

# 基于镇痛、抗炎和抗氧化活性的绿绒蒿品种分类

李玉凰<sup>1,2</sup>, 阳勇<sup>1,2</sup>, 张成江<sup>2</sup>, 刘翔<sup>1</sup>, 樵星芳<sup>1</sup>, 王昌华<sup>1</sup>, 钟国跃<sup>1</sup>, 高思佳<sup>1</sup>, 陈敬财<sup>1</sup>, 王云红<sup>1,2\*</sup>

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000)

**摘要:** 目的 以镇痛、抗炎、抗氧化活性分类绿绒蒿品种。方法 采用醋酸扭体和耳肿胀模型, 比较5种绿绒蒿的镇痛、抗炎能力; 以4种抗氧化试验, 对5种绿绒蒿不同提取部位进行抗氧化试验。结果 与空白组比较, 多刺绿绒蒿组和全缘叶绿绒蒿组均能减少扭体次数 ( $P < 0.05$ ), 抑制率分别为36.65%、37.27%; 五脉绿绒蒿组、全缘叶绿绒蒿组均能抑制小鼠耳廓肿胀 ( $P < 0.01$ ), 抑制率分别为70.02%、66.33%; 多刺绿绒蒿组、总状绿绒蒿组抑制小鼠耳廓肿胀 ( $P < 0.05$ ), 抑制率分别为48.58%、40.49%; 5种绿绒蒿乙醇提取物和水提取物均具有较强的抗氧化活性。结论 为绿绒蒿的品种分类提供依据, 有利于不同种类的绿绒蒿的合理应用与开发。

**关键词:** 绿绒蒿; 镇痛; 抗炎; 抗氧化; 品种分类

中图分类号: R285

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)12-4068-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.058

藏药具有悠久的历史, 因资源短缺、基础研究薄弱等问题, 面临现代化发展严峻考验<sup>[1-2]</sup>。绿绒蒿属主要分布在高海拔地区, 为一年生或多年生草本<sup>[3-5]</sup>。绿绒蒿是传统藏医药用植物, 具有经济利用价值<sup>[6-11]</sup>。

绿绒蒿属植物活性成分为生物碱类<sup>[12-13]</sup>和黄酮类<sup>[14]</sup>, 用于缓解疼痛和炎症。绿绒蒿属植物具有镇痛抗炎、清热利肺、养骨补髓等功效, 因种类差异, 其功能主治不同。

各地对绿绒蒿各品种均有使用, 使用情况较混乱<sup>[15-16]</sup>。为探讨其品种分类, 研究不同种类绿绒蒿镇痛抗炎药理活性和体外抗氧化活性差异, 为绿绒蒿的品种分类提供依据。

## 1 材料

本实验用绿绒蒿药材经重庆市中药研究院刘翔副研究员鉴定为正品, 信息见表1。

表1 样品信息

名称	基原(缩写)	采集地点
多刺绿绒蒿	<i>Meconopsis horridula</i> Hook.f.et Thoms.(M.T)	江孜
五脉绿绒蒿	<i>Meconopsis quintuplinervia</i> Regel(M.R)	西宁药材市场
毛瓣绿绒蒿	<i>Meconopsis torquate</i> Prain(M.P)	江孜
全缘叶绿绒蒿	<i>Meconopsis integrifolia</i> (Maxim).French.(M.F)	青海省玛沁县大武镇
总状绿绒蒿	<i>Meconopsis racemose</i> Maxim.Mel.Biol.(M.B)	西宁药材市场

普通级KM小鼠, 体质量18~22 g, 雌雄各半, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号SCXK(湘)2019-0004。所有动物实验前适应性饲养3 d, 自由进食, 进水。

石油醚(批号20210301)、乙酸乙酯(批号20210301)、95%乙醇(批号20210301)、无水乙醇(批号20180501)、冰醋酸(批号20170801)、盐酸(批号20171201)、二甲苯(批号20110601)、氯化钠(批号20150201), 分析纯, 均购自重庆川东化工(集团)有限公司; DPPH(批号C10505863)、抗坏血酸(批号C10542961)、ABTS(批号C10764136)、过硫酸钾(批号C1055143)、铁氰化钾(批号C10615055)、七水合硫酸亚

铁(批号C11723369), 均购自上海麦克林生化科技有限公司; 磷酸二氢钠(批号P1040495)、三氯化铁(批号P1291260)、三氯乙酸(批号P1671997)、TPTZ(批号P1792247), 均购自上海泰坦科技股份有限公司; 乙酸钠(批号K1421038), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 羧甲基纤维素钠(批号20091015)、吐温80(批号2016042001), 购自成都市科龙化工试剂厂; 氯化钠注射液(批号E121050101), 购自贵州科伦药业有限公司。

BSA224S万分之一电子天平(德国赛多利斯公司); HH-ZK6恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限公司); UPR-II-20L超纯水机(四川优普超纯科技有限公司); 全波长酶标仪(上海闪普科技有限公司)。

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1712300)

作者简介: 李玉凰(1996—), 女, 硕士生, 从事中药质量标准和功能分离富集介质的研究。E-mail: 805944403@qq.com

\*通信作者: 王云红(1986—), 女(满族), 硕士生导师, 副研究员, 从事中药制剂分析研究。E-mail: 271981966@qq.com

## 2 方法

2.1 供试品制备 取5种绿绒蒿，加5倍量乙醇加热回流3次，每次1 h，减压浓缩，浸膏用0.5%羧甲基纤维素钠溶液分散，即得镇痛抗炎供试品。取5种绿绒蒿，加100倍量溶剂加热回流1 h，依次加入石油醚、乙酸乙酯、乙醇、水，减压浓缩，各部位浸膏用乙醇分散，水部位浸膏用水分散，即得抗氧化供试品。

2.2 扭体镇痛试验 将56只KM小鼠随机分为7组（空白组、CMC-Na组、多刺绿绒蒿组、五脉绿绒蒿组、毛瓣绿绒蒿组、全缘叶绿绒蒿组、总状绿绒蒿组），每组8只，雌雄各半，按1.56 g/kg剂量灌胃，灌胃体积为0.01 mL/g。连续给药7 d，第8天各组给药1 h后，各小鼠腹腔注射0.2 mL 0.6%冰醋酸溶液。观察小鼠的扭体潜伏期和20 min内扭体次数，计算镇痛抑制率。

2.3 耳肿胀抗炎试验 将56只KM小鼠随机分为7组（空白组、CMC-Na组、多刺绿绒蒿组、五脉绿绒蒿组、毛瓣绿绒蒿组、全缘叶绿绒蒿组、总状绿绒蒿组），每组8只，雌雄各半，按1.56 g/kg剂量灌胃，灌胃体积0.01 mL/g。连续给药7 d，第8天各组给药1 h后，吸取10 μL二甲苯均匀涂抹在小鼠右耳前后两面，左耳涂抹等量生理盐水。30 min后采用颈椎脱臼法处死小鼠，沿小鼠耳廓基线剪下两耳，采用7 mm直径打孔器于左右耳对称部位打下相同面积的耳片并称质量，计算耳肿胀度与肿胀抑制率。

2.4 DPPH自由基清除能力测定 将0.5 mL DPPH (0.2 mmol/L) 和0.5 mL 2 mg/mL供试品，在黑暗中于室温下反应30 min，在517 nm测定。用乙醇和水分别做为空白对照。配制不同质量浓度维生素C溶液测定并绘制标准曲线<sup>[17]</sup>。线性方程为 $Y_1 = -0.039 5X + 0.025 4$ ， $r = 0.998 9$ 。DPPH自由基清除能力用维生素C的等价抗氧化能力表示。

2.5 ABTS自由基清除能力测定 将等体积的7 mmol/L ABTS水溶液与2.45 mmol/L过硫酸钾水溶液混合，在黑暗中储存反应16 h，使用无水乙醇将反应液稀释40倍，在30℃下保存，可产生 $ABTS^{+}$ <sup>[18-19]</sup>。将1.2 mL的 $ABTS^{+}$ 乙醇溶液与300 μL 2 mg/mL样品提取液混合，在30℃下反应6 min，在734 nm处测定。用乙醇和水分别做为空白对照。配制不同质量浓度维生素C溶液测定并绘制标准曲线。线性

方程为 $Y = -0.019 4X + 0.032 7$ ， $r = 0.998 8$ 。ABTS自由基清除能力用维生素C的等价抗氧化能力表示。

2.6  $Fe^{3+}$ 还原能力测定 取0.2 mL供试品于试管中，加pH6.6磷酸盐缓冲液0.2 mL和1%铁氰化钾溶液0.2 mL，混匀，50℃水浴20 min，加10%三氯乙酸溶液0.2 mL，摇匀，静置10 min，加0.1%氯化铁0.2 mL，摇匀，静置10 min，在700 nm测定。用乙醇和水分别做为空白对照。配制不同质量浓度维生素C溶液测定并绘制标准曲线<sup>[20]</sup>。线性方程为 $Y = -0.011 7X + 0.024$ ， $r = 0.997 7$ 。ABTS自由基清除能力用维生素C的等价抗氧化能力表示。

2.7 FRAP法测定抗氧化活性 将0.3 mol/L乙酸钠缓冲液、0.02 mol/L  $FeCl_3$ 溶液、0.01 mol/L TPTZ溶液按体积比10:1:1混合，得FRAP溶液，在37℃水浴，精密移取水溶液和硫酸亚铁溶液400 μL，加3 mL FRAP溶液，混匀后37℃反应40 min，取200 μL混合液置于96孔板中，在593 nm处测定<sup>[8]</sup>，将400 μL供试品乙醇溶液替代水和硫酸亚铁溶液进行反应，总抗氧化能力用FRAP表示。

2.8 统计学分析 通过SPSS 23.0软件进行处理，计量资料均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 镇痛活性 由表2可知，多刺绿绒蒿组和全缘叶绿绒蒿组均能减少醋酸所致小鼠扭体次数 ( $P < 0.05$ )，抑制率分别为36.65%、37.27%。5种绿绒蒿的镇痛能力为全缘叶绿绒蒿 > 多刺绿绒蒿 > 总状绿绒蒿 > 毛瓣绿绒蒿 > 五脉绿绒蒿，见图1。

表2 不同基原绿绒蒿对小鼠醋酸扭体与潜伏期的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	剂量/ ( $g \cdot kg^{-1}$ )	潜伏期/ s	扭体次 数/次	抑制率/ %
空白组	—	175.33±35.46	26.78±7.55	—
CMC-Na组	—	179.00±93.42	28.83±11.41	—
多刺绿绒蒿组	1.56	222.83±70.24	17.00±8.94*▲	36.65
五脉绿绒蒿组	1.56	233.50±68.12	20.17±7.46	24.84
毛瓣绿绒蒿组	1.56	223.33±29.42	20.00±8.51	25.47
全缘叶绿绒蒿组	1.56	206.00±36.71	16.83±4.02*▲	37.27
总状绿绒蒿组	1.56	228.50±66.43	18.83±7.99▲	29.81

注：与空白组比较，\* $P < 0.05$ ；与CMC-Na组比较，▲ $P < 0.05$ 。

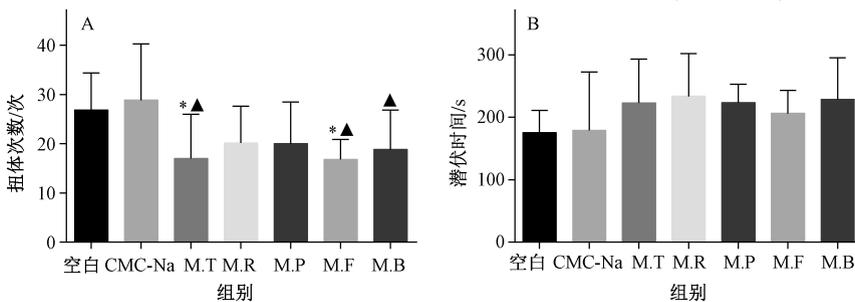


图1 不同基原绿绒蒿对小鼠醋酸扭体 (A) 与潜伏期 (B) 的影响

3.2 抗炎活性 由表3可知，与空白组比较，五脉绿绒蒿组、全缘叶绿绒蒿组均能抑制二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀

( $P < 0.01$ )，抑制率分别为70.02%、66.33%。多刺绿绒蒿组、总状绿绒蒿组能抑制二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀 ( $P <$

0.05), 抑制率分别为 48.58%、40.49%。5 种绿绒蒿的抗炎能力为五脉绿绒蒿>全缘叶绿绒蒿>多刺绿绒蒿>总状绿绒蒿>毛瓣绿绒蒿, 见图 2。

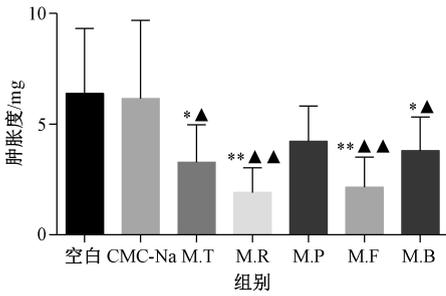


图 2 不同基原绿绒蒿对小鼠耳肿胀的影响

3.3 体外抗氧化活性 5 种绿绒蒿石油醚部位和乙酸乙酯部位的体外抗氧化活性较弱, 乙醇部位和水部位的体外抗氧化活性较强, 见表 4。其中乙醇部位的 ABTS 自由基清除能力为全缘叶绿绒蒿>毛瓣绿绒蒿>多刺绿绒蒿>总状绿绒蒿>五脉绿绒蒿; 其余方法得出的抗氧化活性为全缘叶绿绒蒿>毛瓣绿绒蒿>总状绿绒蒿>多刺绿绒蒿>五脉绿绒蒿; 水部位的抗氧化活性为毛瓣绿绒蒿>多刺绿绒蒿>五脉绿绒蒿>全缘叶绿绒蒿>总状绿绒蒿, 见图 5。

#### 4 讨论

《藏药部颁》将全缘叶绿绒蒿、五脉绿绒蒿和长叶绿绒蒿归为一类记载在绿绒蒿中,《新修晶珠本草》将多刺绿绒蒿和总状绿绒蒿归为一类记载在刺绿绒蒿中。长叶绿绒蒿资源不足且难以采集, 未纳入研究范围。5 种绿绒蒿的乙醇部位和水部位均具有较强的抗氧化能力。多刺绿绒蒿和总状绿绒蒿的镇痛抗炎能力均较好, 且乙醇部位抗氧化能力相近; 五脉绿绒蒿和全缘叶绿绒蒿的抗炎效果均较好; 毛

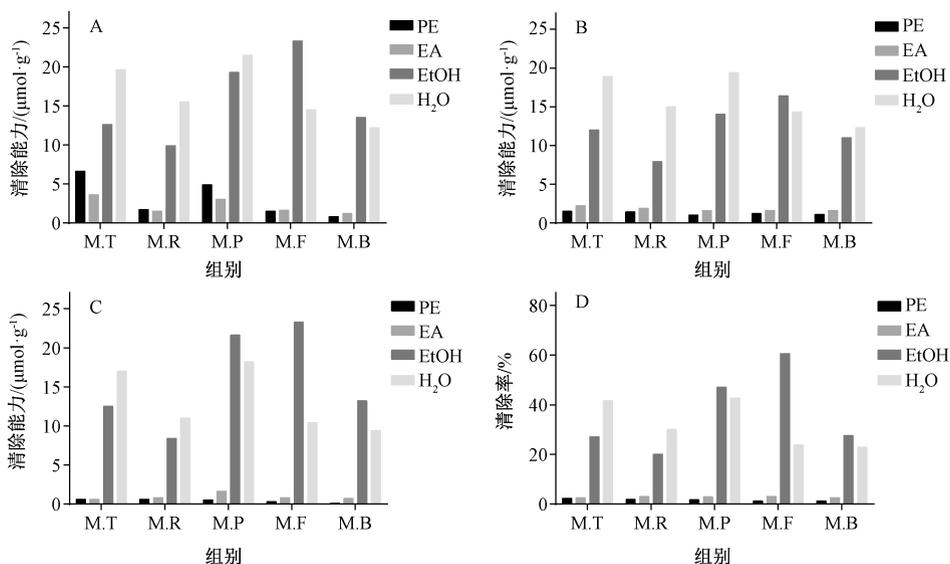
表 3 不同基原绿绒蒿对小鼠耳肿胀的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	肿胀度/mg	抑制率/%
空白组	—	6.39±2.94	—
CMC-Na 组	—	6.17±3.53	—
多刺绿绒蒿组	1.56	3.28±1.68*▲	48.58
五脉绿绒蒿组	1.56	1.91±1.11**▲▲	70.02
毛瓣绿绒蒿组	1.56	4.23±1.59	33.78
全缘叶绿绒蒿组	1.56	2.15±1.36**▲▲	66.33
总状绿绒蒿组	1.56	3.80±1.53*▲	40.49

注: 与空白组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01; 与 CMC-Na 组比较, ▲P<0.05, ▲▲P<0.01。

表 4 不同基原绿绒蒿体外抗氧化活性

组别	DPPH	ABTS	Fe <sup>3+</sup>	FAPR/%	
多刺绿绒蒿组	石油醚	6.6	1.5	0.6	2.2
	乙酸乙酯	3.6	2.2	0.6	2.5
	乙醇	12.6	12.0	12.5	27.1
	水	19.6	18.9	17.0	41.6
五脉绿绒蒿组	石油醚	1.7	1.4	0.6	1.8
	乙酸乙酯	1.5	1.9	0.8	3.0
	乙醇	9.9	7.9	8.4	20.1
	水	15.5	15.0	11.0	30.0
毛瓣绿绒蒿组	石油醚	4.9	1.0	0.5	1.7
	乙酸乙酯	3.0	1.6	1.6	2.9
	乙醇	19.3	14.0	21.6	47.1
	水	21.5	19.4	18.2	42.6
全缘叶绿绒蒿组	石油醚	1.5	1.2	0.3	1.2
	乙酸乙酯	1.6	1.6	0.8	3.1
	乙醇	23.3	16.4	23.3	60.6
	水	14.5	14.3	10.4	23.8
总状绿绒蒿组	石油醚	0.8	1.1	0.1	1.2
	乙酸乙酯	1.2	1.6	0.7	2.5
	乙醇	13.5	11.0	13.2	27.6
	水	12.2	12.3	9.4	22.9



注: A 为 DPPH 自由基清除能力, B 为 ABTS 自由基清除能力, C 为 Fe<sup>3+</sup> 还原能力, D 为 FAPR 法测定抗氧化活性。

图 3 不同基原绿绒蒿四个活性部位体外抗氧化活性

瓣绿绒蒿的镇痛抗炎作用不显著。综上所述,初步认为毛瓣绿绒蒿不能与其余四种绿绒蒿分为一类;多刺绿绒蒿和总状绿绒蒿可分为一类,与《新修晶珠本草》的归类结果一致;五脉绿绒蒿和全缘叶绿绒蒿可分为一类,与《藏药部颁》归类结果基本一致。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Zhao F, Zhang H, Bai R F, *et al.* Advance of a representative traditional Tibetan medicine *Meconopsis horridula* on its phytochemical and pharmacological aspects [ J ]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(19): 3676-3683.
- [ 2 ] 孙晓明,王超群,董林林,等.藏族药种植区域与产业发展策略研究[J].中国中药杂志,2020,45(11):2708-2713.
- [ 3 ] 吴征镒,庄璇.绿绒蒿属分类系统的研究[J].植物分类与资源学报,1980(4):371-381.
- [ 4 ] 向海燕,刘哲,黄艳菲,等.测定多基源绿绒蒿中水分、灰分及浸出物[J].中成药,2019,41(2):456-459.
- [ 5 ] Qu Y, Ou Z, Yang F S, *et al.* The study of transcriptome sequencing for flower coloration in different anthesis stages of alpine ornamental herb (*Meconopsis* 'Lingholm') [ J ]. *Gene*, 2019, 689: 220-226.
- [ 6 ] Xie H Y, Ash J E, Linde C C, *et al.* Himalayan-Tibetan plateau uplift drives divergence of polyploid poppies: *Meconopsis* Viguiier (Papaveraceae) [ J ]. *Plos One*, 2014, 9(6): e99177-e99186.
- [ 7 ] Xie H, Burgess K S, Yang X F, *et al.* Upward elevation and northwest range shifts for alpine *Meconopsis* species in the Himalaya-Hengduan Mountains region [ J ]. *Ecol Evol*, 2019, 9(7): 4055-4064.
- [ 8 ] 黄艳菲,蔡旭,李文兵,等.基于谱效关系的藏药材全缘叶绿绒蒿全草(非花入药部位)抗氧化质量标志物初步研究[J].中草药,2020,51(17):4521-4530.
- [ 9 ] Guo Q, Bai R F, Zhao B S, *et al.* An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review of the genus *Meconopsis* [ J ]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(3): 439-462.
- [ 10 ] Zhao F, Bai R, Li J, *et al.* *Meconopsis horridula* Hook. f. & Thomson extract and its alkaloid oleracein E exert cardioprotective effects against acute myocardial ischaemic injury in mice [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112893-112903.
- [ 11 ] Shang X, Wang D, Miao X, *et al.* Antinociceptive and antitussive activities of the ethanol extract of the flowers of *Meconopsis punicea* Maxim [ J ]. *BMC Complementary Altern Med*, 2015, 15(1): 154-161.
- [ 12 ] Phurpa W C, Keller P A, Pyne S G, *et al.* A new protoberberine alkaloid from *Meconopsis simplicifolia* (D. Don) Walpers with potent antimalarial activity against a multidrug resistant plasmodium falciparum strain [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3): 953-959.
- [ 13 ] Liu J, Wu H, Zheng F, *et al.* Chemical constituents of *Meconopsis horridula* and their simultaneous quantification by high - performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [ J ]. *J Sep Sci*, 2015, 37(18): 2513-2522.
- [ 14 ] Huang Y, Han Y, Chen K, *et al.* Separation and purification of four flavonol diglucosides from the flower of *Meconopsis integrifolia* by high - speed counter - current chromatography [ J ]. *J Sep Sci*, 2016, 38(23): 4136-4140.
- [ 15 ] 豆荣昆,毕振飞,白瑞雪,等.黄花紫堇、多刺绿绒蒿及其同属近缘物种的ITS2条形码鉴定与分析[J].中国中药杂志,2015,40(8):1453-1458.
- [ 16 ] 龚宇,周惠祯,陈胡兰.近十年绿绒蒿属药用植物的研究进展[J].中药材,2020,43(3):758-763.
- [ 17 ] Chai W M, Chong O Y, Huang Q, *et al.* Antityrosinase and antioxidant properties of mung bean seed proanthocyanidins: novel insights into the inhibitory mechanism [ J ]. *Food Chem*, 2018, 260(15): 27-36.
- [ 18 ] Zhou G, Chen Y, Liu S, *et al.* *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 664-670.
- [ 19 ] 王富豪,黄璐,薛晨晨,等.不同品种大豆异黄酮组分及体外抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2021,42(17):241-249.
- [ 20 ] 易骏,马利,吴建国,等.女贞子总三萜酸的体外抗氧化活性研究[J].海峡药学,2020,32(9):25-28.