

半边旗中黄酮成分的分离鉴定与抗氧化活性研究

吕应年, 蒋桂香, 吴科锋, 邓亦峰, 梁念慈

(广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

摘要: 半边旗干燥的全草经粉碎后, 以 80% 乙醇回流萃取得浸膏, 浸膏再用石油醚、氯仿和乙酸乙酯依次抽提, 将乙酸乙酯抽提物减压蒸干得到半边旗黄酮样品。样品经薄板层析、化学显色反应及紫外光谱分析, 初步鉴定了其中的黄酮物质成分; 样品经液相色谱-质谱联用分析, 进一步确证了半边旗黄酮中含有芹菜素、木犀草素和木犀草素葡萄糖苷。样品用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-I}_2$ 滴定试验考察发现其具有良好的抗氧化活性。

关键词: 半边旗; 黄酮; 分离; 鉴定; 高效液相色谱-质谱联用; 抗氧化

中图分类号: TQ 244.3 文献标识码: A

文章编号: 0367-6358(2007)04-205-04

Separation and Identification of Flavonoids in *Pteris semipinnata* L and their Antioxidation Activity

LU Ying nian, JIANG Gui xiang, WU Ke feng, DENG Yi feng, LIANG Ni an ci

(Guangdong Medical College, Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

Abstract: The whole plant parts of *Pteris semipinnata* L were dried, powdered and extracted with 80% ethanol to get the poultice, and then the poultice was extracted in turns with the solvents such as petroleum ether, chloroform and acetic ester. The extract of acetic ester was vaporized to dry under reduced pressure and crude flavonoids were obtained. With the analytical methods including thin layer chromatography, color reaction and UV spectrum, the flavonoid components were preliminarily identified, and further analysis with HPLC-MS confirmed the flavonoid components were apigenin, luteolin and luteolin glucoside in this plant. With $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\text{-I}_2$ titrimetric method, the crude flavonoids were found to have antioxidant activity.

Key words: *Pteris semipinnata* L; flavonoids; isolation; identification; HPLC-MS; antioxidation

半边旗(*Pteris semipinnata* L, 简称为 PsL), 又名半边蕨、半边莲、单边旗, 系凤尾蕨科植物, 是我国南方的常用中草药, 始载于《岭南采药录》, 称半边旗。该植物有止血、生肌、解毒、消肿之功效, 民间用于治疗吐血、外伤出血、发背、疔疮、跌打损伤、目赤肿痛等^[1]。现代研究表明, 半边旗中含有挥发油、萜类、黄酮、皂苷等多种物质成分^[2]。有关半边旗的药效成分研究主要集中在萜类化合物的抗肿瘤活性方面, 从半边旗全草中已分离出几种有抗肿瘤活性的

贝壳杉烷型二萜化合物^[3,4], 但对于半边旗中黄酮类物质的研究报道还较少见, 曾有报道研究半边旗的总黄酮含量测定^[5], 而对于其中黄酮类物质的进一步分离和鉴定尚未有报道。

黄酮类化合物是中草药中一类重要的药效成分, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、降血脂等广泛的生物活性, 天然黄酮主要以游离的苷元或与糖结合成糖苷的形式存在于植物中。本文主要研究了半边旗中黄酮类物质的提取分离及鉴定, 采用有机溶剂提

收稿日期: 2006-11-15; 修回日期: 2007-02-06

作者简介: 吕应年(1975-), 男, 湖北应城人, 硕士, 主要从事天然活性成分的研究, Tel: 0759-2388405, E-mail: lyn7591@hotmail.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

取、薄板层析、化学显色反应、紫外光谱及液相色谱-质谱联用的方法,确定了半边旗中黄酮的物质成分,并研究了半边旗黄酮的抗氧化活性,为半边旗的深入研究和开发利用提供依据。

1 实验部分

1.1 实验材料、试剂和仪器

半边旗植物采收于广东湛江郊区,经广东医学院生药教研室苟占平博士鉴定为半边旗(*Pteris semipinnata* L)全草;芹菜素和木犀草素标准品购于天津尖峰天然产物研究开发公司,甲醇为色谱纯(TEDIA Company Inc. USA),石油醚、氯仿、乙酸乙酯均为分析纯(广州大华试剂公司),硅胶薄板(GF254型,青岛海洋化工厂),其他化学试剂均为分析纯。

岛津 LC MS-8000A 型高效液相色谱-质谱联用仪(含在线脱气机,两台 LG-10Avp 高压输液泵, SCL-10Avp 控制器, SPD-10Avp 紫外检测仪, CTO-10Avp 柱温箱, APC 源接口, 四极杆质谱检测计), 紫外分光光度计(岛津 UV3101PC), 分析天平(Mettler, AE240), 旋转蒸发仪(上海申越科学仪器公司), 四用紫外分析仪(上海顾村科学器材厂)。

1.2 半边旗黄酮的提取流程

称取半边旗干燥全草,经植物粉碎机粉碎,加入约 6 倍体积 80% 的乙醇,回流 2 次,每次 1.5 h,回收乙醇得半边旗醇提取物浸膏(Extract of PSL)。以浸膏为原料依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯抽提,将乙酸乙酯抽提物蒸干即得半边旗黄酮粗品,具体操作步骤如图 1。

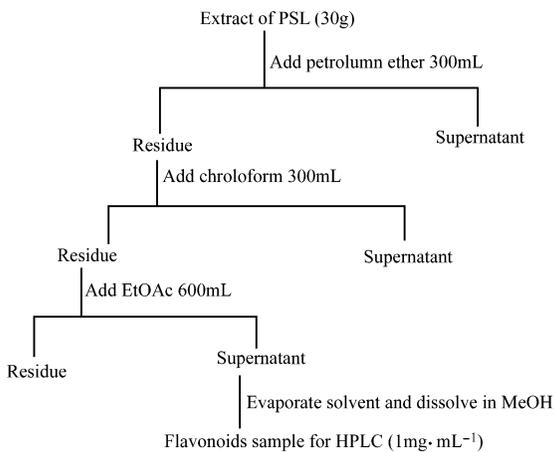


图 1 半边旗黄酮的有机溶剂萃取分离步骤

1.3 理化鉴定

1.3.1 薄板层析: 半边旗黄酮粗品加适量甲醇溶解,点样于硅胶薄板上,以氯仿-甲醇(10:1, v/v)为展开剂上行展开,挥干溶剂,在 254 nm 紫外灯下检视。将样品展开的紫外斑点刮下,分别用丙酮浸泡洗脱,取滤液蒸干得鉴定用样品。

1.3.2 显色反应: 按文献方法^[6]将所得鉴定用样品做定性显色反应。

1.3.3 紫外光谱: 取适量鉴定用样品溶于甲醇,溶液倒入 1 cm 石英比色皿,以空白甲醇为对照,在紫外光谱仪上扫描得 200~400 nm 波长的紫外光谱图。

1.4 高效液相色谱-质谱联用分析

标准溶液配制: 准确称取芹菜素和木犀草素标准品,加甲醇配制成含量分别为 1.25 mg/mL 和 1.15 mg/mL 的标准品溶液。

样品溶液配制: 半边旗黄酮粗品干燥后准确称重,加甲醇溶解成含量为 1.02 mg/mL 的样品溶液。

高效液相色谱(HPLC)条件: 色谱柱 Diamonsil C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 紫外检测波长 283 nm; 流动相为甲醇水溶液,0%~100% 梯度洗脱; 流速 0.2 mL/min; 柱温 35 °C。

质谱(MS)条件: APCI 离子源,电极温度 400 °C,电晕(corona)电压 -4.0 kV,离子传输电压 +55 V,温度 250 °C,偏转电压 40 V,检测器电压 1.6 kV,氮气流速 2.5 L/min,采用选择离子监测(SIM)方式,扫描间隔 1 s,质荷范围(m/z) 50~700。

1.5 体外抗氧化活性试验

采用烘箱储藏法测定油脂抗氧化作用。将纯猪油、添加一定量半边旗黄酮的猪油和添加 0.1% 维生素 C 的猪油分别置于 65 °C 烘箱,按照国家标准 GB/T 5538-1995,每隔一定时间测定并计算其过氧化值(POV)。即精密称取 2~3 g 混匀的样品,置于 250 mL 碘量瓶中,加入氯仿-冰醋酸(2:3)混合液 30 mL,使样品完全溶解。加饱和碘化钾溶液 1 mL,加塞,摇匀,在暗处放置 3 min,加水 50 mL,摇匀后立即用 0.02 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色时,加 0.50% 淀粉指示剂 1 mL,继续滴定至蓝色消失为止。同时以空白试剂滴定为参比。

$$POV = (v_1 - v_2) \times c \times 0.1269 / m \times 100\%$$

式中 v_1 和 v_2 分别为样品和空白试剂消耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液的体积/mL; c 为硫代硫酸钠溶液的浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; m 为样品质量/g; 0.1269 为 1 mg 硫代硫酸钠相当碘的质量数(g)。

2 结果与讨论

2.1 半边旗中黄酮的提取

植物中的黄酮常可用丙酮、乙醇、乙酸乙酯或水来提取^[7],最常用的是甲醇-水(1:1),但上述溶剂的直接提取物中往往包含较多的非黄酮类物质,影响黄酮的分析和鉴定。在本研究中,用体积分数 80% 的乙醇能从 500 g 半边旗全草中提取得到 180.3 g

浸膏, 浸膏密度 1.3, 再依次用石油醚和氯仿除去浸膏中极性小的脂溶性色素和中等极性的二萜类物质, 最后极性较大的黄酮苷及苷元则用乙酸乙酯提取出来, 提取物的成分如表 1。本工艺分离半边旗中的黄酮类物质, 排除了醇提取物中的大量干扰物质, 有利于 HPLC-MS 的分析鉴定, 而且乙酸乙酯作为常用溶剂, 毒性低, 适合于植物提取物的药学应用, 乙酸乙酯抽提所得的半边旗黄酮占乙醇总提物的 15%。

表 1 半边旗黄酮提取工艺各物质成分的含量

物质名称	性状描述	主要成分	质量/g	百分比/%
乙醇提取物	棕黑粘稠物	总混合物	12	100
石油醚抽提物	绿色油状液	脂溶性色素	0.6	5
氯仿抽提物	棕黄色无定形物	二萜类物质	8.89	74
乙酸乙酯抽提物	深棕色固体	黄酮类物质	1.88	15

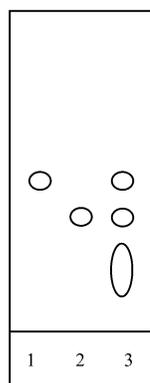


图 2 薄板层析结果

1. 芹菜素标准品;
2. 木犀草素标准品;
3. 半边旗黄酮粗品

2.2 半边旗黄酮的理化鉴定

半边旗黄酮粗品在硅胶薄板上展开, 254 nm 紫外灯下观察有三个斑点(如图 2), 从上到下依次命名为 1、2、3, 其中 3 为条带状, 表明该物质分离不完全。样品 1、2 的 R_f 值分别和芹菜素、木犀草素标准品的 R_f 值相同, 提示这两种成分可能是芹菜素和木犀草素。

显色反应表明, 样品 1、2 的盐酸-锌粉反应都呈阳性, Molish 反应都呈阴性, 提示该物质可能是游离的黄酮苷元, 样品 3 的盐酸-锌粉反应呈阳性, Molish 反应呈阳性, 经水解后 TLC 试验检测到木犀草素和葡萄糖, 提示该物质可能是木犀草素和木犀草素葡萄糖的黄酮苷。

紫外光谱研究表明, 样品 1 在甲醇溶液中有两个吸收峰分别为 267.6 nm 和 334.8 nm, 样品 2 在甲醇溶液中有两个吸收峰分别为 254.4 nm 和 349.4 nm, 结果如图 3, 这和文献报道芹菜素和木犀草素的紫外吸收峰分别相同^[8]。

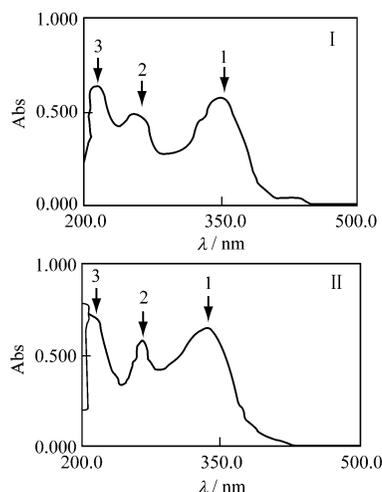


图 3 半边旗黄酮成分的 UV 光谱

综合 TLC 试验、显色反应及紫外光谱分析结果表明, 半边旗黄酮中可能含有芹菜素、木犀草素以及木犀草素葡萄糖苷。

2.3 半边旗黄酮的液-质联用分析

黄酮类化合物的分析方法有分光光度法、毛细管电泳法^[9]以及高效液相色谱法。分光光度法仪器便宜、方法简便, 但主要用于植物提取物总黄酮的含量测定, 不适合于对黄酮类物质单体的分析; 毛细管电泳影响因素复杂。高效液相色谱法具有操作方便、分析准确、样品用量少的优点。文献报道称木犀草素的 HPLC 分析采用含磷酸的流动相能抑制解离^[10], 减少拖尾, 但是由于磷酸盐难以挥发, 对联用的质谱检测器会造成损伤。

本实验采用甲醇和水梯度洗脱的 HPLC 分析方法, 流动相中不含磷酸, 避免对质谱分析的干扰, 梯度洗脱能充分分离半边旗黄酮各单体物质。图 4b 为半边旗黄酮甲醇溶液经高效液相色谱在紫外检测器 283 nm 波长下的分离图谱。采用质谱信息对半边旗提取物的黄酮成分进行鉴定, 确认其中 1 号峰为芹菜素, 2 号峰为木犀草素, 3, 4, 5 为木犀草素葡萄糖苷的同分异构体。图 4c 为相同色谱条件下质谱检测器的总离子图及选择性离子监测结果。HPLC-MS 分析结果表述如下:

1 号峰芹菜素的确认: 将 1 号峰的保留时间与芹菜素标准品对照, 两者相同; 此外 1 号峰的质谱分析和芹菜素标准品质谱也完全一致, 在负离子扫描条件下准分子离子峰(M-H)⁻均为 269。结合 TLC 试验的 R_f 值以及紫外光谱分析表明半边旗黄酮中含有芹菜素黄酮苷元, 因此确认 1 号峰为芹菜素。

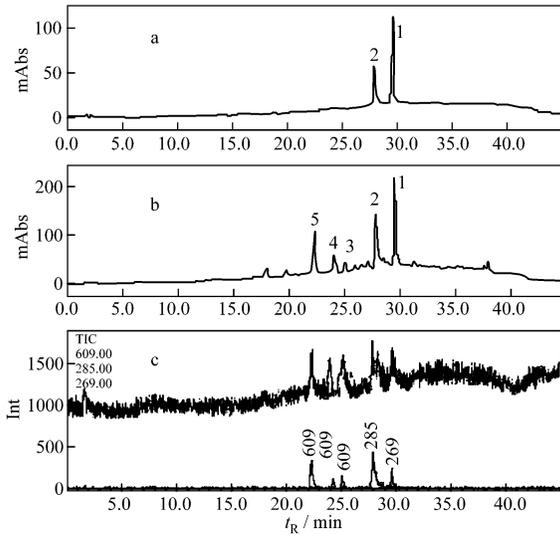


图 4 a. 芹菜素和木犀草素标准品混合物的 HPLC 图(峰 1 为芹菜素, 峰 2 为木犀草素); b. 半边旗黄酮的 HPLC 图; c. 半边旗黄酮液质联用的总离子图

2 号峰木犀草素的确认: 将 2 号峰的保留时间与木犀草素标准品对照, 两者相同; 此外 2 号峰的质量分析和木犀草素标准品的质谱也完全一致, 在负离子扫描条件下准分子离子峰 $(M-H)^-$ 均为 285。结合 TLC 试验的 R_f 值以及紫外光谱分析表明半边旗黄酮中也含有木犀草素黄酮苷元, 因此确认 2 号峰为木犀草素。

3、4、5 号峰: 在负离子扫描条件下准分子离子峰 $(M-H)^-$ 均为 609, 由于 TLC 及定性反应结果显示半边旗黄酮中含有木犀草素葡萄糖苷, 从而推测该物质为 1 分子木犀草素和 2 分子葡萄糖结合形成的黄酮二糖苷。葡萄糖分子能够与木犀草素分子结合形成糖苷键, 在 C—或 O—不同部位结合成异构体分子, 这些异构体虽然相对分子质量相同, 但由于糖苷键位置不同使得分子极性不同, 因此 HPLC 分离出保留时间有差别的三个峰。至于糖苷键的具体结合位置以及化合物分子的精细结构, 有待进一步的研究确证。

2.4 半边旗黄酮体外抗氧化活性测定

以纯猪油为空白对照品、以添加 0.1% 维生素 C 的猪油为阳性对照品、以添加 0.1%、0.2%、0.3% 半边旗黄酮的猪油为供试样品 1、2、3, 分别置于 65 °C 烘箱, 每隔一天取样测定其过氧化值(POV)。结果如表 2。可见, 从半边旗中提取的黄酮成分对猪油的氧化具有明显的抑制作用, 且随着质量分数的增大其抗氧化能力增强, 0.2% 半边旗黄酮的抗氧化活性和对照品 0.1% 维生素 C 相当。

表 2 半边旗黄酮对猪油的抗氧化作用

时间 /d	POV/ %				
	空白对照	阳性对照	供试品 1	供试品 2	供试品 3
1	0.102	0.0851	0.0912	0.0864	0.0825
3	0.117	0.0802	0.0984	0.0812	0.0783
5	0.171	0.0873	0.136	0.0932	0.0832
7	0.614	0.124	0.197	0.158	0.926
9	1.401	0.516	0.879	0.556	0.372

3 结论

半边旗全草经乙醇回流提取所得浸膏, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯抽提得到黄酮类物质, 提取结果表明半边旗黄酮占总提物的 15%。半边旗黄酮经薄板层析、显色反应及紫外光谱分析, 初步确定其中含有芹菜素、木犀草素和木犀草素葡萄糖苷; 经 HPLC-MS 联用分析, 样品分离峰的保留时间及相对分子质量分别和相应标准品的保留时间及相对分子质量一致, 进一步确证了半边旗黄酮的物质成分有芹菜素、木犀草素和木犀草素葡萄糖苷; 半边旗黄酮中含有木犀草素、芹菜素等物质分子具有多酚结构, 这类物质分子能够提供活泼的氢质子, 与油脂氧化产生的自由基结合成较稳定的产物, 从而阻断油脂的自动氧化过程, 因此是一类具有应用前景的天然抗氧化剂。

植物化学成分的鉴定除常用的理化鉴定手段外, HPLC-MS 也常常被应用于植物活性成分的分​​离分析^[1]。HPLC-MS 不仅能分离结构相近的物质, 而且可以根据质谱信息鉴定被分离物质。黄酮类化合物是中草药中一类重要的药效成分, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、降血脂等广泛的生物活性。木犀草素和芹菜素是两种具有代表性的天然黄酮苷元, 能与葡萄糖、乳糖等结合形成糖苷存在于植物体。半边旗中黄酮的含量及物质成分和该草药的药效有一定关系, 本文的研究为半边旗草药资源的开发和应用提供了依据。

参考文献:

[1] 谢宗万, 余有琴. 全国中草药名鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 53.
 [2] Maurakami T, Tanaka N. Occurrence, structure and taxonomic applications of fern constituents[M]. Prog Chem Organic Nat Prod, 1988, 54: 1.
 [3] 张晓, 崔燎, 梁念慈, 等. 半边旗有效成分抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(1): 37-38.

(下转第 220 页)

70℃时水溶液表观粘度明显下降。对含 PEGMA 的共聚物样品而言,在温度升高时表观粘度也有所下降,但下降幅度不如 PEGMA 含量为零的样品明显。这表明存在于 PEGMA 侧链间的分子缔合作用,使样品在温度升高时仍能保持较高的表观粘度。

3 结 论

3.1 由于 PEGMA 侧链的分子间缔合作用,三元共聚物水溶液中聚集体的粒径随 PEGMA 含量的增大而增大。PEGMA 含量增大时共聚物水溶液的表观粘度增大明显,且 PEGMA 含量越高则水溶液剪切变稀行为越明显,这是因为 PEGMA 有助于大分子的相互缔合,而剪切作用导致 PEGMA 分子间缔合作用被破坏所致。

3.2 含 PEGMA 的共聚物表观粘度对浓度的变化更为敏感,且共聚物浓度越高,剪切变稀越明显。三元共聚物水溶液在温度升高时仍能保持较高的表观粘度,这也归因于 PEGMA 侧链的分子间缔合作用。

参考文献:

[1] Tanford C, Wiley J S. The hydrophobic effect: formation of

micelles and biological membranes [M]. 2nd Edition. New York: Wiley C. 1980: 233.

[2] Sabhapondit A, Borhakur A, Haque I. Charaterization of acrylamide polymers for enhanced oil recovery[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2003, 87(12): 1869- 1878.

[3] Yahay G O, Ahdab A A, Ali S A, *et al.* Hamad. Solution behavior of hydrophobically associating water soluble block copolymers of acrylamide and *N*-benzylacrylamide [J]. Polymer, 2001, 42(8): 3363-33772.

[4] Kesim H, Rzaev Z M O, Dincer S, *et al.* Functional bioengineering copolymers. II. Synthesis and characterization of amphiphilic poly (*N*-isopropyl acrylamide-co-maleic anhydride) and its macrobranched derivatives [J]. Polymer, 2003, 44(10): 2897-2909.

[5] Xiao H, Pelton R, Hamielec A. Preparation and kinetic characterization of copolymers of acrylamide and poly (ethylene glycol) (meth) acrylate macromonomers [J]. Polymer, 1996, 37(7): 1201-1209.

[6] Nupponen M, Ojala J, Tenhu H. Aggregation behaviour of well defined amphiphilic diblock copolymers with poly(*N*-isopropylacrylamide) and hydrophobic block[J]. Polymer, 2004, 45(10): 3463-3650.

(上接第 195 页)

3.3 加入有机助剂,进一步增强了钨与活性炭载体表面的相互作用,促进了催化活性的提高。

参考文献:

[1] 周日尤.我国山梨醇工业的现状与发展[J]. 现代化工, 2000, (9): 49-51.

[2] 梁智,黄国红,韦振雷.钨、镍催化剂在加氢试验中的特性对比[J]. 广西化工, 1999, 28(4): 8-9.

[3] Gallezot P, Nicolaus N, Fleche G, *et al.* Glucose hydrogenation on ruthenium catalysts in a trickle bed reactor [J]. J Catal, 1998, 180(1): 51-55.

[4] Guo H B, Li H X, Xu Y P. Liquid phase glucose hydrogenation over Cr promoted alloy catalysts[J]. Materials Letters, 2002, 57: 392-398.

[5] Hoffer B W, Crezee E, Mooijman P R M, *et al.* Carbon supported Ru catalysts as promising alternative for Raney type Ni in the selective hydrogenation of D-glucose [J]. Catal Today, 2003, 35: 79-80.

[6] 徐三魁.我国山梨醇的生产工艺和特点[J]. 河南化工, 1999, (2): 9-11.

[7] 张越,崔宝秋,赵建玲.甘露醇和山梨醇在硼砂水溶液中的旋光性研究[J]. 精细化工, 2000, 17(8): 484-486.

(上接第 208 页)

[4] Li J H, Cui L. Effects of antitumor compounds is isolated from *Pteris semipinnata* L on DNA topoisomerase and cell cycle of HL-60 cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 1999, 20 (6): 541-544.

[5] 傅玉萍,苟占平,胡菊英,等.分光光度法测定不同时期半边旗总黄酮含量[J]. 时珍国医国药, 2001, 12 (12): 1080-1081.

[6] 中国科学院上海植生所. 黄酮体鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1981.

[7] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[8] 李教社, 赵玉英. 密蒙花黄酮类化合物的分离和鉴定 [J]. 药学学报, 1996, 31(11): 849-851.

[9] 王月伶, 吕元琦, 袁卓斌, 等. 毛细管区带电泳法测定芹菜素木犀草素和异槲皮苷[J]. 理化检验 化学分册, 2005, 41(8): 544-546.

[10] 胡峻, 石任兵, 张援虎. 高效液相色谱法测定荆芥穗有效部位中木犀草素和橙皮苷的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(4): 52-54.

[11] 丁明玉, 倪为为. 大黄中鞣质成分的分离与液相色谱/质谱联用分析[J]. 色谱, 2004, 22(6): 605-608.