

中图分类号: R932; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)23-0051-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.23.012



野菊花不同溶剂提取物的体外抗氧化活性研究*

苏小晶, 王治丹, 陈昭阳, 张婷[△]

(四川大学华西医院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 探讨野菊花不同溶剂提取物的体外抗氧化活性, 并采用硝酸铝显色法测定其总黄酮含量。方法 检测石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、残渣萃取、原浸膏提取物对 1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH)自由基和 2,2'-联氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS)自由基的清除能力, 以评价其不同溶剂提取物的抗氧化活性; 以芦丁为对照品, 采用硝酸铝显色法测定各提取物的总黄酮含量。结果 野菊花上述 5 种溶剂提取物清除 DPPH 自由基的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 $(312.2 \pm 10.29) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(3.21 \pm 0.05) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(40.60 \pm 1.73) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(254.85 \pm 3.65) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(114.57 \pm 3.75) \mu\text{g}/\text{mL}$, 清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 分别为 $(112.05 \pm 2.00) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(19.56 \pm 0.92) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(24.03 \pm 0.77) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(88.13 \pm 3.26) \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $(53.78 \pm 1.19) \mu\text{g}/\text{mL}$ 。野菊花上述 5 种溶剂提取物的总黄酮含量分别为 $(14.08 \pm 0.42)\%$ 、 $(42.43 \pm 1.63)\%$ 、 $(18.13 \pm 0.58)\%$ 、 $(5.17 \pm 0.085)\%$ 、 $(16.26 \pm 0.71)\%$ 。结论 野菊花不同溶剂提取物均有很强的抗氧化活性, 其中乙酸乙酯提取物的抗氧化活性最强, 且乙酸乙酯提取物的总黄酮含量也最高, 野菊花中的黄酮类成分可能是其抗氧化的主要活性成分。该研究为从野菊花中提取天然抗氧化剂研究提供了参考。

关键词: 野菊花; 提取物; 抗氧化活性; 1,1-二苯-2-苦基肼自由基; 2,2'-联氨-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐; 总黄酮含量

In Vitro Antioxidant Activity of Extracts from Chrysanthemum Indicum Flos in Different Solvents

SU Xiaojing, WANG Zhidan, CHEN Zhaoyang, ZHANG Ting

(West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China 610041)

Abstract: Objective To investigate the *in vitro* antioxidant activity of extracts from Chrysanthemum Indicum Flos in different solvents, and to determine the content of total flavonoids by the aluminum nitrate colorimetric method. **Methods** The scavenging abilities of petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol, residue extraction, and original extract on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) free radicals and 2,2'-hydrazine-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diamine salt (ABTS) free radicals were detected to evaluate the antioxidant activity of extracts from Chrysanthemum Indicum Flos in different solvents. With rutin as a reference substance, the content of the total flavonoids of each extract was determined by the aluminum nitrate colorimetric method. **Results** The half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of the extracts from Chrysanthemum Indicum Flos in the above five solvents for scavenging DPPH free radicals were $(312.2 \pm 10.29) \mu\text{g}/\text{mL}$, $(3.21 \pm 0.05) \mu\text{g}/\text{mL}$, $(40.60 \pm 1.73) \mu\text{g}/\text{mL}$, $(254.85 \pm 3.65) \mu\text{g}/\text{mL}$, and $(114.57 \pm 3.75) \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively; the IC_{50} values for clearing ABTS free radicals were $(112.05 \pm 2.00) \mu\text{g}/\text{mL}$, $(19.56 \pm 0.92) \mu\text{g}/\text{mL}$, $(24.03 \pm 0.77) \mu\text{g}/\text{mL}$, $(88.13 \pm 3.26) \mu\text{g}/\text{mL}$, and $(53.78 \pm 1.19) \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The contents of total flavonoids of the extracts from Chrysanthemum Indicum Flos in the above five solvents were $(14.08 \pm 0.42)\%$, $(42.43 \pm 1.63)\%$, $(18.13 \pm 0.58)\%$, $(5.17 \pm 0.085)\%$, and $(16.26 \pm 0.71)\%$, respectively. **Conclusion** Extracts from Chrysanthemum Indicum Flos in different solvents have strong antioxidant activity, among which ethyl acetate extract has the strongest antioxidant activity, and the content of total flavonoids of ethyl acetate extract is also the highest. Flavonoids in Chrysanthemum Indicum Flos may be the main active ingredients with antioxidant activity. This study provides a reference for the extraction of natural antioxidants from Chrysanthemum Indicum Flos.

Key words: Chrysanthemum Indicum Flos; extracts; antioxidant activity; DPPH; ABTS; content of total flavonoids

野菊花 *Chrysanthemum indicum* L. 为菊科多年生草本植物, 在我国东北、华北、西北、西南、东南等地区分

* 基金项目: 四川省自然科学基金[2023NSFSC1686]。

第一作者: 苏小晶, 女, 大学本科, 研究方向为医院药学、天然药物化学, (电子信箱)1697333010@qq.com。

[△]通信作者: 张婷, 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为药剂学、药理学、医院药学, (电子信箱)zhangtingyx@yeah.net。

2012, 60(19):1888-1898.

[27] QURESHI Z, KHANZADA M, SAFI A, et al. Hypercholesterolemia: a literature review on management using tafolecimab: a novel member of PCSK9 monoclonal antibodies [J]. Ann Med Surg (Lond), 2024, 86(5):2818-2827.

[26] CUI Y, ZHAO X, QI L, et al. A Potential Long-Acting LDL-Cholesterol-Lowering PCSK9 Monoclonal Antibody: Randomized, Placebo-Controlled Phase 1 Studies [J]. JACC Asia, 2021, 1(3):411-415.

(收稿日期: 2024-07-22; 修回日期: 2024-10-22)

布广泛、资源丰富^[1]。野菊花的叶、花及全草入药,其味苦、辛,性凉,具有清热解毒、疏风散热、活血化瘀、明目等功效,多用于防治流行性脑脊髓膜炎、流感、肝炎、痢疾等疾病^[2]。研究表明,野菊花具有抑菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤^[3-5]、清除自由基、促进胆固醇代谢^[6]等多种活性,其抗氧化活性对生物体自身抵抗疾病、延缓衰老等发挥着重要作用^[7]。目前对野菊花抗氧化活性的研究主要集中在不同溶剂^[8]、不同提取方法^[9]所得提取物抗氧化活性的分析,而野菊花不同溶剂提取物的抗氧化活性与其总黄酮含量的相关性研究尚未见报道,探索野菊花抗氧化活性的主要活性成分对从野菊花中提取抗氧化剂具有重要意义。故本研究中探讨了1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH)自由基法和2,2'-联氮-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)自由基法测定野菊花不同极性溶剂提取物的抗氧化活性,并采用硝酸铝[Al(NO₃)₃]显色法测定各提取物中总黄酮含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

FA2004电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司,精度为0.01 mg);PS-40A型超声波清洗仪(上海同天生物技术股份有限公司,功率为240 W,频率为40 kHz);SHHW21.600A II型三用电热恒温水箱水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);UV-2600型紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司);Hei-VAP型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司)。

1.2 试剂

野菊花(珠海万宝中药饮片有限公司,批号为190801),经遵义医科大学王文君教授鉴定为正品;DPPH 自由基、ABTS 自由基、维生素 C(Vc)、芦丁、Al(NO₃)₃(上海麦克林生化科技有限公司);乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇(分析纯,成都市科隆化工试剂厂);纯化水(自制)。

2 方法与结果

2.1 样品制备与浸膏产率测定

取野菊花(批号190801),干燥,粉碎至粗粉,取约500 g,在室温下用80%无水乙醇浸泡12 h,80℃超声(功率为240 W,频率为40 kHz)提取60 min,抽滤,滤渣再提取3次,合并滤液。最后在65~85℃条件下旋转蒸发,浓缩得野菊花浸膏。得浸膏84.92 g,根据公式计算得野菊花的粗提物浸膏提取率为16.98%。提取率(%)=(浸膏质量/药粉质量)×100%。

用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别对野菊花浸膏进行萃取,得极性逐渐增大的3个样品,即样品1、样品2、样品3,萃取后的残渣作为样品4,取野菊花原浸膏8 g作为样品5,均置4℃冰箱保存,备用。粗提物浸膏量为

76.92 g,根据公式计算得野菊花提取物溶液萃取浸膏产率(见表1)。产率(%)=(浸膏质量/粗提物浸膏量)×100%。

表1 野菊花提取物溶液萃取浸膏产率

Tab. 1 Yield of extracts from Chrysanthemum Indicum Flos solution

样品	萃取溶剂	浸膏质量(g)	产率(%)
样品1	石油醚	15.94	20.72
样品2	乙酸乙酯	2.11	2.74
样品3	正丁醇	3.95	5.14
样品4	水	31.15	40.50

2.2 DPPH 法测定抗氧化活性

DPPH 试剂制备:取 DPPH 4.30 mg,精密称定,置100 mL棕色容量瓶中,用乙醇溶解并定容,得质量浓度为0.043 mg/mL的DPPH试剂,使用前稀释40倍,避光保存。

Vc 对照品溶液制备:取 Vc 10.00 mg,精密称定,用乙醇溶解并定容至25 mL,得质量浓度为0.40 mg/mL的Vc对照品溶液,置4℃冰箱避光暂存,现配现用。

抗氧化活性测定:参考文献[10],分别取2.1项下5种样品各适量,用乙醇溶解并定容,制备5种样品溶液的梯度浓度(见表2)。取2.2.1项下DPPH溶液3.90 mL,分别加入各样品溶液0.10 mL,振摇,室温下避光显色30 min^[11]。以无水乙醇替代样品溶液作为空白对照品,控制样品的吸光度(A₀)₀在0.7±0.05范围内。以Vc作为阳性对照品,在517 nm波长处测定吸光度(A_样),平行测定3次,取平均值。根据公式(1)计算样品对DPPH自由基的清除率,并绘制曲线,再根据线性回归方程计算清除DPPH自由基的半数抑制浓度(IC₅₀)。同一样品重复试验3次,取平均值^[12]。

表2 野菊花提取物溶液的梯度质量浓度 DPPH 法测定结果 (μg/mL)

Tab. 2 Determination results of the gradient mass concentration of extracts from Chrysanthemum Indicum Flos by the DPPH method (μg/mL)

编号	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	Vc
浓度1	200.0	10.0	30.0	75.0	62.5	3.0
浓度2	250.0	20.0	37.5	150.0	87.5	4.0
浓度3	300.0	25.0	42.5	225.0	112.5	5.0
浓度4	375.0	37.5	47.5	300.0	137.5	6.5
浓度5	450.0	50.0	52.5	375.0	162.5	7.5

$$\text{清除率}(\%) = [(A_0 - A_{\text{样}}) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中,A₀为未加入样品的空白对照品的吸光度,A_样为加入样品溶液后与DPPH试剂产生反应后的吸光度^[13]。结果见表3,可见,各样品对DPPH自由基的清除率无显著差异(P>0.05),但各样品各自不同浓度的

清除率差异显著($P < 0.05$)。对表3中的数据进行线性回归,根据线性回归方程计算野菊花各提取物与Vc清除DPPH自由基的能力间的线性关系。结果表明,各提取物对DPPH自由基的清除能力与质量浓度的线性关系良好,其线性关系与计算得到的 IC_{50} 值见图1和表4。可见,野菊花各提取物对DPPH自由基均有很强的清除能力和较好的抗氧化活性,且乙酸乙酯提取物(样品2)的抗氧化活性显著强于其他提取物($P < 0.05$),其 IC_{50} 值为Vc IC_{50} 值的6.53倍。

表3 野菊各提取物对DPPH自由基的清除率($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

Tab.3 The scavenging rates of extracts from Chrysanthemum Indicum Flos on DPPH free radicals ($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

样品	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5
样品1	30.07±0.99	38.58±1.84 ^a	48.14±2.05 ^b	63.08±3.16 ^c	72.74±1.74 ^d
样品2	8.98±2.65	25.55±2.61 ^a	38.46±7.84 ^b	60.76±2.99 ^c	83.03±2.99 ^d
样品3	32.57±4.58	43.35±5.01 ^a	53.47±2.17 ^b	64.20±2.77 ^c	75.57±5.37 ^d
样品4	10.48±0.85	24.17±1.15 ^a	41.61±0.61 ^b	62.64±0.21 ^c	77.03±2.85 ^d
样品5	23.96±3.86	36.87±0.84 ^a	50.46±1.88 ^b	59.88±4.19 ^c	74.06±2.36 ^d

注:与本样品浓度1比较,^a $P < 0.05$;与本样品浓度2比较,^b $P < 0.05$;与本样品浓度3比较,^c $P < 0.05$;与本样品浓度4比较,^d $P < 0.05$ 。表6同。

Note: Compared with concentration 1 of this sample, ^a $P < 0.05$; Compared with the concentration 2 of this sample, ^b $P < 0.05$; Compared with the concentration 3 of this sample, ^c $P < 0.05$; Compared with the concentration 4 of this sample, ^d $P < 0.05$ (for Tab.3 and 6).

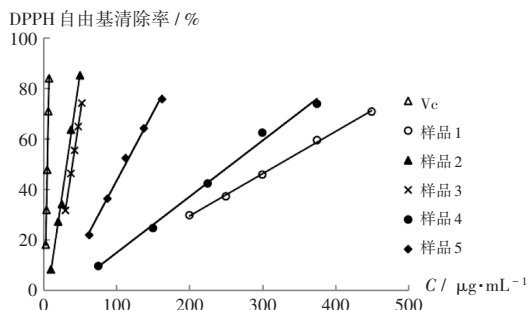


图1 野菊花提取物样品与Vc清除DPPH自由基的线性关系图($n = 3$)

Fig.1 Linear relationship between extracts from Flos Chrysanthemum Indicum and Vc scavenging DPPH free radicals ($n = 3$)

2.3 ABTS法测定抗氧化活性

ABTS⁺试剂制备:取ABTS(38.40 ± 0.05)mg、硫酸钾($K_2S_2O_8$)(6.62 ± 0.05)mg,精密称定,分别用纯化水溶解并定容至10 mL,得浓度为7.0 mmol/L的ABTS溶液和浓度为2.45 mmol/L的 $K_2S_2O_8$ 溶液,再分别取等体积溶液进行1:1混合,室温下避光混合12 h以上,即得浓度为3.5 mmol/L的ABTS⁺工作液。试验前取2.64 mL ABTS⁺工作液,用乙醇稀释并定容至100 mL,即得浓度为0.0925 mmol/L的ABTS⁺试剂,使用前稀释31倍,避光暂存,现配现用。

表4 野菊花提取物与Vc清除DPPH自由基的线性关系及 IC_{50} ($n = 3$)

Tab.4 Linear relationship between extracts from Flos Chrysanthemum Indicum and Vc scavenging DPPH free radicals ($n = 3$)

样品	回归方程	R^2	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$IC_{50}(\bar{X} \pm s,$ $\mu\text{g}/\text{mL})$
样品1	$Y = 1.6696X - 0.0402$	0.9988	200.0~450.0	312.2 ± 10.29
样品2	$Y = 19.884X - 0.1495$	0.9969	10.0~50.0	$32.07 \pm 0.55^{\text{ab}}$
样品3	$Y = 22.902X - 0.4081$	0.9966	30.0~52.5	40.60 ± 1.73
样品4	$Y = 2.3337X - 0.0868$	0.9959	75.0~375.0	254.85 ± 3.65
样品5	$Y = 5.4192X - 0.1095$	0.9952	62.5~162.5	114.57 ± 3.75
Vc	$Y = 148.66X - 0.2684$	0.9991	3.0~7.5	4.91 ± 0.24

注:与其他样品比较,^a $P < 0.05$;与Vc比较,^b $P < 0.05$ 。表7和表8同。

Note: Compared with other samples, ^a $P < 0.05$; Compared with Vc, ^b $P < 0.05$ (for Tab.4 and Tab.7 - 8).

Vc对照品溶液制备:取Vc 3.01 mg,精密称定,用甲醇溶解并定容至10 mL,得质量浓度为0.3 mg/mL的Vc对照品溶液,避光暂存于4℃冰箱,现配现用。

抗氧化活性测定:参考文献[14]的研究方法,分别取2.1项下5种样品各适量,用纯化水溶解并定容,制备各样品的梯度浓度(见表5),密封保存,备用。临用前分别吸取上述样品溶液各50 μL ,置4 mL EP管中,再分别加入1.5 mL ABTS⁺试剂,充分摇匀,室温下避光反应30 min,在最大吸收波长(734 nm)处测定吸光度。为避免溶液的干扰,设置空白对照,同一样品平行测定3次,取平均值。根据公式(2)计算样品对ABTS自由基的清除率,并绘制曲线,根据线性回归方程计算 IC_{50} 。同一样品重复试验3次,取平均值^[15-16]。

表5 野菊花提取物溶液的梯度浓度ABTS法测定结果($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Tab.5 Determination results of the gradient mass concentration of extracts from Chrysanthemum Indicum Flos by the ABTS method ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

编号	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	Vc
浓度1	80.65	9.68	6.45	29.03	38.71	0.97
浓度2	96.77	14.52	12.90	58.06	51.61	1.94
浓度3	112.90	19.35	19.36	87.09	64.52	2.90
浓度4	129.03	24.19	25.81	116.13	77.42	3.87
浓度5	145.16	29.03	32.26	145.16	90.32	4.84

$$\text{清除率}(\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_0 为未加入样品的空白对照品的吸光度, A_1 为添加不同浓度样品溶液并与ABTS⁺试剂反应后的吸光度。结果见表6,可见,各样品间对ABTS自由基的清除率均无显著差异($P > 0.05$),但各样品各自不同浓度间的清除率差异显著($P < 0.05$)。对表6中的数据进行线性回归,根据线性回归方程计算野菊花各提取物与Vc清除ABTS自由基能力间的线性关系。结果表明,各

提取物对 ABTS 自由基的清除能力与质量浓度的线性关系良好,其线性关系与计算得到的 IC_{50} 值见图 2 和表 7。可见,野菊花各提取物对 ABTS 自由基均有很强的清除能力和较好的抗氧化活性,且乙酸乙酯提取物(样品 2)的抗氧化活性显著强于其他提取物($P < 0.05$),其 IC_{50} 值为 Vc IC_{50} 值的 6.79 倍。

表 6 野菊花提取物对 ABTS 自由基的清除率($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

Tab. 6 The scavenging rates of extracts from Chrysanthemum Indicum Flos on ABTS free radicals ($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

样品	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5
样品1	38.51±0.85	44.19±1.48 ^a	50.32±2.00 ^b	53.92±5.11 ^c	59.75±2.96 ^d
样品2	27.41±1.12	38.48±1.02 ^a	49.78±1.45 ^b	60.64±3.03 ^c	72.36±6.47 ^d
样品3	16.13±2.52	29.81±0.26 ^a	42.53±0.66 ^b	52.41±2.16 ^c	65.68±1.29 ^d
样品4	20.39±1.25	33.78±2.39 ^a	49.88±2.78 ^b	64.75±4.38 ^c	78.60±2.13 ^d
样品5	38.57±0.38	48.78±1.36 ^a	58.66±1.50 ^b	66.78±0.55 ^c	76.26±4.52 ^d

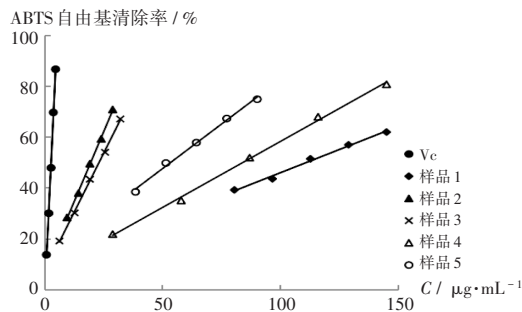


图 2 野菊花提取物与 Vc 清除 ABTS 自由基的线性关系图($n = 3$)

Fig. 2 Linear relationship between extracts from Flos Chrysanthemum Indicum and Vc scavenging ABTS free radicals ($n = 3$)

表 7 野菊花提取物与 Vc 清除 ABTS 自由基的线性关系及 IC_{50} ($n = 3$)

Tab. 7 Linear relationship and IC_{50} between extracts from Flos Chrysanthemum Indicum and Vc scavenging ABTS free radicals ($n = 3$)

样品	回归方程	R^2	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$IC_{50}(\bar{X} \pm s, \mu\text{g}/\text{mL})$
样品1	$Y = 3.6494X + 0.0933$	0.9927	80.65~145.16	112.05±2.003
样品2	$Y = 21.964X + 0.066$	0.9990	9.68~29.03	19.56±0.92 ^{ab}
样品3	$Y = 18.564X + 0.0674$	0.9989	6.45~32.26	24.03±0.77
样品4	$Y = 5.1917X + 0.0618$	0.9978	29.03~145.16	88.13±3.26
样品5	$Y = 7.0038X + 0.1237$	0.9953	38.71~90.32	53.78±1.19
Vc	$Y = 191.71X - 0.0614$	0.9978	0.97~4.84	2.88±0.26

2.4 总黄酮含量测定

溶液制备:取芦丁适量,粉碎,取固体粉末 30 mg,精密称定,室温下用乙醇溶解并定容至 100 mL,得质量浓度为 0.30 mg/mL 的芦丁标准溶液,再进行梯度稀释,得质量浓度分别为 30, 70, 110, 150, 190, 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列芦丁标准溶液,备用。分别取 2.1 项下 5 种样品

各适量,制备样品溶液。取 2 mg 样品 1,用乙醇溶解并定容至 2 mL,得质量浓度为 1 mg/mL 的样品溶液 1;取 3.5 mg 样品 2,用乙醇溶解并定容至 10 mL,得质量浓度为 0.35 mg/mL 的样品溶液 2;取 2 mg 样品 3,用乙醇溶解并定容至 2 mL,得质量浓度为 1 mg/mL 的样品溶液 3;取 2 mg 样品 4,用二甲基亚砷溶解并定容至 2 mL,得质量浓度为 1 mg/mL 的样品溶液 4;取 2 mg 样品 5,用乙醇溶解并定容至 2 mL,得质量浓度为 1 mg/mL 的样品溶液 5。以上样品溶液均平行制备 3 份,现配现用。

芦丁标准曲线建立:分别配制浓度为 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液、浓度为 4% 的 NaOH 溶液和浓度为 5% 的 NaNO_2 溶液,室温保存,现配现用。分别取 2.4.1 项下芦丁标准溶液和样品溶液各 800 μL ,依次置 2 mL 容量瓶中,加入 5% NaNO_2 溶液 40 μL ,摇匀,静置 6 min,再加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 40 μL ,摇匀,静置 6 min,再加入 4% NaOH 溶液 320 μL ,最后加入纯化水使体积达 2 mL,充分摇匀,静置 10 min;用 800 μL 纯化水代替芦丁标准溶液和样品溶液,同法制备空白对照溶液。在最大吸收波长(734 nm)处测定吸光度,同一样品平行测定 3 次,取平均值。绘制标准曲线,并计算样品中总黄酮的含量($\mu\text{g}/\text{g}$,以芦丁计)。以质量浓度(C)为横坐标、吸光度(A)为纵坐标进行线性回归,得芦丁回归方程 $A = 0.0034C + 0.0397 (R^2 = 0.991, n = 6)$ 。结果表明,芦丁的质量浓度在 30~230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好,可用于定量分析。

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色法测定总黄酮含量:在最大吸收波长(510 nm)处测定样品溶液的吸光度(A),带入标准曲线,计算样品溶液中总黄酮的含量(ω), $\omega = m_1 / m_2 \times 100\%$ (式中, m_1 为芦丁质量, m_2 为野菊花提取物质量)。结果野菊花各提取物中,乙酸乙酯提取物(样品 2)的总黄酮含量最高,均显著高于其他提取物($P < 0.05$)。详见表 8。

表 8 野菊花提取物总黄酮含量测定结果($n = 3$)

Tab. 8 Results of the content determination of total flavonoids in extracts from Flos Chrysanthemum Indicum ($n = 3$)

样品	$m_1(\text{mg})$			$m_2(\text{mg})$	含量(%)			平均含量($\bar{X} \pm s, \%$)
	1	2	3		1	2	3	
样品1	109.99	111.61	116.39	800	13.75	13.95	14.55	14.08±0.42
样品2	114.42	118.48	123.54	280	40.86	42.31	44.12	42.43±1.63 ^a
样品3	139.72	147.06	148.66	800	17.46	18.38	18.58	18.13±0.58
样品4	40.87	41.14	42.14	800	5.11	5.14	5.27	5.17±0.08
样品5	124.32	130.26	135.57	800	15.54	16.28	16.95	16.26±0.71

2.5 野菊花提取物抗氧化活性与总黄酮含量的相关性

野菊花各提取物清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基的能力与黄酮含量呈正相关,5 种样品中,总黄酮含量

越高, IC_{50} 值就越小, 抗氧化活性也就越强。由表4、表7和表8可知, 乙酸乙酯提取物(样品2)的总黄酮含量最高, IC_{50} 值最小, 抗氧化活性最强。故对野菊花提取物的抗氧化活性(Y)与总黄酮含量(X)的相关性进行线性回归, 结果见表9, 表明线性关系良好。

表9 野菊花提取物抗氧化活性与总黄酮含量的线性关系考察结果($n = 5$)

Tab. 9 Results of the linear relationship between antioxidant activity and content of total flavonoids of extracts from *Flos Chrysanthemum Indicum* ($n = 5$)

自由基	回归方程	R^2
DPPH	$Y = -0.6239X + 0.2708$	0.4669
ABTS	$Y = -0.1998X + 0.0979$	0.4773

3 讨论

野菊花为传统中药, 含有多种活性成分^[17]。本研究深入研究了野菊花不同极性提取物的体外抗氧化活性, 测定了其总黄酮含量, 并分析了野菊花提取物抗氧化活性与总黄酮含量的关系。

本研究中, 主要采用了DPPH自由基和ABTS自由基清除法, 这2种方法较常用, 可靠性和实用性均较强。试验结果表明, 野菊花各提取物对DPPH自由基和ABTS自由基均有一定清除能力, 其中乙酸乙酯提取物的清除率最高, 与Vc清除DPPH自由基的能力相差最小, 且线性关系良好, 表明乙酸乙酯提取物具有最强清除能力和较强的抗氧化活性。有研究推测, 乙酸乙酯提取物中黄酮类、咖啡酰喹啉酸类等成分的抗氧化活性强^[18-20]。

本研究中以芦丁为标准溶液得到的标准曲线, 在线性范围内重复多次试验, 找到各提取物的最适浓度和吸光度, 计算得总黄酮含量。由表8可知, 野菊花各提取物中均含黄酮类成分, 其中乙酸乙酯提取物的总黄酮含量最高, 也验证了野菊花提取物的抗氧化活性和总黄酮含量具有一致性, 总黄酮含量越高, 抗氧化活性就越强。本研究结果与文献^[20-21]的研究结论相符。

综上所述, 野菊花提取物均能有效清除DPPH自由基和ABTS自由基, 均有良好的抗氧化活性, 且均含黄酮类成分, 其中野菊花乙酸乙酯提取物的抗氧化活性最强、总黄酮含量最高, 野菊花为提取天然抗氧化剂的可靠来源。本研究为野菊花天然产物的深入开发和综合利用提供了理论支持。

参考文献

[1] 李建领, 韩正洲, 池莲锋, 等. 基于色泽和化学成分的野菊花种质资源评价[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5217-5223.

[2] 王瑞雅, 王惠平, 赵薇, 等. 野菊花的生物活性成分及药理作用研究[J]. 甘肃科技, 2020, 36(14): 52-54.

[3] 宋颜君, 许利嘉, 缪剑华, 等. 野菊花的研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(10): 1751-1756.

[4] 全文婕, 史晓欣, 熊润德, 等. 野菊花抗肿瘤活性部位筛选研究[J]. 中南医学科学杂志, 2017, 45(3): 242-246.

[5] 李岳华, 王丽丽, 施剑明. 野菊花总黄酮对肺癌细胞A549作用研究[J]. 九江学院学报(自然科学版), 2014, 29(1): 74-77.

[6] 楚继敏, 孙素娟. 野菊花活性成分的抗炎机制研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(10): 2023-2026.

[7] 张慧杰. 野菊花内酯延缓衰老和治疗肌少症的作用及机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.

[8] 王天顺. 杭白菊、野菊花和神农香菊抗氧化损伤作用及有效成分研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.

[9] 陈佳敏, 汪涛, 郭巧生, 等. 基于熵权TOPSIS法对不同产地野菊花醇提物抗氧化活性抗炎活性的比较[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 907-914.

[10] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 317-322.

[11] JIN J, LI ZX, ZHANG F. Scavenging function of mulberry vinegar extractives for 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2006, 34(3): 135-137.

[12] OZCELIK B, LEE JH, MIN DB. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(2): 487-490.

[13] SCHERER R, GODOY HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method [J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 654-658.

[14] 刘薇, 邱乐, 杨靖, 等. ABTS与邻二氮菲- Fe^{3+} 法测定保健食品抗氧化能力比较分析[J]. 食品工业, 2013, 34(3): 120-124.

[15] 刘薇, 王宏君, 赵建, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 法测定保健食品的抗氧化能力[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 333-337.

[16] CHANG CY, WU KC, CHIANG SH. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1537-1543.

[17] 代书景, 刘洋, 桂金秋, 等. 野菊花抗菌活性的网络药理学研究[J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(1): 4-8.

[18] 张明. 野菊花抗氧化活性成分分离、鉴定及初步分析的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.

[19] 戴胜, 张明, 程文明, 等. HPLC测定野菊花药材中8种黄酮和有机酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1961-1965.

[20] 孟庆玉, 符玲, 高振, 等. 野菊花总黄酮提取方法比较及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(21): 3194-3197.

[21] 谢占芳, 张倩倩, 朱凌佳, 等. 菊花化学成分及药理活性研究进展[J]. 河南大学学报(医学版), 2015, 34(4): 290-300.

(收稿日期: 2023-11-07; 修回日期: 2024-06-20)