

## 甘肃产藏药绿绒蒿中总黄酮和总生物碱的含量测定

文喜艳<sup>1</sup>, 王兰霞<sup>2\*</sup>, 邵晶<sup>1,3\*</sup>, 郭政<sup>1,3</sup> (1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000)

**摘要** [目的]测定甘肃产藏药绿绒蒿中总黄酮、总生物碱含量,为其质量评价提供依据。[方法]采用紫外分光光度法,以芦丁为对照,测定总黄酮含量;以罂粟碱为对照,测定总生物碱含量。[结果]绿绒蒿中总黄酮含量测定条件为:60%乙醇回流提取制备供试品溶液,以芦丁为对照,以5%亚硝酸钠、10%硝酸铝显色,在500 nm处测定吸光度;绿绒蒿中总生物碱含量测定条件为:采用氨水碱化处理,95%乙醇超声提取,0.01 mol/L盐酸溶解定容制备供试品溶液,以罂粟碱为对照,溴甲酚绿显色,在416 nm处测定吸光度。甘肃甘南产五脉绿绒蒿中总黄酮含量介于四川产五脉绿绒蒿和青海产五脉绿绒蒿中总黄酮含量之间,总生物碱含量均低于青海产五脉绿绒蒿和四川产五脉绿绒蒿中总生物碱含量。[结论]所建立的绿绒蒿中总黄酮、总生物碱含量测定方法准确、可行、重现性好,可作为绿绒蒿药材质量评价方法的科学依据,试验结果也为甘肃产绿绒蒿药材内在品质提供科学依据。

**关键词** 绿绒蒿;总黄酮;总生物碱;含量测定

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)29-0134-05

### Determination of Total Flavonoids and Total Alkaloids Content from Tibetan Medicine *Meconopsis* Produced in Gansu

WEN Xi-yan<sup>1</sup>, WANG Lan-xia<sup>2\*</sup>, SHAO Jing<sup>1,3\*</sup> et al (1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000; 2. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou, Gansu 730000; 3. Provincial Key Laboratory of Chemistry and Quality Research of Chinese Medicine in Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000)

**Abstract** [Objective] The research aimed to determine the content of total flavonoids and total alkaloids in *Meconopsis*, and provide the basis for its quality evaluation. [Method] Using ultraviolet spectrophotometry, the contents of total flavonoids were determined by using rutin as control, the content of total alkaloid content was determined by using papaverine as the control. [Result] The content of total flavonoids in *Meconopsis* was determined as follows: 60% ethanol was refluxed to prepare the test solution, using rutin as the control, with 5% sodium nitrite, 10% aluminum nitrate color, the absorbance was measured at 500 nm. The content of total alkaloids in *Meconopsis* was determined as follows: using ammonia water alkalization treatment, 95% ethanol ultrasonic extraction, 0.01 mol/L hydrochloric acid dissolved constant volume preparation of the test solution, using papaverine as the control, bromocresol green color, the absorbance was measured at 416 nm. The content of total flavonoids in *Meconopsis* quintuplinervia in Gannan of Gansu Province was between that of Sichuan and Qinghai, and the content of total alkaloid was lower than that of Qinghai and Sichuan. [Conclusion] The method is simple, feasible and reproducible, and it can be used as the scientific basis for the quality evaluation of the quality of *Meconopsis*. The experimental results also provide the scientific basis for the intrinsic quality of the medicinal plants *Meconopsis* produced in Gansu.

**Key words** *Meconopsis*; Total flavonoids; Total alkaloids; Content determination

藏药绿绒蒿是罂粟科(Papaveraceae)绿绒蒿属(*Meconopsis*)植物,载于《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》第一册,主流品种有五脉绿绒蒿(*Meconopsis quintuplinervia* Regel)、全缘绿绒蒿[*Meconopsis integrifolia*(Maxim.) Franch.]和红花绿绒蒿(*Meconopsis punicea* Maxim.)<sup>[1]</sup>,主要分布于西藏东南部、青海东南部、甘肃西部、四川西南部等地。在传统藏药中称为“欧氏完保”“欧贝”“刺儿恩”等,是极具特色的高山植物藏药<sup>[2-4]</sup>。味甘,涩,性凉,有清热、消炎、止痛、平喘、利尿等功效,藏医主要用其治疗肝炎、肺炎、胆囊炎、肺结核、胃溃疡等症<sup>[1-2]</sup>。现从绿绒蒿中得到的黄酮类化合物主要有槲皮素、木犀草素、柯伊利素、洋芹素等,生物碱类成分主要有罂粟红碱A、C、D、E和黑水罂粟菲酮碱等<sup>[2-4]</sup>。王志旺等<sup>[5-6]</sup>以甘肃产藏药绿绒蒿为研究对象,先后进行了抗炎镇痛、抗氧化、降酶保肝、抗肝纤维化等研究,活性物质筛选结果显示总黄酮、总生物碱是其主要活性部位。为了深入研究

绿绒蒿抗炎镇痛、抗肝损伤的作用机制及量效关系,必须建立准确可行的含量测定方法。该研究对藏药绿绒蒿中总黄酮、总生物碱含量测定方法进行了研究,确定测定方法和条件,并对甘肃产绿绒蒿样品进行检测,为其质量评价提供科学方法,也为绿绒蒿提取物新药开发提供工作基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试材。**五脉绿绒蒿分别采自甘肃甘南地区、甘肃榆中马街山,全缘叶绿绒蒿分别采自甘肃省临洮县、甘肃榆中马街山,经甘肃中医药大学中药资源学教研室晋玲教授鉴定为罂粟科绿绒蒿属植物五脉绿绒蒿(*Meconopsis quintuplinervia* Regel)、全缘叶绿绒蒿[*Meconopsis integrifolia*(Maxim.) Franch.],凭证标本存于甘肃中医药大学药学系生药实验室。青海、四川产五脉绿绒蒿分别通过当地药农购买,经鉴定为罂粟科植物五脉绿绒蒿[*Meconopsis integrifolia*(Maxim.) Franch.]的干燥全草。

**1.1.2 试剂。**罂粟碱对照品(中国药品生物制品鉴定所);芦丁对照品(中国药品生物制品鉴定所);其余试剂均为分析纯。

**1.1.3 仪器。**UV-2401PC紫外分光光度计(日本岛津);BS110S型塞多利斯电子分析天平(北京塞多利斯天平有限公司);KQ-250TD超声波清洗仪(上海必能信超声有限公

**基金项目** 甘肃省教育厅科研项目(2013A-085);甘肃省高等学校基本科研业务费项目(2013-1);甘肃省高等中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zzy-2014-04)。

**作者简介** 文喜艳(1989—),女,甘肃平凉人,硕士研究生,研究方向:中药有效成分与质量标准。\*通讯作者:王兰霞,主任医师,硕士,硕士生导师,从事中药有效成分与质量标准研究;邵晶,副教授,在读博士,从事中药有效成分与质量标准研究。

**收稿日期** 2017-07-26

司);HH-S 数显恒温水浴锅(金坛市正基仪器有限公司);ZK-82B 型真空干燥箱(上海市试验仪器总厂)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 绿绒蒿中总黄酮的含量测定<sup>[1,7]</sup>。

**1.2.1.1 对照品溶液的制备。**精密称定芦丁对照品 9.6 mg 于 50 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇约 20 mL,超声处理使之完全溶解,以 60% 乙醇定容至刻度,即得浓度为 0.192 mg/mL 的芦丁对照品溶液。

**1.2.1.2 供试品溶液的制备。**精密称取各绿绒蒿药材粗粉 1.0 g,置于圆底烧瓶中,精密加入 60% 乙醇 25 mL,称定质量,回流提取 1.5 h,冷却,再次称重,以 60% 乙醇补足缺失的质量,过滤,取续滤液,作为供试品溶液备用。

**1.2.1.3 测定波长的选择。**根据《中国药典》2010 版一部可知黄酮类化合物多在 500 nm 下测定,由于芦丁在 500 nm 处有吸收,并且绿绒蒿中黄酮是多以槲皮素为基本母核的黄酮苷,因此采用紫外分光光度法在 500 nm 处测定吸光度。

**1.2.1.4 标准曲线的绘制。**精密吸取“1.2.1.1”中芦丁对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 分别置于 10 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇稀释至刻度,分别配制成浓度为 0.019 2、0.038 4、0.076 8、0.115 2、0.153 6、0.192 0 mg/mL 的系列对照品溶液。精密量取各浓度对照品溶液各 2.0 mL 于 25 mL 量瓶中,依次精密加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL 和 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀,各放置 6 min,分别用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 10 min。以 60% 乙醇加相应试剂为空白,于 500 nm 处测定吸光度值。以芦丁对照品浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得出线性回归方程为  $Y = 131.18X + 6.9268$  ( $r = 0.9986$ ),表明芦丁浓度在 0.192 ~ 19.200 mg/mL 与吸光度呈良好的线性关系。

### 1.2.1.5 方法学考察。

(1)精密度试验。精密吸取同一供试品溶液 4.0 mL,按照“1.2.1.4”方法进行处理,连续测定吸光度 6 次,计算其 RSD 值。

(2)稳定性试验。精密称取 1.0 g 绿绒蒿药材粗粉,按“1.2.1.2”方法制备供试品溶液,精密吸取 4 mL,按“1.2.1.4”方法进行处理,每隔 0.5 h 测定吸光度,并计算其 RSD 值。

(3)重复性试验。精密称取 1.0 g 绿绒蒿药材粗粉 5 份,按“1.2.1.2”方法制备供试品溶液,精密吸取 4 mL,按“1.2.1.4”方法进行处理,测定吸光度,并计算其 RSD 值。

(4)加样回收率试验。精密称取已知含量的同一样品 9 份,分别加入稀释后的芦丁对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL,按“1.2.1.2”方法制备供试品溶液,精密吸取 4 mL,按“1.2.1.4”方法进行处理,测定吸光度,计算回收率和 RSD 值。

### 1.2.1.6 绿绒蒿中总黄酮提取条件的筛选。

(1)提取方法对绿绒蒿中总黄酮含量的影响。精密称取 1.0 g 绿绒蒿药材粗粉,以 80% 乙醇为溶剂,料液比 1:30,分别采用超声(40 min)、连续回流(2 h)和回流法(2 h)进行提

取,按“1.2.1.4”方法测定提取液中总黄酮含量。

(2)乙醇浓度对绿绒蒿中总黄酮含量的影响。精密称取 1.0 g 绿绒蒿药材粗粉,分别以 40%、60%、80%、95% 的乙醇回流提取 2 h,料液比 1:30,按“1.2.1.4”方法测定提取液中总黄酮含量。

(3)提取时间对绿绒蒿中总黄酮含量的影响。精密称取 1.0 g 绿绒蒿药材粗粉,以 60% 乙醇分别回流提取 0.5、1.0、1.5、2.0 h 进行试验,按“1.2.1.4”方法测定提取液中总黄酮含量。

(4)料液比对五脉绿绒蒿中总黄酮含量的影响。精密称取 1.0 g 绿绒蒿药材粗粉,以 50% 乙醇回流提取 1.5 h,料液比分别为 1:20、1:25、1:30、1:35,所得提取液按“1.2.1.4”方法测定总黄酮含量。

**1.2.1.7 样品含量的测定。**精密称取不同产地绿绒蒿药材粗粉各 1.0 g,按“1.2.1.6”筛选的条件制备供试品溶液,精密吸取 0.5 mL,按“1.2.1.4”方法测定吸光度,并计算总黄酮的含量。

### 1.2.2 绿绒蒿中总生物碱的含量测定<sup>[1,8]</sup>。

**1.2.2.1 对照品溶液的制备。**精密称取罂粟碱对照品 15.4 mg,用 0.01 mol/L 的盐酸溶液溶解并定容至 250 mL 容量瓶中,即得浓度为 61.6 μg/mL 的盐酸罂粟碱对照品溶液。

**1.2.2.2 供试品溶液的制备。**精密称取各绿绒蒿药材粉末 2.0 g,至锥形瓶中加入 10 mL 浓氨水充分搅拌,浸泡 30 min,加 95% 乙醇 60 mL 浸渍 2 h 后超声处理 30 min,抽滤,滤液至蒸发皿中水浴蒸干,残渣加 0.01 mol/L 盐酸 5 mL 使其完全溶解,过滤,取续滤液作为供试品溶液,备用。

**1.2.2.3 测定波长选择。**通过对盐酸罂粟碱的全波长扫描结果,并结合文献报道,选择在 416 nm 下进行测定。

**1.2.2.4 标准曲线的绘制。**精密吸取盐酸罂粟碱对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置分液漏斗中,依次加入醋酸盐缓冲液 5.0 mL、溴甲酚绿 2.0 mL 摇匀,再加 16 mL 氯仿充分振摇,静置 1.5 h,取氯仿层,在 416 nm 处测定其吸光度,以 0.01 mol/L 盐酸同法作空白对照。以罂粟碱浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得出线性回归方程为  $A = 0.0323C + 0.0263$  ( $r = 0.9985$ ),表明罂粟碱浓度在 61.6 ~ 369.6 μg/mL 与吸光度呈良好的线性关系。

### 1.2.2.5 方法学考察。

(1)精密度试验。精密吸取同一供试品溶液 0.5 mL,按“1.2.2.4”方法连续测定 6 次,计算 RSD。

(2)稳定性试验。精密称取 2.0 g 绿绒蒿药材粗粉,按“1.2.2.2”方法制备供试品溶液,精密吸取 0.5 mL,按“1.2.2.4”方法进行处理,分别于每 30 min 测定其吸光度,并计算其 RSD。

(3)重复性试验。精密称取 2.0 g 绿绒蒿药材粗粉 5 份,按“1.2.2.2”方法制备供试品溶液,精密吸取 0.5 mL,按“1.2.2.4”方法进行处理,测定吸光度,计算样品中总黄酮的平均含量和 RSD。

(4)加样回收率试验。精密称定已知含量的同一样品

9份,每份1.0 g,分别加入盐酸罂粟碱对照品溶液12、16、20 mL,按“1.2.2.2”方法制备供试品溶液,精密吸取0.5 mL,按“1.2.2.4”方法进行处理,测定吸光度,计算回收率和RSD。

### 1.2.2.6 绿绒蒿中总生物碱提取条件的筛选。

(1)提取溶剂对绿绒蒿中总生物碱含量的影响。精密称取绿绒蒿药材粗粉2.0 g,2组分别以50 mL 95%乙醇、50 mL 氯仿为溶剂进行回流提取2 h,另2组分别加浓氨水10 mL,充分搅拌并静置30 min后再分别以60 mL 95%乙醇、60 mL 氯仿为溶剂回流提取2 h,滤液至蒸发皿中水浴蒸干,残渣加0.01 mol/L盐酸5 mL使其完全溶解,过滤,精密量取续滤液0.5 mL,按“1.2.2.4”方法测定其吸光度,并计算含量。

(2)提取方法对绿绒蒿中总生物碱含量的影响。精密称取绿绒蒿药材粗粉2.0 g,至250 mL锥形瓶中,加浓氨水10 mL,充分搅拌并静置30 min,加95%乙醇60 mL分别采用超声(40 min)、回流(2 h)、浸渍(2 h)以及浸渍2 h并超声处理30 min进行提取,提取液至蒸发皿中水浴挥干溶剂,残留物加5 mL 0.01 mol/L盐酸使其完全溶解,过滤,精密吸取续滤液0.5 mL,按“1.2.2.4”方法处理,测定吸光度,并计算含量。

(3)料液比对绿绒蒿中总生物碱含量的影响。精密称取绿绒蒿药材粗粉2.0 g,加浓氨水10 mL,充分搅拌并静置30

min,分别加15、20、25、30倍95%乙醇浸渍2 h后,超声处理30 min,提取液至蒸发皿中水浴挥干溶剂,残留物加5 mL 0.01 mol/L盐酸使其完全溶解,过滤,精密吸取续滤液0.5 mL,按“1.2.2.4”方法处理,测定吸光度,并计算含量。

1.2.2.7 样品含量的测定。精密称取不同产地绿绒蒿药材粗粉各2.0 g,按“1.2.2.6”筛选的条件制备供试品溶液,精密吸取0.5 mL,按“1.2.2.4”方法测定吸光度,并计算其总生物碱含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿绒蒿中总黄酮的含量测定

#### 2.1.1 方法学考察。

2.1.1.1 精密度试验。按“1.2.1.5”方法操作,计算6次吸光度平均值为0.401,RSD为0.13%,表明仪器的精密度良好。

2.1.1.2 稳定性试验。按“1.2.1.5”方法操作,计算其RSD为1.21%,表明样品在2.5 h内稳定性良好。

2.1.1.3 重复性试验。按“1.2.1.5”方法操作,计算其RSD为1.84%,表明该方法的重复性良好。

2.1.1.4 加样回收率试验。由表1可知,绿绒蒿中总黄酮的加样回收率平均为98.58%,RSD为1.82%,表明该方法准确性良好。

表1 绿绒蒿总黄酮的加样回收率试验(n=9)

Table 1 Sample recovery rate test of total flavonoids in *Meconopsis*

编号 No.	样品质量 Sample weight g	样品中总黄酮含量 Content of total flavonoids in sample//mg	加入芦丁量 Added the amount of rutin//mg	测得量 Measured amount mg	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
1	0.502 4	0.062 9	0.055 3	0.119 1	101.63	98.58	1.82
2	0.501 8	0.062 8	0.055 3	0.116 7	97.45		
3	0.506 5	0.063 4	0.055 3	0.117 8	98.19		
4	0.500 7	0.062 6	0.069 1	0.129 9	97.40		
5	0.506 8	0.063 4	0.069 1	0.130 1	96.53		
6	0.508 4	0.063 6	0.069 1	0.131 2	97.83		
7	0.505 8	0.063 3	0.082 9	0.147 3	101.33		
8	0.505 3	0.063 2	0.082 9	0.145 5	99.28		
9	0.510 5	0.063 8	0.082 9	0.144 8	97.71		

#### 2.1.2 提取条件的筛选。

2.1.2.1 提取方法对绿绒蒿中总黄酮含量的影响。由图1可知,在限定时间内超声提取的效果不好,绿绒蒿中总黄酮含量为0.068 6 mg/g;连续回流提取和回流提取在相同时间内提取率相差不大,绿绒蒿中总黄酮含量分别为0.116 3和0.118 4 mg/g。综合考虑,选定回流提取作为绿绒蒿中总黄酮的提取方法,且提取时间为2 h。

2.1.2.2 乙醇浓度对绿绒蒿中总黄酮含量的影响。由图2可知,随着乙醇浓度的升高,总黄酮含量也相应的增加,当提取溶剂乙醇浓度为60%时,绿绒蒿中总黄酮的含量最高(0.112 1 mg/g),但到80%乙醇时总黄酮含量又有所下降,这可能与样品中所含总黄酮极性有关。因此,提取绿绒蒿中总黄酮的最佳乙醇浓度为60%。

2.1.2.3 提取时间对绿绒蒿中总黄酮含量的影响。由图3

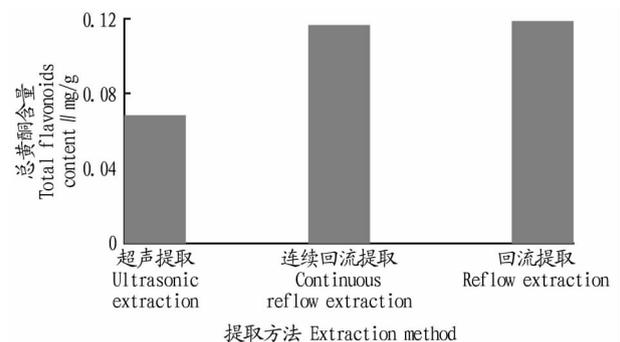


图1 提取方法对五脉绿绒蒿中总黄酮含量的影响

Fig. 1 Effect of extraction method on the total flavonoids content in *Meconopsis quintuplinervia*

可知,当提取时间为0.5~1.0 h时,绿绒蒿中总黄酮含量呈上升趋势,而1.0~2.0 h无明显变化。综合考虑,初步确定

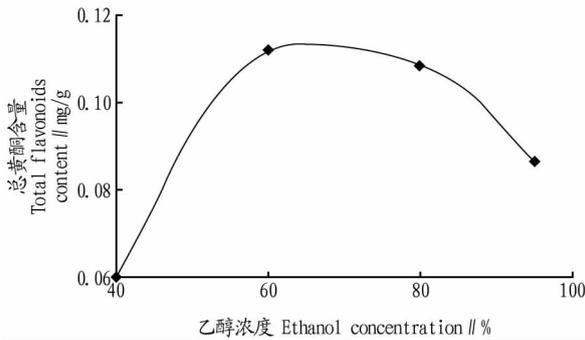


图2 乙醇浓度对五脉绿绒蒿中总黄酮含量的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on the total flavonoids content in *Meconopsis quintuplinervia*

1.0 h 为水浴回流最佳时间。

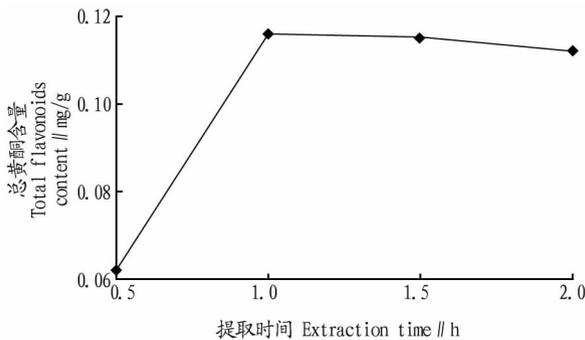


图3 提取时间对五脉绿绒蒿中总黄酮含量的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on the total flavonoids content in *Meconopsis quintuplinervia*

2.1.2.4 料液比对五脉绿绒蒿中总黄酮含量的影响。由图4可知,当料液比为1:20~1:25时,绿绒蒿中总黄酮含量上升趋势明显,料液比为1:25~1:30时,绿绒蒿中总黄酮含量上升趋势不明显;但当料液比为1:35时,绿绒蒿中总黄酮含量稍降低。因此,确定最佳料液比为1:25。

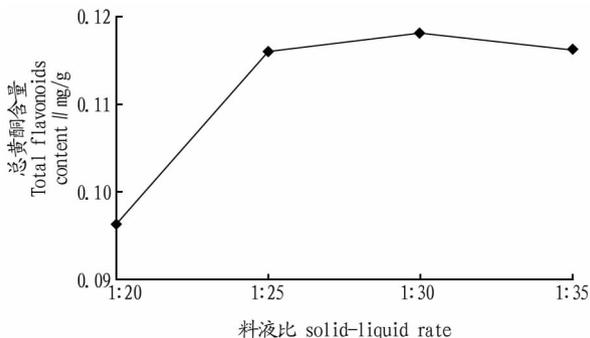


图4 料液比对五脉绿绒蒿中总黄酮含量的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid rate on the total flavonoids content in *Meconopsis quintuplinervia*

综合上述单因素筛选试验结果,最终确定供试品溶液的制备方法为:精密称取各绿绒蒿药材粗粉1.0 g,置于圆底烧瓶中,精密加入60%乙醇25 mL,称定质量,回流提取1.0 h,冷却,再次称重,以60%乙醇补足缺失的质量,过滤,取续滤液,作为供试品溶液备用。

2.1.3 样品的含量测定。精密称取6种不同产地的绿绒蒿药材粗粉1.0 g,置于圆底烧瓶中,精密加入60%乙醇25 mL,称定质量,回流提取1.0 h,冷却,再次称重,以60%乙醇补足缺失的质量,过滤,取续滤液0.5 mL,按“1.2.1.4”方法测定吸光度,计算其总黄酮含量。结果发现(表2),青海产五脉绿绒蒿中总黄酮含量最高,甘肃榆中马街山产全缘绿绒蒿中总黄酮含量最低;甘肃甘南产五脉绿绒蒿中总黄酮含量介于四川产五脉绿绒蒿和青海产五脉绿绒蒿中总黄酮含量之间。

表2 不同产地绿绒蒿中总黄酮含量测定(n=3)

Table 2 Determination of total flavonoids content in *Meconopsis* in different areas (n=3)

序号 No.	产地 Origin	含量 Content / mg/g
1	四川产五脉绿绒蒿	0.125 0
2	青海产五脉绿绒蒿	0.178 3
3	甘肃甘南产五脉绿绒蒿	0.155 6
4	甘肃榆中马街山产五脉绿绒蒿	0.120 9
5	甘肃临洮产全缘绿绒蒿	0.139 0
6	甘肃榆中马街山产全缘绿绒蒿	0.115 7

## 2.2 绿绒蒿中总生物碱的含量测定。

### 2.2.1 方法学考察。

2.2.1.1 精密度试验。按“1.2.2.5”方法操作,计算其RSD为0.33%,表明仪器的精密度良好。

2.2.1.2 稳定性试验。按“1.2.2.5”方法操作,计算其RSD为1.95%,表明样品在2.5 h内稳定性良好。

2.2.1.3 重复性试验。按“1.2.2.5”方法操作,计算其RSD为2.30%,结果表明该方法的重复性良好。

2.2.1.4 加样回收率试验。从表3可看出,样品的平均回收率为97.56%,RSD为1.14%,表明该方法准确性良好。

### 2.2.2 提取条件的筛选。

2.2.2.1 提取溶剂对绿绒蒿中总生物碱含量的影响。由表4可知,当绿绒蒿药材粗粉采用浓氨水处理后,再采用95%乙醇提取时,绿绒蒿中总生物碱的含量最高,为0.964 4 mg/g。

2.2.2.2 提取方法对绿绒蒿中总生物碱含量的影响。由表5可知,当绿绒蒿药材粗粉加浓氨水浸渍2 h后,超声处理30 min时,绿绒蒿中总生物碱的含量最高,为0.938 6 mg/g。

2.2.2.3 料液比对绿绒蒿中总生物碱含量的影响。试验结果表明,当提取绿绒蒿中总生物碱的溶剂料液比为1:20~1:30时,绿绒蒿中总生物碱的含量呈明显上升趋势,当料液比为1:30,绿绒蒿中总生物碱的含量最高,为0.908 3 mg/g;但当料液比为1:35时,绿绒蒿中总生物碱的含量稍降低。故选取最佳料液比为1:30。

综合上述单因素筛选试验结果,最终确定供试品溶液的制备方法为:精密称取绿绒蒿药材粉末2.0 g,加10 mL浓氨水充分搅拌,浸泡30 min,加95%乙醇60 mL,浸渍2 h后超声处理30 min,抽滤,滤液至蒸发皿中水浴蒸干,残渣加0.01 mol/L盐酸5 mL使其完全溶解,过滤,取续滤液作为供试品溶液,备用。

表3 绿绒蒿中总生物碱的加样回收率试验( $n=9$ )Table 3 Sample recovery rate test of total alkaloids in *Meconopsis* ( $n=9$ )

编号 No.	样品质量 Sample weight g	样品中总生物碱含量 Content of total alkaloids in sample//mg	加入盐酸罂粟碱量 Added the amount of papaverine hydrochloride//mg	测得量 Measured amount mg	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
1	1.010 4	0.951 0	0.739 2	1.689 0	99.84	97.56	1.14
2	1.021 8	0.961 7	0.739 2	1.683 9	97.70		
3	1.006 5	0.947 3	0.739 2	1.665 8	97.20		
4	1.020 7	0.960 7	0.985 6	1.920 3	97.36		
5	1.006 8	0.947 6	0.985 6	1.915 8	98.23		
6	1.008 4	0.949 1	0.985 6	1.906 6	97.15		
7	1.013 8	0.954 2	1.232 0	2.162 0	98.04		
8	1.005 3	0.946 2	1.232 0	2.137 2	96.67		
9	1.010 5	0.951 1	1.232 0	2.132 2	95.87		

表4 不同提取溶剂对绿绒蒿中总生物碱含量的影响( $n=3$ )Table 4 Effects of different extraction solvents on total alkaloid content in *Meconopsis* ( $n=3$ )

序号 No.	提取溶剂 Extraction solvents	总生物碱含量 Total alkaloid content//mg/g
1	95%乙醇直接提取	0.533 0
2	氯仿直接提取	0.508 4
3	浓氨水处理后95%乙醇提取	0.964 4
4	浓氨水处理后氯仿提取	0.936 1

表5 提取方法对绿绒蒿中总生物碱含量的影响( $n=3$ )Table 5 Effects of extraction methods on total alkaloid content in *Meconopsis* ( $n=3$ )

序号 No.	提取方法 Extraction methods	总生物碱含量 Total alkaloid content//mg/g
1	超声提取(40 min)	0.706 2
2	回流提取(2 h)	0.796 3
3	浸渍提取(2 h)	0.698 3
4	浸渍2 h并超声处理30 min	0.938 6

**2.2.3 样品的含量测定。**精密称取6种不同产地的绿绒蒿药材粉末2.0 g,加10 mL浓氨水充分搅拌,浸泡30 min,加95%乙醇60 mL,浸渍2 h后超声处理30 min,抽滤,滤液至蒸发皿中水浴蒸干,残渣加0.01 mol/L盐酸5 mL使其完全溶解,过滤,取续滤液0.5 mL,按“1.2.2.4”方法测定吸光度,计算其总生物碱含量。结果发现(表6),四川产五脉绿绒蒿中总生物碱含量最高,甘肃榆中马街山产全缘绿绒蒿中总生物碱含量最低;甘肃甘南产五脉绿绒蒿中总生物碱含量均低于青海产五脉绿绒蒿和四川产五脉绿绒蒿中总生物碱含量。

表6 不同产地绿绒蒿中总生物碱含量测定( $n=3$ )Table 6 Determination of total alkaloid content in *Meconopsis* in different areas ( $n=3$ )

序号 No.	产地 Origin	含量 Content//mg/g
1	四川产五脉绿绒蒿	1.035 0
2	青海产五脉绿绒蒿	0.974 5
3	甘肃甘南产五脉绿绒蒿	0.941 2
4	甘肃榆中马街山产五脉绿绒蒿	0.852 2
5	甘肃临洮产全缘绿绒蒿	0.802 0
6	甘肃榆中马街山产全缘绿绒蒿	0.675 0

### 3 结论与讨论

采用紫外分光光度法,以芦丁为对照,测定总黄酮含量;以罂粟碱为对照,测定总生物碱含量。结果表明,绿绒蒿中总黄酮含量测定条件为:60%乙醇回流提取制备供试品溶液,以芦丁为对照,以5%亚硝酸钠、10%硝酸铝显色,在500 nm处测定吸光度;绿绒蒿中总生物碱含量测定条件为:采用氨水碱化处理,95%乙醇超声提取,0.01 mol/L盐酸溶解定容制备供试品溶液,以罂粟碱为对照,溴甲酚绿显色,在416 nm处测定吸光度。采用所建立的方法,对采集到的甘肃4个产地绿绒蒿以及购买的四川和青海产绿绒蒿均进行了检测,甘肃甘南产五脉绿绒蒿中总黄酮含量、总生物碱含量最高,甘肃榆中马街山产五脉绿绒蒿中总黄酮含量、总生物碱含量最低;但甘肃甘南产五脉绿绒蒿中总黄酮高于四川产五脉绿绒蒿、低于青海产五脉绿绒蒿,总生物碱含量均低于四川产五脉绿绒蒿和青海产五脉绿绒蒿。

现阶段,绿绒蒿基本还是以野生为主,没有形成人工栽培的规模,且由于采集到的不同产地样品有限,因此,不能以检测数据来武断地评价不同产地药材质量的优劣,但检测结果说明所建立的绿绒蒿中总黄酮、总生物碱含量测定方法准确、可行、重现性好,可以作为将来绿绒蒿药材质量评价方法的科学依据,也为甘肃产绿绒蒿的药材内在品质提供科学数据。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第1册[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,1995:98.
- [2] 冯志舟. 绿绒蒿及其药用价值[J]. 云南林业,2004,25(5):24.
- [3] 吴征镒,庄璇. 绿绒蒿属分类系统的研究[J]. 云南植物研究,1980,2(4):371-381.
- [4] LUO D S, SUN A L, XIA G C. Investigation on Tibetan medicines *Meconopsis*[J]. China Tradit Herb Drugs, 1984,15(8):23-24.
- [5] 王志旺,邵晶,郭玫,等. 五脉绿绒蒿总黄酮和总生物碱抗大鼠肝纤维化[J]. 中成药,2013,35(6):1125-1128.
- [6] 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- $\beta$ 1表达的影响[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(2):135-139.
- [7] 尚小雅,张承忠,李冲,等. 藏药五脉绿绒蒿中总黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 中药材,2002,25(4):250-252.
- [8] 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.
- [9] 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]. 天然药物开发与研究,2010,22(4):643-646.
- [10] 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.