

32种云南蕨类植物中的总黄酮测定^{*}

方云山^{1,2}, 杨雪琼¹, 刘劲芸¹, 杨明惠¹, 太志刚¹, 一中涛¹

(1. 教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南大学化学科学与工程学院, 云南昆明 650091;

2. 昆明师范高等专科学校化学系, 云南昆明 650031)

摘要: 采用分光光度法, 以芦丁为标准品, 对 32 种云南蕨类植物中总黄酮进行了测定. 结果表明: 所研究的 32 种云南蕨类植物中均含有黄酮类化合物, 而且其中 18 种植物的总黄酮质量分数超过 3%, 总黄酮质量分数低于 1% 的仅有 6 种, 表明蕨类植物是黄酮类化合物的极好资源, 有待进一步开发利用.

关键词: 蕨类植物; 总黄酮; 分光光度法

中图分类号: Q 949.36, O 657.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)04-0401-04

蕨类植物现存约 12 000 种, 以热带、亚热带地区分布最广. 我国有 61 科, 223 属, 约 2 600 种, 其中可供药用的约 300 余种, 主要分布在华南及西南地区. 云南是中国蕨类植物资源最丰富的地区, 约有 1 500 种, 种数占全国的 57.7%, 特有种类达 200 余种. 我国用蕨类植物入药已有悠久的历史, 早在公元前 2 世纪左右的《神农本草经》中就已有记载^[1]. 药用蕨类植物具有舒筋活血、除湿镇痛、清热滑肠、止咳化痰、利尿安神、止血、驱虫、解毒、抗菌、抗癌、抗 HIV 等功效. 药用蕨类植物的成分主要有酚类化合物、黄酮类、生物碱类、甾体及三萜类化合物等^[2~6], 其中黄酮类化合物是蕨类植物中广泛存在的一类成分, 且多具有生理活性, 如清除自由基抑制亚油酸氧化, 在生理学、医学和营养学上均具有重要意义, 松弛血管痉挛、抗心肌缺血、降血脂、抗肿瘤、抑菌、保肝等活性^[7~9]. 同时蕨类植物中的黄酮类成分还具有一定系统学意义^[10]. 本文对采自云南省的 32 种蕨类植物的总黄酮质量分数进行了测定, 为云南蕨类植物资源的开发利用及进一步的深入研究提供指导和参考.

1 实验

1.1 仪器、样品与试剂 UV-VIS-PC2401 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 32 种蕨类

植物于 2006 年分别采自云南元阳县、麻栗坡县、屏边大围山、威信大雪山、彝良小草坝、广南坝美等地(表 1), 并经云南大学生命科学院陆树刚教授鉴定. 芦丁标准品(上海生物试剂厂)、NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH、无水乙醇等均为分析纯, 所用水为蒸馏水.

1.2 实验方法^[11, 12]

1.2.1 蕨类植物的提取 将采来的植物洗净、晒干、粉碎后, 用无水乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 提取液过滤、减压蒸干后, 放入真空干燥箱干燥备用.

1.2.2 溶液配制 蕨类植物粗提浸膏用无水乙醇超声溶解, 过滤, 配制成 0.2 mg/mL 的使用液. 0.2 mg/mL 的芦丁乙醇溶液; 5% 的 NaNO₂ 溶液; 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液; 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液.

1.2.3 标准曲线方程 分别取 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 的 0.2 mg/mL 芦丁标准溶液于 8 支 10 mL 的比色管中, 分别加入 0.3 mL 5% 的 NaNO₂ 溶液, 0.3 mL 的 10% Al(NO₃)₃ 溶液和 1.0 mol/L NaOH 溶液 4.0 mL, 定容至刻度, 摇匀. 以空白溶液作参比, 在 $\lambda = 510$ nm 处测吸光度. 绘制所含总黄酮质量 m (mg) - 吸光度 A 的标准曲线, 经线性回归, 得回归方程 $m = 8.3198 \times 10^{-3} + 0.761A$, 其线性范围为 0~0.6 mg, 相关系数 $r = 0.9998$.

* 收稿日期: 2007-11-21

基金项目: 国家自然科学基金和云南省自然科学基金联合资助项目(30560178); 云南大学校基金资助项目(2003Q008A).

作者简介: 方云山(1980-), 男, 云南人, 硕士, 主要从事分析化学方面的研究.

通讯作者: 丁中涛(1968-), 男, 云南人, 博士生导师, 教授, E-mail: ztding@ynu.edu.cn.

表 1 32 种云南蕨类植物样品总黄酮的质量分数
Tab. 1 Total flavonoid contents of 32 fern plants in Yunnan province

植物科属	植物名称	w (总黄酮) / %
乌毛蕨科, 狗脊蕨属	狗脊蕨 <i>Woodwardia japonica</i>	8. 70
乌毛蕨科, 狗脊蕨属	单芽狗脊 <i>Woodwardia unigemmata</i>	8. 38
乌毛蕨科, 苏铁蕨属	苏铁蕨 <i>Brainea insignis</i>	6. 48
鳞毛蕨科, 耳蕨属	密果耳蕨 <i>Polystichum pycnopterum</i>	3. 58
鳞毛蕨科, 耳蕨属	半育耳蕨 <i>Polystichum semifertile</i>	4. 94
鳞毛蕨科, 肉刺蕨属	有盖肉刺蕨 <i>Nothoperanema hendersonii</i>	5. 88
鳞毛蕨科, 鳞毛蕨属	联合鳞毛蕨 <i>Dryopteris conjugata</i>	5. 57
鳞毛蕨科, 鳞毛蕨属	近川西鳞毛蕨 <i>Dryopteris neorosthornii</i>	4. 31
水龙骨科, 节肢蕨属	单行节肢蕨 <i>Arthromeris wallichiana</i>	3. 39
水龙骨科, 石韦属	石韦 <i>Pyrrosia lingua</i>	3. 59
水龙骨科, 石韦属	庐山石韦 <i>Pyrrosia shearei</i>	4. 03
水龙骨科, 石韦属	绒毛石韦 <i>Pyrrosia subfurfuracea</i>	1. 81
水龙骨科, 水龙骨属	友水龙骨 <i>Polypodiodes amoena</i>	0. 94
水龙骨科, 水龙骨属	蒙自拟水龙骨 <i>Polypodiodes mengtzeense</i>	3. 74
水龙骨科, 瘤蕨属	光亮瘤蕨 <i>Phymatosorus cuspidatus</i>	5. 54
紫萁科, 紫萁属	紫萁 <i>Osmunda japonica</i>	2. 82
紫萁科, 紫萁属	分株紫萁 <i>Osmunda cinnamomea</i>	3. 35
紫萁科, 紫萁属	绒紫萁 <i>Osmunda clytoniana</i>	1. 16
瘤足蕨科, 瘤足蕨属	大瘤足蕨 <i>Plagiogyria maxima</i>	1. 05
瘤足蕨科, 瘤足蕨属	镰叶瘤足蕨 <i>Plagiogyria distinctissima</i>	0. 64
叉蕨科, 轴鳞蕨属	泡鳞轴鳞蕨 <i>Dryopsis mariformis</i>	4. 44
叉蕨科, 轴鳞蕨属	异鳞轴鳞蕨 <i>Dryopsis heterolaena</i>	5. 31
石杉科, 马尾杉属	椭圆叶马尾杉 <i>Phlegmariurus henryi</i>	2. 65
石杉科, 石杉属	皱边石杉 <i>Huperzia crispata</i>	2. 25
鳞始蕨科, 鳞始蕨属	鳞始蕨 <i>Lindsaea odorata</i>	0. 65
桫欏科, 白桫欏属	白桫欏 <i>Sphaeropteris brunoniana</i>	4. 73
铁角蕨科, 铁角蕨属	厚叶铁角蕨 <i>Asplenium griffithianum</i>	0. 41
金星蕨科, 钩毛蕨属	滇东南钩毛蕨 <i>Cyclogramma neoauriculata</i>	2. 54
凤尾蕨科, 凤尾蕨属	云南凤尾蕨 <i>Pteris yunnanensis</i>	0. 50
球子蕨科, 荚果蕨属	东方荚果蕨 <i>Matteuccia orientalis</i>	1. 31
蹄盖蕨科, 短肠蕨属	喜马拉雅短肠蕨 <i>Allantodia himalayensis</i>	0. 56
骨碎补科, 阴石蕨属	半圆盖阴石蕨 <i>Humata platylepis</i>	5. 78

1.2.4 样品的测定 在10 mL比色管中加入0.2 mg/mL的待测样品的乙醇液5 mL,再分别加入0.3 mL 5%的NaNO₂溶液,0.3 mL 10%的Al(NO₃)₃溶液,及1.0 mol/L的NaOH溶液4.0 mL,定容至10 mL.摇匀,用空白溶液作参比.在λ=510 nm处测吸光度.

植物样品中总黄酮质量分数(以芦丁计,%) =

$$\frac{m_1 m_3 V_1}{m_2 m_4 V_2} \times 100$$

式中: m_1 为所测样品液中的总黄酮量(mg); m_2 为配制样品使用液时所称粗提浸膏质量(mg); m_3 为粗提浸膏总量(g); m_4 为植物样品总干重(g); V_1 为配制的样品溶液总体积(mL); V_2 为测量时所取样品溶液体积(mL).

1.2.5 加标回收实验 取4支10 mL比色管,分别加入2 mL 0.3 mg/mL的乙醇样品溶液,在其中3份中分别加入0.5 mL的0.2 mg/mL的标准溶液,然后再在4支比色管中分别加0.3 mL 5% NaNO₂溶液,0.3 mL 10%的Al(NO₃)₃溶液,及1.0 mol/L的NaOH溶液4.0 mL,定容至10 mL,摇匀.用空白溶液作参比.在λ=510 nm处测吸光度.

回收率(%) = [测得总量/(样品含量+加标量)] × 100

2 结果与讨论

所研究32种蕨类植物中涉及15科,22属.从表1可看出,黄酮类化合物普遍存在于蕨类植物中,但不同蕨类植物中,总黄酮的质量分数明显不同.在所测试的样品中,质量分数最高的是狗脊蕨(*Woodwardia japonica*),达到了8.70%.质量分数

最低的是厚叶铁角蕨(*Asplenium griffithianum*),仅为0.410%.蔡建秀等曾对22种福建产蕨类植物的总黄酮质量分数进行了研究^[12],发现鳞始蕨科植物乌蕨(*Stenoloma chusans*)的地上部分的黄酮质量分数高达34.24%.本研究测定了其同科植物鳞始蕨(*Lindsaea odorata*)中总黄酮质量分数,仅为0.65%.福建产狗脊蕨地上和地下部分的黄酮质量分数分别为3.045%和2.774%,石韦(*Pyrrosia lingua*)的黄酮质量分数为2.188%.而云南产狗脊蕨的黄酮质量分数达8.70%,石韦的黄酮质量分数为3.59%.表明植物的生长环境不同,其黄酮质量分数也有明显差异.综合文献报道和本研究结果,初步可以看出乌毛蕨科、鳞毛蕨科、水龙骨科、叉蕨科植物中黄酮含量相对丰富,而凤尾蕨科、铁角蕨科、瘤足蕨科植物中黄酮含量相对较低.

从银杏叶、桑叶中提取的总黄酮制成的药用片剂或针剂在临床上已广泛应用,显示较好的疗效,其中银杏叶黄酮质量分数在2.5%~5%(干重)之间,桑叶黄酮质量分数在1%~3%(干重)之间.在测定的32个样品中,有18个种的总黄酮质量分数超过3%,总黄酮质量分数低于1%的仅有6种,表明蕨类植物是黄酮类化合物的极好资源.

3 加标回收率

选择了部分样品进行了加标回收实验,以考察测定方法及结果的可靠性.平均加标回收率测定结果见表2.从测定的结果看,测定样品的平均加标回收率在96.7%~102%之间,标准偏差在1.2%~2.9%之间,表明测定方法可靠,测定结果可信.

表2 加标回收率的测定结果(n=3)

Tab. 2 The recovery of total flavonoids in some fern plants

样品名称	原样品液中 总黄酮量/mg	加标后总平均 黄酮量/mg	平均回收 率/%	RSD/%
狗脊蕨 <i>Woodwardia japonica</i>	0.31	0.42	102	2.6
单芽狗脊 <i>Woodwardia unigemmata</i>	0.36	0.46	100	2.1
苏铁蕨 <i>Brainea insignis</i>	0.27	0.36	97.2	1.9
有盖肉刺蕨 <i>Nothoperanema hendersonii</i>	0.32	0.42	100	1.2
异鳞轴鳞蕨 <i>Dryopsis heterolaena</i>	0.20	0.29	96.7	2.9

参考文献:

- [1] 吴征镒. 新华本草纲要[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [2] 何春霞, 苏力坦, 阿巴白克力. 蕨类植物生物活性成分研究进展[J]. 中成药, 2007, 29(5): 736-740.
- [3] YONATHAN M, ASRES K, ASSEFA A, et al. In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinose* [J]. J Ethnopharmacology, 2006, 108: 462-470.
- [4] CHEN Y H, CHANG F R, LIU Y J, et al. Identification of phenolic antioxidants from sword brake fern (*Pteris enformis* Burm) [J]. Food Chemistry, 2007, 105: 48-56.
- [5] REDDY V L N, RAVIKANTH V, RAO T P, et al. A new triterpenoid from the fern *Adiantum lunulatum* and evaluation of antibacterial activity [J]. Phytochemistry, 2001, 56: 173-175.
- [6] LAM T L, LAM M L, AU T K, et al. A comparison of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibition activities by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs [J]. Life Sciences, 2000, 67(23): 2889-2896.
- [7] 马云峰, 尚富德. 黄酮类化合物在药用植物中的分布 [J]. 生物学杂志, 2003, 20(1): 35-39.
- [8] PATEL R P, BOERSMA B J, CARWFORD J H, et al. Antioxidant mechanism of isoflavones in liquid system: paradoxical effects of peroxy radical scavenging [J]. Free Radical Biol Med, 2001, 31(12): 1570-1581.
- [9] 袁静, 肖东, 顾振纶. 槲皮素抗肿瘤作用研究进展 [J]. 国外医药- 中医中药分册, 1996, 18(5): 3-5.
- [10] 周铜水. 蕨类植物的黄酮类成分及其系统学意义 [J]. 武汉植物学研究, 1989, 17(4): 377-382.
- [11] 孟宪纾. 中成药分析 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [12] 蔡建秀, 吴文姍, 吴凌云, 等. 22 种药用蕨类植物的总黄酮质量分数研究 [J]. 福建师范大学学报, 2000, 16(4): 63-66.

Total flavonoid contents of 32 kinds of fern plants in Yunnan Province

FANG Yun-shan^{1,2}, YANG Xue-qiong¹, LIU Jing-yun¹,
YANG Ming-hui¹, TAI Zhi-gang¹, DING Zhong-tao¹

(1. Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Nature Resource, Ministry of Education, School of Chemical Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China;
2. Department of Chemistry, Kunming Teachers College, Kunming 650031, China)

Abstract: The total flavonoid contents of 32 kinds of fern plants in Yunnan Province was determined by spectrophotometry. The results showed that the fern plants contained flavonoids, and the total flavonoids contents were different for the various ferns. The total flavonoid contents of 18 among the 32 kinds of fern plants were beyond 3%, which indicated that fern is a good resource of flavonoids, and it is necessary to study its chemical constituents and pharmacology.

Key words: fern; total flavonoids; spectrophotometry