 |
| MITF | 0.1 | 26.00±3.16 | 21.00±8.94 |
| MPTF | 0.1 | 24.83±9.95 | 6.67±9.83\*\* |
| MHTF | 0.1 | 21.80±7.26\* | 9.67±8.04\*\* |
| 水飞蓟宾 | 0.1 | 29.00±11.00 | 12.00±12.55 |

注：与模型组比较，\*表示*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01

### **3** 讨论

本研究显示，三种绿绒蒿植株总黄酮可显著降低血清中ALT、AST、LDH含量，显著降低肝组织中MDA含量，升高肝组织中SOD活性，减少肝组织中炎细胞浸润灶和减轻肝细胞坏死程度，说明三种绿绒蒿总黄酮提取物具有肝保护作用。从生化指标检测结果和病理结果来看，可认为三种绿绒蒿中，紫色花的川西绿绒蒿对肝损伤的保护作用效果最好，与四川藏区当地 藏医用药习惯一致；其次为全缘叶绿绒蒿，全缘叶绿绒蒿的抗氧化效果最 强，低剂量MITF可显著升高损伤肝组织中SOD活力，缓解因肝损伤产生的氧化应激，有助于肝损伤的恢复。

本次研究病理学检查结果与生化指标测定结果不完全一致，MITF有良好的降低ALT、AST的作用，但在病理学检查中并没有显示出其这一优势，对炎细胞浸润灶的作用效果与MPTF差异不大，甚至不如MPTF效果好。产生这一结果的原因可能是由于取材的特征信息不足，未能全面反映肝损

51

伤病理变化中局部与整体的关系；另一方面，机体的形态、代谢与功能异常是疾病的本质变化，三者之间相互联系、相互影响，但三者的变化有可能不一致[62-63]。有研究报道认为，肝炎患者血清中ALT、AST与肝脏炎症分级呈正相关[64-65]，但也有报道指出，血清ALT、AST在不同病理分级之间无显著差异，只是AST与病理分级呈显著正相关[66]，具体原因还有待进一步研究。

52

## 第四节 三种不同花色绿绒蒿提取物对脂多糖致小鼠肺损伤的作用

研究表明，绿绒蒿提取物对动物肝损伤有较好的保护作用，二十五味绿绒蒿等藏成药也将绿绒蒿用于肝病的治疗，而有关绿绒蒿对于肺炎的作用效果研究未见报道。通过在川西藏区调查发现，当地藏医很少将绿绒蒿用于肺部疾病的治疗，只有极少数医生使用，与《晶珠本草》记载有差异，而不同花色的绿绒蒿是否有治疗肺部疾病的作用及不同绿绒蒿之间的作用效果差异还有待进一步研究。因此，本试验以全缘叶绿绒蒿、红花绿绒蒿和川西绿绒蒿植株的95%乙醇提取物为样品，初步研究不同花色绿绒蒿对小鼠脂多糖性肺损伤的作用，为藏药材绿绒蒿的合理利用提供科学依据。

### **1** 材料与方法

#### **1.1** 实验动物、试剂与材料

昆明小鼠，SPF级，体重18～22 g，雌雄各半，由四川省中医药科学院实验动物中心提供，生产许可证编号：SCXK（川）2013-19。

脂多糖（LPS, Sigama公司）；醋酸地塞米松片（浙江仙琚制药股份有限公司）；BCA蛋白含量检测试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司）；小鼠TNF-α、IL-1β、IL-6 ELISA试剂盒为R& D进口分装；SOD、髓过氧化物酶（Myeloperoxidase, MPO）、MDA试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

全缘叶绿绒蒿、川西绿绒蒿于2013年6月30日采于四川省阿坝州马

尔康县梦笔山，海拔4200 m，红花绿绒蒿于2013年7月2日采于四川省

阿坝州红原县月亮湾，海拔3600 m。将花与植株分开烘干，烘干后植株

打粉，95%浸提，1次7天，提取3次，减压旋蒸回收溶液，得浸膏用于试验。

#### **1.2** 仪器

VARIOSKAN FLASH酶标仪（美国Thermo Scientific公司）；METTLER AE240型电子天平（梅特勒-托利多（上海）有限公司）；TGL-16高速冷冻离心机（四川蜀科仪器有限公司），TSJ-Q型全自动封闭式组织脱水机（常

53

州中威电子仪器厂）；BMJ-III型包埋机（常州中威电子仪器厂）；轮转式切片机（德国LEICA）；CX31光学显微镜（日本OLYMPUS）。

#### **1.3** 模型制备及分组

动物模型的制备参考郭玲等[67]和杨东等[68]所建立的模型和阳性对照药方法。适应性喂养1周后，将90只昆明小鼠按性别体重随机分成9组，

分为空白对照组、模型组、全缘叶绿绒蒿1 g/kg组、全缘叶绿绒蒿2 g/kg

组、红花绿绒蒿1 g/kg组、红花绿绒蒿2 g/kg组、川西绿绒蒿1 g/kg、川西绿绒蒿2 g/kg和醋酸地塞米松3 mg/kg组。空白对照组和模型组灌胃生理盐水，其余各组连续给药6天，末次给药后半小时除空白对照组外其他各组按文献[67]的方法，采用吸入LPS的方式造模，对小鼠腹腔注射水合氯醛（100 g/L），麻醉后将小鼠仰放于45º板上，用镊子拉住小鼠的舌，将50μL LPS（1 g/L）滴于咽后壁，捏住小鼠鼻子20 s后，松开小鼠舌鼻，放于笼中自然苏醒，空白对照组以蒸馏水代替LPS溶液。

造模24 h后，对小鼠进行麻醉，眼眶取血，分离血清，4℃保存备用；颈椎脱臼处死，解剖取肺，右侧肺作为肺湿/干重比值（W/D）测定；左侧肺一叶称重，制成10%匀浆，4℃3500 r/min离心10 min，取上清液，用于肺组织生化指标检测；剩下的肺组织固定于福尔马林中，用于观察肺组织病理改变。

#### **1.4** 肺组织病理形态学观察

取肺组织纵切面取材，梯度乙醇脱水，石蜡包膜，4μm切片，HE染色，奥林巴斯光学显微照相系统下观察，根据病变程度分成五个等级，统 计试验组各病变等级动物只数，用Ridit分析方法对病理检测结果进行统计学评价。

#### **1.5** 肺湿**/**干重比值（**W/D**）测定

将右肺取下用滤纸吸干表明血液后，称湿重（W）后置于60℃烘箱内烘至全干，称干重（D），计算肺W/D值，以评价肺组织的水肿程度。

#### **1.6** 指标测定

取小鼠血清，按试剂盒方法测定TNF-α、IL-1β、IL-6；取小鼠肺

54

匀浆液，按试剂盒方法测定SOD、MDA和MPO。

#### **1.7** 统计方法

试验结果均以*x*±*s*表示，组间比较采用T检验，*P*<0.05具有统计学意义。

### **2** 结果与分析

#### **2.1** **HE** 染色结果

HE 染色结果见图 3-13 和表 3-7。镜下见肺由各级支气管、肺泡及肺间质构成；正常对照组肺泡壁完整，间质内见少量结缔组织及血管，未见 炎细胞浸润、充血及增厚，肺泡腔未见扩张；其余模型组及各给药组可见 不同程度的以叶支气管为中心的肺泡壁增厚，中性粒及淋巴细胞浸润，肺 泡正常形态结构不同程度的破坏消失，肺实质变；根据病变程度，可分为 以下 5 个等级：

0 级：肺泡壁完整，未见炎细胞浸润、充血及间质增厚，肺泡腔未见 扩张或不张；

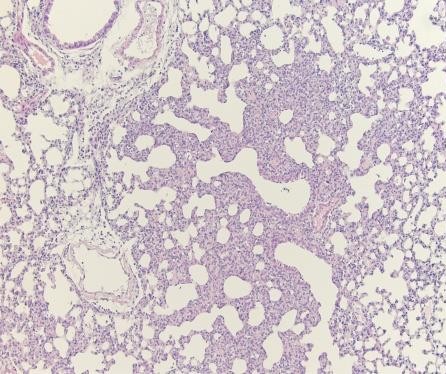
1级：肺泡壁增厚1～2倍，可见少量炎细胞浸润及充血，肺泡腔未见炎细胞浸润肺泡腔未见扩张或不张；

2级：小灶性肺泡壁严重增厚3～10倍，肺泡腔内可见较多炎细胞浸润，肺泡腔未见扩张或不张；

3级：25%～50%肺切面被大量炎细胞浸润，正常肺泡形态结构消失； 其余肺泡还可见正常形态结构；

4级：50%以上肺切面被大量炎细胞浸润，正常肺泡形态结构消失， 肺实质变，仅肺尖及底部还可见少量正常肺泡形态结构。

55



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 0 级病变 HE 20× | 1 级病变 HE 20× | 2 级病变 HE 20× |
| 3 级病变 HE 20× | 4 级病变 HE 20× |  |



图3-13 小鼠肺组织形态病理分级图

Figure 3-13 Pathology classification in mice lung injury表3-7各试验组肺组织病理形态不同等级改变的动物数（*n*=10）

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组 别 | 剂量  （g/kg） | 0 级 | 1 级 | 2 级 | 3 级 | 4 级 | *P* |
| 正常对照 | / | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | <0.05 |
| LPS | / | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 |  |
| 全缘叶绿绒蒿 | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | >0.05 |
| 全缘叶绿绒蒿 | 2 | 0 | 0 | 4 | 3 | 3 | >0.05 |
| 红花绿绒蒿 | 1 | 0 | 0 | 5 | 4 | 1 | >0.05 |
| 红花绿绒蒿 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 0 | <0.05 |
| 川西绿绒蒿 | 1 | 0 | 2 | 2 | 4 | 2 | >0.05 |
| 川西绿绒蒿 | 2 | 0 | 0 | 3 | 7 | 0 | >0.05 |
| 地塞米松 | 0.3 | 2 | 4 | 4 | 0 | 0 | <0.05 |

Table 3-7 The animal number of pathology classification in mice lung injury (*n*=10)

注：*P*值为各组与模型对照组比较

56

经统计分析可见，模型组与正常对照组比较具有统计学显著性差异

（*P*<0.05），提示肺炎模型成立；红花绿绒蒿2 g/kg给药组和地塞米松给药组与模型组比较也具有显著性差异（*P*<0.05），说明红花绿绒蒿、地塞米松对小鼠LPS引起的急性肺炎引起的病理形态改变具有显著的改善作用。

#### **2.2** 肺**W/D**比值的改变

试验结果表明，LPS组的W/D比值明显高于正常对照组（*P*<0.05），除此之外，只有地塞米松组的W/D比值与LPS组相比有显著性差异（*P*<0.05），结果见表3-8。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量（g/kg） | W/D | *P* |
| 正常对照 | / | 4.75±0.19 |  |
| LPS | / | 5.02±0.22# | <0.05 |
| 全缘叶绿绒蒿 | 1 | 5.00±0.14 | >0.05 |
| 全缘叶绿绒蒿 | 2 | 5.02±0.14 | >0.05 |
| 红花绿绒蒿 | 1 | 4.96±0.16 | >0.05 |
| 红花绿绒蒿 | 2 | 5.06±0.14 | >0.05 |
| 川西绿绒蒿 | 1 | 4.95±0.19 | >0.05 |
| 川西绿绒蒿 | 2 | 4.88±0.12 | >0.05 |
| 地塞米松 | 0.3 | 4.79±0.22\* | <0.05 |

表3-8三种绿绒蒿提取物对LPS诱导的肺损伤小鼠W/D比值的影响（*n*=10,*x*±*s*）Table 3-8 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* plant on lung wet weight/dry weight ratio (W/D) in LPS induced lung injury (*n*=10,*x*±*s*)

注：#表示模型组与正常对照组比较，*P*<0.5；\*表示与模型对照组比较，*P*<0.5

#### **2.3** 三种绿绒蒿提取物对**LPS**诱导的脂多糖肺损伤小鼠血清中**TNF-α、IL-1β、IL-6**的影响

与正常对照组相比，LPS组中TNF-α含量显著升高，各个药物组与

LPS组相比，除全缘叶绿绒蒿1 g/kg组外，TNF-α含量显著降低，提示

57

三种不同花色绿绒蒿乙醇提取物具有降低LPS致肺损伤小鼠中的促炎因子TNF-α的作用。但试验结果中，LPS组与正常对照组相比，血清中IL-1β和IL-6的含量无显著变化，给药后含量也无显著变化，原因有待进一步研究。结果见表3-9。

表3-9 三种绿绒蒿提取物对LPS诱导的肺损伤小鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6含量的影响（*n*=10,*x*±*s*）

Table 3-9 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* plant on serum TNF-α, IL-1βand IL-6 in LPS induced lung injury ( *n*=10,*x*

±*s*)

| 组别 | 剂量（g/kg） | TNF-α（ng/mL） | IL-1β（ng/mL） | IL-6(ng/mL) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 正常对照 | / | 691.20±35.89 | 1.59±0.13 | 3.58±0.88 |
| LPS | / | 767.34±58.94# | 1.54±0.19 | 3.77±1.70 |
| 全缘叶绿绒蒿 | 1 | 680.12±102.23 | 1.56±0.22 | 3.04±0.30 |
| 全缘叶绿绒蒿 | 2 | 678.91±68.14\* | 1.53±0.19 | 3.46±0.84 |
| 红花绿绒蒿 | 1 | 681.66±47.24\*\* | 1.84±0.56 | 3.27±0.80 |
| 红花绿绒蒿 | 2 | 648.02±23.92\*\* | 1.56±0.30 | 3.04±0.59 |
| 川西绿绒蒿 | 1 | 663.54±39.68\*\* | 1.47±0.13 | 3.01±0.64 |
| 川西绿绒蒿 | 2 | 672.90±74.01\*\* | 1.55±0.13 | 3.26±0.60 |
| 地塞米松 | 0.3 | 667.65±70.88\*\* | 1.72±0.14 | 3.35±0.59 |

注：#表示与正常组比较，*P*<0.05；\*表示与LPS模型组比较，*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01

#### **2.4** 三种绿绒蒿提取物对**LPS**诱导的脂多糖肺损伤小鼠肺组织中SOD、

**MDA和MPO的影响**

LPS组中SOD含量明显低于正常对照组（*P*<0.01），除红花绿绒蒿1 g/kg组外，其他各组与LPS组比较SOD活性显著升高。但MDA和MPO含量正常对照组与模型组无显著差异，原因还有待进一步研究。结果见表3-10。

58

表3-10 三种绿绒蒿提取物对LPS诱导的肺损伤小鼠肺组织中SOD、MDA和MPO含量的影响（*n*=10,*x*±*s*）

Table 3-10 Effects of ethanol extract of three species of *Meconopsis* plant on lung tissues SOD, MDA and MPO in LPS induced lung injury (*n*=10,*x*

±*s*)

| 组别 | 剂量  （g/kg） | SOD(U/mgprot) | MDA(nmol/mgprot) | MPO  （U/克组织湿重） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 正常对照 | / | 53.66±8.93 | 1.17±0.10 | 2.41±0.68 |
| LPS | / | 33.36±6.16## | 1.55±0.30 | 3.11±0.42 |
| 全缘叶绿绒蒿 | 1 | 40.30±6.94\* | 1.22±0.23 | 2.82±0.54 |
| 全缘叶绿绒蒿 | 2 | 38.57±2.76\* | 1.16±0.13 | 2.60±0.52 |
| 红花绿绒蒿 | 1 | 41.65±6.35\* | 1.18±0.26 | 2.59±0.59 |
| 红花绿绒蒿 | 2 | 37.55±4.88 | 1.23±0.22 | 2.97±0.50 |
| 川西绿绒蒿 | 1 | 38.32±3.51\* | 1.25±0.20 | 3.23±0.83 |
| 川西绿绒蒿 | 2 | 39.49±5.56\* | 1.13±0.13 | 3.02±1.02 |
| 地塞米松 | 0.3 | 44.81±5.86\*\* | 1.25±0.26 | 3.42±1.10 |

注：##表示与正常组比较，*P*<0.01；\*表示与LPS模型组比较，*P*<0.05，\*\*表示*P*<0.01

**3****讨论**

通过试验研究初步表明，从病理结果来看，红花绿绒蒿95%乙醇提取物能显著改善LPS诱导的肺损伤小鼠的病理形态，提示红花绿绒蒿对肺损伤具有一定的保护作用。全缘叶绿绒蒿和川西绿绒蒿95%乙醇提取物对小鼠肺损伤无明显改善作用。从生化指标检测结果来看，全缘叶绿绒蒿、红花绿绒蒿和川西绿绒蒿对肺损伤小鼠中血清中TNF-α有很好的抑制作用，提高SOD活力。但IL-1β和MDA、MPO的测定结果与文献[67, 69-71]所述的LPS致炎后IL-1β、MDA、MPO含量升高的结果不一致，本试验中，IL-1β、

MDA、MPO在LPS致炎后含量无显著变化，未查到有关文献对此进行说明，具体原因还有待进一步研究。

综合病理结果和生化指标结果，三种不同花色绿绒蒿中，以红花绿绒

59

蒿对小鼠肺损伤有一定的保护作用，全缘叶绿绒蒿和川西绿绒蒿的作用效 果不明显，这一试验结果与藏医典籍记载“欧贝”类绿绒蒿“清肺热、肝 热”功效不一致。提示治疗肺部疾病可以红花绿绒蒿入药，其作用机制和 活性效应成分还有待进一步研究。但是红花绿绒蒿为国家Ⅱ级重点保护野 生植物[72-73]，由于生长环境的限制，人工目前还无法开展绿绒蒿药材的规范化种植，无法人工抚育，野生资源少，大量采集将破坏青藏高原原本生 态平衡，因此，不宜大量采集样品进行研究，故课题没有对红花绿绒蒿进 行进一步研究。

60

# 第四章 高速逆流色谱法分离纯化藏药材全缘叶绿绒蒿花的黄酮类成分

中药民族药的化学对照品是现代常用的保证药材品质的根本保障，由于分离技术和分离条件的制约，部分中药材以及大部分民族药材质量控制的特异性指标成分都无法满足，亟需采用科学有效的方法进行研究。《部颁藏药标准》对“欧贝”类绿绒蒿药材的质量控制要求只有显微鉴别和粉末鉴别，尚未有特征性化学指标成分对其进行质量控制。尽管现代化学成分研究对绿绒蒿的地上部分的化学成分进行了较系统的研究，采用传统分离方法分离得到了生物碱和黄酮等化合物[ 74 - 76]，但所得到的多数化合物无法购买对照品，通过原有制备方法也难以重复制备，因此少有文献对绿绒蒿药材进行质量评价研究；另外，“欧贝”类绿绒蒿以花入药，未查阅到有文献报道全缘叶绿绒蒿花的化学成分。可见，绿绒蒿药材的活性有效成分并不明确，没有指标性成分对其进行质量控制，因此需建立简单易重复的分离制备绿绒蒿活性成分的方法。

绿绒蒿属植物的化学成分多采用硅胶柱色谱、中压柱层析、制备液相、Sephadex LH-20等传统分离方法进行分离[ 74 - 78]，虽然传统方法分离化合物较全面，但耗时长、溶剂用量大、不易重复。高速逆流色谱（High-speed counter-current chromatography, HSCCC）技术依据化合物在互不相溶的两相溶剂中的分配系数的差异而实现分离。不需要固体载体，可避免样品在分离过程中的不可逆吸附和分解，溶剂系统的极性可根据化合物的性质选择，选择范围广，适合各种极性的化合物， 并且分析时间较短，回收率和产品纯度高，适宜放大，便于工业化生产，可有效用于分离制备天然产物[79-81]。

Zhou等[17]报道，全缘叶绿绒蒿地上部分70%乙醇提取物有较好的肝保护作用，课题前期研究也表明，MIFE具有很强的体外抗氧化活性，提取物中多酚和黄酮类化合物为主要成分，因此本研究通过建立HSCCC法，首次对活性部位MIFE的主要化学成分进行分离制备，研究全缘叶绿绒蒿花

61

的化学成分组成，并为绿绒蒿药材对照品的制备提供参考方法，为全缘叶绿绒蒿花药材的物质基础阐明、药材的质量控制提供科学依据和实验基础。

**1****材料**

高速逆流色谱仪，包括AKTA-Prime溶剂泵系统（美国GE公司）和TBE-300B半制备型高速逆流色谱主机（上海同田生化技术有限公司）；Waters ACQuity超高效液相色谱仪，包括四元泵溶剂系统、自动进样器和PDA检测器（美国Waters公司）；普析TU-1950紫外分光光度计（北京普析公司）；Telstar LyoQuest冷冻干燥机（西班牙Telstar公司）；IKA

RV10旋转蒸发仪（德国IKA公司）；Agilent Technologies DD2 400-MR核磁共振仪（美国安捷伦科技公司）；Bruker AVANCE 600 MHz核磁共振仪（Bruker Spectrospin, Switzerland）；Thermo VELOS PRO质谱仪（美国Thermo公司）；METTLER AE240型电子天平（梅特勒-托利多（上海）有限公司）。

色谱级乙腈（美国Fisher公司），蒸馏水（屈臣氏公司），乙酸乙酯、正丁醇为分析纯，水纯净水。

全缘叶绿绒蒿的花2013年6月30日采于四川省阿坝州马尔康县梦笔

山，海拔4200 m。

**2****方法**

#### **2.1** 样品制备

浸膏的提取[17]：称取全缘叶绿绒蒿的花10 g，打粉机粉碎，粉末不大于0.3 mm（基本全部通过3号筛），加70%乙醇（v/v）200 mL，超声（45 kHz, 300 w）提取3次，每次45 min，合并3次滤液，减压回收乙醇，得浓缩液，将浓缩液置于-80℃冰箱过夜后，冷冻干燥，得干浸膏3.11

g，干浸膏得率为31.1%。

取浸膏约150 mg，用50 mL水溶解，转移至分液漏斗中，依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取，合并乙酸乙酯和正丁醇萃取液，45℃减压回收溶剂，残渣作为HSCCC一次进样样品，重复进样4次，样品总量约为600 mg。

62

#### **2.2** 分配系数的确定

取静置分层的上下相溶剂各3 mL置于试管中，再取少量样品浸膏，加入静置分层的两相溶剂系统中，剧烈振荡使样品充分溶解、分层后，取 上、下两相各2 mL，使用旋转蒸发仪减压回收溶剂，用甲醇溶解残渣，并定容于2 mL容量瓶中，采用超高效液相色谱（Ultra performance liquid

chromatography，UPLC）检测，上相峰面积为*A*1，下相峰面积为*A*2，分配系数𝐾=𝐴1/𝐴2.

#### **2.3** 溶剂体系及样品溶液的制备

在分液漏斗中按乙酸乙酯/正丁醇/水（2∶3∶5, v/v/v）配置两相溶剂系统共2 L，充分振摇，静置分层。以上相为固定相，下相为流动相，将制备好的样品浸膏溶于20 mL下相中，备用。

#### **2.4** **HSCCC**分离制备

以20 mL/min的流速将溶剂系统上相泵入主机充满分离螺线管，循环水浴温度35℃，UV检测波长254 nm，转速900 r/min，正转。转速稳定后，以流速2.0 mL/min泵入下相，待下相从管柱出口流出并且基线稳定后，将样品溶液由进样圈注入，根据色谱图手动收集各色谱峰组分，用

UPLC检测纯度。

#### **2.5** **UPLC**分析及结构鉴定

ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱（2.1×100 mm, 1.8μm, 美国Waters公司），柱温35℃，流速300μL/min，进样量2μL，检测波长范围210～400 nm，流动相：乙腈（A）～0.1%冰醋酸水（B），等度洗脱，0～10 min，

16%A. HSCCC分离的组分由旋转蒸发仪减压回收溶剂，用甲醇复溶后再由

UPLC检测其纯度。

HSCCC分离得到的化合物结构由Ultra performance liquid chromatography-Mass spectrometry ( UPLC-MS)、1H-NMR、13C-NMR、Distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT)、1H-1H correlated spectroscopy [COSY(1H-1H)]、1H detected heteronuclear single quantum coherence（HSQC）和1H detected heteronuclear

63

multiple boan correlation（HMBC）数据进行鉴定。

### **3** 结果与分析

#### **3.1** **UPLC**条件选择

为了计算全缘叶绿绒蒿的花醇提取物中目标化合物在各溶剂体系的*K*值，需采用UPLC分析提取物中各化合物的峰面积。优化的UPLC条件包括色谱柱的填料、流动相组成、流速、柱温、最大吸收波长。考察了用于普遍分析的杂化硅胶颗粒柱Waters UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, 1.7μm)和亲水性较好的Waters UPLC HSS T3 (2.1×100 mm, 1.8μm)，试验结果表明：MIFE中的目标成分水溶性较好，采用Waters UPLC HSS T3柱能得到更好的分离。考察了甲醇-水和乙腈-水为流动相，发现乙腈-水的分离效果更好，采用16%乙腈-84%乙酸水进行等度洗脱就能将提取物中的主要化合物分离，UPLC色谱图见图4-1。考察200μL /min和300μL /min的流速，300μL/min出峰更快，并不影响出峰效果，故选择流速为300

μL/min。考察了柱温30℃和35℃，发现35℃出峰更快，并且峰形更窄，故选择柱温35℃。通过波长范围210～400 nm的扫描，得到MIFE中4个主要化合物的最大波长均为255 nm。



图4-1 全缘叶绿绒蒿花醇提取物UPLC色谱图

Figure 4-1 UPLC chromatogram of the crude extract from the flower of*M. integrifolia*

64

#### **3.2** 溶剂系统的选择和分离条件的优化

溶剂体系的选择是高速逆流色谱分离中至关重要的环节，需根据待分离物质的理化性质，选择合适的溶剂体系。通过UPLC-MS对MIFE色谱峰分析表明，全缘叶绿绒蒿的花中黄酮类化合物主要为以槲皮素为苷元的黄酮苷类化合物，极性较大，故应选择中等极性体系或亲水性体系作物分离的溶剂体系。分配系数是HSCCC分离的一个重要参数，是筛选溶剂体系的参考依据之一，理想的分配系数（*K*）为0.5～2，*K*值太大使谱带增宽，*K*值太小则峰无法分离[82-83]。本试验采用UPLC法测定溶剂体系的*K*值，结果见表4-1。

表4-1 化合物1～4在不同溶剂系统中的*K* 值

Table 4-1 The*K* (partition coefficients) values of 1–4 in different systems

| 溶剂系统 | 溶剂比例 (V/V) |  |  | K |  | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 1 | 2 |  | 3 | 4 |
| EtOAc/n-BuOH/H2O | 4∶1∶5 | 0.25 | 0.50 |  | 1.33 | 1.18 |
| EtOAc/n-BuOH/MeOH/H2O | 4∶1.5∶0.5∶5 | 0.59 | 0.80 |  | 1.44 | 1.31 |
| EtOAc/n-BuOH/H2O | 3∶2∶5 | 0.93 | 1.44 |  | 2.91 | 2.78 |
| EtOAc/n-BuOH/H2O | 2∶3∶5 | 1.85 | 2.42 |  | 4.50 | 4.32 |
| CHCl3/MeOH/H2O | 4∶3∶2 | 8.82 | 7.92 |  | 5.81 | 5.03 |

从表4-1可以看出，氯仿/甲醇/水体系（4∶3∶2）中目标化合物的

*K*值太大，不适合分离，故尝试选择乙酸乙酯/正丁醇/水体系。试验结果表明，不同体积溶剂配比中，乙酸乙酯/正丁醇/甲醇/水体系（4∶1∶0.5∶

5，v/v/v/v）尽管*K*值（1. *K*=0.59; 2. *K*=0.80; 3. *K*=1.44; 4. *K*=1.31）合适，但实际分离中目标峰的分离效果并不好，峰未分开，四个峰被一起冲出。故考虑通过增大*K*值的方式使出峰时间延缓，试验是否能使峰达到分离的目的。参考文献方法[84-85]分离黄酮苷的方法，适当增大*K*值，以达到峰分离的目的。减少乙酸乙酯的体积，增大正丁醇的体积，当采用溶剂体系为乙酸乙酯/正丁醇/水体系（3∶2∶5, v/v/v）时，*K*值较大，峰3和4的*K*值已大于2，分离效果较好，但峰3和峰4纯度较低。继续减少

65

乙酸乙酯，增大正丁醇的量，采用乙酸乙酯/正丁醇/水体系（2∶3∶5，

v/v/v），尽管*K*值已经很大（1. *K*=1.85; 2. *K*=2.42; 3. *K*=4.50; 4. *K*=4.32），远大于2，但峰3和峰4的分离效果较好，纯度较高，因此选择该溶剂体系对全缘叶绿绒蒿花提取物进行分离。有文献报道，适当增大*K*值（*K*值范围为1～4）有利于极性化合物的分离[86-87]，本研究结果与文献报道一致。

HSCCC分离的其他条件如转速、柱温、流速对分离也有较大的影响，需进行试验选择合适的条件。乙酸乙酯/正丁醇/水体系属于界面张力较高的溶剂系统，较高的转速可以促进分配和减少质点的传递阻力[88]，故选择转速为900 r/min。仪器柱温对固定相的保留有不可忽视的作用，对亲水性强的正丁醇溶剂体系的固定相保留率有较大影响，升高柱温有助于提高该体系的固定相保留率[89]，试验结果表明：当柱温35℃时，乙酸乙酯/正丁醇/水（2∶3∶5, v/v/v）体系的保留率为46%，达到分离要求。由于所选溶剂体系保留率较低，高流速不利于固定相保留，故选择流速为

2.0 mL/min。

#### **3.3** **HSCCC**分离

采用已建立的HSCCC分离方法对MIFE进行分离，HSCCC色谱图见图4-2。



图4-2 全缘叶绿绒蒿花醇提取物HSCCC色谱图

Figure 4-2 HSCCC chromatogram of the crude extract from the flower of*M. integrifolia*

66

在该条件下，得到纯度较高的化合物4个。得到化合物1（60 mg, 纯度98%），化合物2（40 mg, 纯度95%），化合物3（11 mg, 纯度90%），化合物4（16 mg, 纯度92%），各化合物纯度由UPLC测定，通过各化合物峰面积占总峰面积的比值计算纯度，各个化合物的色谱图见图4-3.4个化合物结构通过1H-NMR、13C-NMR、DEPT、COSY(1H-1H)、HSQC和HMBC数据

进行鉴定。化合物1为槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷，

化合物2为槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄

糖苷]，化合物3为槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]，化合物4为槲皮素-3-*O*-[6'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]，化合物结构见图4-4。整个分离过程，从泵入上相到峰分离结束所花时间为480 min。



图4-3 化合物1～4的UPLC色谱图

Figure 4-3 UPLC chromatograms of the compounds obtained by HSCCC separation

67



#### **3.4** 结构鉴定

图4-4 化合物1～4的结构图Figure 4-4 Structures of compounds 1–4

化合物1：黄色粉末，ESI-MS（负离子模式）：*m/z* 625.16。化合物11H-NMR和13C-NMR数据见表4-2和表4-3。化合物1的数据与文献[90]中槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷的数据基本一致。

化合物2：黄色粉末，ESI-MS（负离子模式）：*m/z* 667.22，MS/MS产生的二级碎片离子有*m/z* 625.13、607.13、301.01。化合物2 1H-NMR和13C-NMR数据见表4-2和表4-3。化合物2的数据与文献[91]中槲皮素

-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的数据基本一致。

化合物3：黄色粉末，ESI-MS（负离子模式）：*m/z* 667.23。化合物3的分子量与化合物2的分子量一致。MS/MS产生的二级碎片离子有*m/z*

625.13、607.13、301.01，与化合物2一致，丢失了碎片CH3CO、C2H5O2、

C14H23O11，并且二者H-NMR和C-NMR数据相似，可见二者为同分异构体，苷元为槲皮素。不同之处为乙酰基与槲皮素苷的连接位置。在HMBC图谱中，乙酰基的C=O（δC 169.7）与δH 4.66相关，δH 4.66与C-2'''（δC

1 13

71.2）和C-4''('

δC67.6）相关，HSQC图谱中，δH 4.66与C-3''('

δC 77.8）

68

相关，因此，可确定乙酰基与C-3'''相连，化合物3为槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-

乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]。

化合物4：黄色粉末，ESI-MS（负离子模式）：*m/z* 667.24. MS/MS产生的二级碎片离子有*m/z* 625.16、607.16、301.01，与化合物2和化合物3一致，丢失了碎片CH3CO、C2H5O2、C14H23O11，并且核磁数据也与化合物2和化合物3相似。不同之处为乙酰基与槲皮素苷的连接位置。在HMBC图谱中，乙酰基中C=O（δC 170.3）与δH 3.93和4.10相关，说明乙酰基可能与一个亚甲基相连。在HSQC图谱中，δH 3.93和4.10和δC 63.5 (C-6''')相关，由此可知，乙酰基与C-6'''相连，化合物4为槲皮素-3-*O*-[6'''

-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]。

### **4** 讨论

本研究采用HSCCC技术，优选乙酸乙酯/正丁醇/水体系（2∶3∶5, v/v/v）为溶剂系统，从藏药材全缘叶绿绒蒿花的70%乙醇提取物中分离得到了4种结构相似的黄酮苷类化合物，经峰面积归一化法测定纯度达到90%以上，化合物1～4均首次从全缘叶绿绒蒿中分离得到，并且经过文献检索确证，化合物3和4为新化合物。

本研究首次对全缘叶绿绒蒿的花中化学成分进行研究，首次建立了HSCCC法分离制备MIFE中的化学成分，分离制备的化合物均为首次从全缘叶绿绒蒿中分离得到，为研究全缘叶绿绒蒿的活性物质基础提供实验基础。该方法简单、重复性好、制备的化合物纯度高，可用于放大生产，快速制备全缘叶绿绒蒿药材的化学对照品。

对于分离水溶性强、强极性的黄酮苷类化合物，并且化合物结构相似， 难以分离时，如果目标化合物极性较大，应考虑通过适当增大*K*值，延长化合物出峰时间来达到分离的目的。

前期研究发现，全缘叶绿绒蒿、红花绿绒蒿和川西绿绒蒿总黄酮为易 溶于水的多酚、黄酮等强极性化合物，而强极性化合物一直是天然产物分 离的难点，强极性化合物在反相色谱中不保留，在正向柱中强保留，形成 了难以分离的局面。经过多年的发展，现代分离技术用于亲水性、强极性

69

化合物分离的主要方法有亲水作用色谱（Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC）、凝胶过滤色谱（Gel filtration chromatography, GFL）、正相色谱（Normal phase chromatography, NPC）、HSCCC和膜分离技术（Membrane separation technique, MST）等[23]。相比HSCCC技术，其他方法工作较繁琐或是成本太高，因此HSCCC现已被广泛应用于分离多酚、黄酮、皂苷等大极性化合物[92]。本研究除了对MIFE中的主要化学成分进行分离，还尝试了对MITF进行分离。通过UPLC-PDA分析和UPLC-MS/MS分析，发现MITF中含有与花相同的HSCCC分离得到的化合物，除此之外，还含有8个槲皮素的糖苷（UPLC色谱图和TIC图见第五章），峰28、T2、T3、T4、T5为同分异构体，其中一个化合物在五脉绿绒蒿的醇提物的水溶性部分中分离得到，但其他4个同分异构体未见报道，推测为新的槲皮素苷；U1、U2、U3还未见报道，可能为新的槲皮素苷。采用与分离花提取物相同的方法分离植株总黄酮，一次分离可直接得到槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷和花中化合物2、3、4的另一个同分异构体，而其他8个槲皮素糖苷则保留与固定相中，可通过收集固定相再进行分离。由于时间关系，化合物2、3、4的同分异构体的结构未完全解析，还未能确定乙酰基的具体连接位置；固定相部分的分离遇到很大困难，由于化合物个数较多，分子量大小一样，化学性质相近，存在*K*值相近而同时出峰的情况，更换多个溶剂系统也无法分离，因此该部分化合物的分离还有待进一步研究。

70

表4-2 化合物1～4氢谱数据 a

Table 4-2 1H-NMR spectroscopic data for compoundsa

| No. | 1 | 2 | 3 | 4 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 6 | 6.17(1H, s) | 6.20 (1H, s) | 6.10 (1H, s) | 6.09 (1H, s) |
| 8 | 6.37 (1H, s) | 6.42 (1H, s) | 6.26 (1H, s) | 6.28 (1H, s) |
| 2' | 7.57 (1H, s) | 7.76 (1H, m ) | 7.57 (1H, m ) | 7.56 (1H, s) |
| 5' | 6.84 (1H, d, J= 8.8) | 6.88 (1H, d, J= 8.5) | 6.80 (1H, d, J= 7.8) | 6.81 (1H, d, J= 8.7) |
| 6' | 7.57 (1H, s) | 7.76 (1H, s) | 7.57 (1H, m ) | 7.56 (1H, s) |
| 1'' | 5.40 (1H, d, J=6.7) | 5.24 (1H ,d, J =7.7) | 5.37 (1H, d, J= 6.8) | 5.36 (1H, d, J= 7.4) |
| 2'' | 3.22 (1H, m ) | 3.51 (1H, m) | 3.22 (1H, m ) | 3.24 (1H, m ) |
| 3'' | 3.22 (1H, m ) | 3.42 (1H, t, J = 9.0 ) | 3.22 (1H, m ) | 3.24 (1H, m ) |
| 4'' | 3.18 (1H, m ) | 3.16 (1H, m) | 3.22 (1H, m ) | 3.13 (1H, t, J= 9.0) |
| 5'' | 3.29 (1H, m ) | 3.30(1H, m) | 3.28 (1H, m) | 3.30 (1H, m ) |
| 6'' | (A)3.86(1H, d, J=  11.2) | (A)3.91 (1H, d, J  =11.6) | (A)3.88 (1H, d, J=  11.0) | (A)3.81 (1H, d, J=  11.5) |
|  | (B)3.49(1H, m) | (B)3.59 (1H, m) | (B)3.53 (1H, m ) | (B)3.50(1H, m) |
| 1''' | 4.06 (1H, d, J=6.7) | 4.23 (1H, d, J = 8.0 ) | 4.17 (1H, d, J = 7.7) | 4.10 (1H, t, J =  10.9) |
| 2''' | 2.83(1H, m) | 4.45 (1H, dd, J = 9.5,  8.1) | 3.06 (1H, m ) | 2.85 (1H, m) |
| 3''' | 2.97(1H, m) | 3.16 (1H, m) | 4.66 (1H, t, J = 9.4) | 2.98 (1H, m) |
| 4''' | 2.97(1H, m) | 3.30 (1H, m) | 3.22 (1H, m ) | 2.98 (1H, m) |
| 5''' | 3.18 (1H, m) | 2.82 ( 1H, m) | 3.06 (1H, m ) | 3.05 (1H, m ) |
| 6''' | (A)3.49(1H, m) | (A) 3.71 (1H, dd, J  =12.1, 2.2) | (A) 3.57 (1H, d, J=  11.2) | (A) 4.10 (1H, t, J=  10.9) |
|  | (B)3.36 (1H, dd, J  =11.7,5.1) | (B)3.59 (1H, m) | (B) 3.43 (1H, m ) | (B) 3.93 (m) |
| Ac |  | 1.71 (3H, s) | 1.99 (3H, s) | 1.97 (3H, s) |

a Compound 1 (DMSO) and compound 2 (methanol-*d*) were measured at 400 MHz; compound 3 (DMSO) and compound 4 (DMSO) were measured at 600 MHz. The peak assignments for compounds 2–4 were based on DEPT, 1H-1H COSY, HSQC and HMBC experiments, while the assignment for compound 1 was based on reference.

*4*

71

表4-3 化合物1～4碳谱数据 a

Table 4-3 13C-NMR spectroscopic data for compounds 1–4a

| No. | 1 | 2 | 3 | 4 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 | 156.3 | 158.4 | 156.6 | 156.6 |
| 3 | 133.3 | 135.5 | 133.1 | 133.1 |
| 4 | 177.3 | 179.2 | 176.7 | 176.8 |
| 5 | 161.2 | 163.0 | 161.0 | 161.1 |
| 6 | 98.8 | 100.1 | 99.5 | 99.4 |
| 7 | 164.6 | 166.3 | 167.0 | 166.7 |
| 8 | 93.7 | 95.0 | 94.0 | 93.9 |
| 9 | 156.4 | 158.4 | 155.7 | 155.9 |
| 10 | 103.2 | 105.7 | 102.8 | 103.1 |
| 1' | 121.1 | 122.9 | 120.6 | 121.5 |
| 2' | 116.3 | 117.5 | 116.0 | 116.0 |
| 3' | 144.8 | 146.0 | 145.1 | 145.1 |
| 4' | 148.6 | 150.1 | 149.4 | 149.2 |
| 5' | 115.3 | 116.3 | 115.4 | 115.3 |
| 6' | 121.7 | 123.5 | 121.6 | 121.5 |
| 1'' | 101.0 | 103.9 | 101.3 | 101.3 |
| 2'' | 74.0 | 75.7 | 74.1 | 74.0 |
| 3'' | 76.6 | 77.9 | 76.4 | 76.5 |
| 4'' | 69.8 | 71.5 | 69.6 | 69.9 |
| 5'' | 76.5 | 78.9 | 76.0 | 76.3 |
| 6'' | 68.1 | 69.0 | 68.6 | 68.4 |
| 1''' | 103.9 | 102.2 | 103.2 | 103.1 |
| 2''' | 73.4 | 75.4 | 71.2 | 73.3 |
| 3''' | 76.4 | 75.7 | 77.8 | 76.2 |
| 4''' | 69.7 | 71.4 | 67.6 | 69.8 |
| 5''' | 76.6 | 77.3 | 76.4 | 76.3 |
| 6''' | 60.8 | 62.2 | 60.5 | 63.5 |
| Ac |  | 20.7 | 21.1 | 20.6 |
|  |  | 171.9 | 169.7 | 170.3 |

a Compound 1 (DMSO) and compound 2 (methanol-*d*) were measured at 101 MHz; compound 3 (DMSO) and compound 4 (DMSO) were measured at 151 MHz. The peak assignments for compounds 2–4 were based on DEPT, 1H-1H COSY, HSQC and HMBC experiments, while the assignment for compound 1 was based on reference.

*4*

72

# 第五章 全缘叶绿绒蒿谱效关系及质量评价研究

## 第一节 全缘叶绿绒蒿抗氧化作用的谱效关系研究

中药及民族药由植物药、动物药和矿物药等组成，组分复杂，发挥疗效作用为多组分、多靶点及多途径协同作用的结果。近年来发展的中药指纹图谱从整体上最大程度地反映中药中所含的化学成分和含量，但仅仅是中药提取物的指纹图谱与药效关系并不明确，单纯的中药化学指纹图谱无法准确反映中药质量[93-95]。研究表明，ROS引发的氧化应激是多种肝病的共同病理生理基础[37]，因此，MITF的极强抗氧化活性与其肝损伤保护作用具有密切关系。本研究以现代中药谱-效关系研究方法为背景，以MITF的指纹图谱和体外抗氧化活性为基础，采用统计学方法（主成分分析、灰色关联度分析法[95]）对指纹图谱-药效数据进行处理，探寻MITF中主要化学成分与抗氧化活性之间的相关性，为研究全缘叶绿绒蒿药材的效应物质基础提供科学依据。

### **1** 仪器与材料

Waters ACQuity超高效液相色谱仪，包括四元泵溶剂系统、自动进样器、PDA检测器和Empower 3色谱工作站（美国Waters公司）；Waters Quattro Premier XE质谱仪（美国Waters公司）；TU-1950紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；Telstar LyoQuest冷冻干燥机（西班牙Telstar公司）；IKA RV10旋转蒸发仪（德国IKA公司）；Sartorious BT 25 S十万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器（北京）有限公司）；ESJ200-4万分之一电子天平（沈阳龙腾电子有限公司）。

芦丁（批号：100080-201408，中国食品药品检定研究院）；没食子酸（批号: MUST-13040103）购于四川成都曼斯特生物科技有限公司；福林-酚试剂（北京Solarbio科技有限公司，1N），DPPH（悌希爱（上海）化成工业发展有限公司）；2, 6-二叔丁基对甲酚（BHT，

73

成都市科龙化工试剂厂）；2,4,6-三（2-吡啶基）-1,3,5三嗪（TPTZ，北京百灵威科技有限公司）；抗坏血酸（Vc，广东光华科技股份有限公司）；ABTS（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；AlCl3、Na2CO3、过硫酸钾、FeCl3、HCl、FeSO4、醋酸钠为国产分析纯；水为蒸馏水

（屈臣氏公司）；色谱级乙腈（Sigma公司）；色谱级冰醋酸（天津科密欧化学试剂有限公司）；抗超氧阴离子试剂盒（南京建成生物工程 研究所）。

MITF为自制，采用前期优化的大孔树脂富集纯化全缘叶绿绒蒿总黄酮的方法制备提取物，全缘叶绿绒蒿*M. integrifolia* (Maxim.)

Franch样品信息见表5-1.

表 5-1 全缘叶绿绒蒿样品信息

|  | Table 5-1 | Source of materials of M. integrifolia |  |
| --- | --- | --- | --- |
| No. | 名称 | 拉丁名 采集地 | 采集日期 |
| S1 |  | 四川省阿坝州红原县阿木乡龙让沟 | 2015-06-19 |
| S2 |  | 四川省阿坝州小金县夹金山 | 2015-06-20 |
| S3 |  | 四川省阿坝州汶川县卧龙特区巴郎山 | 2015-06-23 |
| S4 |  | 四川省甘孜州康定县折多山 | 2014-08-06 |
| S5 |  | M. 四川省阿坝州小金县汗牛乡 | 2015-08-20 |
| S6 | 全缘叶绿绒蒿  integrifolia 四川省甘孜州康定县雅家埂虫草基地 | | 2014-06-21 |
| S7 |  | 四川省甘孜州康定县雅家埂山顶 | 2014-06-21 |
| S8 |  | 四川省阿坝州小金县美沃乡 | 2014-05-10 |
| S9 |  | 四川省甘孜州康定县折多山二台子 | 2014-06-22 |
| S10 |  | 四川省甘孜州康定县折多山垭口 | 2015-07-04 |

### **2** 方法与结果

#### **2.1** 供试品溶液的制备

取全缘叶绿绒蒿粉末约20 g，加8倍量70%乙醇热回流提取 3

次，每次1.5 h，提取液过滤，合并滤液，用旋转蒸发仪45℃减压回收溶剂，经过大孔树脂富集纯化总黄酮后，减压回收溶剂，残渣

74

用少量蒸馏水溶解，移出，冷冻干燥成干浸膏，保存于4℃冰箱中备用。

精密称取50 mg干浸膏，50%乙醇（v/v）复溶，定容至50 mL容量瓶，制成质量浓度1.0 mg/mL体外抗氧化试验待测样品溶液，保存与4℃冰箱中备用。

精密称取25 mg干浸膏，加体积分数50%甲醇溶解，定容至25 mL容量瓶，得质量浓度1.0 mg/mL指纹图谱供试液。

#### **2.2** 对照品溶液的制备

取槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素对照品适量，加甲醇溶解，得对照品溶液。

#### **2.3** 全缘叶绿绒蒿植株总黄酮**UPLC**指纹图谱的建立

2.3.1色谱条件和质谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱（2.1×100 mm, 1.8μm, 美国Waters公司），柱温30℃，流速300μL/min，进样量2μL，检测波长范围210～400 nm，流动相：乙腈（A）～0.1%冰醋酸水（B），梯度洗脱，洗脱条件如下：0～10 min，4%A～14%A；10～20 min，14%A～16%A；20～30 min，16%A～25%A；30～35 min，25%A～60%A。

采用电喷雾电离离子源（ESI），正离子检测模式：*m*/*z* 100～1000，毛细管电压2.8 kV，锥孔电压25 kV，离子源温度100℃，脱溶剂

温度250℃，脱溶剂气体流速500 L/h，锥孔气流量40 L/h；负离

子检测模式：*m*/*z* 100～1000，毛细管电压2.8 kV，锥孔电压25 kV，

离子源温度100℃，脱溶剂温度250℃，脱溶剂气体流速500 L/h，

锥孔气流量40 L/h。

数据分析：质谱数据采用MarkerLynx 4.0软件对数据进行分析。

2.3.2方法学考察

对试验方法进行精密度、稳定性、重复性考察，结果图谱相似度RSD%均小于3%，符合分析要求。

2.3.3 UPLC指纹图谱

按“2.3.1”项下色谱条件进样，得到10批MITF的指纹图谱和

75

对照品图谱，结果见图5-1。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版”软件，对10批MITF样品指纹图谱进行处理，得到对照指纹图谱，结果见图5-2。以MITF指纹图谱的共有模式作为10批药材色谱峰匹配的依据，与样品指纹图谱进行相似度评价，结果见表5-2，结果显示，所选共有峰具有代表性，与样品色谱峰的相关系数均大于0.90，能够标示MITF的成分特征。确定了29个共有峰，

23号峰为槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷，选定该峰为对照峰。



图5-1 10批全缘叶绿绒蒿植株总黄酮样品的UPLC指纹图谱



Figure 5-1 UPLC fingerprint of total flavonoids of *M. integrifolia* plant

图5-2 10批全缘叶绿绒蒿植株总黄酮样品对照指纹图谱

Figure 5-2 Chromatographic control fingerprint of total flavonoids of

*M. integrifolia* plant

76

表5-2 全缘叶绿绒蒿植株总黄酮样品指纹图谱相似度结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | 对照  指纹图谱 |
| S1 | 1.00 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| S2 | 0.85 | 1.00 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| S3 | 0.80 | 0.94 | 1.00 |  |  |  |  |  |  |  |  |
| S4 | 0.79 | 0.74 | 0.76 | 1.00 |  |  |  |  |  |  |  |
| S5 | 0.97 | 0.84 | 0.79 | 0.79 | 1.00 |  |  |  |  |  |  |
| S6 | 0.90 | 0.92 | 0.86 | 0.89 | 0.87 | 1.00 |  |  |  |  |  |
| S7 | 0.87 | 0.82 | 0.76 | 0.94 | 0.84 | 0.96 | 1.00 |  |  |  |  |
| S8 | 0.86 | 0.88 | 0.95 | 0.8 | 0.84 | 0.85 | 0.77 | 1.00 |  |  |  |
| S9 | 0.90 | 0.84 | 0.83 | 0.95 | 0.87 | 0.94 | 0.95 | 0.88 | 1.00 |  |  |
| S10 | 0.85 | 0.84 | 0.85 | 0.95 | 0.84 | 0.93 | 0.94 | 0.84 | 0.94 | 1.00 |  |
| 对照指  纹图谱 | 0.95 | 0.92 | 0.91 | 0.90 | 0.94 | 0.96 | 0.92 | 0.94 | 0.96 | 0.94 | 1.00 |

Table 5-2 Fingerprint similarities results of total flavonoids of*M. integrifolia* plant

#### **2.4** 全缘叶绿绒蒿植株总黄酮体外抗氧化活性比较研究

以前期所采用的方法测定MITF中的总多酚、总黄酮含量，并对样品的总抗氧化能力、DPPH自由基清除能力、ABTS自由基清除能力和抑制超氧阴离子自由基能力进行测定，结果见表5-3。

表5-3 10批全缘叶绿绒蒿植株总黄酮样品体外抗氧化能力结果

Table 5-3 Antioxidant capacity of total flavonoids of*M. integrifolia*

plant

| No. | 总多酚（mg/g） | 总黄酮（mg/g） | 总抗氧化能力  （mg/mL） | IC50/DPPH  (μg/mL) | IC50/ABTS  (μg/mL) | 抑制超氧阴离子  自由基（U/g） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| S1 | 465.03±10.54 | 560.24±35.97 | 13.04±0.19 | 24.73 | 18.69 | 127.36±11.71 |
| S2 | 561.87±17.86 | 850.01±29.06 | 13.15±0.00 | 21.26 | 16.63 | 130.41±5.42 |
| S3 | 485.36±18.26 | 630.39±30.31 | 12.04±0.21 | 27.13 | 20.46 | 121.62±2.82 |
| S4 | 223.63±10.17 | 250.18±7.42 | 5.79±0.10 | 69.42 | 36.26 | 109.97±5.14 |
| S5 | 314.92±7.67 | 307.62±1.61 | 9.93±0.02 | 38.88 | 23.69 | 114.19±5.27 |
| S6 | 354.92±18.11 | 449.81±19.35 | 8.48±0.06 | 41.45 | 31.32 | 119.43±6.81 |
| S7 | 441.40±3.33 | 702.45±15.07 | 12.35±0.25 | 31.97 | 24.16 | 118.07±14.37 |

77

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| S8 | 425.08±1.99 | 432.22±29.67 | 12.36±0.12 | 40.40 | 30.98 | 127.20±14.27 |
| S9 | 406.91±4.40 | 610.60±14.69 | 11.61±0.04 | 33.05 | 24.98 | 125.34±14.17 |
| S10 | 437.23±2.00 | 371.05±3.24 | 12.02±0.04 | 31.61 | 23.89 | 110.47±25.86 |

对比结果可知，不同产地不同批次的MITF的主要成分为多酚类和黄酮类化合物，10批提取物都有很强的体外抗氧化活性，但由于产地不同、采集时间不同，总多酚和总黄酮的含量有一定差异，采集于5月和6月的样品中总多酚和总黄酮含量高于7月和8月采集的样品，抗氧化活性也更强；除此之外，10批样品的色谱峰也有较大差异，差异主要在保留时间13 min之后。可见，各化合物的含量高低、成分的差异均与抗氧化活性有关联，需以谱-效关系研究，明 确各色谱峰与活性的关系。

#### **2.5** 谱效学研究与药效物质筛选

2.5.1主成分分析（Principal component analysis, PCA）

体外抗氧化试验从总抗氧化能力（*X*1）、DPPH自由基清除能力

（*X*2）、ABTS自由基清除能力（*X*3）和抑制超氧阴离子自由基能力（*X*4），总共4个方面评价MITF的体外抗氧化能力，各个指标之间存在一定的相关性，因此，将体外抗氧化活性的4个指标通过主成分分析法进行降维处理，重新组合成一组新的互不相关的综合指标来代替原有的指标[96-97]。运用SPSS19.0统计分析软件进行PCA分析，得主成分方差和初始因子载荷矩阵，结果见表5-4、5-5。试验结果表明，主成分1的贡献率为80.313%，主成分2的贡献率14.159%，两个主成分累积方差贡献率为94.472%，根据累积贡献率大于85%的原则，可用前两个主成分作为新变量代替原有的4个变量。由特征向量写出前两个主成分的关系式：

*F*1=-0.53*X*1+0.54*X*2+0.50*X*3-0.42*X*4 *F*2=-0.05*X*1+0.22*X*2+0.43*X*3+0.87*X*4

其中，*F*1、*F*2表示2个主成分，系数的绝对值越大，说明该主成分受该指标的影响越大，因此，可以确定影响第1主成分和第2主成分大小的指标为*X*2和*X*4，即DPPH自由基清除能力和抑制超氧

78

阴离子自由基能力可较大程度地反映MITF的抗氧化能力强弱。

表 5-4 体外抗氧化指标PCA分析贡献率及累积贡献率

Table 5-4 Contribution rate and cumulative contribution rate of PCA in

*vitro* antioxidant activity

|  |  | 初始特征值 | |  | 提取特征值 | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 主成  分 | 特征根 | 方差贡献率（%） | 累积方差贡献率  （%） | 特征根 | 方差贡献率（%） | 累积方差贡献率  （%） |
| 1 | 3.213 | 80.313 | 80.313 | 3.213 | 80.313 | 80.313 |
| 2 | 0.566 | 14.159 | 94.472 | 0.566 | 14.159 | 94.472 |
| 3 | 0.173 | 4.316 | 98.787 | 0.173 | 4.316 | 98.787 |
| 4 | 0.049 | 1.213 | 100.000 | 0.049 | 1.213 | 100.000 |

表 5-5 初始因子载荷矩阵

|  | | Table | 5-5 | Matrix | Of initial factors |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 指标 | 1 |  |  | 2 | 成分  3 | 4 |
| X1 | -0.946 |  |  | -0.038 | 0.309 | 0.09 |
| X2 | 0.97 |  |  | 0.164 | -0.019 | 0.179 |
| X3 | 0.905 |  |  | 0.326 | 0.257 | -0.092 |
| X4 | -0.747 |  |  | 0.657 | -0.105 | 0.006 |

2.5.2灰色关联度分析（Grey relational analysis, GRA）

将10批全缘叶绿绒蒿总黄酮提取物样品的29个共有峰的峰面积数据与DPPH自由基清除能力和抑制超氧阴离子自由基能力数据进行关联。对原始数据进行标准化转化后，计算关联度，结果见表5-6、表5-7。通过关联系数反应被比较母序列和子序列的相似程度，各个子序列的关联系数的平均值为关联度，将各个子序列对同一母序列的关联度按大小排序，得到关联序，关联序反应了各子序列对母序列的贡献大小，从而可初步确定色谱峰与所对应的化合物与药效间的联系[94]。根据关联度的大小评价样品共有峰与体外抗氧化活性的

79

关联大小，由表5-7可知，29个共有峰与DPPH自由基清除能力和抑制超氧阴离子自由基能力的关联度均大于0.5，说明全缘叶绿绒蒿总黄酮提取物的抗氧化作用是多成分协同作用的结果，对“DPPH自由基清除能力”贡献较大的色谱峰是10、23、8、12、2、22、14、18、28、16、21、15、20、5、11号色谱峰（关联度大于0.7），对“抑制超氧阴离子自由基能力”贡献较大的色谱峰是10、8、22、12、21、4、26、6、25、18、24、28、16、20、27、29、14号色谱峰（关联度大于0.7）。可见，与上述两个指标最有关联的化学成分有一定区别，说明两种自由基的清除机理不同，与其反应的化学成分也不尽相同。可初步将这些贡献最大的化合物作为指纹图谱的药效控制点， 更好地对全缘叶绿绒蒿药材进行质量控制。

80

表 5-6 全缘叶绿绒蒿植株总黄酮样品共有峰的相对峰面积与关联度值

Table 5-6 Relative peak area of common peaks and relevancy of total flavonoids of*M. integrifolia* plant

相对峰面积

| 峰号 | 相对保留时间 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 与 X2 关联度 | 与 X4 关联度 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 |  |  |
| 1 | 0.115 | 0.039 | 0.018 | 0.019 | 0.048 | 0.031 | 0.040 | 0.027 | 0.031 | 0.034 | 0.040 | 0.689 | 0.617 |
| 2 | 0.132 | 0.042 | 0.014 | 0.018 | 0.034 | 0.027 | 0.047 | 0.024 | 0.031 | 0.035 | 0.048 | 0.778 | 0.646 |
| 3 | 0.166 | 0.129 | 0.048 | 0.056 | 0.126 | 0.144 | 0.095 | 0.060 | 0.080 | 0.073 | 0.121 | 0.693 | 0.540 |
| 4 | 0.222 | 0.038 | 0.015 | 0.017 | 0.039 | 0.016 | 0.033 | 0.022 | 0.017 | 0.051 | 0.033 | 0.647 | 0.763 |
| 5 | 0.260 | 0.047 | 0.018 | 0.016 | 0.030 | 0.014 | 0.025 | 0.016 | 0.010 | 0.034 | 0.033 | 0.711 | 0.589 |
| 6 | 0.286 | 0.105 | 0.051 | 0.043 | 0.241 | 0.045 | 0.086 | 0.077 | 0.016 | 0.118 | 0.071 | 0.647 | 0.736 |
| 7 | 0.317 | 0.025 | 0.006 | 0.027 | 0.040 | 0.030 | 0.041 | 0.016 | 0.016 | 0.030 | 0.054 | 0.674 | 0.643 |
| 8 | 0.334 | 0.033 | 0.028 | 0.017 | 0.030 | 0.165 | 0.031 | 0.023 | 0.041 | 0.027 | 0.036 | 0.808 | 0.825 |
| 9 | 0.400 | 0.057 | 0.027 | 0.033 | 0.066 | 0.075 | 0.042 | 0.041 | 0.028 | 0.055 | 0.062 | 0.621 | 0.689 |
| 10 | 0.460 | 0.034 | 0.021 | 0.017 | 0.079 | 0.244 | 0.039 | 0.040 | 0.028 | 0.031 | 0.068 | 0.817 | 0.828 |
| 11 | 0.490 | 0.028 | 0.017 | 0.017 | 0.048 | 0.023 | 0.061 | 0.047 | 0.036 | 0.055 | 0.027 | 0.702 | 0.580 |
| 12 | 0.509 | 0.007 | 0.004 | 0.003 | 0.013 | 0.039 | 0.010 | 0.011 | 0.007 | 0.013 | 0.009 | 0.803 | 0.770 |
| 13 | 0.544 | 0.200 | 0.081 | 0.072 | 0.186 | 0.208 | 0.114 | 0.108 | 0.089 | 0.150 | 0.148 | 0.606 | 0.618 |
| 14 | 0.594 | 0.065 | 0.097 | 0.117 | 0.177 | 0.280 | 0.064 | 0.078 | 0.121 | 0.067 | 0.079 | 0.766 | 0.700 |
|  |  |  |  |  |  |  | 81 |  |  |  |  |  |  |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 15 | 0.609 | 0.032 | 0.035 | 0.027 | 0.066 | 0.095 | 0.052 | 0.048 | 0.041 | 0.041 | 0.058 | 0.740 | 0.643 |
| 16 | 0.653 | 0.140 | 0.190 | 0.135 | 0.296 | 0.437 | 0.126 | 0.160 | 0.119 | 0.099 | 0.177 | 0.744 | 0.705 |
| 17 | 0.673 | 0.056 | 0.035 | 0.022 | 0.083 | 0.077 | 0.064 | 0.036 | 0.030 | 0.051 | 0.057 | 0.694 | 0.625 |
| 18 | 0.722 | 0.014 | 0.029 | 0.006 | 0.059 | 0.095 | 0.015 | 0.032 | 0.009 | 0.019 | 0.013 | 0.765 | 0.715 |
| 19 | 0.787 | 0.029 | 0.039 | 0.012 | 0.027 | 0.062 | 0.023 | 0.039 | 0.025 | 0.013 | 0.023 | 0.655 | 0.696 |
| 20 | 0.826 | 0.013 | 0.046 | 0.022 | 0.036 | 0.106 | 0.043 | 0.062 | 0.020 | 0.030 | 0.049 | 0.738 | 0.702 |
| 21 | 0.850 | 0.045 | 0.055 | 0.030 | 0.073 | 0.380 | 0.052 | 0.062 | 0.021 | 0.028 | 0.145 | 0.740 | 0.767 |
| 22 | 0.951 | 0.018 | 0.030 | 0.017 | 0.013 | 0.127 | 0.013 | 0.021 | 0.012 | 0.009 | 0.036 | 0.774 | 0.787 |
| 23 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.817 | 0.617 |
| 24 | 1.109 | 0.044 | 0.422 | 0.154 | 0.094 | 0.116 | 0.587 | 0.359 | 0.064 | 0.082 | 0.155 | 0.588 | 0.713 |
| 25 | 1.136 | 2.449 | 1.351 | 0.701 | 1.210 | 2.463 | 1.715 | 2.154 | 0.756 | 1.431 | 1.247 | 0.646 | 0.729 |
| 26 | 1.173 | 0.596 | 0.404 | 0.303 | 0.322 | 0.809 | 0.299 | 0.344 | 0.189 | 0.278 | 0.576 | 0.610 | 0.741 |
| 27 | 1.204 | 0.123 | 0.197 | 0.083 | 0.228 | 0.371 | 0.212 | 0.193 | 0.041 | 0.104 | 0.174 | 0.658 | 0.701 |
| 28 | 1.269 | 0.082 | 0.062 | 0.038 | 1.060 | 0.046 | 0.675 | 1.367 | 0.019 | 0.669 | 0.857 | 0.747 | 0.706 |
| 29 | 2.231 | 0.108 | 0.272 | 0.295 | 0.051 | 0.034 | 0.202 | 0.188 | 0.017 | 0.048 | 0.387 | 0.572 | 0.700 |

82

表5-7全缘叶绿绒蒿植株总黄酮样品指纹图谱特征与其抗氧化作用的关联序Table 5-7 Relational order between fingerprint and antioxidant activity of total flavonoids of *M. integrifolia* plant

DPPH 自由基清除能力 抑制超氧阴离子自由基能力

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 关联序 | 峰号 | 关联度 |  | 峰号 | 关联度 |
| 1 | 10 | 0.817 |  | 10 | 0.828 |
| 2 | 23 | 0.817 |  | 8 | 0.825 |
| 3 | 8 | 0.808 |  | 22 | 0.787 |
| 4 | 12 | 0.803 |  | 12 | 0.770 |
| 5 | 2 | 0.778 |  | 21 | 0.767 |
| 6 | 22 | 0.774 |  | 4 | 0.763 |
| 7 | 14 | 0.766 |  | 26 | 0.741 |
| 8 | 18 | 0.765 |  | 6 | 0.736 |
| 9 | 28 | 0.747 |  | 25 | 0.729 |
| 10 | 16 | 0.744 |  | 18 | 0.715 |
| 11 | 21 | 0.740 |  | 24 | 0.713 |
| 12 | 15 | 0.740 |  | 28 | 0.706 |
| 13 | 20 | 0.738 |  | 16 | 0.705 |
| 14 | 5 | 0.711 |  | 20 | 0.702 |
| 15 | 11 | 0.702 |  | 27 | 0.701 |
| 16 | 17 | 0.694 |  | 29 | 0.700 |
| 17 | 3 | 0.693 |  | 14 | 0.700 |
| 18 | 1 | 0.689 |  | 19 | 0.696 |
| 19 | 7 | 0.674 |  | 9 | 0.689 |
| 20 | 27 | 0.658 |  | 2 | 0.646 |
| 21 | 19 | 0.655 |  | 15 | 0.643 |
| 22 | 6 | 0.647 |  | 7 | 0.643 |
| 23 | 4 | 0.647 |  | 17 | 0.625 |
| 24 | 25 | 0.646 |  | 13 | 0.618 |
| 25 | 9 | 0.621 |  | 1 | 0.617 |
| 26 | 26 | 0.610 |  | 23 | 0.617 |
| 27 | 13 | 0.606 |  | 5 | 0.589 |
| 28 | 24 | 0.588 |  | 11 | 0.580 |
| 29 | 29 | 0.572 |  | 3 | 0.540 |
|  |  |  | 83 |  |  |

#### **2.6** 全缘叶绿绒蒿总黄酮主要化学成分鉴定

绿绒蒿样品总离子流图（Total ion chromatography, TIC）见图5-3，化合物质谱数据见表5-8。根据总离子流色谱峰上所得到的分子量信息，初步确定化合物，再对分子离子峰进行碰撞诱导解离

（Collision-induced dissociation, CID），得到化合物相应的碎片离子，通过一级和二级质谱信息，与化学对照品对照、化合物保留时间和文献比对推测，鉴定化合物。可明确鉴定MITF中的5个化合物，初步鉴定8个化合物。可明确鉴定的化合物为槲皮素

-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷（23），槲皮素3-*O*-[2'''

-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]（24），槲皮素3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]（26），槲

皮素3-*O*-[6'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]

（27），槲皮素（29）。初步鉴定的8个化合物为槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-7-*O*-β-D-龙胆双糖苷（14），mangochinine（18），

magnofloring（T1，非共有峰），quercetin 3-*O*-[2''',6'''-*O*-diacetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→6) -β-D-glucopyranoside]或其同分异构体（T2、T3、T4、T5，非共有峰）。U1、U2、U3（非共有峰）为准分子离子峰均为*m/z* 753.6454[M+H] +，二级碎片峰均为*m/z* 303.6156、229.7835、169.6533、109.6092的同分异构体，说明这三个化合物可能为槲皮素的三糖苷，但未查阅到相关文献鉴定这三个化合物。



84

图5-3 全缘叶绿绒蒿植株总黄酮TIC 图

Figure 5-3 Total ion chromatogram of total flavonoids of *M. integrifolia*

plant

2.6.1可确定化合物的鉴定

化合物23的准分子离子峰*m/z* 627.4756[M+H] +，二级碎片离子峰有*m/z* 303.6429，提示为槲皮素的苷，分子量与槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷一致，通过与对照品比对，鉴定该化 合物为槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷。

化合物24、26、27分子量一致，准分子离子峰均为*m/z*

669.3056[M+H] +，二级碎片离子峰*m/z* 303.6389、205.5479、187.6245、

127.5704，由以上数据可知这3个化合物为槲皮素的苷，分子量与槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]一致，通过与全缘叶绿绒蒿的花醇提取物色谱峰比对，可知这3个化合物分别为槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄 糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]、槲皮素-3-*O*-[3''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄

糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]、槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]。化合物25的分子量与这3个化合物

一致，二级碎片离子一致，可见化合物25与以上3个化合物为同分异构体，只是乙酰基的连接位置不同，乙酰基具体连在哪个位置还有待进一步研究。

化合物29的准分子离子峰为*m/z* 303.3945[M+H] +，与槲皮素对照品比对，化学位移和光谱一致，说明该化合物为槲皮素。

2.6.2初步鉴定化合物的鉴定

化合物14的准分子离子峰为*m/z* 789.4924[M+H] +，二级质谱给出槲皮素的分子碎片*m/z* 465.6018、303.3657、274.7541、163.9724，可见该化合物为槲皮素的糖苷，*m/z* 465.6018为丢失龙胆二糖的碎片，与文献[97]比对，得知该化合物可能为槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖

-7-*O*-β-D-龙胆双糖苷。

化合物18与化合物T1分子量仅相差14，二级质谱碎片离子结

85

果一致，说明这两个化合物结构相似，只相差一个CH2. T1的二级质谱碎片离子与文献[98]中木兰花碱的二级质谱一致，说明T1为木兰花碱。通过ChemBlink查找推断，化合物18为mangochinine。

化合物28与T2、T3、T4、T5分子量一致，二级质谱离子碎片相似，均含槲皮素峰，说明为槲皮素的苷，与文献比对，得知其中一个化合物为quercetin-3-*O*-[2''',6'''-*O*-diacetyl-β-D-gluc- opyranosyl-(1→6) -β-D-glucopyranoside]，其他4个化合物为其同分异构体，化合物具体结构还有待进一步研究。

86

表 5-8 全缘叶绿绒蒿植株总黄酮主要化学成分鉴定分析

Table 5-8 Qualitative analysis of chemical constituents in total flavonoids of*M. integrifolia* plant

| No. | Retention Time | Observed (Positive) | MS/MS (Positive) | Formula | Compounds | Reference |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 7.904 | 789.4924 | 465.6018, 303.3657, 274.7541,  163.9724 | C33H40O22 | 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-7-O-β-D-龙胆双  糖苷 | [97] |
| 2 | 9.852 | 328.4004 | 297.6802,282.7344,265.6732,24  7.8438,237.8396,222.6419,209.  9462,191.7377 | C19H22NO4 | mangochinine |  |
| 3 | 10.376 | 342.4895 | 297.8085,282.5420,265.8014,23  7.6419,222.6419,201.8675,194.  8151 | C20H24NO4 | 木兰花碱 | [98] |
| 4 | 13.602 | 627.4756 | 303.6429 | C27H31O17 | Quercetin-3-O-β-D-galactopyranosy-(1→  6)-β-D- glucopyranoside | [91] |
| 5 | 15.111 | 669.7332 | 303.5739,205.5479,127.5704 | C29H33O18 | Quercetin-3-O-[2'''-O-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside] | [91] |
| 6 | 15.592 | 669.4631 | 303.5739,205.5479,127.5704,10  9.6564 | C29H33O18 | Quercetin-3-O-[2'''-O-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside]的同分异构体 | [91] |
| 7 | 16.116 | 669.5306 | 303.5739,205.5479,145.8113 | C29H33O18 | Quercetin-3-O-[3'''-O-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside] | [91] |
| 8 | 16.556 | 669.3956 | 303.3709,127.5055109.7862 | C29H33O18 | Quercetin-3-O-[6'''-O-diacetyl-β-D- | [91] |

87

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  | glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside] |  |
| 9 | 17.666 | 711.4525 | 303.6156,229.5337,187.6338,12  7.5823,109.5468 | C31H35O19 | Quercetin-3-*O*-[2''' ,6'''-*O*-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside]或其同分异构体 | [91] |
| 10 | 20.369 | 711.8576 | 303.6781,  247.7704,169.5284,139.5033 | C31H35O19 | Quercetin-3-*O*-[2''' ,6'''-*O*-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside] 或其同分异构体 | [91] |
| 11 | 20.997 | 711.385 | 303.6781,229.5961,187.8211,12  7.7695 | C31H35O19 | Quercetin-3-*O*-[2''' ,6'''-*O*-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside] 或其同分异构体 | [91] |
| 12 | 22.338 | 711.4525 | 303.4282,247.7704,169.6533,10  9.6092 | C31H35O19 | Quercetin-3-*O*-[2''' ,6'''-*O*-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside] 或其同分异构体 | [91] |
| 13 | 22.946 | 711.385 | 303.6156,229.6586,139.5657,10  9.4844 | C31H35O19 | Quercetin-3-*O*-[2''' ,6'''-*O*-diacetyl-β-D- glucopyranosyl-(1→  6)-β-D-glucopyranoside] 或其同分异构体 | [91] |
| 14 | 31.326 | 303.3271 | 287.5552,269.6841,153.5022,13  5.8326 | C15H10O7 | 槲皮素 | [99] |

88

### **3** 讨论

灰色关联度分析是通过灰色关联度来分析系统中因素间的关联程度的一种方法，依据各因素数列曲线性状的接近程度来进行发展态势的分析。关联度量度了因素间的关联性大小，如果各因素变化态势基本一致，则认为两个因素之间关联度较大；反之则关联度较小。通过数批药材活性提取物建立的指纹图谱，以指纹图谱的共有峰作为特征量化指标，构成子序列，以所有批次样品的药效学指标作为母序列，计算母序列与子序列关联度的大小，从而得到各特征色谱峰对药效的贡献大小，可初步确定对该药效有较大关联的活性化学成分。该方法虽然简单易行，但对数据敏感，分析前需对数据进行标准化处理。该方法从一定程度上阐释了药物组分与药效的关系，但复杂样品与药效错综复杂的关系用统计学的方法还不能完全阐明[100]。

DPPH自由基清除能力法和抑制超氧阴离子自由基能力法均为以清除自由基为基础的方法。DPPH自由基为人工合成自由基，超氧自由基（O2・¯）为生物体中存在的自由基。具有抗氧化活性的化学成分在单一抗氧化系统中可能存在多重机制，或在不同系统有不同的机制，此外，自由基不同，化学成分的清除机制也不同，如类胡萝卜素具有很强的清除单线态氧的能力，但清除过氧自由基的能力较弱

[39]. 由此可推测，全缘叶绿绒蒿植株总黄酮提取物中的部分化学成

分在不同氧化系统中具有不同的抗氧化机制，对不同自由基具有不同的清除能力。

全缘叶绿绒蒿为藏药材绿绒蒿的来源之一，《部颁藏药标准》对其的要求只有显微鉴别，质量控制方法落后，并且未查阅到文献对绿绒蒿的活性黄酮类组分中的化学成分进行研究，有文献报道了以木犀草素[101]、槲皮素[102-103]为评价指标对绿绒蒿药材进行质量评价，但研究发现，木犀草素和槲皮素在绿绒蒿提取物中的含量并不高，不是主要化学成分，因而至今未有科学可靠的质量评价方法。

本研究通过对10批不同产地、不同采集时间的全缘叶绿绒蒿样

89

品，富集纯化得到具有很强抗氧化活性和较好肝损伤保护作用的总黄酮提取物，建立10批样品的指纹图谱，发现产地不同、采集时间不同样品峰的数量和峰面积有差异。采用主成分分析和灰色关联度分析法研究了MITF的抗氧化活性化学成分，试验结果表明29个共有峰的关联度都大于0.5，说明抗氧化作用是29个化合物共同作用的结果，其中在两个评价指标中关联度大于0.7的2、4、5、8、6、

10、11、12、14、16、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、

29号峰初步认为是全缘叶绿绒蒿植株总黄酮提取物中抗氧化的主要活性成分。

研究表明，通过UPLC-MS/MS分析得知MITF中主要化合物为槲皮素的糖苷，另含有少量生物碱，说明槲皮素的糖苷为MITF抗氧化活性的物质基础，强抗氧化能力与多个槲皮素苷与生物碱之间的协同作用有关。

90

## 第二节 **UPLC**法测定全缘叶绿绒蒿花主要成分的含量

课题前期研究表明，全缘叶绿绒蒿花的主要化学成分为黄酮苷，以槲皮素的双糖苷为主，具有很强的抗氧化活性。为了更加客观评价全缘叶绿绒蒿花药材的质量，对其进行质量评价和质量控制，本研究建立了UPLC同时测定全缘叶绿绒蒿花中3种主要活性成分的方法，对不同产地全缘叶绿绒蒿花进行含量分析，以期为全缘叶绿绒蒿的花质量标准研究提供科学依据。

### **1** 仪器与试药

Waters ACQuity超高效液相色谱仪，包括四元泵溶剂系统、自动进样器、PDA检测器和Empower 3色谱工作站（美国Waters公司）；Sartorious BT 25 S十万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器（北京）有限公司）；ESJ200-4万分之一电子天平（沈阳龙腾电子有限公司）。

槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷（RS1），槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]（RS2） 为自制（经核磁和质谱鉴定，采用液相色谱峰面积归一化法计算，纯度为98%和95%）；异槲皮苷（RS3）（批号：MUST-15070211，成都曼斯特生物科技有限公司）；色谱级乙腈（美国Sigma-Aldrich公司）；色谱级冰醋酸（天津科密欧化学试剂有限公司）；甲醇、乙醇为分析纯，水为屈臣氏蒸馏水。

全缘叶绿绒蒿花的具体信息见表5-9。

91

表5-9 全缘叶绿绒蒿花的样品信息

Table 5-9 Source of materials of*M. integrifolia* flower

| No. | 名称 | 拉丁名 | 采集地 | 海拔/m | 采集日期 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| H1 |  |  | 四川省阿坝州小金县木壳壳梁子 | 3600 | 2014-05-10 |
| H2 |  |  | 四川省甘孜州康定县雅家埂虫草基地 | 3870 | 2014-06-21 |
| H3 |  |  | 四川省甘孜州康定县折多山二台子 | 4100 | 2014-06-22 |
| H4 |  |  | 四川省阿坝州小金县卧龙特区巴朗山 | 4000 | 2014-05-10 |
| H5 |  |  | 四川省阿坝州马尔康县梦笔山 | 4200 | 2013-06-30 |
| H6 | 全缘叶绿绒  蒿花 | M.  integrifolia | 四川省甘孜州康定县雅家埂山顶 | 4000 | 2014-06-21 |
| H7 |  |  | 四川省甘孜州康定县雅家埂 | 3870 | 2015-06-30 |
| H8 |  |  | 四川省阿坝州红原县阿木乡龙让沟 | 3700 | 2015-06-19 |
| H9 |  |  | 四川省阿坝州汶川县卧龙特区巴朗山 | 4000 | 2015-06-23 |
| H10 |  |  | 四川省阿坝州小金县夹金山 | 3950 | 2015-06-20 |
| H11 |  |  | 四川省甘孜州康定县折多山 | 4300 | 2015-07-04 |

### **2** 方法与结果

#### **2.1** 色谱条件

色谱条件参照前期UPLC分离全缘叶绿绒蒿花已建立的色谱条件。ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱（2.1×100 mm, 1.8μm, 美国Waters公司），柱温35℃，流速300μL/min，进样量2μL，检测波长范围210～400 nm，流动相：乙腈（A）～0.1%冰醋酸水（B），等度洗脱，0～10 min，16%A。对照品及样品色谱图见图5-4。

92



1. 槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷；2. 槲皮素3-*O*-[2''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷；3. 异槲皮苷.

图5-4 对照品（A）和样品（H8，B）UPLC色谱图

1. quercetin-3-O-β-D-glucopyrannosy-(1→6) -β-D-glucopyranoside, 2. quercetin-3-O-[2'''-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→6) -β-D-glucop

Yranoside], 3. isoquercitrin

Figure 5-4 UPLC chromatograms of reference substances (A) and samples (H8, B)

#### **2.2** 对照品溶液的制备

取RS1、RS2和RS3适量，精密称定，加甲醇溶解，定容至25 mL容量瓶，得质量浓度分别为0.5008 mg/mL、0.5004 mg/mL、0.2008

mg/mL对照品储备液。

#### **2.3** 供试品溶液的制备

取全缘叶绿绒蒿的花约0.25 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入体积分数90%甲醇30 mL，称定质量，超声处理（45 kHz, 300 w）45 min，放至室温，称定质量，90%甲醇补足质量，摇匀，过滤，滤液经0.22μm微孔滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液。

#### **2.4** 标准曲线绘制

将对照品储备液稀释成不同浓度梯度，按“2.1”项下色谱条件

93

测定RS1、RS2和RS3的峰面积，以各成分色谱峰面积为纵坐标（*y*），对照品质量浓度为横坐标（*x*），绘制标准曲线，得标准曲线方程。以信噪比为3时的浓度定为检测限（LOD），信噪比为10时的浓度定为定量限（LOQ）。标准曲线及LOD、LOQ结果见表5-10。

表5-10 标准曲线、线性范围、检测限、定量限

Table 5-10 Calibration curves, linear ranges, LOD and LOQ

| 对照品 | 标准曲线 | 相关系数  （R2） | 线性范围（mg/mL） | LOD  （μg/mL） | LOQ  （μg/mL） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| RS1 | y=1E+07x-26910 | 1.0000 | 0.02504～0.5008 | 0.9375 | 1.812 |
| RS2 | y=9E+06x-8280.3 | 0.9999 | 0.02502～0.5004 | 1.125 | 2.5 |
| RS3 | y=2E+07x-38258 | 0.9998 | 0.006275～0.2008 | 1.255 | 2.5 |

#### **2.5** 精密度试验

取RS1、RS2和RS3混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样6次，计算峰面积RSD，3种化合物峰面积RSD分别为0.78%、

0.71%、0.88%，表明仪器精密度良好，符合定量测定要求。

#### **2.6** 重复性试验

精密称取同一样品6份，按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备样品，按“2.1”项下色谱条件分析测定。3种化合物峰面积RSD分别为3.56%、3.23%、3.90%。

#### **2.7** 稳定性试验

取样品溶液，于室温下放置，分别在2、3、5、7、9、12、24 h进样，测定峰面积，根据峰面积计算RSD，考察样品稳定性。样品中

3种被测成分的峰面积RSD分别为1.13%、1.16%、1.50%，表明样品在24 h内保持稳定。

#### **2.8** 回收率试验

精密称取全缘叶绿绒蒿的花样品（H4）粉末0.125 g，称取6份，分别加入对照品溶液适量（相当于药材中含量的100%），按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备样品，按“2.1”项下色谱条件分析测

94

定，计算各被测成分的加样回收率和RSD，结果见表5-11。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 对照品 | 原含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 平均回收率/% | RSD/% |
| RS1 | 6.025 | 6.160 | 12.393 | 103.39% | 2.83% |
| RS2 | 4.482 | 4.504 | 9.082 | 102.13% | 1.01% |
| RS3 | 0.812 | 0.858 | 1.587 | 90.36% | 2.13% |

表5-11 3种对照品的加样回收率（*n*=6）Table 5-11 Recoveries of three compounds (*n*=6)

#### **2.9** 样品测定

取11批全缘叶绿绒蒿的花样品，按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备样品，按“2.1”项下色谱条件进样，测定峰面积，以峰面积按外标法计算3个化合物的含量，结果见表5-12。

表5-12 全缘叶绿绒蒿花样品中3种成分的含量（*n*=2，mg/g）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| No. | RS1 | RS2 | RS3 | 总量 |
| H1 | 28.68 | 23.89 | 6.41 | 58.98 |
| H2 | 26.42 | 37.78 | 1.18 | 65.38 |
| H3 | 25.27 | 30.08 | 0.82 | 56.16 |
| H4 | 45.98 | 35.42 | 6.22 | 87.62 |
| H5 | 53.13 | 33.00 | 4.44 | 90.57 |
| H6 | 24.79 | 36.06 | 1.38 | 62.23 |
| H7 | 33.57 | 24.34 | 2.37 | 60.28 |
| H8 | 24.83 | 44.43 | 2.24 | 71.49 |
| H9 | 33.26 | 50.04 | 2.54 | 85.84 |
| H10 | 32.05 | 47.17 | 2.96 | 82.17 |
| H11 | 12.40 | 28.15 | 1.29 | 41.84 |

Table 5-12 Contents of three compounds of *M. integrifolia* flower (*n*=2， mg/g)

95

### **3** 讨论

考察了超声提取和热回流提取，热回流提取效果略优于超声提取，但考察发现热回流提取重复性差，结果误差大，故选择超声提取作为提取方法；考察体积分数50%甲醇、70%甲醇、50%乙醇、70%乙醇作为提取溶剂对提取效果的影响，试验结果表明70%甲醇的提取效果要优于其他3种溶剂；考察了不同甲醇浓度（10%、30%、50%、

70%、90%）对提取效果的影响，90%甲醇提取效果最好，故选择90%甲醇为提取溶剂；超声45 min优于超声15 min、30 min，与超声

60 min差异不大，选择超声时间为45 min。

从本次试验结果可以看出，所采集的全缘叶绿绒蒿的花样品主要来源于青藏高原东南缘的小金县、康定县、马尔康县、红原县和汶川县，采收时间从2013年至2015年均有采集，采集月份为5 月

至7月。从产地上看，化合物含量总量最高的为位于小金县的巴郎山地区和马尔康县梦笔山，其次为位于汶川县卧龙特区巴郎山地区的样品，这三个采集的共同特点是海拔高，采集月份为全缘叶绿绒蒿刚开花的5月和开花最茂盛的6月；在小金县木壳壳梁子海拔较低的山路上所采集的样品中黄酮的含量则低于小金县巴郎山地区所采集的样品。有文献研究表明，五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素的含量随海拔升高而增高的趋势，可能是为了抵御逆境胁迫下强辐射所造成的氧化损伤，而在植物体内需要更大量的合成抗氧化物质，因此使得海拔越高，黄酮类化合物的含量越高[104]。康定县所采集的样品同为6月份采，虽然海拔也较高，但样品中3种化合物的总量不如小金县，说明次生代谢产物的积累可能还与所处生长环境的多种生态因子有关，当地的降雨量、温度、紫外线强度和温度都会影响植物体中黄酮的富集[104]。

采集时间对全缘叶绿绒蒿的花中黄酮的富集也有较大影响。黄酮含量的最高的H4和H5样品采集与5月和6月，含量最低的H11样品采集于7月，说明植物生长最茂盛的时间有利于次生代谢产物的

富集；到了7月，全缘叶绿绒蒿已开始结果实，此时花中的黄酮成

96

分含量也开始下降。黄酮成分在全缘叶绿绒蒿的花中的动态积累规律还有待进一步研究。

本研究首次采用UPLC法对全缘叶绿绒蒿的花中的主要化学成分进行含量测定，其含量最高的4个化合物均无可购买的对照品进行含量测定。自制的RS1和RS2含量均在95%以上，并且RS2中的杂质峰对所进行含量测定的3个化合物无影响，故用于全缘叶绿绒蒿的花中主要化学成分的含量测定，填补至今无文献研究全缘叶绿绒蒿花的空白。除样品H5和H8外，其他9个样品中，含有少量的RS2

（槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]）的一个同分异构体，该化合物与RS2无法完全分离，故RS2的含量测定在样品H5和H8外，还包含了RS2的一个同分异构体。由于该同分异构体与RS2仅乙酰基的连接位置不同，其质谱碎片完全一致，因此即便采用三重四级杆质谱作为检测器也无法对RS2进行准确定量，如何完全分离这两个化合物还有待进一步研究。

97

结语

### **1** 结语

**（1）对三种不同花色的绿绒蒿药材进行了系统生药鉴别研究。**通过原植物鉴别、性状鉴别、显微鉴别的方法，准确区分全缘叶绿绒 蒿、红花绿绒蒿和川西绿绒蒿。花颜色的差异和植株大小不同是三种 绿绒蒿最明显的差异；根的差异、花粉囊内壁细胞的特征也可以准确 鉴别三种绿绒蒿。花粉粒由于具有稳定的遗传特征和不受环境影响等 特点，也可作为三种绿绒蒿鉴别的特征。全缘叶绿绒蒿和红花绿绒蒿 的花粉粒较为相似，但仔细观察发现二者表面的平滑程度有差异，刺 状凸起也有一定差别。

**（2）不同花色、不同药用部位绿绒蒿药材的药效学比较研究。**通过比较三种不同花色绿绒蒿植株总黄酮的体外抗氧化能力、肝损伤和肺损伤保护作用、以及三种不同花色绿绒蒿花的醇提取物对细胞炎症的作用，表明三种绿绒蒿植株总黄酮均能有效降低ALT、AST，升高SOD活力、降低MDA，以抵御肝损伤导致的氧化应激，减轻肝细胞坏死程度，与水飞蓟宾具有相似或更好的效果，其中以蓝紫色花的川西绿绒蒿降ALT、AST的效果最好，其次为全缘叶绿绒蒿，最后为红花绿绒蒿；全缘叶绿绒蒿的抗氧化作用效果最好，这与川西地区藏医以紫色或蓝紫色花绿绒蒿用于肝病治疗的用药经验一致，**也说明可以用蓝紫色花绿绒蒿的全草与其花等同入药治疗肝病**。研究发现，全缘叶绿绒蒿的抗氧化作用效果最好，其对肝损伤也有很好的保护作用，其较强的抗氧化作用可有效缓解肝病引发的氧化应激， 并且由于全缘叶绿绒蒿资源丰富，植株大，因此，**建议将全缘叶绿绒蒿的花和全草与紫色或蓝紫色花的绿绒蒿同等入药**，用于肝病治疗，或利用全缘叶绿绒蒿提取物开发成藏医特色的肝病治疗药物。红花绿绒蒿能改善肺炎导致的炎细胞浸润和肺泡正常结构的破坏，抑制炎症细胞因子TNF-α的生成，提高SOD活力，这提示红花绿绒蒿可用于肺损伤的保护和治疗；而全缘叶绿绒蒿和川西绿绒蒿对肺

98

损伤导致的肺实质变无明显改善作用，这与藏医很少或不用绿绒蒿药材用于肺部疾病的调查结果一致。三种绿绒蒿花的醇提取物的研究表明，高浓度绿绒蒿的花醇提取物具有细胞毒性，抑制细胞Caspase 3/7的表达，具有抑制细胞凋亡的作用，具有极强的清除

ROS能力，同时具有一定的减轻炎症细胞分泌致炎因子、促进分泌抗炎因子的作用。清除ROS能力以全缘叶绿绒蒿花提取物最强。

**（3）全缘叶绿绒蒿活性部位的化学成分研究及其与抗氧化作用的相关性。**通过药效比较研究可知，全缘叶绿绒蒿植株及其花具有很强的抗氧化活性和很好的肝保护作用，鉴于全缘叶绿绒蒿资源丰富、花朵大、产量高，有利于进一步研究，故选择全缘叶绿绒蒿进行化学成分和谱-效关系研究。利用UPLC对全缘叶绿绒蒿中的成分进行分析，发现全缘叶绿绒蒿的花中成分较单一，以水溶性成分为主，有5个主要成分，建立HSCCC法分离纯化了全缘叶绿绒蒿花的醇提取物中的主要化合物，得到了槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷，槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]，槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]，槲皮素-3-*O*-[6'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖

-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]，4个化合物均首次从全缘叶绿绒蒿中分离得到，后两个化合物为新发现的槲皮素糖苷的同分异构体化合物。通过对全缘叶绿绒蒿植株总黄酮进行UPLC研究，全缘叶绿绒蒿植株总黄酮中同样含有以上4个化合物，并且占有很大的峰面积比值，为全缘叶绿绒蒿植株总黄酮中的主要成分，前期抗氧化研究发现，**全缘叶绿绒蒿植株总黄酮的抗氧化活性并不低于全缘叶绿绒蒿花的醇提取物，其主要化学成分相似，为全缘叶绿绒蒿植株总黄酮与花等同入药提供了科学依据。**谱-效关系研究说明全缘叶绿绒蒿总黄酮 的抗氧化作用是多个化合物协同作用的结果，全缘叶绿绒蒿总黄酮的主要成分为以槲皮素为苷元的糖苷化合物。槲皮素是抗氧化活性很强的黄酮化合物。槲皮素的苷类化合物易于溶解，被肠道吸收，进入血液后被代谢为槲皮素，所以能显示很强的活性。

99

**（4）不同地区全缘叶绿绒蒿花的采收期及其质量评价研究。**通过对不同产地全缘叶绿绒蒿的花中主要活性成分的含量测定，不同产地、不同海拔高度、不同采收月份成分含量差异较大，以小金县巴郎山地区和马尔康县梦笔山于6月份采集的样品含量最高，这两个地区的共同特点是海拔高，提示川西高原小金县和马尔康县海拔较高地区的全缘叶绿绒蒿的花品质更优，采集时间应为花盛开期的 5

月至6月。

通过本课题的实施，表明三种不同花色绿绒蒿中，蓝紫色花的川西绿绒蒿对肝损伤的保护作用效果最好，具有不低于阳性对照药水飞蓟宾的药效，因此建议将川西绿绒蒿植株与其花等同入药，减少其非药用部位资源的浪费。三种不同花色绿绒蒿中，黄色花的全缘叶绿绒蒿抗氧化活性最强，对肝损伤的保护作用效果仅次于蓝紫色花的川西绿绒蒿，同样具有不低于阳性对照药水飞蓟宾的药效，并且其花朵大、植株大、资源较丰富，因此，建议将全缘叶绿绒蒿的全草及其花与蓝紫色花的川西绿绒蒿等同入药，以最大限度保护绿绒蒿的药用植物资源。川西高原的全缘叶绿绒蒿花以小金县和马尔康县海拔较高地区的品质较好，采收时间建议为花盛开期的5～6月。

### **2** 下一步工作打算

采用代谢组学整体论方法进行有效的科学表征，以ADME系统

（Caco-2细胞单层模型）高通量筛选和谱-效关系（实验动物）、多维统计方法、灰色关联度分析相结合的方法，从体外、体内两个角度综合探讨“欧贝”中蓝花、黄花和红花的绿绒蒿的花、全植株（不 带花）及对应配伍的“二十五味绿绒蒿丸”中的“清肝热”药效成分群的异同，揭示绿绒蒿的花色、全植株（不带花）与“清肝热”药性的相关性。

100

参考文献

[1]中国科学院中国植物志编委会：中国植物志[M]. 32卷，北京，科学出版社，1999.

[2]冯志舟. 绿绒蒿的药用价值[J]. 云南林业，2007，28（1）：23.

[3]帝玛尔・丹增彭措. 晶珠本草[M]. 6，7，114, 115.

[4] 宇妥・元丹贡布等. 四部医典（译本，1987年版）[M]. 149, 156, 269.

[5]钟国跃，周福成，石上梅，等. 藏药材常用品种及质量标准现状调查分析研究[J]. 中国中药杂志，2012，37（16）：2349-2355.

[6]中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁：青海人民出版社，1991。

[7]国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海：上海科学技术出版社，2002.

[8]宋立人，洪恂，丁绪亮，等. 现代中药学大辞典[M]. 北京：人民卫生出版社，2001.

[9]罗达尚. 新修晶珠本草[M]. 四川出版集团・四川科学技术出版社，2004.

[10]刘炳仑. 我国罂粟科（Papaveraceae）植物的花粉形态[J]. 植物研究，1984, 4(4)：61-81.

[11]李萍. 现代生药学[M]. 北京：科学出版社，2006.

[12] Grady LWF, Kevin JC. Pollen morphology and systematic of palaeotropical *Phyllanthus* and related genera of subtribe *Phyllanthinae* (Euphorbiaceae)[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2008, 157(4): 591-608.

[13] Santiago LJM, Louro RP, Emmerich M. The pollen morphology of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) section *Choretropsis*[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2004, 144(2): 243-250.

[14] WS3-BC-0098-95，中国卫生部药品标准・藏药[S]. 1995.

[15]杨韬，宁艳梅，陈红刚，等. 藏药五脉绿绒蒿的生药学研究[J]. 甘肃中医学院学报，2012，29（4）：53-57.

101

[16]吴海峰，丁立生，王环，等. 绿绒蒿属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2011，23（1）：163-168.

[17] Zhou G, Chen YX, Liu S, *et al*. In vitro and in vivo hepat oprotective and antioxidant avtivity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 148:664.

[18]王志旺，王瑞琼，郭玫，等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对小鼠实验

性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（2）：206-209.

[19]王志旺，程小丽，郭玫，等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿有效部位对肝纤维化疗效和TGF-β1表达的影响[J]. 中国免疫学杂志，2013, 29（2）：135-139.

[20]张旭，王锦玉，仝燕，等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展

望[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（6）：286-290.

[21]陈建真，季忆，陈彬. 槐花散总黄酮大孔树脂分离纯化的工艺研究[J]. 中华中医药杂志，2015，30（7）:2607-2609.

[22]郑媛媛，李辰，封士兰，等. 油橄榄叶中总黄酮含量测定方法探讨[J]. 光谱学与光谱分析，2011，（31）2: 547-550.

[23]唐德智. 黄酮类化合物的提取、分离、纯化研究进展[J]. 海峡药学，2009，21（12）：101-104.

[24]徐志红，肖泽仪，李磊，等. 超滤深度提纯银杏黄酮[J]. 精细化工，2004，21（2）：112-114+124.

[25]陈丛瑾. 大孔吸附树脂分离纯化黄酮类化合物的研究进展[J]. 化学与生物工程，2010，27（11）：1-4.

[26] Li J, Chase HA. Characterization and evaluation of a macroporous adsorbent for possible use in the expanded bed adsorption of flavonoids from *Ginkgo biloba* L. [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(50): 8730-8740.

[27]王秋林，王浩毅，王树人. 氧化应激状态的评价[J]. 中国病理生理杂志，2005, 21（10）：2069-2074.

102

[28]房祥军，郜海燕，陈杭君. 山核桃加工、贮藏前后总多酚含量及其抗氧化活性的变化[J]. 食品科学，2011，32（5）：104-107.

[29] Benzie Iris FF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of" antioxidant power": The FRAP assay[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.

[30]马天翔，史宁，陈乾，等. 红景天中8种成分体外抗氧化作用的比较[J]. 中国药理学通报，2012，28（9）：1224-1228.

[31] Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, *et al*. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(10):3954-3962.

[32] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants[J]. Journal of Natural Products, 2000, 63:1035-1042.

[33] Sanchez-Moreno. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems[J]. Food Science and Technology International, 2002, 8: 121–137.

[34] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al*. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical decolorization assay[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237.

[35] Farah H, Tarik MC, Riadh K, *et al*. Antioxidant activity profiling by spectrophometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*[J]. Chinese Journal of Nature Medicines, 2014, 12(6): 425-422.

[36]张昊，任发政. 羟基和超氧自由基的检测研究进展[J]. 光谱学与光谱分析，2009，29（4）：1093-1099.

[37]吴娜，蔡光明，何群. 氧化应激与肝脏损伤[J]. 世界华人消化杂志，2008，16（29）：3310-3315.

[38]光吉博則，谷仁烨. 氧化应激的病理生理作用[J]. 日本医学介绍，2007，28（4）：150-152.

103

[39]王晓宇，杜国荣，李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2012，31（3）：247-252.

[40]王志旺，邵晶，郭玫，等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿有效部位对肝纤维化大鼠炎症相关因子的影响[J]. 免疫学杂志，2013，（29）1: 24-27.

[41]刘松渝，王宪楷. 藏药红花绿绒蒿的化学成分研究[J]. 中药通报，1986，11（6）：40-42.

[42]王志旺，郭枚，马骏，等. 五脉绿绒蒿抗炎镇痛作用有效部位的研究[J]. 中国中医药信息杂志，2010，17（1）：21-22.

[43]吴海峰，潘莉，丁立生，等. 藏药五脉绿绒蒿的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发，2007，19（5）：811-813.

[44]汪倪萍，魏伟. 中药活性成分的抗炎免疫和镇痛作用[J]. 中国药理学通报，2003，19（4）：366-370.

[45]张贤，郭泽，张冲，等. 黄芪总黄酮对脂多糖体外诱导的RAW264.7细胞的细胞因子和NO分泌水平的影响[J]. 中国兽医科学，2015, 45（3）：321-324.

[46]杨晓露，刘朵，卞卡，等. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究

[J]. 中国中药杂志，2013，38(1)：99-104.

[47]王宇翎，张艳，方明，等. 白花蛇舌草总黄酮的抗炎及抗菌作用[J]. 中国药理学通报，2005，21（3）：348-350.

[48]王栋，唐炜，杨光明，等. 藏药镰形棘豆黄酮类成分的抗炎、抗氧化及细胞毒性研究（英文）[J]. 中国天然药物，2010，8（6）：461-465.

[49]柯春林，任茂生，王娣，等. 黄酮化合物抗菌机理的研究进展[J]. 食品工业科技，2015，（2）：388-391.

[50]汪娟，蒋维，王毅. 降香黄酮类化合物对脂多糖诱导的RAW 264.7细胞抗炎作用研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2013，29（7）：681-684.

[51] Russo G, Leopold JA, Loscalzo. Vasoactive substance: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis[J]. Vascular Pharmacology, 2002, 38(5): 259-269.

[52]叶莎莎，曾耀英，尹乐乐. 红景天苷对小鼠腹腔巨噬细胞体外增殖、凋亡、

104

吞噬、ROS和NO产生的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2011, 27（3）：237-241.

[53] Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, *et al*. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha[J]. 1990, 145(12): 4290-4297.

[54] Pil HP, Hong LH, Megan RM, *et al*. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha production by diponcetin is mediated by transcripitional and posttranscriptional mechanisms[J]. Journal Biological Chemistry, 2008, 283(40): 26850-26858.

[55] Modesto R, Wenbo ZH, Dexter LL, *et al*. Role of IL-6 in angiotensin IL-induced retinal vascular inflammation[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010, 51(3): 54-61.

[56] Chon H, Choi B, Lee E, *et al*. Immunomodulatory effects of specific bacterial components of Lactobacillus plantarum KFCC11389P on the murine macrophage cell line RAW 264.7[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(5): 1588-1597.

[57]赵瑞杰，李引乾，王会，等. Caspase家族与细胞凋亡的关系[J]. 中国畜牧杂志，2010，46（17）：73-78.

[58] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. Methods in Molecular Biology, 2008, 27(5): 13-21.

[59]张亚宏，甘莹，郭子华，等. 紫草素通过ROS/p38信号通路诱导人宫颈癌

Hela细胞凋亡[J]. 中国药理学通报，2011，27(6)：864-867.

[60] Liu B, Cheng Y, Zhang B, *et al*. Polygonatum cyrtonema lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway[J]. Canncer Letters, 2008, 275(1): 54-60.

105

[61]刘悦晖，范学工，李宁，等. 刀豆球蛋白A所致实验性肝损伤模型的构建[J]. 中国感染控制杂志，2008，7（5）：297-301.

[62]龚西騟，孟刚. 病理学诊断的局限性[J]. 临床与实验病理学杂志，2002，18（4）：349-351.

[63]步宏，魏兵. 病理学诊断的重复性与局限性[J]. 临床与实验病理学杂志，2003，19（1）：97-98.

[64]姜涛，涂尚程. 慢性乙型肝炎76例血生化指标与病理诊断的相关性探讨[J]. 临床和实验医学杂志，2012，11（2）：125-126.

[65]陈立宇，王娟，王威亚，等. 301例慢性乙型肝炎病毒感染者血清学指标与肝脏组织病理的相关性分析[J]. 四川大学学报（医学版），2015，46（4）：641-644.

[66]张占卿，叶佩燕，王渭康. 肝脏生化指标与慢性肝炎病理分级分期的相关性[J]. 世界感染杂志，2004，4（1）：20-22.

[67]郭玲，李文静，徐明江，等. 吸入脂多糖诱导小鼠急性肺炎模型的建立

[J]. 北京大学学报（医学版），2009，41（2）：226-229.

[68]杨东，仇玮祎，张畅，等. 地塞米松治疗LPS诱导急性肺炎模型小鼠病理学评价方法的建立[J]. 实验动物科学，2013，30（4）：9-12+65.

[69]张昊晴，邹鹏，王华东，等. 小檗碱抗小鼠脂多糖性肺损伤的作用机制

[J]. 中国病理生理杂志，2007，23(3)：495-499.

[70]汤慧芳，毛连根，江若安，等. 甘草酸单铵对脂多糖致小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 药学学报，2007，42（9）：954-958.

[71] Huang GJ, Deng JS, Chen CC, *et al*. Methanol Extract of *Antrodia camphorata* Protects against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Suppressing NF-κB and MAPK Pathways in Mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(23): 5321-5329.

[72]柯君，刁治民，陈振宁，等．高原草地绿绒蒿资源及应用现状[J]．青海草业，2007，16（4）：50-54.

[73]屈燕，区智.绿绒蒿属植物国内外研究进展[J]. 北方园艺，2012，（2）：191-194.

106

[74]傅予，何芝州，白央，等.西藏产全缘叶绿绒蒿的化学成分研究

[J]. 中国民族医药杂志，2010，2: 46-48.

[75]吴海峰，沈建伟，宋志军，等.藏药全缘叶绿绒蒿的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发，2009，21（3）：430-432.

[76]高黎明，王小雄，郑尚珍，等. 藏药全缘叶绿绒蒿化学成分的研究（Ⅰ）[J]. 西北师范大学学报（自然科学版），1997, 33（3）：49-52.

[77] Xie HY, Xu JC, Teng RW, *et al*. Two new epimeric isopavine N-oxides from *Meconopsis horridula* var. *racemosa*[J]. Fitoerapia, 2001, 72(2):120-123.

[78] Phurpa WC, Keller PA, Pyne SG, *et al*. A new protoberberine alkaloid from *Meconopsis simplicifolia* (D. Don) Walpers with potent antimalarial activity against a multidrug resistant *Plasmodium falciparum* strain[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 150 (3): 953-959.

[79]候志国，罗建光，孔令义. 高速逆流色谱联用技术应用于天然产物的研

究进展[J]. 中国天然药物，2010，8（1）：62-67.

[80]曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京：化学工业出版社，2005。

[81] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1065(2): 145-168.

[82]程杰，符晓晖，王维娜. 高速逆流色谱在中药分离中溶剂体系的筛选[J]. 中草药，2008，39（8）：1272-1275.

[83] Ye HY, Chen LJ, Li YF, *et al*. Preparative isolation and purification of three rotenoids and one isoflavone from the seeds of *Millettia pachycarpa* Benth by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1178(1-2): 101-107.

[84]刘云，侴桂新. 高速逆流色谱法分离制备乌药叶中的黄酮类成分

107

[J]. 色谱，2007，5: 735-739.

[85] Wang X, Cheng CG, Sun QL, *et al*. Isolation and purification of four flavonoid constituents from the flowers of *Paeinia suffruticosa* by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1075(1-2): 127-131.

[86] Shu XK, Duan WJ, Liu F, *et al*. Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 947–948: 62–67.

[87] Wang X, Cheng, CG, Sun, QL, *et al*. Isolation and purification of four flavonoid constituents from the flowers of Paeonia suffruticosa by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1075(1-2): 127–131.

[88] Berthod A, Schmitt N. Water-organic solvent systems in counter-current chromatography: liquid stationary phase retention and solvent polarity[J]. Talanta, 1993, 40(10):1489-1498.

[89] Ito Y, Conway WD. Experimental observations of the hydrodynamic behavior of solvent systems in high-speed counter-current chromatography: ⅢEffects of physical properties of the solvent systems and operating temperature on the distribution of two-phase solvent systems[J]. Journal of Chromatography A, 1984, 301(2): 405-414.

[90] Erisa B, Gil SJ, Ren BA, *et al*. Tribuli fructus constituents protect against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. Archives of Pharmacal Research, 2010, 33(1): 67-70.

[91] Shang XY, Wang YH, Li C, *et al*. Acetylated flavonol diglucosides from *Meconopsis quintuplinervia*[J].

Phytochemistry, 2006, 67(5):511-515.

108

[92]张春森，鲁春梅，姜立勇. 天然药物强极性化学成分分离技术研究进展[J]. 企业导报，2011，10: 289-290.

[93]陈心悦，柳小亚，陈亚丽，等. 红芪药材防治肝纤维化的谱效关系[J]. 色谱，2015，33（4）：413-418.

[94]池婕，林兵，刘志宏，等. 雷公藤制剂指纹图谱及谱效关系研究[J]. 中国中药杂志，2015，40（8）：1479-1483.

[95]秦昆明，郑礼娟，沈保家，等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思

考[J]. 中国中药杂志，2013，38（1）：26-31. [96] 许禄. 化学计量学[M]. 北京：科学出版社，2004. [97]冯卫生，李春阁，陈文静，等. 南葶苈子各化学拆分组分化学成分的研

究[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2015，17（3）：455-463.

[98] Wirginia KK. Application of hydrostatic CCC–TLC–HPLC–ESI- TOF

-MS for the bioguided fractionation of anticholinesterase alkaloids from *Argemone mexicana* L. roots[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(9): 2581–2589.

[99]许文，傅志勤，林婧，等. HPLC-Q-TOF-MS和UPLC-QqQ-MS的三叶青主要成分定性与定量研究[J]. 中国中药杂志，2014, 39( 22)：4365-4372.

[100]韩胜男，张晓杭，周培培，等. 化学计量学在中药组效关系研究中的应用进展[J]. 中国中药杂志，2014，39（14）：2595-2602.

[101]吴蜀星，宋良科，余成龙，等. 黄花绿绒蒿与蓝花绿绒蒿的比较研究[J]. 现代中药研究与实践，2014，28（5）：22-25.

[102]孙跃宁，王海英，孙楠. HPLC测定绿绒蒿中槲皮素的含量研究[J]. 中国民族医药杂志，2013，7: 34-35.

[103]邵晶，郭玫，樊秦，等. 甘肃产不同品种藏药绿绒蒿的质量评价方法研究[J]. 中药材，2011，34（11）：1678-1681.

[104]张长现，叶润蓉，卢学峰，等. 不同海拔高度五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素含量变化[J]. 天然产物研究与开发，2010，22（4）：643-646+691.

109

附录

###### 文献综述

**1****绿绒蒿属植物化学成分和药理活性研究进展**

绿绒蒿属（*Meconopsis*）为罂粟科（Papaveraceae）一年或多年生草本，该属为著名观赏植物，部分种类入药[1-2]。

绿绒蒿作为藏药材在藏族地区具有悠久的使用历史和广泛的应用。《四部医典》记载绿绒蒿与其他药材作为复方一起使用，如二十五味绿绒蒿丸、二十五味松石丸、红花七味方、竹黄安乐方、毛瓣绿绒蒿八味方等[3]。《晶珠本草》记载：花类药材“绿绒蒿（藏药名：欧贝）清肝热、肺热”，并能治热邪引起的喉阻塞；生于高山阴坡，根单一，状如防风叶，先端圆，淡绿色，被小毛，花状如藏金盏，荚果状如半个空心金刚，种子小，黑色，多粒，味甘涩，气味芳香；由于花的颜色不同分为四种，白花绿绒蒿治培根、龙的合并病，蓝花绿绒蒿清热，治赤巴病，红花绿绒蒿治血分病，黄花绿绒蒿治培根病[4]。《藏药志》记载：绿绒蒿藏语的音译名称叫“吾巴拉”，各地藏医所用吾巴拉的原植物为五脉绿绒蒿、红花绿绒蒿、全缘叶绿绒蒿、圆锥绿绒蒿、尼泊尔绿绒蒿和毛瓣绿绒蒿[5]。《中华本草・藏药卷》收载的绿绒蒿药材有毛瓣绿绒蒿（藏药名：吾白恩布）、全缘叶 绿绒蒿（藏药名：欧贝赛保）、多刺绿绒蒿（藏药名：阿恰才温）、红花绿绒蒿（藏药名：吾白玛布）、单叶绿绒蒿（藏药名：木穹典云）

[6]. 《现代中药学大辞典》收载的绿绒蒿药材为全缘叶绿绒蒿

*Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch的花、果实或全草，味苦、涩，性寒，有小毒。功能清热利湿。用于肺热咳喘、湿热水肿、泄泻痢疾、白带等症，此外尚有止痛的功效[7]。

本文通过对绿绒蒿属植物的资源种类、分布，化学成分、药理活性及临床应用等方面的研究进行综述，以期为该属植物的进一步开发利用提供科学依据。

110

**1.1绿绒蒿属植物的资源种类、分布及应用情况**

绿绒蒿属（*Meconopsis*）属于罂粟科（Papaveraceae），有绿绒蒿亚属（Subg. *Meconopsis*）和具盘绿绒蒿亚属（Subg. Discogyne

Tayl.），共有49个种，西欧产1种，其余48种分布于中国——喜

马拉雅地区的中国、印度、尼泊尔、巴基斯坦等国，我国有38种，主要分布于我国西南部西藏、云南、四川、青海、甘肃、陕西等省区[1-2]。主要绿绒蒿属药用植物的分布及应用情况见表1。

表1 绿绒蒿属药用植物的分布及应用情况

| 种名 | 拉丁名 | 分布地区 | 花瓣颜色 | 药用部位与功效 | 参考文献 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 柱果绿绒蒿 | Meconopsis oliverana | 豫、鄂、陕、川 | 黄色 | 全草，清热解毒、利尿、消炎、止痛 | 1、33 |
| 全缘叶绿绒蒿 | M.integrifol ia | 甘、青、四、云、藏 | 黄色 | 全草和花，清热解毒  、利尿、消炎、止痛 | 1、4、5、6、  7 |
| 多刺绿绒蒿 | M. horridula | 甘、青、川、藏、尼泊尔、锡金、不  丹 | 蓝紫色 | 全草和花，接骨、  清热、止痛、活血化瘀 | 1、4、5、6 |
| 长叶绿绒蒿 | M. lancifolia | 云、藏、川、甘 | 紫色或蓝色 | 全草，清热、  利尿、消炎、止痛 | 1、8 |
| 红花绿绒蒿 | M. punicea | 川、藏、青、甘 | 深红色 | 全草和花，清热解毒、利尿、消炎、止痛 | 1、4、5、6 |
| 五脉绿绒蒿 | M.quintuplin er | 鄂、川、藏、甘、陕、青 | 淡蓝色或紫色 | 全草和花，清热解毒、利尿、消炎、止痛 | 1、4、5 |
| 总状绿绒蒿 | M.racemosa | 云、川、藏、青、甘 | 天蓝色或蓝紫色 | 西藏用全草消炎、止骨痛、治头伤、骨折；云南用根 治气虚下陷、浮肿、脱肛、久痢、哮喘；青海以花、 茎入药，治腰痛、腿痛 | 1、5 |
| 毛瓣绿绒蒿 | M. torquata | 藏、青、川、甘 | 蓝色 | 全草和花，清热、利尿、消炎、止痛 | 1、5、6 |
| 尼泊尔绿绒蒿 | M.napaulensi s | 川、云、藏、尼泊尔、锡金 | 蓝色，稀红色、紫色或白色 | 全草，清热止咳 | 1、5 |
| 单叶绿绒蒿 | M.simplicifo lia | 藏、尼泊尔、锡金、  不丹 | 紫色或天蓝色 | 全草，养骨、补骨、接骨、愈疮 | 1、6 |

111

**1.2化学成分**

由于生长环境的特殊性，人们对绿绒蒿属植物的化学成分研究较少。目前从绿绒蒿属植物中分离的化学成分主要包括生物碱、黄酮等。

**1.2.1生物碱类化学成分**

生物碱类成分是绿绒蒿属植物的主要特征成分之一，是化学成分研究的主要方向之一。目前从国产绿绒蒿属植物中发现的生物碱类化合物约19种，主要有karachine、valachine、二氢血根碱

（[dihydrosanguinarine](http://dict.youdao.com/w/dihydrosanguinarine/)）、威尔士绿绒蒿定碱（mecambridine）、普托品碱（protopine）、马齿苋酰胺E（oleracein E）、小糪碱、阿苞碱（alborine）、8,9-dihydroxy-1,5,6,10 b- tetrahydro- 2*H*-pyrrolo-[2,1-a] isoquinolin-3-one、甲氧基淡黄巴豆亭碱

（*O*-methylflavinantine）、去甲血根碱（norsanguinarine）、五脉绿绒蒿碱、6-丙酮基-5,6-二氢血根碱（6-acetonyl-5, 6-dihy drosanguinarine）、simplicifolianine、6-methoxydihydro-sangu

inarine、oxysanguinarine、N-oxides A、N-oxides B、脉奎宁[9-18]. 目前对绿绒蒿属植物生物碱的含量测定研究较少，Zhou Yang 等

采用响应面法优化色谱条件和质谱条件，测定6种绿绒蒿（毛瓣绿绒蒿、总状绿绒蒿、全缘叶绿绒蒿、五脉绿绒蒿、藿香叶绿绒蒿和多刺绿绒蒿）中的4种生物碱成分（*O*-methylflavinantine 、

mecambridine、protopine、albore）。结果表明，protopine在6种绿绒蒿中均有很高的含量，最高为多刺绿绒蒿，达到178.71μg/g；*O*-methylflavinantine和mecambridine只在五脉绿绒蒿和多刺绿绒蒿中有一定含量；albore只在藿香叶绿绒蒿中有较高含量[19]。师霞等[20]采用HPLC法测定不同产地五脉绿绒蒿甲氧基淡黄巴豆亭碱的含量，采用乙腈-0.012%冰醋酸水溶液为流动相，结果表明，不同产地甲氧基淡黄巴豆亭碱的含量四川产>甘肃产>青海产。杨仕兵等[21]采用紫外分光光度法对青海10个不同产地的五脉绿绒蒿样品中的总生物碱含量进行了测定，结果表明，不同产地五脉绿绒蒿总生物碱

112

含量为0.0262%～0.0788%，平均0.0502%，与分布海拔呈正相关，与分布纬度无显著关联。

**1.2.2黄酮类化学成分**

黄酮类成分是绿绒蒿属植物中的另一大类化合物，目前，从绿绒蒿属植物中分离得到的黄酮类成分约26种，主要有木犀草素、小麦黄素、二氢槲皮素、洋芹素、大风子素、小麦黄素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、槲皮素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、山柰素-3-*O*-[β-*D*-葡萄 糖

（1→2）] -β-*D*-葡萄糖苷、异鼠李黄素-3-*O*-[β-*D*-半乳糖苷( 1→6)]-β-*D*-葡萄糖、懈皮素、柯伊利素、华中冬青黄酮、木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、槲皮素-3-*O*-[β-*D*-半乳糖（1→6）] -β-*D*- 葡萄糖苷、小麦黄素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、山奈酚-3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、山奈酚-4′-甲醚、山奈酚、4c,5,7-三羟基-3c，5c-二甲氧基黄酮 、 金 圣 草 黄 素 、 kaempferol-3-*O*-(6-*O*-β-*D*

-glucopyranosyl) -β-*D*-glucopyranoside、kaempferol-3-*O*- (6-*O*-β-*D*-glucopyranosyl) -β-*D*-galactopyranoside、quercetin- 3-*O*-[2′′′-*O*-acetyl-β-*D*-glucopyranosyl-(1→6) -β-*D*-glucopyran

oside]、quercetin-3-*O*-[2′′′，6′′′-*O*-diacetyl-β-*D*-glucopyranosyl

-(1→6) -β-*D*-glucopyranoside]、isorhamnetin-3-*O*-[2′′′-*O*-acetyl

-β-*D*-glucopyranosyl-(1→6) -β-*D*-glucopyranoside]、quercetin-3-*O*-[2′′′-*O*-acetyl-α-*L*-arabinopyranosyl-(1→6) -β-*D*-glucopyranoside] [9,11-12, 22-28]。

对于绿绒蒿属植物中黄酮类成分的含量测定只基于部分黄酮苷元，其主要活性成分的含量有待进一步研究。张长现等[29]采用HPLC法测定了青海省达里加山和拉鸡山地区不同海拔五脉绿绒蒿的槲皮素和木犀草素含量，试验结果表明，槲皮素和木犀草素含量在达里加山地区呈现随海拔升高而升高的趋势，但在拉鸡山地区则呈现先降后升的变化趋势。

**1.2.3挥发性成分**

绿绒蒿属植物中含有一定量的挥发油成分，但研究尚未深入。

113

吴海峰等[30]采用GC-MS法分析青海产全缘叶绿绒蒿、五脉绿绒蒿和多刺绿绒蒿的挥发油成分，以水蒸气蒸馏法提取挥发油，MS技术结合计算机检索对挥发油中化学成分进行结构鉴定，结果从三种绿绒蒿中分别鉴定了25、42和53个化合物，占各自总量80.76%、73.34%、

76.10%；全缘叶绿绒蒿挥发油含量最高的为：软脂酸乙酯（29.13%）、亚油酸乙酯（15.54%）、亚麻酸乙酯（15.34%），五脉绿绒蒿含量最高的为：亚油酸甲酯（26.61%）、软脂酸甲酯（22.75%），多刺绿绒蒿含量最高的为：亚麻酸甲酯（27.94%）、亚油酸甲酯（24.21%）、苯乙酸甲酯（4.56%）。潘宣[31]采用GC-MS法对红花绿绒蒿的油脂性部分进行了分析，试验结果表明红花绿绒蒿95%乙醇提取物的石油醚部分中的主要成分为酯类化合物，亚油酸乙酯、十六碳酸甲酯、(*Z*) -9-十八碳烯酸甲酯、亚麻酸甲酯及油酸乙酯的含量均超过5%。官艳丽等[32]采用GC-MS法分析全缘叶绿绒蒿的花精油中的化学成分，共分离鉴定出55个化合物，占全缘叶绿绒蒿的花精油的92%，其含量最高的挥发性成分主要有：蚕醛（26.0%）、2-十七烷酮（11.6%）、亚油酸甲酯（11.0%）和金合欢醇（6.9%）等。高昂等[33]采用GC-MS法分析柱果绿绒蒿挥发油的化学成分从中分离鉴定出47个化合物，占挥发油总量的91.866%，主要包括芳香族化合物（11.141%）、萜类和醇类（18.324%）、脂肪族化合物（42.535%）、酯类及羰基类化合物（19.866%），主要的单体化合物为十六烷酸（27.653%）和6, 10,14-三甲基-2-十五烷酮（16.330%）。

**1.2.4其他化学成分**

吴海峰等[9]从红花绿绒蒿中除了分离出生物碱和黄酮类成分外，还分离到了对羟基桂皮酸和尿嘧啶。高黎明等[34]从全缘叶绿绒蒿中分离得到了β-谷甾醇、胡萝卜苷、二十九烷醇和亚麻油酸乙酯。王明安等[35]从五脉绿绒蒿中分离得到5, 5′-双氧甲基呋喃醛和2-羟乙酰基-呋喃。尚小雅等[22]从五脉绿绒蒿中分离出了咖啡酸、原儿茶酸、2-（3,4-二羟笨基）-乙醇-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、对羟基苯甲酸-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、肉桂酸-4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、5, 7-二羟基色原

114

酮和胡萝卜苷。吴海妹等[24]从多刺绿绒蒿中分离鉴定出了桂皮酰胺、 对羟基桂皮酰胺对羟基苯乙胺。张国林等[36]从红花绿绒蒿中分离鉴定出了21α-羟基熊果酸、肉豆蔻酸-2,3-二羟基丙酯、豆甾醇、β-香树精、熊果酸和胡萝卜苷。郭志琴等[26]等从多刺绿绒蒿中分离得到了对羟基肉桂酸葡萄糖酯、stigmast-5-ene-3β-ylformate、3β-hydroxy-7α-ethoxy-24β-ethylcholest-5-ene。

**1.3绿绒蒿的药理活性和临床应用研究进展**

绿绒蒿属的次生代谢产物主要为生物碱和黄酮，该属植物有部分种类入药，为藏医常用药材，在藏医临床上有重要价值。在藏医药临床使用上，绿绒蒿主要与其他药材组成复方使用，如二十五味绿绒蒿丸、二十五味绿松石丸等。

**1.3.1药理活性**

**1.3.1.1抗氧化作用**

绿绒蒿属植物中含有大量的多酚类化合物和黄酮类化合物，多酚类化合物包括原儿茶酸、对羟基肉桂酸等，黄酮类成分主要包括槲皮素、二氢槲皮素、木犀草素、次大风子素和黄酮苷等。体外和体内试验表明，在藏药中药材名同为“欧贝”的五脉绿绒蒿和全缘叶绿绒蒿的植株提取物具有抗氧化作用。这两种绿绒蒿的乙醇提取物在体外对DPPH、ABTS等自由基具有清除作用，在体内能显著提高超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）和谷胱甘肽（GSH）水平，显著降低丙二醛（MDA）水平[37-38]。体外试验表明，柱果绿绒蒿挥发油及醇提物均具有清除羟基自由基和DPPH自由基的能力，清除能力强于2，6-二叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）[33, 39]。

**1.3.1.2对肝损伤和肝纤维化的保护作用**

药理研究表明，五脉绿绒蒿和全缘叶绿绒蒿对小鼠和大鼠急性肝损伤、肝纤维化具有一定的保护作用。大鼠体内试验表明，五脉绿绒蒿醇提物和醇提物中萃取的总黄酮对肝纤维化有一定的保护作用，具有保护抗氧化系统、改善细胞因子失衡水平、抑制TGF-β1的表达的作用[40-42]。另有研究表明，五脉绿绒蒿总黄酮能降低CCl4、

115

TAA或AP诱发肝损伤小鼠的血清ALT和AST，提高CCl4或TAA诱发肝损伤小鼠肝组织SOD和GSH-PX的活性，降低CCl4或TAA诱发肝损伤小鼠肝组织MDA含量，对肝损伤具有一定的保护作用[43]。

**1.3.1.3抗疲劳作用**

药效学研究表明，总状绿绒蒿低剂量组（16 g生药/kg）、高剂量组（32 g生药/kg）给药情况下，显著延长气虚小鼠的爬杆时间，并且对血细胞数和血红蛋白含量无显著影响[44]。

**1.3.1.4止泻作用**

总状绿绒蒿对番泻叶致小鼠腹泻的影响试验表明，总状绿绒蒿乙醇提取物具有非常显著的止泻作用，而水提物无明显止泻作用[44]。

**1.3.1.5镇痛作用**

总状绿绒蒿95%乙醇提物和五脉绿绒蒿总生物碱能明显减少注射醋酸后小鼠的扭体次数，并且五脉绿绒蒿总生物碱镇痛作用优于五脉绿绒蒿总黄酮[44-45]。

**1.3.2临床应用**

**1.3.2.1治疗肝脏疾病**

肝脏是人体的重要器官，肝代谢是药物代谢的必经途径之一，肝脏病变将严重影响人们的正常生活。绿绒蒿药材的主要功能是

“清肝热、肺热”，故藏药中治疗肝病的复方藏药大都含有绿绒蒿[3]。有文献报道采用藏西医结合的方法成功治疗慢性乙型肝炎，首次治疗者2周以内以西医结合服用藏药二十五味松石丸、九味牛黄散、十三味红花散、八味茵陈蒿散和二十五味绿绒蒿散，2周后继续口服藏药至各指标转阴，该方案的有效率为95%[46]。单用二十五味松石丸

（复方中含有五脉绿绒蒿）治疗病毒性肝炎也取得满意的治疗效果

[47-50]。九味红花丸（复方中含有五脉绿绒蒿）适用于各种新旧肝病，

具有清热解毒、疏肝化瘀的作用，并且无明显毒副作用[51]。利用二十五味绿绒蒿丸治疗慢性重型肝炎疗效较显著，有效率达80.5%，治疗期间及用药后未发现异常变化和不良反应[52]。

**1.3.2.2治疗胆囊炎**

116

以藏药十一味金色散、二十五味绿绒蒿散、八味獐牙菜散为主药，酌情给予适量西药，治疗急慢性胆囊炎可得到满意的疗效，总有效率达96.85%[53]。

**1.3.2.3治疗消化性溃疡**

消化性溃疡是消化系统常见疾病，易反复发作，给患者带来很大痛苦。利用十七味寒水石丸（复方中含有五脉绿绒蒿）治疗胃溃疡和十二指肠溃疡，并与单纯口服西药西咪替丁和甲硝唑对比，疗效满意[54]。另有文献报道，利用十三味止血散（复方中含有绿绒蒿） 治疗胃十二指肠溃疡出血，效果满意，服药7日后大便潜血试验为阴性[55]。

**1.3.2.4治疗顽固性头痛**

通过口服二十五味珊瑚丸配合中医针灸，初治再配合适当艾灸治疗顽固性头痛，效果显著[56]。

**2****高速逆流色谱技术在天然产物研究中的应用**

高速逆流色谱技术（HSCCC）是20世纪80年代初发明的液-液分离技术，经过30年的发展，HSCCC已在医药、生物、环境、化学等领域取得了广泛的应用[57-58]。与其他分离技术相比，HSCCC无需固体载体固定相，以互不相溶的两相作固定相和流动相，被分离物质在两相中由于分配系数的不同进行分配，可根据被分离样品极性的不同选择不同极性的溶剂体系，选择面广，由于没有固体载体，样品不会产生不可逆吸附、变性、污染和峰形拖尾等问题[59]。目前，

HSCCC已被大量应用于天然产物的成分分析和制备分离，已成功分离纯化的天然产物包括黄酮、生物碱、萜类、多酚、香豆素、木质素、醌类、皂苷等化学成分[60-67]. HSCCC分离功能强、分析时间短、制备量大、回收率高，在天然产物的分离制备研究中发挥着越来越重要的作用，将极大改善我国天然产物标准品数量不足的现状[68]。

**2.1 HSCCC原理**

HSCCC的工作原理是基于单向流体动力学的平衡现象[69]，利用螺旋管的高速行星式运动产生的不对称力，使互不相溶的两相在高速

117

旋转的螺旋管中单向分布，以其中一相作固定相，用泵连续输入载有样品的流动相穿过固定相，此时两相溶剂在螺旋管中任何部分反复进行着混合和静置的分配过程。流动相不断流过固定相，被分离物质随流动相进入螺旋管，并在两相之间反复分配，按分配系数的大小被依次洗脱[70]。

高速逆流色谱仪有两个轴，一个公转轴，一个自转轴[70-72]，其设计简图如图1所示。公转轴与自转轴平行安装，螺旋管在仪器中缠绕成几个线圈，安装在自转轴上，当整个螺旋管柱以中心轴线公转时，各线圈也同时绕自转轴作相同方向和相同角速度的自转。



图1 高速逆流色谱仪螺旋管示意图[70, 72]

在高速旋转的螺旋管中，互不相溶的两相溶剂的流体动力学分布如图2所示。即在达到稳定的流体动力学平衡后，螺旋管中呈现两个不同的区域，在靠近轴中心大约1/4的区域，两相激烈混合，为混合区；其余区域两相分成两层，较重的一相在外部，较轻的一相在内部，两相在螺旋管中形成一个线状分界面。如果将螺旋管拉直， 则发现每个混合区带都由螺旋管的尾端向首端行进，行进速率与整个螺旋管的公转速率相同，如果转速为800 r/min，则相当于两相的

分配频率为13次/s[70-71]。

118



图2 两相溶剂在螺旋管中的流体动力学分布图[70, 72]

**2.2高速逆流色谱的特点与存在的问题**

**2.2.1高速逆流色谱的特点**

（1）固定相和流动相均为液体，固定相无需固体支撑，避免样品的不可逆吸附、污染、变性、分解等问题；滞留在柱子中的样品可全部回收，且不易对柱子造成污染。

（2）溶剂极性选择面广。可通过不同极性的溶剂选择合适的配比，将溶剂体系配成弱极性、中等极性和亲水的溶剂体系。体系极性的配比灵活多样，根据目标化合物的极性进行调节。

（3）进样量大。普通制备液相的进样量最多为毫克级，而高速逆流色谱的进样量最多可达到克级，可缩短样品制备时间。

（4）HSCCC分离能力强，部分样品可一次分离得到1个或多个化合物，纯度高。也可在溶剂体系中添加离子对试剂或手性选择试剂等对离子化合物和手性化合物进行分离。

119

（5）重现性好。

**2.2.2存在的问题**

（1）不易选择合适的溶剂体系。溶剂体系选择合适与否是分离成败的关键，由于HSCCC发展时间较短，目前尚无成熟理论指导，只能通过可参考的资料和试验经验选择，造成一定的盲目性。并且由于溶剂使用量较大，当试验失败时，溶剂不能回收，容易造成浪费[73-74]。

（2）对亲水溶剂体系保留率较差。固定相的保留率也是HSCCC分离成功与否的一个关键因素。在分离极性化合物所需的极性溶剂体系及分离生物大分子的双水相体系固定相的保留能力较差。故如何提高HSCCC对极性溶剂体系的保留率是一个亟待解决的问题[75]。

**2.3高速逆流色谱的色谱条件优化**

**2.3.1溶剂体系的选择**

溶剂体系的选择是HSCCC分离的一个重要环节。溶剂体系的选择应遵循以下原则：①样品在溶剂体系中有足够高的溶解度；②溶剂体系不会造成样品的分解和变性；③样品在溶剂体系上下两相中的分配系数（*K*）在0.5～2之间；④固定相要有足够高的保留[76]。试验之前了解被分离物质的理化性质，如溶解度、极性、酸碱

度、稳定性等，参考文献资料，选择一种或几种溶解度较好的溶剂和一种或几种溶解度较差的溶剂构成新的溶剂体系。经过研究人员的不断摸索，目前发现分离天然产物的溶剂体系主要分为3类：非极性或弱极性体系、中等极性体系和亲水性体系。非极性或弱极性化合物常用的溶剂体系有：正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水、正己烷-甲醇-水、正己烷-乙醇-水、四氯化碳-甲醇-水、正己烷-乙腈-乙酸乙酯、正己烷-乙腈-二氯甲烷等体系；中等极性化合物常用的溶剂体系有：正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水、正己烷-乙酸乙酯-乙醇-水、氯仿-甲醇-水、氯仿-甲醇-丁醇-水等体系；亲水性化合物常用的溶剂体系有：乙酸乙酯-丁醇-甲醇-水、乙酸乙酯-丁醇-乙醇-水、丁醇-水等体系[59]。

120

2.3.2**转速的选择**[71]

对于界面张力较大的溶剂系统，可选择较高的转速，使上下两相能够剧烈混合，促进分配和减少质点传递阻力。

对于界面张力较小的溶剂系统，可选择较低转速，避免过度混合引起溶剂乳化，以及减少固定相流失。

**2.3.3流速的选择**

现代研究表明，流动相的线速度的平方和固定相保留率之间呈线性关系[77]。流动相流速越大，将使固定相损失加重，一般选择流动相流速在2～4 mL/min。

**2.3.4温度的选择**

温度是影响HSCCC分离效果的重要因素之一，特别是对于亲水性强的丁醇溶剂体系的固定相保留率有重要影响。随着温度升高，可使溶剂体系的粘度降低，缩短两相溶剂的分层时间[78]。如丁醇体系在50～60℃时，分层时间最短，提高固定相的保留率[71]。

**2.4 HSCCC在天然产物分离纯化中的应用**

**2.4.1生物碱**

生物碱是一类含氮有机化合物，广泛存在于植物体内，多具有显著而特殊的生物活性，是天然产物分离研究的重要方向之一。目前，利用HSCCC已分离出多种生物碱。Tang等[79]采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-0.2 M HCl（1∶3.5∶2∶4.5, v/v/v/v）体系，从黄花乌头中分离出了Guanfu base P、Guanfu base G、Guanfu base F、atisine、Guanfu base A和Guanfu base I，纯度分别为96.9%、95.7%、91.5%、

98.9%、95.8%和95.5%. Zhang等[61]通过对比传统HSCCC分离体系石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水（5∶5∶4.5∶5.5, v/v/v/v）和pH区带精致逆流色谱（pH-Zone-refining CCC）体系石油醚-乙酸乙酯-正丁醇-水（3∶2∶7∶9, v/v/v/v），上相加入10 mM三乙胺，下相加入5 mM盐酸，发现pH区带精致逆流色谱具有更高的样品容量，可一次分离克级的粗提物，而传统HSCCC分离方法一次只能分离数百毫克的粗提物；并采用pH区带精致逆流色谱从2 g苦树粗提物中一次分

121

离出了6种生物碱，包括87 mg 5-methoxycanthin-6-one、38 mg 1-methoxy-β-carboline、134 mg 1-ethyl-4,8-dimethoxy-β

-carboline、74 mg 1-ethoxycarbonyl-β-carboline、56 mg 1-vinyl-4,8-dimethoxy-β-carboline和26 mg1-vinyl-4- dimethoxy-β-carboline. Su等[80]采用pH区带精致逆流色谱法，溶剂系统甲基叔丁基醚-乙腈-水（3∶1.5∶4，v/v/v），上相加入20 mM三乙胺，下相加入10 mM盐酸，从1.5 g钩吻粗提物中分离得到3个生物碱，312 mg gelsemine、420 mg koumine和195 mg gelsevirine。

Yu等[81]同样采用pH区带精致逆流色谱法，氯仿-甲醇-水（2∶1∶1，

v/v/v）体系，在下相加入10 mM三乙胺，上相加入10 mM盐酸，从

1.2 g延胡索粗提物中分离出两个季胺生物碱，129 mg

Dehydrocorydaline和12 mg palmatine。

**2.4.2黄酮类**

黄酮类化合物是广泛存在于高等植物中的一大类化合物，具有多方面生物活性，在低等植物如菌类、藻类、地衣类中较少见。大部分与糖结合成苷的形式存在，一部分为游离态。Chen等[82]采用甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水-三氟乙酸（2∶2∶1∶5∶0.01 ，

v/v/v/v），从蓝靛果忍冬粗提物中分离出了cyanidin 3-glucoside，纯度达到98.1%. Chen等[83]采用传统HSCCC法，正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水（5∶5∶4∶3, v/v/v/v）体系，从啤酒花中分离得到

xanthohumol，纯度为95%. Zhu等[84]采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水

（0.7∶4∶0.8∶4, v/v/v/v）体系，从番石榴叶中分离得到5个黄酮类化合物，分别是hyperoside、isoquercitrin、reynoutrin、quercetin-3-*O*-β-*D*-arabinopyranoside和quercetin-3-*O*-α-

*L*-arabinofuranoside，5个化合物的纯度均大于95%. Li等[60]采用

HSCCC从荔枝草中分离纯化出4个黄酮类化合物，分别为hispidulin、

nepetin、homoplantaginin和nepetin-7-glucoside，采用正己烷-氯仿-甲醇-水（0.5∶4∶3∶2，v/v/v/v）体系结合氯仿-甲醇-水

（4∶3∶2, v/v/v）体系进行分离纯化。

122

**2.4.3多酚类**

多酚类化合物又称单宁、鞣制，是由没食子酸和没食子酸的聚合物共同组成的植物多元酚，广泛存在于种子植物中，具有很强的清除自由基作用。He等[63]以东南葡萄为原料，正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水体系，以（2∶5∶2∶5, v/v/v/v）的溶剂比率结合（1∶2∶1∶2，

v/v/v/v）的溶剂比率，一次分离出了3个多酚类化合物，21.1 mg

hopeaphenol、37.2 mg amurensin、95.6 mg vitisin A，纯度均达到95%以上。Sun等[85]以丹参粗提物为原料，正己烷-乙酸乙酯-甲醇

-水（3∶6∶6∶10，v/v/v/v）体系，采用传统HSCCC法，从260 mg粗提物中分离得到4.27 mg salvianolic acid A和32.09 mg salvianolic acid B. 张扬等[86]采用HSCCC法，乙醚-乙酸乙酯-水

（4∶10∶25, v/v/v）的溶剂体系，从茶叶提取物中得到高纯度的茶叶重要功能成分：儿茶素类单体表没食子儿茶素没食子酸酯

（EGCG）。

**2.4.4香豆素类和木质素类**

香豆素类和木质素类化合物都属于苯丙素类化合物，是天然药物化学成分的重要类群。Guo等[65]采用逆流色谱和大孔吸附树脂在线结合的方法，分离纯化牛蒡字中的牛蒡子苷，利用单组份有机溶剂与无机盐组成的溶剂系统：乙酸乙酯-8%氯化钠水溶液和丁醇-1%氯化钠水溶液系统，所分离的牛蒡子苷纯度超过97%. Chu等[87]采用超临界流体萃取结合HSCCC的方法，正己烷-乙酸乙酯-甲醇- 水

（6∶4∶5∶5，6∶4∶6∶4, 6∶4∶8∶2，v/v/v/v）体系，梯度洗脱方式，从300 mg五味子粗提物中分离纯化出5个木质素类化合物。Hou等[88]利用HSCCC与电喷雾质谱在线联接的方式，对白花前胡粗提物中的香豆素类成分分离纯化及对分离得到的产物进行在线分析，该方法不仅可用于无紫外吸收的化合物分离分析，还可及时对分离的化合物进行初步鉴定。

**2.4.5醌类**

醌类化合物是一类含有醌式结构的化合物，以蒽醌及其衍生物

123

最为重要。Jia等[66]采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水（5∶5∶10∶4，

v/v/v/v）体系，从150 mg藏药川西獐牙菜中分离制备了8 mg

methylswertianin、21 mg swerchirin和11 mg decussatin 3种蒽醌化合物。Zeng等[89]采用HSCCC结合超声法建立了一种分离制备丹参提取物中丹参酮磺酸钠的新方法。首先将丹参酮粗品与冰醋酸、醋酸酐、浓硫酸在超声中磺化20 min，磺化后利用高速逆流色谱正己烷-乙酸乙酯-乙醇-5%氯化钠水溶液（1∶8∶4∶10, v/v/v/v）体系，从磺化后的丹参酮粗品中分离纯化了7.1 mg丹参酮磺酸钠ⅡA和2.8 mg丹参酮磺酸钠Ⅰ，纯度均超过95%. Chen等[90]等利用HSCCC结合大孔吸附树脂技术从唐古特大黄中分离纯化了3个蒽醌苷类化合物和1个二苯乙烯苷，采用的是氯仿-乙酸乙酯-甲醇- 水

（8∶1∶6∶5, v/v/v/v）体系。

**2.4.6萜类**

萜类化合物是一类基本碳架具有2个或2个以上异戊二烯单位结构特征的化合物。Ma等[67]采用HSCCC联接ELSD检测器的方法，正丁醇-醋酸-6 mM醋酸铵水溶液（4∶1∶5, v/v/v）体系，从300 mg大蒜粗提物中分离制备出4个甾体皂苷。He等[91]采用HSCCC对金钱松的乙醇提取物进行分离分析，通过三步梯度洗脱分析，分离出8个二萜化合物。从第一步梯度正己烷-乙酸乙酯-甲醇- 水

（1∶1∶1∶1，v/v/v/v）体系中分离出了pseudolaric acid H、pseudolaric acid A、pseudolaric acid B methyl ester，从第二步梯度正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水（2∶3∶2∶3，v/v/v/v）体系中分离出了pseudolaric acid B、deacetylpseudolaric acid A和pseudolaric acid C，从第三步梯度正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水

（1∶3.5∶1∶3.5，v/v/v/v）体系中分离出了pseudolaric acid B-*O*-β-*D*-glucopyranoside、pseudolaric acid A*-O*-β-*D*-

glucopyranoside. Ha等[92]采用HSCCC结合RP-HPLC的方法，氯仿-甲醇-异丙醇-水（3∶2∶2∶3，v/v/v/v）体系，从桔梗提取物中分离得到2个小皂苷，3''-*O*-acetylplatycodin和polygalacin D，两

124

个化合物的纯度均纯度超过98%。

**3小结**

绿绒蒿虽为藏医常用药材，但相较于藏红花、红景天等已经被大众普遍了解的藏药材，绿绒蒿的基础研究还远远不足。由于绿绒蒿生长在海拔3000～5000米的高山草甸、高山灌丛、流石滩，少数物种分布在亚高山地带；冰霜凛冽、辐射强烈、风大土薄、昼夜温差悬殊、气候变化迅速、生长周期短（大雪融化之时的5月～大雪

再次封山的10月），每年能够采集到的绿绒蒿药材非常有限，花的产量就更低；高寒缺氧对采集者的身体要求高、伤害大；道路暗冰、山体滑坡等自然灾害频繁发生，课题组在高原采集绿绒蒿样品的过程中多次遇到险情，安全隐患随处存在，所以，课题组所能够采集到的样品已经是当年5月～6月开花季节中的绿绒蒿野生植物资源。至今未能成功开展规模化人工种植绿绒蒿，资源总量非常少。

自上世纪60年代国内外研究者开始对绿绒蒿属植物进行化学成分和生物活性研究，但是绿绒蒿药材的药理活性及药效物质基础仍不明确，药材质量标准落后，无活性成分对照品对药材进行质量控制，因而对绿绒蒿进行更深入细致的研究工作，对合理、综合开发和保护绿绒蒿资源、传承和发展藏医药有着十分重要的现实意义。高速逆流色谱（HSCCC）是近30年才发展起来的液-液分析和制

备技术，有许多其他色谱技术无法比拟的优点，随着该技术的研究不断深入、理论日趋成熟，HSCCC将在未来天然产物研究及标准品制备等方面发挥着越来越重要的作用。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 32卷: 11-50.

[2] 冯志舟. 绿绒蒿的药用价值[J]. 云南林业, 2007, 28（1）: 23.

[3] 宇妥•元丹贡布等. 四部医典（译本, 1987年版）[M]. 149, 156, 269.125

[4] 帝玛尔•丹增彭措. 晶珠本草[M]. 6, 7, 114, 115.

[5] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.

[6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.

[7] 宋立人, 洪恂, 丁绪亮, 等. 现代中药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

[8] WS3-BC-0098-95, 中华人民共和国卫生部颁藏药标准[S].

[9] 吴海峰, 宋志军, 朱华结, 等. 藏药红花绿绒蒿的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23: 202-207.

[10] 刘松渝, 王宪楷. 藏药红花绿绒蒿的化学成分研究[J]. 中药通报, 1986, 11（6）: 40-42.

[11] 吴海峰, 沈建伟, 宋志军, 等. 藏药全缘叶绿绒蒿的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 430-432.

[12] 吴海峰, 潘莉, 丁立生, 等. 藏药五脉绿绒蒿的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 811-813.

[13] 王明安, 陈绍农, 张惠迪, 等. 藏药五脉绿绒蒿化学成分的研究Ⅰ[J]. 兰州大学学报（自然科学版）, 1991, 27（4）: 80-82.

[14] 尚小雅, 石建功, 杨永春, 等. 藏药五脉绿绒蒿中的生物碱[J]. 药学学报, 2003, 38( 4): 276-278.

[15] 傅予, 何芝州, 白央, 等. 西藏产全缘叶绿绒篙的化学成分研究[J]. 中国民族医药杂志, 2010, 2: 46-48.

[16] Wangchuk P, Keller PA, Pyne SG, *et al*. A new protoberberine alkaloid from *Meconopsis simplicifolia* (D. Don) Walpers with potent antimalarial activity against a multidrug resistant Plasmodium falciparum strain[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 150: 953–959.

[17] Xie H, Xu J, Teng R, *et al*. Two new epimeric isopavine N-oxides from

*Meconopsis horridula* var. *racemosa*[J]. Fitoterapia, 2001, 72:

126

120-123.

[18]王明安，陈耀祖. 五脉绿绒蒿中一个新生物碱的结构[J]. 天然产物研究与开发，1995，7（1）：32-34.

[19] Zhou Y, Song JZ, Choi FF, *et al*. An experimental design approach using response surface techniques to obtain optimal liquid chromatography and mass spectrometry conditions to determine the alkaloids in *Meconopsi* species[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 7013–7023.

[20]师霞，程芳，郭玫，等. HPLC测定藏药五脉绿绒蒿中甲氧基淡黄巴豆亭碱的含量[J]. 中国中药杂志，2011，36（23）：3290-3292.

[21]杨仕兵，刘德铭，刘洋，等. 青海省不同地区五脉绿绒蒿总生物碱含量的比较[J]. 中药材，2006，29（5）：430-432.

[22]尚小雅，李冲，张承忠，等. 藏药五脉绿绒蒿中非生物碱成分[J]. 中国中药杂志，2006，31（6）：468-471.

[23]尚小雅，张承忠，李冲，等. 藏药五脉绿绒篙中黄酮类成分的分离与鉴定

[J]. 中药材，2002，25(4)：250-252.

[24]吴海妹，袁瑞瑛，小尼玛顿珠，等. 多刺绿绒蒿的化学成分[J]. 药学与临床研究，2012,20（4）：314-316.

[25]马明芳，丁克毅，丁立生，等. 多刺绿绒蒿的化学成分研究[J]. 华西药学杂志，2009, 24( 3)：227-229.

[26]郭志琴，郭强，朱枝祥，等. 藏药多刺绿绒蒿的化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2014，39（7）：1152-1156.

[27] Tanaka M, Fujimori T, Uchida I, *et al*. A malonylated anthocyanin and flavonols in blue *Meconopsis* flowers[J]. Phytochemistry, 2001, 56: 373-376.

[28] Shang XY, Wang YH, Li C, *et al*. Acetylated flavonol diglucosides from *Meconopsis quintuplinervia*[J]. Phytochemistry, 2006, 67: 511-515.

[29]张长现，叶润蓉，卢学峰，等. 不同海拔高度五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀

127

草素含量变化[J]. 天然产物研究与开发，2010，22: 643-646, 691.

[30]吴海峰，潘丽，邹多生，等. 3种绿绒蒿挥发油化学成分的GC-MS分析[J]. 中国药学杂志，2006，41（17）：1298-1300.

[31]潘宣. 红花绿绒蒿油脂性成分的研究[J]. 中国药学杂志，1998, 33（4）：208-210.

[32]官艳丽，达娃卓玛，格桑索朗，等. 全缘叶绿绒蒿花精油的GC-MS分析[J]. 中国药学杂志，2007，42（7）：539-540.

[33]高昂，赵兵，巩江，等. 柱果绿绒蒿挥发油化学成分及其抗氧化活性的研究[J]. 中国中药杂志，2013，38（2）：284-288.

[34]高黎明，王小雄，郑尚珍，等. 藏药全缘叶绿绒蒿化学成分的研究（Ⅰ）

[J]. 西北师范大学学报（自然科学版），1997，33（3）：49-52.

[35]王明安，陈绍农，张惠迪，等. 藏药五脉绿绒蒿化学成分的研究Ⅰ[J]. 兰州大学学报（自然科学版），1991，27（4）：80-82.

[36]张国林，李伯刚，周正质. 红花绿绒蒿的非生物碱成分[J]. 天然产物研究与开发，1997，9（2）：4-6.

[37] He JS, Huang B, Ban XQ, *et al*. In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 141: 104-110.

[38] Zhou G, Chen YX, Liu S, *et al*. In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 148: 664–670.

[39]巩江，路峰，姚默，等. 柱果绿绒蒿抗氧化成分提取及其活性研究[J]. 时珍国医国药，2012，23（11）：2745-2747.

[40]王志旺，王瑞琼，郭玫，等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿有效部位对肝纤维化大鼠抗氧化系统的影响[J]. 中国老年学杂志，2013，33（20）：5043-5046.

[41]王志旺，邵晶，郭玫，等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿有效部位对肝纤维化大鼠炎症相关因子的影响[J]. 免疫学杂志，2013，29（1）：24-27.

[42]王志旺，程小丽，郭玫，等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿有效部位对肝纤维化

128

疗效和TGF-β1表达的影响[J]. 中国免疫学杂志，2013，29（2）：135-139.

[43]王志旺，王瑞琼，郭玫，等. 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（2）：206-209.

[44]郭世民，赵远，王曙光. 总状绿绒蒿药效学的初步研究[J]. 云南中医中药杂志，2003，24（1）：25-27.

[45]郭玫，张扬，王志旺，等. 藏药五脉绿绒蒿总黄酮和总生物碱镇痛作用的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报，2010，27（2）：31-32.

[46]多杰才让. 藏西医结合治疗慢性乙型肝炎78例[J]. 中国民族医药杂志，1999, 5（3）：21-22.

[47]文清杰. 藏药25味松石丸治疗病毒性肝炎104例临床观察[J]. 中国民族医药杂志，1997，3（2）：20-21.

[48]詹登. 藏药25味松石丸治疗乙型肝炎34例疗效分析[J]. 中国民族医药杂志，1996，2（3）：19.

[49]胡成福，黄和益. 藏药二十五味松石丸治疗慢性乙型肝炎43例临床观察

[J]. 中国民族医药杂志，2009，（6）：8-9.

[50]多杰卓玛，才让吉. 藏西医结合治疗小儿急性黄疸型肝炎的临床观察[J]. 中国民族民间医药杂志，1995，17: 22-23.

[51]金学英，道吉塔. 藏药九味红花丸治疗乙肝的临床疗效总结[J]. 中国民族医药杂志，2000，6（1）：20.

[52]汪海英，马万媛. 藏药二十五味绿绒蒿丸治疗慢性重型肝炎56例[J]. 中国社区医师，2009，11（17）：145.

[53]德吉措毛. 藏西医结合治疗急慢性胆囊炎疗效观察[J]. 中国民族医药杂志，2002，8（4）：22.

[54]马青芳. 十七味寒水石丸治疗消化性溃疡80例临床观察[J]. 中国民间疗法，2012，20（1）：65-66.

[55]才让吉，多杰卓玛，吉合毛. 藏药13味止血散治疗胃十二指肠溃疡出血的疗效观察[J]. 中国民族民间医药杂志，2001，51: 200-201.

[56]白树军，由文峰. 二十五味珊瑚丸配合针灸治疗顽固性头痛8例小结[J]. 甘肃中医，2000，3: 50.

129

[57]侯志国，罗建光，孔令义，等. 高速逆流色谱联用技术应用于天然产物的研究进展[J]. 中国天然药物，2010，8（1）：62-67.

[58]戴德瞬，王义明，罗国安. 高速逆流色谱研究进展[J]. 分析化学，2001，29（5）：586-591.

[59]程杰，符晓晖，王维娜. 高速逆流色谱在中药分离中溶剂体系的筛选[J]. 中草药，2008，39（8）：1272-1275.

[60] Li J, Zhang XY, Yu Q, *et al*. One-step separation of four flavonoids from Herba salviae plbeiae by HSCCC[J]. Journal of Chromatographic Science, 2014, 52(10):1288-1293.

[61] Zhang QH, Shu XK, Jing F, *et al*. Preparative Separation of Alkaloids from *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. by Conventional and pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography[J]. Molecules, 2014, 19(7): 8752-8761.

[62] Huang XY, Fu JF, Di DL. Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed counter-current chromatography[J]. Separation and Purification Technology, 2010, 71(2): 220-224.

[63] He S, Lu YB, Jiang LY, *et al*. Preparative isolation and purification of antioxidative stilbene oligomers from Vitis chunganeniss using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode [J]. Journal of Separation Science, 2009, 32(14):2339-2345.

[64] He K, Ye XL, Li XG, *et al*. Separation of two constituents from purple sweet potato by combination of silica gel column and high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 881-882:49-54.

[65] Guo MZ, Liang JL, Wu SH. On-line coupline of counter-current chromatography and macroporous resine chromatography for continuous isolation of arctiin from the fruit of *Arctium lappa* L. [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(33): 5398-5406.

130

[66] Jia J, Chen T, Wang P, *et al*. Preparative separation of methylswertianin, swerchirin and decussating from the Tibetan medicinal plant *Swertia mussotii* using high-speed counter-current chromatography[J]. Phytochemical Analysis, 2012, 23(4):332-336.

[67] Ma Q, Luo JG, Kong LY. Preparative isolation of steroidal saponins from Garlic (*Allium sativum* L.) using high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2011, 34: 1997-2007.

[68]张天佑，钱渊华，韩笑. 标准样品发展现状和分析[J]. 中国标准样品，2007, 3.

[69] Oka F, Oka H, Ito Y. Systematic search for suitable two-phase solvent for high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1991, 538(1): 99-108.

[70]李爱峰，刘宁宁，柳仁民. 高速逆流色谱原理及其在天然产物化学成分分离中的应用研究进展[J]. 理化检验-化学分册，2008，44（5）：481-487, 489.

[71]王尉，杜宁，周晓晶，等. 高速逆流色谱技术在天然产物研究方面的应用

[J]. 现代科学仪器，2010，(4)：123-128.

[72] Ito Y. Efficient preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge[J]. Journal of Chromatography A, 1981, 214(1): 122-125.

[73] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1065(2): 145-168

[74] Pauli GF, Pro SM, Friesen JB. Countercurrent separation of natural products[J]. Journal of Nature products, 2008, 71(8): 1489-1508.

[75]曹学丽，王尉，裴海闰. 逆流色谱技术及其在食品领域的应用进展[J]. 北京工商大学学报（自然科学版），2010，28（3）：6-11.

131

[76]张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京：北京科学技术出版社，1993.

[77] Du QZ, Wu CJ, Qian GJ, *et al*. Relationship between the flow rate of the mobile phase and retention of the stationary phase of the stationary phase in countercurrent chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 835: 231-235.

[78] Ito Y, Conway WD. Experimental observations of the hydrodynamic behavior of solvent systems in high-speed counter-current chromatography: ⅢEffects of physical properties of the solvent systems and operating temperature on the distribution of two-phase solvent systems[J]. Journal of Chromatography A, 1984, 301(2): 405-414.

[79] Tang QF, Yang CH, Ye WC, *et al*. Preparative isolation and purification of bioactive constituents from *Aconitum coreanum* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1144(2): 203-207.

[80] Su YP, Shen J, Xu Y, *et al*. Preparative separation of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. using pH-zone-refining counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(23): 3695-3698.

[81] Yu Q, Tong S, Hong C, *et al*. Preparative separation of quaternary ammonium alkaloids from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by pH-zone-refining counter-current chromatography[J]. Journal of Separation Science, 2011, 34(3): 278-285.

[82] Chen L, Xin XL, Lan R, *et al*. Isolation of cyanidin 3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography[J]. Food Chemistry, 2014, 152: 386-390.

[83] Chen QH, Fu ML, Chen MM, *et al*. Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by

132

High-speed counter-current chromatography[J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 619-623.

[84] Zhu YD, Liu Y, Zhan Y, *et al*. Preparative isolation and purification of five flavonoid glycosides and one benzophenone galloyl glycoside from *Psidium guajava* by high-speed counter-current chromatography (HSCCC)[J]. Molecules, 2013, 18(12): 15648-15661.

[85] Sun Y, Zhu H, Wang J, *et al*. Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(8-9): 733-737.

[86]张扬，江燕斌，黄少烈，等. 高速逆流色谱提纯茶叶粗提物中EGCG单体研究[J]. 中药材，2009，32（5）：784-787.

[87] Chu C, Zhang S, Tong S, *et al*. An efficient strategy for the extraction and purification of lignans from *Schisandra chinensis* by a combination of supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Separation Science, 2013, 36(24): 3958-3964.

[88] Hou Z, Xu D, Yao S, *et al*. An application of high-speed counter-current chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry for separation and online identification of coumarins from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. [J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(24): 2571-2578.

[89] Zeng LP, Wu DF, Wu SH. A novel protocol for the preparation of sodium tanshinone sulphonates by direct ultrasound-assisted sulphonation of the crude extract of the roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and following counter-current chromatography purification [J]. Phytochemical Analysis, 2011, 22(5): 424-431.

[90] Chen T, Liu YL, Chen C, *et al*. Application of high-speed

133

Counter-current chromatography combined with macroporous resin for rapid enrichment and separation of three anthraquinone glycosides and one stilbene glycoside from *Rheum tanguticum*[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 957: 90-95.

[91] He SC, Li SC, Yang JH, *et al*. Application of step-wise gradient high-performance counter-current chromatography for rapid preparative separation and purification of diterpene components from *Pseudolarix kaempferi* Gordon[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1235: 34-38.

[92] Ha IJ, Kang M, Na YC, *et al*. Preparative separation of minor saponins from Platycodi Radix by high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Separation Science, 2011, 34(19): 2559-2565.

134

# 附图

20140416Fullscan2 #2084 RT: 3.44 AV: 1 NL: 1.00E7 T: ITMS - c ESI Full ms [250.00-800.00]

100 625.16



95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5

0 255.23 300.13 317.37 333.09

373.39 391.24 415.00

463.44 494.23 514.39

551.67 572.41 603.43

641.14

688.07

723.08

745.11

782.99

250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800

m/z

附图1 槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷的一级质谱图

20140416Ms2 #69 RT: 3.41 AV: 1 NL: 3.81E6

T: ITMS - c ESI Full ms2 [625.20@cid35.00](mailto:625.20@cid35.00) [170.00-700.00] 100 301.00



95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5

178.94

0

229.00

255.02 270.99

312.96

343.02

373.03

409.08

443.22 463.05 481.12

515.19

565.09 581.28

607.13

200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700

m/z

附图2 槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷的二级质谱图

135



附图3 槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷的1H-NMR图谱



附图4 槲皮素-3-*O*-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷的13C-NMR图谱

136

20140416Fullscan2 #2525 RT: 4.14 AV: 1 NL: 8.18E6 T: ITMS - c ESI Full ms [250.00-800.00]

100 667.22



95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5 489.29 765.09

0 255.24 301.17 317.40 333.19

374.91 390.90

429.28

465.26

492.26 527.31

571.32

609.29 625.35

683.15

730.01

787.04

250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800

m/z

附图5 槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的一级质谱图

20140416Ms2 #148 RT: 4.14 AV: 1 NL: 8.88E6

T: ITMS - c ESI Full ms2 [667.20@cid35.00](mailto:667.20@cid35.00) [180.00-700.00]

100 625.13



95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

301.01

15

607.13

10

5

0 193.07

229.10 255.00 270.99

313.06

343.01

373.09

409.10 445.12 463.16

505.13 523.21 547.22

589.26

649.14

200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700

m/z

附图6 槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的二级质谱图

137



附图7 槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的

1H-NMR图谱



附图8 槲皮素-3-*O*-[2'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的

13C-NMR图谱

138

20140416Fullscan2 #3172 RT: 5.20 AV: 1 NL: 2.87E6 T: ITMS - c ESI Full ms [250.00-800.00]

100 667.23



95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5

255.17

0

299.11 317.26

353.06 374.97 391.04

435.02

467.02 507.27

535.41

563.21

600.46 624.66 650.98

688.97 721.11

749.19 765.13

787.14

250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800

m/z

附图9 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的一级质谱图

20140416Ms2 #251 RT: 5.18 AV: 1 NL: 2.29E6

T: ITMS - c ESI Full ms2 [667.20@cid35.00](mailto:667.20@cid35.00) [200.00-700.00]

100 625.13



95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25 301.01

607.13

20

15

10

5

229.03 255.00 271.06

0

313.04

343.01

385.09 409.12

445.18 463.07

505.08 523.11 547.12

589.11

649.13

200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700

m/z

附图10 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的二级质谱图

139



附图11 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的

1H-NMR图谱



附图12 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的

13C-NMR图谱

140



附图13 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的

DEPT 90图谱



附图14 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的

DEPT 135图谱

141



附图15 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的

1H-1H COSY图谱



附图16 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的HSQC图谱

142



附图17 槲皮素-3-*O*-[3'''-*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的HMBC图谱

20140416Fullscan2 #3658 RT: 5.99 AV: 1 NL: 2.53E6 T: ITMS - c ESI Full ms [250.00-800.00]

709.16 749.14 765.17

255.24 299.18

359.03 375.01 404.48 435.11 463.29 487.34 519.08 539.22 578.70 593.27

625.06 651.27 683.21

787.12

100 667.24

95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5

0

250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800

m/z

附图18 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的一级质谱图

143

20140416Ms2 #330 RT: 5.98 AV: 1 NL: 9.77E5

T: ITMS - c ESI Full ms2 [667.20@cid35.00](mailto:667.20@cid35.00) [200.00-700.00]

301.01

607.16

343.03

255.01 271.02

227.10 283.10 313.08

373.04

409.23

445.22 463.11

505.10

547.14

589.18

649.16

100 625.16

95

90

85

80

75

70

65

60

55

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5

0

200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700

m/z



附图19 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的二级质谱图

附图20 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷] 的

1H-NMR图谱

144



附图21 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷] 的

13C-NMR图谱



附图22 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的DEPT 90图谱

145





附图23 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的DEPT 135图谱

附图24 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷] 的

1H-1H COSY图谱

146





附图25 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的HSQC图谱

附图26 槲皮素-3-*O*-[6''' -*O*-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6) -β-D-葡萄糖苷]的HMBC图谱

147

# 博士研究Th期间获得的成果

**1. 发表的论文**

**[1] Yanfei Huang**, Yatao Han, Keli Chen, Bisheng Huang\*, Yuan Liu\*. Separation and purification of four flavonol diglucosides from the flower of *Meconopsis integrifolia* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38(23): 4136-4140. **(Impact Factor 2.737)**

[2]**黄艳菲**，孙美，许云章，等. 不同炮制方法对加拿大产西洋参中10种人参皂苷的影响[J]. 中国中药杂志. 2014，39（20）：3950-3954.

**[3]** Lianxin Peng#, **Yanfei Huang**#, Liu Yuan\*, Zhifeng Zhang, Luyang Lu, Zhao Gang\*. Evaluation of Essential and Toxic Element Concentrations in Buckwheat by Experimental and Chemometric Approaches [J]. *Journal of Integrative Agriculture*. 2014, 13(8): 1691-1698. **(Impact Factor 0.625)**

[4]**黄艳菲**，冯协和，王凯顺，等. 藏医临床常用绿绒蒿药材的鉴别研究[J]. 西南大学学报.已修回.

**2. 专著**

《民族药资源开发与综合利用研究》，北京：科学出版社，2015年8月，副主编.

**3. 专利申请**

[1]从全缘叶绿绒蒿花中同时分离纯化多种黄酮类成分的方法，专利申请号：201510543021.2，发明人：刘圆，**黄艳菲**，韩亚涛.

148

[2]一种黄酮类化合物，专利申请号：201510541275.0，发明人：刘圆，**黄艳菲**，韩亚涛.

[3]一种黄酮类化合物及其制备方法和用途，专利申请号：

201510543417.7，发明人：刘圆，**黄艳菲**，韩亚涛.

**4. 科技进步奖**

[1] 2015年四川省科学技术进步奖三等奖“民族药资源开发与综合利用研究”第五完成人.

[2] 2015年四川省阿坝州科技进步奖一等奖“藏药经典成方制剂（三味龙胆花片、智托洁白片）的开发研究及产业化应用”第十一完成人.

149

致谢

三年紧张充实收获满满的博士研究生生活就要结束了，心里舍不下这美丽的中医大校园，更舍不得与我朝夕相处的老师和同学们。本文是在我尊敬的导师黄必胜教授的悉心指导和殷切关怀下完

成的，在选题、设计、实验和论文撰写方面，黄老师都给了我耐心的指导和无私的帮助。黄老师实事求是的治学态度、敏锐的洞察力、 渊博的学识及认真勤奋的工作作风是我毕生学习的楷模；黄老师积极乐观的生活态度，和蔼可亲、宽宏大度的待人之道，临危不乱当机立断的做事风格是我未来生活和工作的学习榜样。三年来，黄老师教会了我很多做人做事的道理，教会了我面对未来人生应有的态度，在此，向我的恩师表示真诚的感谢和敬意！

感谢导师刘圆教授对我无微不至的关怀和帮助，在我的课题立题、设计、实验和论文撰写方面无不凝结了老师的心血。刘老师宽宏的气度、广阔的视野、极具亲和力的待人风格、坚决果断的处事态度和高尚的人格为我生活和工作树立了榜样，使我受益终身，对于老师的感谢和敬意无以言表！

感谢陈科力教授对我的课题立题、设计、实验和论文撰写方面的悉心指导和无私帮助，您是我永远学习的楷模和为我指路的灯塔。感谢八十岁高龄还依然奋战在学术之路上的罗达尚老师，感谢老

师在样品鉴定上的大力帮助，老师为民族医药奉献终生的精神是我毕生的榜样。

感谢四川省中医药科学院李利民老师、黄利老师在药理实验的设计和实验方面的大力帮助。

感谢湖北中医药大学药学院的领导和全体老师和班主任余敏蓉老师、课题组刘义梅老师、曹艳老师、李娟老师等全体老师对我的教育和培养。

感谢西南民族大学张志锋老师、张吉仲老师、石治川老师的大力帮助。

150

感谢湖北中医药大学同师门徐健师兄、周文兵师兄、程伟、蔡旭、冯协和、何博、马文涛、柳施一、赵平、崔瑞琴、雷焱、陈龙、杨磊蕾、李孟芝、罗颖、曾晓璇等同学在实验过程和论文撰写过程的鼎力相助。

感谢西南民族大学同师门王静霞、许云章、赵小燕、杨正明、李波、陈奕君、刘盼盼、王景富、张绍山、黄钟杰、余孟杰、滕云、王凯顺、汪凤淋、翟雪、赵薇、韩亚涛、李伯超、刘春林、向海燕在实验过程和论文撰写过程的鼎力相助。

感谢同学严书超、黄茜茜、朱洁、周广文、徐派的、曹婷的帮助。 在样品的采集过程中，得到了四川省阿坝师范学院任朝琴老师及

其家人、四川省阿坝州藏医院拉目加医生和甘孜州康定县黄师傅的大力帮助，在此对他们表示衷心的感谢。

感谢湖北中医药大学和西南民族大学众多同学和师弟妹们在我课题研究和论文撰写过程中给予的支持和帮助。

最后要感谢在背后默默给我支持和无私奉献的家人和朋友，感谢父母对我学习和生活的全力支持和关怀。

感谢所有关心和帮助我的人！感谢你们！

151