

几种开封观赏菊中总黄酮的研究

杨浩¹, 郭允², 郭猛¹, 袁琦¹, 蒲晓辉^{1*}

(1. 河南大学药学院, 河南 开封 475004; 2. 郑州市卫生学校, 郑州 450005)

[摘要] **目的:** 确定开封观赏菊中总黄酮的最佳提取工艺及其在不同品种与部位中含量的差异。**方法:** 以紫外分光光度法测定总黄酮的含量为指标, 首先对微波法和超声波法提取工艺进行比较, 考察提取时间、料液比、乙醇浓度等实验条件对3种开封观赏菊中总黄酮提取率的影响; 然后采用最佳的提取工艺方法, 考察开封观赏性大立菊的花、茎、叶中总黄酮含量的差异。**结果:** 超声波法提取效率高, 最佳提取工艺条件为乙醇浓度80%, 料液比1:25, 提取时间30 min。总黄酮在20~70 mg·L⁻¹线性关系良好, 平均加样回收率97.5%, RSD 1.81%, 3种菊花中紫悬崖菊花的总黄酮含量最高, 大立菊的总黄酮含量最低; 其中大立菊花中的黄酮含量最高, 叶中的黄酮含量次之, 茎中的黄酮含量最低。**结论:** 超声波法提取效率高, 稳定性好, 可作为观赏菊中总黄酮的最佳提取方法, 紫外分光光度法测定总黄酮的含量测定方法简单快速、准确可靠, 稳定性好, 为观赏性菊的质量控制研究提供更多的参考。

[关键词] 开封观赏菊; 总黄酮; 超声波法; 微波法; 紫外-可见分光光度法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0078-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150078

Study on Total Flavonoid from Kaifeng Ornamental Chrysanthemum

YANG Hao¹, GUO Yun², GUO Meng¹, YUAN Qi¹, PU Xiao-hui^{1*}

(1. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Zhengzhou Health School, Zhengzhou 450005, China)

[Abstract] **Objective:** To select the perfect method of extracting technology of total flavonoid from Kaifeng Ornamental chrysanthemum and to find differences of content from different parts. **Method:** Using total

[收稿日期] 20140115(017)

[基金项目] NSFC-河南省人才培养联合基金项目(U1304826)

[第一作者] 杨浩, 学士, 实验师, 从事药物分析及中药分析研究, Tel:0371-23880680, E-mail: yanghao@henu.edu.cn

[通讯作者] *蒲晓辉, 博士, 副教授, 从事药物新剂型及其质量研究, Tel:0371-23880680, E-mail: pgh425@163.com

[2] 王如峰, 安燕南, 袁铭, 等. HPLC 指纹图谱法评价市售胖大海的质量一致性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17):73.

[3] 吴南. 一种测定食品中黄曲霉毒素快速、经济的薄层色谱法[J]. 国外医学:卫生学分册, 1993(1):97.

[4] 江涛, 柳楨, 郑佳, 等. 总黄曲霉毒素 ELISA 定量检测方法的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(4):292.

[5] 梁雄宇, 黄义活, 麦浪. 小微粒色谱柱-高效液相色谱紫外检测器法测定花生中黄曲霉毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3):701.

[6] 郑荣, 毛丹, 王柯, 等. HPLC 法测定中药中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25

(6):610.

[7] 韦日伟, 杨小丽, 仇峰, 等. 免疫亲和柱净化-在线柱后光化学衍生-HPLC-FLD 同时测定甘草中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 和赭曲霉毒素 A 的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17):2342.

[8] 陈娟, 肖丽恒. 羊乳以及羊奶粉中黄曲霉毒素 M₁ 和黄曲霉毒素 B₁ 的 HPLC 柱后衍生生化法检测[J]. 中国民族民间医药, 2013, (13):33.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010.

[10] 李娜, 高昂, 巩江, 等. 胖大海药学研究概况[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16):9609.

[责任编辑 顾雪竹]

flaconoids content as indicator, firstly studying and selecting the the optimum extraction technology from microwave and ultrasonic by extraction time, solid-liquidratio and ethanol concentration. Then the total flaconoids content of Ornamental Kaifeng Chrysanthemum Dali flowers, leaves, stems were extracted by the optimum extraction technology and determined with UV-Vis spectrophotometry. **Result:** The optimized extraction technology of ultrasonic method was extraction time 30 min, solid-liquid ratio 1:25 and ethanol concentration 80%. The total flavonoids content showed a linear range of 20-70 mg·L⁻¹, the average recoveries of the total flaconoids content was 97.5%, RSD was 1.81%. Among the three kinds of chrysanthemum, Purple Chrysanthemum cliff was the highest content of total flavonoids and Dali Chrysanthemum was the lowest. The content of total flavonoids was the highest in Dali Chrysanthemum flowers, second in leaves, and the lowest in stems. **Conclusion:** The method of ultrasonic is high efficiency and stability, which can be the best method of extracting technology of total flavonoid from Ornamental Chrysanthemum, the UV-Vis is very simple, quick, accurate, reliable and stability, which can provide more reference for studying the quality control of Ornamental Chrysanthemum.

[**Key words**] Kaifeng Ornamental Chrysanthemum; total flavonoids; ultrasonic method; microwave; UV-Vis spectrophotometry

菊花具有疏风、清热、明目、解毒之功效^[1]。黄酮类化合物是其主要有效成分^[2-5],除具有抗菌、消炎、抗突变、降压、清热解毒、镇静、利尿等作用外,在抗氧化、抗癌、防癌、抑制脂肪酶等方面也有显著效果^[5],是一种重要的具有开发前景的天然有机抗氧化剂^[6-7]。

有关野菊花、怀菊花、嘉白菊等菊花中黄酮类物质提取工艺的研究已有报道,但国内外对开封观赏性菊的药用研究报道不多,曾有文献对其抗氧化活性^[8-9], α -葡萄糖苷酶抑制活性^[10]以及脂溶性成分^[11-13]进行研究。观赏性菊往往在无观赏价值时被抛掉,作者考虑将其作为中药材加以利用,以便有效地开发和扩大中药材资源,对其总黄酮成分含量进行初步考察,为下一步对其深入研究提供实验依据。采用有机溶剂浸泡并结合微波法和超声波法提取菊花中总黄酮的方法,并通过单因素试验确定总黄酮的最佳提取工艺,然后采用超声波法比较3种开封观赏性菊花与怀菊花中总黄酮的含量,同时还对大立菊不同部位的总黄酮含量进行比较,为观赏性菊药用价值的深入研究奠定基础,为其后续的开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 UV-1600型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州长城科贸工有限公司),AS3120型超声波清洗器(天津奥特赛恩仪器有限公司),SB-1100型水浴锅(上海爱朗仪器有限公司),BP211D型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),Sartorius BSA2202S型电子天平(上海民桥精密科学仪器有

限公司)。

1.2 试剂 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号100080-200707),观赏性菊(开封市园林菊花研究所菊花基地赠送),怀菊花(购自焦作市国控大药房),以上各种菊由河南大学药学院中药教研室李钦教授鉴定均为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat 的干燥头状花序。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析方法的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品0.0150 g,置于50 mL量瓶中,加70%乙醇溶解,定容至刻度,振荡摇匀,配制成0.2102 g·L⁻¹的对照品溶液,备用。

2.1.2 测定波长的选择 精密量取芦丁对照品溶液2 mL,置10 mL量瓶中,加5% NaNO₂溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min加10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min加4% NaOH溶液4 mL,再用30%乙醇液稀释至刻度,摇匀,放置10 min后置比色皿中,在波长400~600 nm测定吸收谱,确定最大吸收波长为510 nm。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取样1 g供试品粉末,置于锥形瓶中,加80%乙醇25 mL,超声振荡30 min,抽滤,用80%的乙醇洗涤滤渣3次,将滤液转移至100 mL量瓶,滤瓶用80%乙醇洗涤3次,加80%乙醇定容至刻度,振荡摇匀,作为供试品溶液。

2.1.4 稳定性考察 精密量取3份芦丁对照品溶液,每份2 mL,分别置3个10 mL量瓶中,按**2.1.2**

项下的方法操作,每隔 10 min 于 510 nm 测定其吸光度,观察其吸光度变化情况,结果如表 1,根据吸光度变化确定最佳测定时间为显色后 1.5 h。

表 1 芦丁对照品溶液的吸光度变化

t/min	A1	A2	A3	\bar{A}
10	0.482	0.481	0.483	0.482
20	0.476	0.473	0.475	0.475
30	0.472	0.471	0.472	0.472
60	0.470	0.468	0.469	0.469
90	0.475	0.474	0.475	0.475
120	0.475	0.475	0.475	0.475
150	0.441	0.444	0.443	0.443
180	0.423	0.420	0.422	0.422

2.1.5 标准曲线的绘制 精密吸取芦丁对照品溶液 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 3.5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加 50 g·L⁻¹ NaNO₂ 溶液 0.3 mL,振荡摇匀,放置 6 min,加 100 g·L⁻¹ Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,振荡摇匀,放置 6 min,再加 40 g·L⁻¹ NaOH 溶液 4 mL,振荡摇匀,用 30% 乙醇定容至刻度,振荡摇匀^[14],放置 1.5 h 后采用紫外分光光度法在 510 nm 处测定吸光度,以对照品质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.116 X - 0.009$ ($r = 0.9996$)。

2.1.6 精密度试验 精密吸取芦丁对照品溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中,加体积分数为 30% 乙醇定容至刻度,再从中吸取 3 mL 置另一 10 mL 量瓶中,按 2.1.2 项下操作,放置 1.5 h 后测其吸光度,重复测定 5 次,得吸光度平均值为 0.364, RSD 0.19%。

2.1.7 重复性试验 分别精密称取大立菊花 1.0 g 各 5 份,按 2.1.3 项下方法制备待测液,并按 2.1.5 项操作,放置 1.5 h 后测其吸光度,得黄酮质量分数的平均值 8.58%, RSD 1.00%。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取大立菊花粉末 0.24, 0.20, 0.16 g, 大立菊叶粉末 0.41, 0.34, 0.27, g, 茎粉末 4.00, 3.33, 2.66 g 各 3 份置于锥形瓶中,分别加入芦丁对照品 0.015 g,按 2.1.3 项下方法制备待测液,并按 2.1.5 项下操作,放置 1.5 h 后测其吸光度,大立菊花中黄酮质量分数按 8.58% 计算,平均回收率及 RSD 见表 2。

2.1.9 样品中总黄酮的测定 精密吸取供试样品溶液 3 mL 置 10 mL 量瓶中,用体积分数为 30% 乙醇定容至刻度,精密吸取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,按 2.1.5 项下自加 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL 起至再用体积分数为 30% 乙醇液稀释至刻度,摇匀,放置 1.5 h

表 2 大立菊花、叶、茎部位总黄酮的提取回收率

测定部位	浓度级别	回收率/%	平均值/%	RSD/%
菊花	低	97.8	97.5	1.81
	中	97.2		
	高	97.6		
菊叶	低	98.0	98.5	0.81
	中	98.4		
	高	99.1		
菊茎	低	97.2	97.4	1.12
	中	97.0		
	高	97.9		

后测其吸光度,每种样品平行操作 3 份,结果见表 3。

表 3 3 种菊花与怀菊中黄酮质量分数的比较

品名	取样量/g	含量/%	平均值/%	RSD/%
怀菊花	1.003 0	6.65	6.67	0.30
	1.018 0	6.67		
	1.019 4	6.69		
紫悬崖菊	1.020 8	9.13	9.14	0.19
	1.024 0	9.16		
	1.000 3	9.13		
线菊	0.997 7	8.88	8.89	0.17
	1.006 7	8.91		
	1.002 2	8.90		
大立菊	1.000 1	7.61	7.63	0.26
	1.002 6	7.65		
	0.998 7	7.63		

2.2 菊花中总黄酮的提取方法筛选

2.2.1 微波法 将菊花粉碎,精密称取 1.00 g 菊花粉末于 50 mL 锥形瓶中,加入乙醇微波处理,趁热减压抽滤,洗涤置 100 mL 量瓶中,加相同体积分数的乙醇定容至刻度。

分别对乙醇浓度、料液比和提取时间进行单因素试验,经过一系列试验,最终确定,最高提取率(8.97%)时,乙醇体积分数 70%,提取时间 100 s,料液比 1:30。

2.2.2 超声波法 准确称取 1.00 g 菊花粉末置于 50 mL 的锥形瓶中,加入相同体积分数乙醇超声处理,趁热减压抽滤定容至 100 mL,加乙醇定容至刻度。

分别对乙醇体积分数、料液比和提取时间进行单因素试验,经过一系列试验,最终确定:最高提取率(9.29%)时,乙醇浓度 80%,提取时间 30 min,料液比 1:25。

2.2.3 总黄酮提取率的测定 精密吸取供试液 1.5 mL 至 25 mL 量瓶中,按 2.1.4 项下方法测定吸光度,菊花中总黄酮提取率的计算公式^[15]:

$$\text{提取率} = (\text{总黄酮质量浓度} \times \text{定容体积}) / \text{样品质量} \times 100\%$$

2.3 大立菊不同部位的总黄酮含量比较

2.3.1 供试品溶液的制备 将大立菊的花、叶、茎粉碎后,除茎精密称取样 7 g 外,其余均按 2.1.3 项下分别制备花、叶、茎的供试品溶液。

2.3.2 样品中总黄酮的测定 精密吸取花、茎、叶的供试品溶液 3 mL 至 10 mL 量瓶中,加入 30% 乙醇定容至刻度,再精密吸取 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加入 5% NaNO_2 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,再用 30% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 1.5 h 后测其吸光度,每种样品平行操作 3 份,结果见表 4。

表 4 大立菊的花、叶、茎中总黄酮含量

品名	取样量/g	质量分数/%	平均值/%	RSD/%
大立菊花	1.000 0	7.59	7.61	0.35
	1.001 3	7.60		
	0.997 4	7.64		
大立菊叶	1.002 4	4.13	4.12	0.24
	1.004 8	4.12		
	1.004 9	4.11		
大立菊茎	6.936 7	0.79	0.78	1.28
	7.025 6	0.78		
	7.103 9	0.77		

3 讨论

通过对微波法和超声波法的对比,我们可以看出超声波法的提取率较微波法高(9.29%),工艺条件为 80% 乙醇,提取 30 min,料液比 1:25。用该工艺提取菊花总黄酮工艺简单、提取时间短,提取率高,溶剂耗量少、不产生污染,与传统煎煮法相比,克服了药材细粉易凝聚、易焦化的弊端,具有较好的应用前景。

通过 3 种开封菊花与怀菊花总黄酮含量比较,结果表明,3 种开封菊花总黄酮的含量均高于怀菊花,紫悬崖中黄酮类化合物含量最高,大立菊中黄酮类化合物含量最低。传统经验来讲,菊花中黄酮成分含量均高于叶、茎部位的量,为了证明此推断的合理性,并同时考虑到大立菊花中总黄酮量较低,有利于减少对照品和其他试剂的用量,从而降低成本,故本文选择大立菊为研究对象,研究不同部位中总黄酮含量。经过对大立菊花、叶、茎中总黄酮含量比较,结果表明,花中的黄酮含量最高,叶中的黄酮含量次之,茎中的黄酮含量最低。

通过以上研究,可以发现开封观赏性菊有望作为提取抗氧化、抗肿瘤等黄酮类活性成分的原药材。

开封观赏性菊中若干品种的药用价值需要我们继续深入地研究,如明确菊花挥发油,绿原酸、黄酮类等物质的具体成分及其含量,从而对开封观赏性菊进行综合质量评价,为其质量评价及其药用开发提供更可靠的理论依据。

[参考文献]

- [1] 王存琴,汪荣斌,张艳华. 菊花的化学成分及药理活性[J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(1): 28.
- [2] 张清华,张玲. 菊花化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(2): 60.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第七册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:461.
- [4] 顾瑶华,秦民坚. 我国药用菊花的化学及药理学研究新进展[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(6): 7.
- [5] 覃珊,温学森. HPLC 同时测定菊花中 6 种活性成分含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1474.
- [6] 陆松侯,施兆鹏. 茶叶审评与检验[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社, 2001.
- [7] 方世辉,徐国谦,夏涛,等. 花茶窈制中几个主要因子对花茶香气的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(4): 440.
- [8] 李永菊,朱成科. 花茶窈制中主要因素对花茶品质的影响[J]. 茶叶科学技术, 2006(3): 7.
- [9] 刘瑜新,常星,康文艺. 两种开封产黄色菊花的体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 85.
- [10] 张东娣,康文艺,刘瑜新,等. 开封产 3 种白色菊花提取物的抗氧化活性[J]. 精细化工, 2009, 26(5): 465.
- [11] 张骏艳,张磊,李俊,等. 野菊花总黄酮对佐剂性关节炎大鼠氧自由基代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(3): 344.
- [12] 康文艺,张东娣,刘瑜新,等. 七种菊花对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 精细化工, 2009, 26(4): 352.
- [13] 宋艳丽,张丽,刘瑜新,等. 开封产两个菊花品种的脂溶性成分的 GC-MS 分析[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 813.
- [14] 刘瑜新,宋艳丽,康文艺,等. 开封产两个变种紫菊花的脂溶性成分研究[J]. 中成药, 2009, 31(9): 1408.
- [15] 康文艺,张东娣,宋艳丽,等. 两种开封产黄菊花脂肪酸成分研究[J]. 精细化工, 2009, 26(1): 24.
- [16] 侯冬岩,回瑞华,刘晓媛,等. 万寿菊花、叶、茎中黄酮的含量及抗氧化性能的分析[J]. 鞍山师范学院学报, 2008, 10(4): 15.
- [17] 郭勤,王登良,张大春. 花茶窈制技术研究进展[J]. 茶业通报, 2002, 24(3): 31.

[责任编辑 顾雪竹]