

两个品种猴腿蹄盖蕨总黄酮含量的测定及抗氧化活性研究

刘冬梅 盛继文^{①a} 李万忠 张轳轳 李少霞^b

(潍坊医学院药学教研室 山东省潍坊市宝通西街 7166 号 261053)

^a(潍坊医学院化学教研室 山东省潍坊市宝通西街 7166 号 261053)

^b(齐鲁制药有限公司 济南市 250101)

摘要 初步建立两个品种猴腿蹄盖蕨不同部位总黄酮的 HPLC 指纹图谱, 并测定总黄酮含量, 研究其抗氧化活性。采用 RP-HPLC 法, 建立不同部位总黄酮的 HPLC 指纹图谱; 紫外分光光度法测定总黄酮含量及对 HO· 和 O₂^{·-} 的清除率。两个品种猴腿蹄盖蕨总黄酮含量均较高, HPLC 指纹图谱显示地上部分总黄酮成分类似, 根总黄酮成分有差异; 不同部位总黄酮粗提物对 HO· 和 O₂^{·-} 均有清除作用。猴腿蹄盖蕨总黄酮具有较强的抗氧化活性, 值得深入研究。

关键词 猴腿蹄盖蕨; 蹄盖蕨科; 分光光度法; 高效液相色谱; 指纹图谱; 总黄酮; 抗氧化活性

中图分类号: O657.32; O657.7⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8138(2010)03-0803-06

1 引言

猴腿蹄盖蕨系蹄盖蕨科植物, 又名多齿蹄盖蕨、猴腿菜、猴腿儿, 主要分布于长白山区各县, 华北、朝鲜、日本也有分布, 是一种多年生蕨类植物, 多生于海拔 500—1300m 间的杂木林、针阔混交林下及林缘的湿润处。其拳状嫩叶和根状茎可食用, 春季采摘, 可冷焗、凉拌或以肉丝炒食, 也可加盐渍或晒成干菜, 味道鲜美、风味独特, 是长白山的一种主要山野菜。

猴腿蹄盖蕨不仅可以食用, 也可药用。猴腿蹄盖蕨根茎与全草均可入药, 味甘、微苦、涩凉, 能安神、降压、利尿、解热镇痛、驱风湿等, 并可驱虫、止血、治蛇虫叮咬等^[1], 是一类“药、食两用”蕨类植物, 其营养成分和药用功效与蕨菜相当。经常食用可治疗高血压、头昏、子宫出血、关节炎等症, 并对麻疹、流感有预防作用。此外, 猴腿菜中含有丰富的赖氨酸, 能促进骨骼发育和牙齿的形成, 抑制病毒性感染等, 特别对婴幼儿、孕妇营养的补充有很大意义。

猴腿蹄盖蕨有紫猴腿、绿猴腿两个品种。紫猴腿茎叶为紫色, 绿猴腿茎叶为绿色, 故分别称为紫茎菜、绿茎菜, 二者除茎叶颜色不同外, 在外观形态方面并无明显区别, 作为山野菜或药材使用通常不进行区别, 同时应用, 统称猴腿蹄盖蕨。本实验利用 RP-HPLC 法, 初步建立了紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮的指纹图谱, 利用紫外分光光度法测定了总黄酮的含量及抗氧化活性, 期望通过相关分析测试数据和抗氧化活性指标的初步研究, 为紫猴腿、绿猴腿在药材质量控制及营养学研究等方面提供理论参考依据, 同时为猴腿蹄盖蕨化学成分及生物活性研究奠定理论基础。

① 联系人, 手机: (0) 13854422586; E-mail: sjwchy@wfm.c.edu.cn

作者简介: 盛继文 (1978—), 男, 山东省日照市人, 讲师, 主要从事有机化学教学工作。

收稿日期: 2009-09-19; 接受日期: 2009-10-17

2 实验部分

2.1 材料及药品

猴腿蹄盖蕨子于 2008 年 9 月采自吉林省抚松县, 由潍坊医学院药用植物学教研室许崇梅博士鉴定为蹄盖蕨科植物猴腿蹄盖蕨的两个品种: 紫茎菜、绿茎菜(下称紫猴腿、绿猴腿); 芦丁(中国药品生物制品检定所, 批号 10080-200306); HPLC 流动相甲醇为色谱纯; 流动相用水为重蒸水, 其他测试用水为普通蒸馏水; 其他实验试剂均为国产分析纯; 柱层析硅胶(100—200 目, 青岛海洋化工厂)。

2.2 仪器

Waters 1525 型高效液相色谱仪(上海葵园电子科技有限公司); RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); UV-3000 型紫外可见分光光度计(上海嘉鹏科技有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器(上海昨非实验室设备有限公司)。

2.3 实验方法

采用 RP-HPLC 法, 初步建立紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮的 HPLC 指纹图谱; 利用紫外分光光度法测定紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮含量及对 $\text{HO}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率。

3 结果与讨论

3.1 紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮的 HPLC 指纹图谱研究

3.1.1 色谱条件

Waters WAT045905 Symmetry C18 柱(4.6mm×150mm, 5 μm), 甲醇-水(35:65)为流动相, 流速 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 254nm, 柱温为室温, 进样量 $10\mu\text{L}$, 所有组分在 10min 内均被检测完。

3.1.2 总黄酮的制备

称取紫猴腿、绿猴腿地上部分及根干燥粉末各 10g, 分别放入圆底烧瓶中, 加入甲醇 60mL, 加热回流 3 次, 每次 1.5h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至干, 加入蒸馏水超声溶解, 依次用石油醚、乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯萃取物减压浓缩至干, 加入适量甲醇超声溶解, 在硅胶柱层析色谱上精制, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 合并盐酸-镁粉反应呈阳性的组分, 减压浓缩至干, 得紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮。分别以甲醇溶解并定容至 50mL, 备用。

3.1.3 总黄酮 HPLC 分析

吸取上述制备的紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮甲醇溶液, 微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 分别进行 HPLC 分析, 结果见图 1—4。

由图 1—4(检测时间为 60 min 时每组峰均成窄细的标准峰形, 但所有组分均在 10min 内被检测完, 本实验图 1—4 为检测 10 min 得到的结果) 可以看出, 紫猴腿、绿猴腿地上部分总黄酮的 HPLC 指纹图谱相似, 主要有 3 组峰, 保留时间分别为 1.074、1.598、1.972min; 紫猴腿、绿猴腿根总黄酮的 HPLC 指纹图谱有显著差异, 绿猴腿根总黄酮指纹图谱中除含保留时间为 1.074min 的第一组峰外, 在 1.203min 处也有一组峰, 明显区别于紫猴腿根总黄酮的 HPLC 指纹图谱。实验结果表明紫猴腿、绿猴腿地上部分总黄酮成分相同或相近, 根总黄酮成分有差异。

3.2 紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮含量的测定

3.2.1 总黄酮的提取

准确称取紫猴腿、绿猴腿地上部分及根干燥粉末各 2g, 分别放入圆底烧瓶中, 加入甲醇 30mL,

加热回流3次,每次2h,过滤,合并滤液,减压浓缩,所得浸膏分别加甲醇超声溶解,定容至250mL,得紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮甲醇溶液,密闭备用。

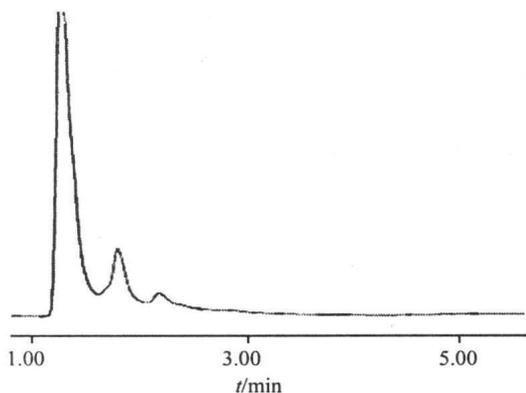


图 1 紫猴腿地上部分总黄酮指纹图谱

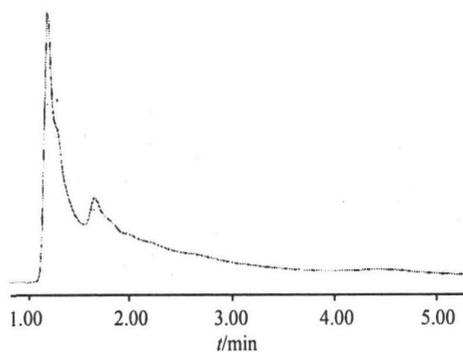


图 2 紫猴腿根总黄酮指纹图谱

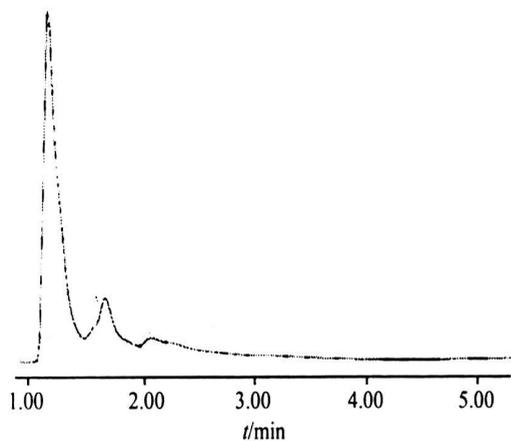


图 3 绿猴腿地上部分总黄酮指纹图谱

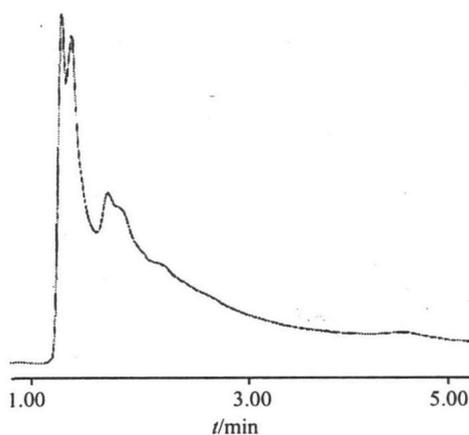


图 4 绿猴腿根总黄酮指纹图谱

3.2.2 测定波长的选择

准确称取干燥至恒重的芦丁0.01g,用甲醇溶解并定容至100mL容量瓶中,摇匀,得浓度为 $0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芦丁标准品溶液。

吸取芦丁标准品溶液及“3.2.1”项下制得的紫猴腿地上部分样品溶液各0.1mL于10mL容量瓶中,分别加入5% NaNO_2 溶液0.3mL,摇匀,放置6min,加入10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液0.3mL,摇匀,放置6min,加入 $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液4mL,摇匀,放置15min,甲醇定容至刻度。利用紫外可见分光光度计在200—600nm波长下扫描,根据扫描吸收光谱确定最大吸收峰波长。

扫描结果显示芦丁标准品和样品溶液在399nm波长处均有最大吸收,空白在此无吸收,因此选择399nm波长作为测定波长。

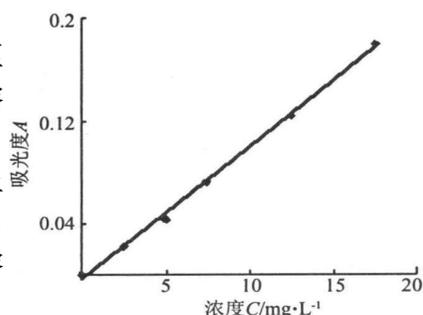


图 5 校准曲线

3.2.3 校准曲线的制作

准确移取芦丁标准品溶液 0.00, 0.25, 0.5, 0.75, 1.25, 1.75 mL 于 10 mL 容量瓶中, 分别加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加入 1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 4 mL, 摇匀, 放置 15 min, 甲醇定容至刻度。399 nm 波长处比色, 以吸光度 *A* 为纵坐标, 芦丁浓度 *C* 为横坐标, 绘制校准曲线, 得回归方程: $y = 0.0103x - 0.0037$, $r = 0.9990$ 。结果表明芦丁浓度在 2.5—17.5 mg · L⁻¹ 范围内, 与吸光度之间线性关系良好, 校准曲线见图 5。

3.2.4 稳定性试验

准确吸取“3.2.1”项下制得的紫猴腿地上部分总黄酮样品溶液 0.1 mL, 按校准曲线的制作项下方法, 于 399 nm 波长每隔 5 min 测定其吸光度。结果表明样品液在 45 min 内吸光度没有明显变化, 因此在 45 min 内完成测定稳定性良好。

3.2.5 回收率试验

准确吸取已知总黄酮含量的绿猴腿地上部分溶液 5 份, 分别加入一定量芦丁标准品, 按校准曲线的制作项下方法测定吸光度值, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

序号	原样品黄酮量 (mg)	加入标准品量 (mg)	实测黄酮量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.071	0.1	0.167	97.0	98.4	2.1
2	0.226	0.1	0.327	101.0		
3	0.275	0.2	0.474	99.5		
4	0.413	0.2	0.605	96.0		
5	0.480	0.3	0.779	99.7		

绿猴腿地上部分总黄酮平均加样回收率为 98.4%, RSD 为 2.1%, $n = 5$ 。结果表明在测定过程中黄酮没有较大损失, 测定结果可靠。

3.2.6 样品的测定

准确吸取“3.2.1”项下制得的样品溶液各 0.1 mL, 按校准曲线的制作项下方法测定吸光度值, 根据回归方程分别求总黄酮含量, 结果见表 2。

表 2 样品总黄酮含量测定结果

序号	样品名称	吸光度	黄酮含量 (%)
1	紫猴腿地上部分	0.150	18.72
2	紫猴腿根	0.104	13.02
3	绿猴腿地上部分	0.153	19.08
4	绿猴腿根	0.074	9.45

由表 2 可知, 紫猴腿和绿猴腿地上部分及根总黄酮含量不同, 同一品种地上部分及根总黄酮含量也不同。

3.2.7 精密度试验

准确吸取 5 份芦丁标准品溶液, 各 0.1 mL, 按校准曲线的制作项下方法测定吸光度值, 计算 RSD 为 1.0%, $n = 5$, 方法精密度良好, 操作可靠。另准确吸取 1 份芦丁标准品溶液 0.1 mL, 操作同上, 连续测定吸光度值 5 次, 计算 RSD 为 0.14%, $n = 5$, 仪器精密度良好。

3.3 紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮抗氧化性试验

3.3.1 总黄酮的制备

取紫猴腿、绿猴腿地上部分及根干燥粉末各 50 g, 分别放入圆底烧瓶中, 加入甲醇 350 mL, 加热

回流3次,每次2h,过滤,合并滤液,减压浓缩。所得浸膏分别加入蒸馏水超声溶解,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯层浓缩至干,得紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮粗品,分别取0.1g,75%乙醇溶解并定容至25mL,得浓度为 $4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮粗品乙醇溶液,备用。

3.3.2 总黄酮对HO·清除率的测定

采用Fenton反应^[2]产生羟自由基,HO·与水杨酸生成的有色物质在510nm有强吸收。取5只10mL容量瓶,依次向其中各加入 $2.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO₄ 3.0mL、 $1.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 3.0mL,摇匀。再分别加入 $6.0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸 3.0mL,摇匀,于37℃水浴上加热15min。加热完毕,以蒸馏水调零,在紫外可见分光光度计上于510nm处测定吸光度 A_e 。然后分别向5只容量瓶中加入“3.3.1”项下制得的紫猴腿地上部分总黄酮乙醇溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL,再分别加入蒸馏水定容至刻度,摇匀,水浴加热15min后,再次测其吸光度 A_f 。在测定过程中,总黄酮样品溶液和蒸馏水的添加会导致吸光度降低,为消除这部分影响,实验中测完 A_f 后,继续在37℃水浴上加热10min,测定吸光度 A_m ,再加入蒸馏水1.0mL,再测定吸光度 A_n 。其他样品对HO·清除率的测定及计算方法同上。清除率计算公式如下,结果见图6。

$$\text{清除率} = [A_e - A_f - (A_m - A_n)] / A_e \times 100\%$$

实验结果显示,紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮浓度为 $4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时即显示出一定的HO·清除作用。随着紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮含量的增加,对HO·的清除率逐渐上升,并呈现明显的量效关系。

3.3.3 总黄酮对O₂⁻清除率的测定

采用邻苯三酚自氧化法。取6只10mL容量瓶,依次向其中各加入 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl缓冲液(pH 8.2) 4.5mL,“3.3.1”项下制得的紫猴腿地上部分总黄酮乙醇溶液0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL,蒸馏水4.2、4.0、3.8、3.6、3.4、3.2mL,摇匀,放入25℃水浴20min,再分别加入25℃预热过的 $3\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯三酚0.3mL,摇匀,开始计时。计时开始60s后,以0.0mL总黄酮乙醇溶液管调零(空白管),在紫外分光光度计上测定5min内392nm处的吸光度A,每30s记录一次,把所得的数据以时间为横坐标,吸光度A值为纵坐标进行线性回归,其他样品对O₂⁻清除率的测定及计算方法同上。清除率公式如下,结果见图7。

$$\text{清除率} = (A_{\text{空}} - A_{\text{样}}) / A_{\text{空}} \times 100\%$$

式中: $A_{\text{空}}$ ——空白管吸光度; $A_{\text{样}}$ ——样品液吸光度。

实验结果显示,紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮在浓度为 $4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对O₂⁻也显示出一定的清除能力,但均比同浓度下对HO·的清除作用弱。紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮对O₂⁻的清除率也呈现明显的量效关系。

4 结论

为考察紫猴腿、绿猴腿总黄酮类化学成分的差异、进一步分离纯化总黄酮,本实验初步建立了紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮的HPLC指纹图谱,同时测定了各部分总黄酮含量及抗氧化活

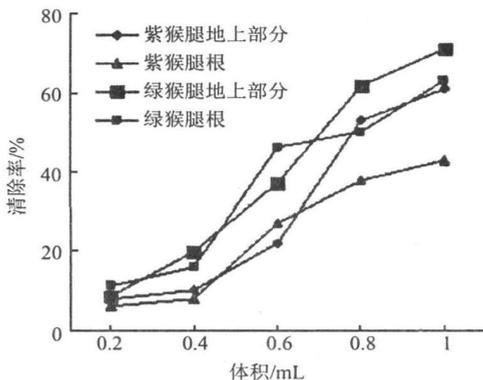


图6 紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮对HO·清除率

性。抗氧化实验结果表明,紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮均表现出不同程度的抗氧化活性,但体外抗氧化活性与总黄酮含量之间并不是完全的线性变化关系,总黄酮含量最高的紫猴腿地上部分体外抗氧化活性并不是最强的,相同浓度、同一部位的总黄酮对 $\text{HO}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力不同,可能与总黄酮类物质的结构、起抗氧化作用的物质有关,猴腿蹄盖蕨总黄酮抗氧化作用机制有待进一步深入探讨。

蹄盖蕨科是蕨类植物三大科之一,是我国真蕨植物主要的药用科属之一,资源非常丰富。蹄盖蕨科植物作为我国传统的民间中草药具有驱虫、清热解毒、利尿、止血之功效,用于治疗痢疾、消肿止痛、外伤出血、驱蛔虫、疮毒疖肿及配伍治疗各种癌症等^[3],具有广泛的生物学活性和临床效用。猴腿蹄盖蕨作为蹄盖蕨科植物,具有广阔的应用前景和开发价值。本实验将对猴腿蹄盖蕨黄酮类化学成分及生物活性进一步深入研究。

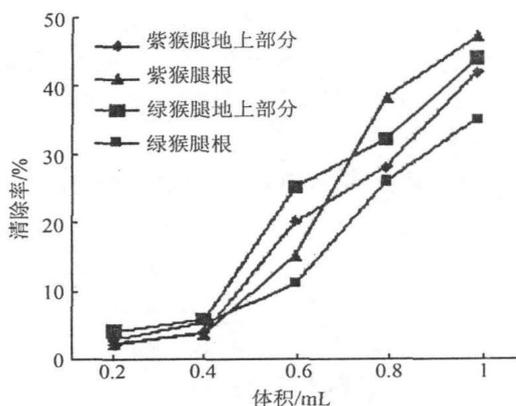


图 7 紫猴腿、绿猴腿地上部分及根总黄酮对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除率

参考文献

- [1] 马琼. 猴腿菜的生物特性及开发利用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(34): 1031.
 [2] 丁利君, 周圳辉, 林燕如. 芒其中黄酮物质的提取及其抗氧化研究[J]. 食品科学, 2005, 52(8): 4—5.
 [3] 杨明惠, 杨雪琼, 汪国松等. 蹄盖蕨属植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(15): 1189—1191.

Study on Content and Antioxidation Effect of Total Flavonoids from Two Kinds of *Athyrium Multidentatum*(Doll.) Ching.

LIU Dong-Mei SHENG Ji-Wen^a LI Wan-Zhong ZHANG Lu-Lu LI Shao-Xia^b

(Department of Pharmacy, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, P. R. China)

^a(Department of Chemistry, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, P. R. China)

^b(Qilu Pharmaceutical Co. LTD., Jinan 250101 P. R. China)

Abstract The HPLC fingerprint, content and antioxidation effect of total flavonoids from two kinds of *Athyrium multidentatum*(Doll.) Ching. were studied. Fingerprints for different parts of total flavonoids were obtained by RP-HPLC. The content of total flavonoids and $\text{HO}\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging capacities were determined by ultraviolet spectrophotometry. The content of total flavonoids was high. Fingerprints of total flavonoids for overground parts of different *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. were similar, and which for root were different. Total flavonoids from different parts have showed obvious scavenging effect on $\text{HO}\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$. The antioxidation effect of total flavonoids from different parts of two kinds of *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. was obvious and deserved for further study.

Key words *Athyrium Multidentatum* (Doll.) Ching.; Athyriaceae; Spectrophotometry;