

野菊花总黄酮提取方法比较及其抗氧化活性研究

孟庆云², 符玲^{1#}, 高振¹, 尹芬¹, 姚寒春¹, 毕跃峰^{1*}

1. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450001

2. 郑州市疾病预防控制中心, 河南 郑州 450007

摘要: **目的** 研究不同提取工艺的野菊花中总黄酮的量及其抗氧化活性。**方法** 采用经典回流提取法、超声提取法、组织破碎提取法提取野菊花中黄酮类成分, 以芦丁为对照品, 通过紫外-可见分光光度法测定黄酮类成分的量, 并用流动注射化学发光法测定野菊花中黄酮类成分的抗氧化活性。**结果** 经典回流提取法、超声提取法、组织破碎提取法所提取的总黄酮的量分别为 12.60、11.02、10.95 mg/g, 采用流动注射化学发光法测得 3 种不同提取方法的总黄酮提取物的 IC₅₀ 分别是 2.67、3.43、5.13 μg/mL。**结论** 经典回流提取法提取得到的野菊花总黄酮的量最高, 且抗氧化活性最强, 说明野菊花中总黄酮的量和抗氧化活性具有一致性。

关键词: 野菊花; 黄酮; 抗氧化活性; 流动注射化学发光法; 回流提取法; 超声提取法; 组织破碎提取法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)21-3194-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.012

Comparison on different extraction processes of total flavonoids in *Chrysanthemum indicum* and its anti-oxidant effect

MENG Qing-yun², FU Ling¹, GAO Zhen¹, YIN Fen¹, YAO Han-chun¹, BI Yue-feng¹

1. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

2. Zhengzhou Center for Diseases Control and Prevention, Zhengzhou 450007, China

Abstract: Objective To study three different extraction processes of the content of total flavonoids in *Chrysanthemum indicum* and their anti-oxidant activities. **Methods** The reflux, ultrasonic, and tissue-breaking methods were used for extracting the total flavonoids from *C. indicum*, which were determined by UV spectrophotometry, and the anti-oxidant activity was determined by flow injection chemiluminescence. **Results** The contents of total flavonoids obtained using various methods, such as reflux, ultrasonic, and tissue-breaking, were 12.60, 11.02, and 10.95 mg/g, and their IC₅₀ were 2.67, 3.43, and 5.13 μg/mL, respectively. **Conclusion** The research indicates that the reflux extraction method is applied to isolating the total flavonoids from *C. indicum*, with the advantage of high extraction efficiency, and the total flavonoids show the strong anti-oxidant activity.

Key words: *Chrysanthemum indicum* L.; flavonoid; anti-oxidant activity; flow injection chemiluminescence; reflux method; ultrasonic method; tissue-breaking method

野菊花 *Chrysanthemi Indici Flos* 是菊科 (Compositae) 菊属 *Chrysanthemum* L. 植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 具有清热解毒、清肝明目的功效^[1], 临床主要用于清热、

抗菌、抗炎、抗病毒、降血压^[2], 主要活性成分为挥发油类、倍半萜类、黄酮类等化合物。

氧自由基的存在和活动是许多代谢紊乱的重要诱因, 进而引起生物体内各种疾病的产生, 如心脑血管

收稿日期: 2015-09-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30973872); 河南省基础与前沿科学研究项目 (09230041010); 河南省重点科技公关计划项目 (122102310085); 河南省教育厅课题 (基础与前沿) (12B360020)

作者简介: 孟庆云 (1970—), 博士。Tel: 15939023630 E-mail: qingyunm111@163.com

符玲 (1978—), 博士在读, 讲师。Tel: 13673629566 E-mail: fuling1011@126.com

*通信作者 毕跃峰, 女, 博士后, 教授, 研究生导师, 研究方向为天然药物化学及天然健康产品研究开发。

Tel: 13939091607 E-mail: 2000byf@sina.com

#并列第一作者

血管疾病、癌症、糖尿病^[3]、白内障^[4]，预防和治疗这些疾病可以采用向机体补充抗氧化剂的办法来进行，黄酮类成分是目前国内外公认的具有抗氧化活性的成分之一。建立一种灵敏可靠的野菊花总黄酮抗氧化活性的测定方法对其药用资源的开发和利用十分重要。目前，野菊花总黄酮抗氧化活性的测定方法主要有1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、邻苯三酚自氧化法、羟基自由基清除能力法等^[5]。化学发光法具有灵敏度高、操作简便、测定快速等优点，已被广泛地应用于抗氧化活性的测定^[6]。目前，关于化学发光法测定野菊花中总黄酮抗氧化活性的研究未见报道。

前期采用经典回流提取法、超声提取法、组织破碎提取法3种不同提取方法对野菊花中总黄酮指标成分蒙花苷和木犀草素的提取工艺进行了研究^[7]，本实验在前期根据野菊花中有效成分的量优选的提取工艺条件基础上，采用流动注射发光法测定了野菊花中黄酮类成分的抗氧化活性，并考察了野菊花中总黄酮的量以及主要的黄酮类指标成分蒙花苷和木犀草素的量和抗氧化活性的关系，建立了其抗氧化活性评价方法，优选了野菊花中抗氧化活性部位的最佳提取方法，为下一步合理开发和利用野菊花药材资源中黄酮类成分提供参考。

1 仪器与材料

UV-2500 紫外-可见分光光度计，日本岛津；IFFM-D 型流动注射化学发光仪，西安瑞迈电子科技有限公司，蠕动泵，六通阀，聚四氟乙烯管；IFFS-A 型多功能化学发光检测器，西安瑞迈电子科技有限公司；RE-52AA 旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；SHZ-DIII 型循环水式真空泵，巩义市予华仪器公司；KQ-300DE 型超声清洗机，昆山市超声仪器有限公司；闪式提取器，北京金鼎科技发展有限公司；电热套，河南铭骏仪器仪表有限公司。

野菊花采自河南省信阳市，由郑州大学潘成学副教授鉴定为菊科菊属植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序，标本保存于郑州大学药学院标本馆。75%乙醇、2 mol/L KOH 溶液、10 mmol/L 鲁米诺储备液（用时以 KOH 溶液稀释配制）、5 mmol/L 铁氰化钾储备液、维生素 C (VC) 标准品（批号 91184，质量分数 >98%），购于上海源叶生物科技有限公司；芦丁对照品购于中国食品药品检定研究院，批号为 100080-200306，质量分数 >98%；所用试剂均为分析纯；水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 野菊花中黄酮类成分的提取

2.1.1 回流提取法 称取野菊花药材 40 g 于圆底烧瓶中，加沸石，浸泡 20 min，用 75%乙醇溶液 320 mL，加热回流 60 min，提取 3 次，滤过，合并滤液，浓缩得浸膏，干燥称质量为 16.85 g，得膏率 42.12%。

2.1.2 超声提取法 称取野菊花药材粉末 40 g 于锥形瓶中，加入 320 mL 75%乙醇溶液，浸泡 20 min，利用超声波清洗机超声提取 3 次，提取时间为 30 min，提取 3 次，滤过，合并滤液，浓缩得浸膏，干燥称质量为 16.63 g，得膏率为 41.57%。

2.1.3 组织破碎提取法 称取野菊花药材粉末 40 g，加入 75%乙醇溶液 320 mL，浸泡 20 min，利用闪式提取器进行组织破碎提取 2 min，提取 3 次，每次滤过前静置平衡 10 min，合并滤液，浓缩得浸膏，干燥称质量为 16.84 g，得膏率为 42.10%。

2.2 野菊花提取物中总黄酮的测定

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取 5 mg 芦丁对照品，置于 25 mL 量瓶中，加 75%乙醇使其溶解，稀释至刻度，摇匀备用。

2.2.2 供试品溶液的配制 分别称取 3 种提取方法提取得到的浸膏 0.5 g，置于 25 mL 量瓶中，加入 75%乙醇溶解，稀释至刻度，摇匀备用。

2.2.3 最大吸收波长的选择 野菊花提取物溶液中移取样品液 0.1 mL 置于 10 mL 比色管中，用 1% AlCl₃ 溶液定容至刻度。以 1% AlCl₃ 溶液为参比液，在 400~800 nm 扫描，得到其吸收光谱，最大吸收波长为 420 nm。

移取上述芦丁对照品溶液 1 mL 置于 10 mL 比色管中，1% AlCl₃ 溶液定容至刻度。以 1% AlCl₃ 溶液为参比液，在 400~800 nm 扫描，最大吸收波长为 420 nm。

2.2.4 线性关系的考察 准确吸取芦丁对照品溶液 0、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75 mL，分别置于 10 mL 比色管中，用 1% AlCl₃ 溶液定容至刻度，以 1% AlCl₃ 溶液为参比液，在 420 nm 波长处分别测定其吸光度 (A) 值，求得 A 值与质量浓度 (C) 关系的回归方程 $A=41.218 C-0.006 2$ ， $r^2=0.998 9$ 。结果表明芦丁对照品在 0.005~0.04 mg/mL 与 A 值呈良好的线性关系。

2.2.5 稳定性试验 取对照品及 3 种不同方法提取的供试品溶液于室温分别放置 0、5、10、15、20、30 min 后，测定 A 值，RSD 分别为 0.1%、0.18%、

0.1%、0.16%。结果表明对照品溶液及样品溶液在30 min内稳定。

2.2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液适量,按“2.2.4”项下方法操作,连续测定6次,RSD为0.18%,结果表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 另取野菊花药材粉末40 g共18批,分别按照“2.1.1”“2.1.2”和“2.1.3”项下的方法各提取测定6批,3种方法的RSD值均小于3%,结果表明方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 分别精密移取160、180、200 μL质量浓度分别为0.85、0.53、0.52 mg/mL的3种样品储备液于10 mL比色管中,再分别精密加入芦丁对照品溶液,按“2.2.2”和“2.2.4”项下方法进行制备及测定,并计算回收率,3种不同提取方法的平均回收率分别为104.90%、98.22%、95.83%,RSD值分别为0.88%、1.52%、1.16%。

2.2.9 样品测定 精密移取3种提取方法的样品储备液,按“2.2.2”和“2.2.4”项条件进行制备与定量测定,分别计算野菊花总黄酮的量,结果回流提取法、超声提取法、组织破碎提取法得到提取物中总黄酮的量分别为12.60、11.02、10.95 mg/g。

2.3 流动注射化学发光法测定野菊花中黄酮类成分的抗氧化活性

实验流路如图1所示,在比色管中加入50 μmol/L鲁米诺溶液、0.2 mol/L KOH溶液、30 μmol/L铁氰化钾溶液,鲁米诺溶液(KOH溶液配制)经a通道、水作为载流经b通道一起进入,铁氰化钾溶液经c通道(副下内通道)、样液经d通道(副下外

通道)一起进入混合器,之后四者混合,发生化学反应,发光检测器检测发光信号,测定3次,取峰值平均值进行定量,发光强度以计数表示。以水作为空白对照(已去除乙醇溶液对体系的影响),测定空白对照实验的发光强度为 I_0 ,加入样品溶液后测定的发光强度为 I ,用以下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (I_0 - I) / I_0$$

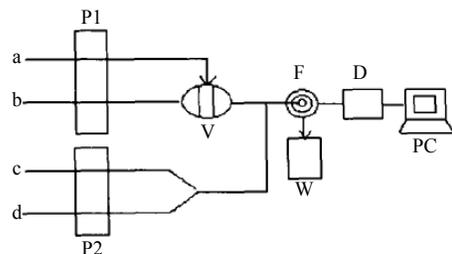
以 IC_{50} 值来比较清除·OH能力的大小,以VC标准品作为阳性对照,相同条件下比较其与样品溶液的抑制率的大小。

为了筛选和寻找最佳的流动注射化学发光的条件,采用控制变量法考察了鲁米诺体系、铁氰化钾浓度、KOH浓度对体系的影响,确定鲁米诺的浓度50 μmol/L、铁氰化钾溶液浓度30 μmol/L、KOH浓度0.2 mol/L为最佳的流动注射化学发光的条件。

在浓度为50 μmol/L的鲁米诺溶液和30 μmol/L的铁氰化钾溶液以及0.2 mol/L KOH溶液的条件下,配制在1~100 μmol/L的一系列浓度的样品溶液,采用流动化学发光法测得总黄酮的抗氧化活性。结果见表1。

表1 野菊花不同提取工艺总黄酮提取物的抗氧化活性
Table 1 Anti-oxidant effect of total flavonoids extracts obtained by three different extraction processes

提取工艺	$IC_{50}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
回流提取法	2.67
超声提取法	3.43
组织破碎提取法	5.13
VC	2.16



a-鲁米诺溶液 b-载流(水) c-铁氰化钾溶液 d-样品溶液 P1、P2-蠕动泵 V-六通阀 F-流通池 W-废液池 D-发光检测器 PC-计算机
a-Luminol solution b-load flow (water) c-iron potassium cyanide solution d-sample solution P1 and P2-peristaltic pumps V-six-way injection valve F-circulating pool W-waste liquid pool D-luminescence detector PC-computer

图1 系统的流动注射化学发光流路示意图

Fig. 1 Schematic diagram of flow injection chemiluminescence system

3 讨论

前期研究^[8]中,野菊花药材RP-HPLC指纹图谱研究表明蒙花苷和木犀草素色谱峰是野菊花中黄酮类化合物的特征峰,且两者的量相对较高,可以作为野菊花总黄酮中的指标成分,蒙花苷和木犀草素具有多种药理功效,其中抗氧化活性是其主要功效之一。文献研究表明薄荷中含有的蒙花苷^[9]和淫羊藿中含有的木犀草素^[10]均具有抗氧化活性,故两者可以作为野菊花总黄酮中的目标成分及有效成分。前期研究^[7]以蒙花苷和木犀草素的量为指标,进行3种不同提取工艺的优选,表明加热回流提取法优于组织破碎提取法和超声提取法。综合前期化学成分研究结果和提取工艺研究结果,野菊花中总黄酮的抗氧化实验也同样采取了这3种提取工艺,结果

表明加热回流提取法得到的总黄酮的量最高,且抗氧化活性最强,这一结果正好和前期根据黄酮类化学成分进行工艺优选的结果相吻合,也再次说明了蒙花苷和木犀草素是野菊花药材中抗氧化活性的主要物质基础。

本研究以野菊花抗氧化活性为着手点,一方面采用经典回流提取法、超声提取法、组织破碎提取法考察了野菊花黄酮类成分的提取工艺,另一方面用流动化学发光法对野菊花中黄酮类成分进行抗氧化活性测定,采用野菊花中黄酮类成分的流动注射化学发光分析方法,考察了黄酮类成分和抗氧化活性的关系。研究表明,经典回流提取法得到的野菊花总黄酮的量最高,且抗氧化活性最强,说明野菊花中的总黄酮的量和抗氧化活性具有一致性,丰富了野菊花的基础研究,为野菊花药材的开发和应用提供参考。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 黄森. 氧自由基与糖尿病发病机制 [J]. 实用临床医学, 2006, 7(4): 146-147.
- [4] 胡建章. 自由基与白内障的关系研究进展 [J]. 国外医学: 眼科学分册, 2003, 27(1): 45-49.
- [5] 曹小燕, 杨海涛. 野菊花总黄酮清除自由基的活性研究 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 307-309.
- [6] 樊雪梅, 王书民. 流动注射化学发光法测定水杨酸 [J]. 分析化学, 2010, 38(12): 1839.
- [7] 毕跃峰, 符玲. 不同野菊花提取物中蒙花苷和木犀草素的含量测定比较 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1797-1799.
- [8] 毕跃峰, 符玲. 不同市售野菊花药材的 RP-HPLC 指纹图谱 [J]. 郑州大学学报: 理学版, 2010, 42(4): 92-94.
- [9] 徐晶晶, 刘斌. 基于 DPPH、FRAP 法的薄荷药材抗氧化谱效关系研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(6): 405-410.
- [10] 冯育林, 张武岗, 孙丽仁, 等. HPLC 法测定杏香兔耳风中原绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 513-514.