

# 蕨菜乙醇提取物不同萃取部位 抗氧化活性测定及其组分 HPLC 分析

陈乃东<sup>1,2</sup>, 陈乃富<sup>1,2,\*</sup>, 陈存武<sup>1,2</sup>, 钱立武<sup>3</sup>, 张莉<sup>1,2</sup>

(1. 皖西学院生物与制药工程学院, 安徽六安 237012;

2. 植物细胞工程安徽省工程技术研究中心, 安徽六安 237012;

3. 安徽省药物研究所, 安徽合肥 230022)

**摘要:**目的:对蕨菜乙醇提取物不同萃取部位抗氧化活性测定和组分分析以追踪蕨菜抗氧化活性药效物质基础。方法:乙醇预处理的脱脂蕨粉经 75% 乙醇提取后以石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取, 获得石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、正丁醇相及水相 5 个部位, 通过测定对超氧阴离子、羟自由基的清除能力评价各组分的活性, HPLC 法对总提物及 5 个部位的组分进行对比分析。结果:总提物及五个萃取部位活性明显不同, 乙酸乙酯相和氯仿相的抗氧化活性明显高于总提物和正丁醇相, 石油醚相和水相抗氧化性较弱。各项的组分存在显著差异。结论:蕨菜乙醇提取物经石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取, 可实现组分的初步分离。其中黄酮类化合物含量较高的乙酸乙酯萃取部位, 与总提物相比, 体外抗氧化活性显著提高, 且呈明显的量效关系, 黄酮是蕨菜主要的抗氧化活性物质之一。研究结果对探讨蕨菜乙醇提取物抗氧化活性物质基础, 建立蕨菜质量评价标准、蕨菜资源的深度开发奠定基础。

**关键词:**蕨菜, 黄酮, 抗氧化

## Antioxidant activities and HPLC analysis of different parts partitioned from the ethanol extract of *Pteridium aquilinum*

CHEN Nai-dong<sup>1,2</sup>, CHEN Nai-fu<sup>1,2,\*</sup>, CHEN Cun-wu<sup>1,2</sup>, QIAN Li-wu<sup>3</sup>, ZHANG Li<sup>1,2</sup>

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China;

2. Anhui Biotechnology Research Center of Plant Cell Engineering, Lu'an 237012, China;

3. Anhui Institute of Materia Medica, Hefei 230022, China)

**Abstract:** Objective: To investigate the potential antioxidant constituents of *Pteridium aquilinum* using bioassay-guided method. Methods: 75% ethanol extraction from dry *P. aquilinum* powder having been primed by ether was partitioned by petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, butanol to afford five fractions. Then the antioxidant activity and chemical constituents of the five extracting parts together with the total ethanol extract were compared by detecting the removing ratio to superoxide anion and hydroxyl radical and HPLC method, respectively. Results: Remarkable variety in both chemical constituents and antioxidant activity existed between the extractions. Conclusion: The potential antioxidant components were mainly in ethyl acetate, in which the flavonoids were obviously much more abundant than the other parts. This might provide us new strategy for searching new antioxidant from this flavonoid-rich plant and revealing the possible pharmacodynamic material basis of the antioxidant activity of *P. aquilinum*.

**Key words:** *Pteridium aquilinum*; flavonoids; antioxidation

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)17-0049-04

蕨菜 (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn var. *Latiusculum* (Desv) Underw) 别名拳头菜、龙爪菜、

收稿日期: 2013-03-05 \* 通讯联系人

作者简介: 陈乃东 (1972-), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然药物活性成分分离鉴定及其结构修饰、中药质量标准及质量控制研究。

基金项目: 安徽省自然科学基金 (090413113); 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目 (KJ2009A165, KJ2012A277, KJ20108259); 六安市定向委托皖西学院市级研究重点项目 (2011LWA001); 国家自然科学基金 (81274021)。

如意菜等, 因其生长在山林野地, 少受污染, 加之富含对人体有益的营养成分, 已成为深受人们喜爱的山野菜<sup>[1]</sup>。蕨菜全草可入药, 具有较高药用价值。据《本草纲目》记载: 蕨味甘寒, 具清热、滑肠、降气、驱风、化痰等功效, 主治食膈、气膈、肠风热毒等病症, 如: 蕨花焙干后研末, 每日 10~15g, 内服可治食膈、气膈、肠风热毒。蕨根烧成灰, 用香油调和, 外敷可治毒蛇咬伤、蜂蛰伤等<sup>[2-3]</sup>。现代药理研究表明: 蕨菜富含黄酮类化合物<sup>[4-6]</sup>。其乙醇总提物——粗黄酮, 具有体外抗氧化<sup>[6-9]</sup>、降血脂<sup>[9-11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12]</sup> 等作

用<sup>[12-13]</sup>。本文对蕨菜乙醇总提取物、乙醇总提取物不同萃取部位抗氧化性及组分进行对比研究,追踪抗氧化活性物质可能存在部位,为探讨蕨菜药效物质基础,揭示蕨菜黄酮抗氧化、降血脂等药理活性机制,建立蕨菜质量评价标准、蕨菜资源的深度开发奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

实验材料蕨菜 采自安徽天堂寨地区,品种经安徽师范大学植物标本馆馆长周守标教授鉴定。杀青后于 103℃ 烘干至恒重,研碎成粉末过 40 目筛制得蕨菜粉。

无水乙醇、无水乙醚、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、冰醋酸、三氯化铝、邻苯三酚等试剂均为国产分析纯。

安捷伦 1200 高效液相色谱仪 美国安捷伦公司;安捷伦二极管阵列检测器美国安捷伦公司;RE-52B 旋转蒸发器 上海青浦沪西仪器厂;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 称取一定质量干蕨菜粉碎,过 40 目筛后于烘箱中 103℃ 烘至恒重,以无水乙醚索氏提取法脱脂至回流液无色,挥尽乙醚。脱脂蕨粉以 75% 的乙醇、料液比 1:5、80℃ 水浴冷凝回流提取 3h,提取三次。合并提取液,减压回收乙醇至浓缩液无醇味,加水适当稀释,等体积石油醚反复萃取至石油醚层无色。合并萃取液回收石油醚,残渣即为蕨菜乙醇提取物石油醚相。水层水浴挥尽石油醚,等体积氯仿反复萃取至氯仿层近无色,合并萃取液回收氯仿,获蕨菜乙醇提取物氯仿相。同样操作,分别制备乙酸乙酯相、正丁醇相。正丁醇萃取后的水层减压浓缩获蕨菜乙醇提取物水相。将蕨菜 75% 乙醇总提取物、石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相烘干至恒重,备用。

1.2.2 总黄酮含量的测定 采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定各提取液中黄酮含量,其原理是利用黄酮类化合物与铝盐反应生成红色络合物,以芦丁为标准品在 510nm 处测吸光度。

1.2.2.1 标准曲线制作 准确称取 10mg 经 103℃ 烘干至恒重的芦丁标准品,用体积分数 70% 乙醇溶解并定容至 100mL 即为标准液。精确吸取芦丁标准液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL 分别置于 6 支具塞试管中,用水定容至 5mL,加质量分数 5% NaOH 溶液 0.3mL,摇匀,放置 6min 后,加质量分数 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.3mL,摇匀,放置 6min 后,再加质量分数 4% NaOH 溶液 4mL,加水 0.4mL,摇匀,放置 15min 后,在 510nm 处测吸光度,绘制标准曲线,得回归方程:  $y = 13.21x - 0.013$ , 相关系数  $R^2 = 0.9998$ , 式中:  $Y$ , 吸光值;  $x$ , 芦丁浓度, mg/mL。

1.2.2.2 黄酮类化合物含量的测定 采用制作标准曲线相同的方法,利用回归方程进行计算。结果以各样品中含有相当芦丁(rutin)的毫克数表示(mg rutin/g 样品干重)。

1.2.3 抗氧化活性的测定

1.2.3.1 对超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)的清除活性测定 取 5 支试管分别加入 pH8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 4.5mL,置于 20℃ 水浴中预热 20min,分别加入同浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL 的样品溶液 4.2mL 和 25mmol/L 的邻苯三酚溶液 0.3mL,混匀后,于 25℃ 水浴中反应 5min,加入 8mol/L 的 HCl 溶液 1mL 终止反应,然后在 325nm 处测定吸光度  $A_i$ ,空白以蒸馏水代替试样液,测定吸光度  $A_0$ <sup>[14]</sup>。每组测定 3 次,取平均值并按公式计算清除率。

$$O_2^- \cdot \text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

1.2.3.2 对羟自由基(·OH)的清除活性 将蕨菜乙醇提取物不同萃取部位样品配成 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL 的样品液,按以下步骤测定·OH 清除率:取 7 支 10.0mL 刻度试管,分别加入 1.0mmol/L 邻二氮菲溶液 1.5mL,加入 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液 4.5mL (pH7.4),充分混匀后再加 1.0mmol/L FeSO<sub>4</sub> 1.0mL 立即混匀。在 2~7 号试管中各加入 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0mL,然后向 3~7 号试管分别加入 1.0mL 不同浓度的样品溶液,混匀,1 号试管不加提取液和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,7 支试管均用蒸馏水定容至 10.0mL,然后于 37℃ 保温 1h,在 536nm 处测吸光度值,重复 3 次,取平均值并按公式计算·OH 清除率<sup>[15]</sup>。其中  $A_0$  为 1 号管的吸光度, $A_1$  为 2 号管的吸光度, $A_i$  为 3~7 号管的吸光度。

$$\cdot OH \text{ 清除率}(\%) = \frac{A_i - A_1}{A_0 - A_1} \times 100$$

1.2.4 各部位组分 HPLC-DAD 的分析 本实验 HPLC 检测条件根据刘素艳等方法<sup>[16]</sup>,通过反复预试改进而来,具体色谱条件为:色谱柱: Hypersil ODS2 柱(4.6mm × 250mm);检测器:二极管阵列检测器(DAD);流速: 1.0mL/min;柱温为室温;进样量: 10μL,分析时间:26min;梯度洗脱,设置见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 The gradient elution requirement used in the HPLC analysis

时间(min)	甲醇(%)	酸水(水:乙酸=44.5:0.5,%)
起始	40	60
2.5	40	60
3.5	50	50
5.0	55	45
5.5	55	45
10.0	65	35
13.0	65	35
13.5	85	15
16.0	85	15
17.0	100	0
26.0	100	0

## 2 结果与分析

### 2.1 蕨菜乙醇提取物不同萃取部位黄酮的含量

蕨菜乙醇总提取物及各萃取相黄酮含量测定结果见表 2。在我们的实验条件下,以芦丁计,乙酸乙酯相黄酮的含量为 29.31% ± 0.93%,高于其它萃取相

表2 蕨菜乙醇提取物不同萃取部位总黄酮含量

Table 2 The total flavonoid contents of the parts partitioned from the ethanol extraction from *P.aquilinum*

样品名称	乙醇总提取物	石油醚相	氯仿相	乙酸乙酯相	正丁醇相	水相
总黄酮含量(%)	13.32 ± 1.26	2.65 ± 0.59	5.97 ± 0.87	29.31 ± 0.93	14.51 ± 2.66	4.03 ± 1.19

注:结果表示为平均值 ± 标准偏差, n = 3。

及蕨菜乙醇总提取物中的总黄酮含量,石油醚相与氯仿相黄酮含量低,说明蕨菜黄酮小极性黄酮所占比例较少。

通过石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取分段,就以芦丁计总黄酮含量而言,有效的实现了蕨菜黄酮的初步分离,提示蕨菜黄酮的定向分离可以采用不同有机试剂萃取分段进行初步富集、分离。

### 2.2 清除超氧阴离子活性测定

蕨菜乙醇提取物各萃取部位对超氧阴离子均有一定的清除作用,且随浓度增加清除活性增强。在本实验条件下,乙酸乙酯相清除超氧阴离子活性较强,2.5mg/mL的乙酸乙酯相,对超氧阴离子的清除率达87.6%,高于同浓度的氯仿相的75.7%及蕨菜乙醇总提取物的72.7%(图1),明显高于石油醚相的34.2%。

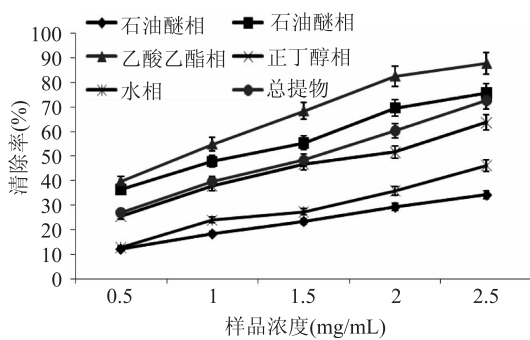


图1 蕨菜乙醇提取物不同萃取部位对超氧阴离子清除效果(n = 3)

Fig.1 The removing ratio to superoxide anion of different parts partitioned

from the ethanol extraction from *P.aquilinum*(n = 3)

正丁醇相的63.7%和水相的46.1%,清除超氧阴离子能力均低于相同浓度的总提取物,提示蕨菜乙醇提取物抗氧化活性成分主要集中在氯仿萃取部位和乙酸乙酯萃取位、通过分段萃取可获得活性高于总提取物的清除超氧阴离子有效部位。

### 2.3 清除羟自由基活性测定

蕨菜乙醇提取物各萃取部位清除羟自由基活性测定结果见图2。蕨菜乙醇提取物各萃取部位随浓度增加清除超氧阴离子活性增强。乙酸乙酯相活性明显高于其它各组分,当浓度低于2.0mg/mL时,随着浓度增加,对羟自由基的清除活性快速增加,当浓度超过2.0mg/mL,清除活性上升趋势较为平缓,在本实验条件下,2.5mg/mL的乙酸乙酯相,对超氧阴离子的清除率达91.7%,明显高于同浓度的氯仿相的75.3%及蕨菜乙醇总提取物的62.7%,石油醚相、正丁醇相和水相清除超氧阴离子能力均低于相同浓度的总体物,进一步提示蕨菜抗氧化成分主要集中在乙酸乙酯萃取部位和氯仿萃取位,通过萃取可以获得

活性明显提高有效部位。

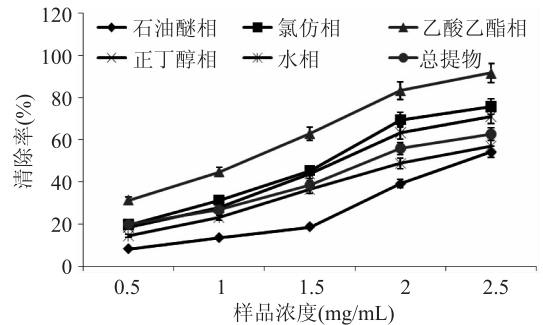


图2 蕨菜乙醇提取物不同萃取部位对羟自由基清除效果(n = 3)

Fig.2 The removing ratio to hydroxyl radical of different parts partitioned

from the ethanol extraction from *P.aquilinum*(n = 3)

### 2.4 蕨菜乙醇提取物不同萃取部位对两种自由基清除能力比较

为了更准确地评价样品间的抗氧化活性,常用清除率50%自由基时的溶液浓度IC<sub>50</sub>来比较。IC<sub>50</sub>越大抗氧化活性越小,反之越大。蕨菜乙醇总提取物及其萃取部位石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相、正丁醇相、水相清除超氧阴离子的IC<sub>50</sub>分别为:1.30、5.90、0.97、0.76、1.63、3.3mg/mL;对羟自由基活性的IC<sub>50</sub>值依次为:1.84、2.82、1.37、0.91、1.53、2.17mg/mL 乙酸乙酯相、氯仿相、总提取物对超氧阴离子清除的IC<sub>50</sub>值均小于对羟自由基清除的IC<sub>50</sub>值,而石油醚相、正丁醇相及水相的清除超氧阴离子的IC<sub>50</sub>值对羟自由基清除的IC<sub>50</sub>值,蕨菜乙醇提取物不同萃取部位对超氧阴离子及羟自由基清除能力明显不同。

### 2.5 HPLC-DAD 检测结果

分析各萃取部位的HPLC-DAD检出组分的200~400nm范围内的吸收光谱显示,大部分组分在254nm处有较强的吸收,近一半的组分在300nm后吸收很弱甚至没有吸收,因此,选择检测波长254nm检测各组样品的组分。蕨菜乙醇提取物及其不同萃取部位在254nm下测定结果见图3。对图3直观分析表明,石油醚相组分检出时间相对较长,大部分组分保留时间都在10~30min之间;氯仿相几乎可检测到乙醇总提取物的所有物质峰,但10min之后的物质峰按积分面积计为主峰;乙酸乙酯部位,在10min之前有12个主峰,而在10min后仅有5个小峰被检出;正丁醇相仅在前8min检测到5个峰;水相在前8min仅检测到4个峰。通过对各组分色谱图的直观分析可见:从石油醚相到水相,所萃取得到组分极性逐渐增大,且大极性组分主要集中在乙酸乙酯相,小极性组分主要集中在石油醚相。氯仿相几乎拥有石油醚

相和乙酸乙酯相所有组分峰。

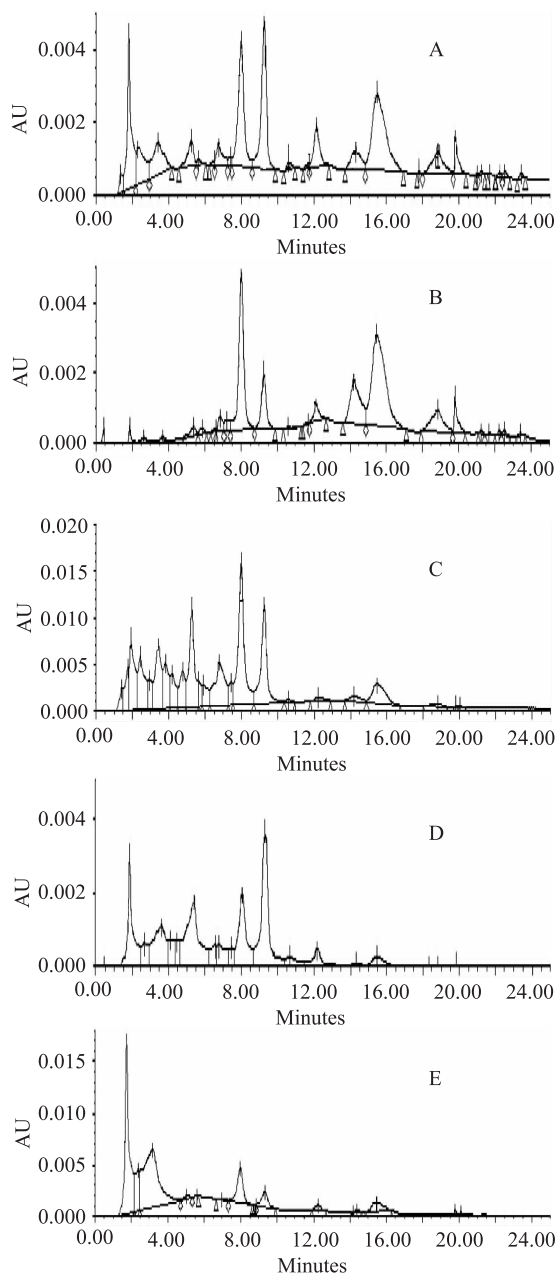


图3 蕨菜乙醇提取物各萃取部位组分 HPLC 检测结果

Fig.3 The results of HPLC analysis about different parts partitioned from the ethanol extraction from *P. aquilinum*

注: A:石油醚相; B:氯仿相; C:乙酸乙酯相;

D:正丁醇相; E:水相。

### 3 结论

蕨菜乙醇总提取物乙酸乙酯相、正丁醇相、总提取物、水相和石油醚相的黄酮含量与其清除自由基活性呈明显正相关,提示黄酮可能是蕨菜抗氧化活性的药效物质基础。氯仿相的黄酮含量以芦丁计仅为 $5.97\% \pm 0.87\%$ ,远低于正丁醇相的 $14.51\% \pm 2.66\%$ 、总提取物的 $13.32\% \pm 1.26\%$ 与乙酸乙酯相的 $29.31\% \pm 3.93\%$ ,然而,对超氧阴离子及羟自由基的清除活性分别为 $IC_{50} = 0.97、1.37\text{mg/mL}$ ,远低于正丁醇相的 $IC_{50} = 1.63、1.53\text{mg/mL}$ 与总提取物的 $IC_{50} = 1.30、1.84\text{mg/mL}$ ,氯仿相的清除自由基活性与其黄酮含量负相关,提

示黄酮可能不是蕨菜抗氧化活性的唯一药效物质基础,比起石油醚,这些非黄酮类抗氧化活性物质更易溶于氯仿中。

蕨菜乙醇不同萃取部位对两种自由基的清除作用大小并不一致:氯仿、乙酸乙酯、总提取物对超氧阴离子的清除活性大于其对羟自由基的清除活性,而石油醚相、正丁醇相和水相对羟自由基的清除活性较强,提示蕨菜中存在对超氧阴离子和羟自由基清除具有一定选择性的物质,这些选择性的抗氧化物质的在不同萃取部位的含量不同导致不同部位对羟自由基和超氧阴离子的清除作用表现出一定的选择性。

通过有机试剂分段萃取,黄酮含量可由总提取物的 $13.32\% \pm 1.26\%$ 提高到乙酸乙酯相的 $29.31\% \pm 3.93\%$ ,有效实现蕨菜黄酮的富集。体外清除超氧阴离子及羟自由基的活性也由总提取物的 $IC_{50}$ 分别为 $1.30、1.84\text{mg/mL}$ 降低到乙酸乙酯相的 $IC_{50}$ 分别为 $0.97、1.37\text{mg/mL}$ ,获得活性更强的有效部位,对进一步追踪蕨菜的药效物质基础及蕨菜质量标准制定、蕨菜深度开发奠定研究基础。

### 参考文献

- [1]安徽植物志协会组编.安徽植物志(第一卷)[M].北京:中国展望出版社.
- [2]闫鑫,李青旺.蕨菜总黄酮抗宫颈癌作用及机理研究[D].秦皇岛:燕山大学,2009.
- [3]陈乃富,谷仿丽,韩邦兴,等.蕨菜黄酮对高脂血症大鼠脂代谢的影响[J].中国中医药科技,2007,14(6):423-424.
- [5]陈乃富,张莉.蕨菜黄酮类化合物的提取与分析[J].中国林副特产,2004(6):1-4.
- [6]陈乃富.蕨菜茶的加工工艺研究[J].食品与发酵工业,2006,32(3):125-128.
- [7]陈乃富.蕨菜黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用[J].食品与发酵工业,2003,29(11):63-66.
- [8]Markham K R.The Flavonoids: Advances in Research Since 1980[M].Hapman and Hall,London,1988.
- [9]Voirin B. Recherches Chimiques, Taxinomiques et Physiologiques sur les Flavonoids des Pteridophytes[M].France: University of Lyon,Ph.D.thesis,1970.
- [10]Perato F.Kaempferol 3-O-(5'-feruloylapioside) from *Pteridium aquilinum*[J].Phytochemistry,1996,43(6):1421-1423.
- [11]Imperato F.Rhamnetin 3-O-laminaribioside from *Pteridium aquilinum*[J].Phytochemistry,1997,45(8):1729-1730.
- [12]Imperato F.Kaempferol 7-O-rhamnoside-4'-O-glucoside from *Pteridium aquilinum*[J].Phytochemistry,1998,47(5):911-913.
- [13]郑亚杰,张长弓,李晓斌.大孔吸附树脂分离纯化山楂总黄酮的研究[J].华中科技大学学报,2004,33(2):136-142.
- [14]陆志科,谢碧霞.大孔树脂对竹叶黄酮的吸附分离特性研究[J].经济林研究,2003,21(3):1-4.
- [15]韦霄,黄兴贤,蒋运生,等.3种金花茶组植物提取物的抗氧化活性比较[J].中国中药杂志,2011,36(5):639-631.
- [16]金鸣,蔡亚欣,李金荣,等.邻二萜菲- $Fe^{2+}$ 氧化法检测 $H_2O_2/Fe^{2+}$ 产生的羟自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553-536.
- [17]刘素艳,杨宇春,赵宏,等.银杏总黄酮含量的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,1999,30(11):513-514.