

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.

野菊花总黄酮清除自由基的活性

曹小燕,杨海涛

(陕西理工学院化学与环境科学学院,陕西汉中 723001)

摘要:采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法、邻苯三酚自氧化和 ABTS 法,分别测定野菊花总黄酮对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、ABTS 自由基正离子($\text{ABTS}^{+\cdot}$)的清除率。结果表明,野菊花总黄酮清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 的半数有效浓度(EC_{50} 值)分别为 0.016 mg/mL、0.012 mg/mL、6.95 $\mu\text{g/mL}$,优越于常规抗氧化剂维生素 C 和柠檬酸,证明野菊花具有良好的还原能力和自由基清除活性。

关键词:野菊花;总黄酮;自由基;清除率;维生素 C;柠檬酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0307-03

野菊花(*Chrysanthemum indicum* L.)为菊科多年生草本植物菊花的头状花序,民间在秋季开花时采后凉干或晒干泡茶饮用,但更多的是药用。野菊花富含酚酸、黄酮、萜类及挥发油等有效成分,具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒等活性^[1]。经调研发现,野菊花的主要活性成分为黄酮类化合物和绿原酸,黄酮类化合物具有抗癌、抑菌、抗氧化、抗衰老等作用^[2]。野菊花黄酮的主要成分是蒙花苷和木犀草素,其中蒙花苷别称野菊花黄酮苷,能有效抑制金黄色葡萄球菌和乙型溶血链球菌,并具有抑制磷酸二酯酶、醛糖还原酶和保肝的作用,对慢性气管炎也有一定疗效^[3-4];木犀草素具有抑菌活性,对黄嘌呤氧化酶具有较强的抑制活性,对 cAMP-磷酸二酯酶的 IC_{50} 值为 79 $\mu\text{mol/L}$ ^[5]。野菊花多糖具有清除活性氧自由基的作用^[6];其水提取物能够有效地抑制红细胞溶血,还可以提高体内抗氧化酶的活性^[7];其挥发油还能够有效地清除 DPPH· 自由基^[8-9]。

近年来,世界上掀起了植物药开发的热潮,植物药以其天然、低毒的特点备受青睐,其中黄酮类化合物以其广谱的药理作用引人瞩目。本试验以乙醇为溶剂,研究野菊花总黄酮含量及自由基清除活性,为野菊花的生物活性研究及其开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

野菊花采于陕西省汉中市褒河镇;芸香苷标准品(自制);亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、水杨酸、过氧化氢、硫酸亚铁、无水乙醇、柠檬酸、维生素 C、碘化钾、冰醋酸、三氯甲烷、淀粉、铁氰化钾、三氯化铁、三氯乙酸、三羟甲基氨基甲烷、邻苯三酚,均为市售分析纯。

AL204-IC 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);722E 分光光度计(上海光谱仪器有限公司);

收稿日期:2014-01-02

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划(编号:2013JK0680);陕西理工学院校级人才启动项目(编号:SLGQD13-1)。

作者简介:曹小燕(1982—),女,河南开封人,博士,讲师,主要从事有机化学研究。E-mail:ruoshuizhihan@163.com。

HHS-1 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市金祥龙电子有限公司);101A-1 电热鼓风干燥箱(中国重庆银河试验仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(河南省巩义市英峪予华仪器厂);CL-2 型加热磁力搅拌器(河南省巩义市英峪予华仪器厂);TGL-16C 型台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 野菊花中总黄酮的提取 取新鲜野菊花,烘干,粉碎。称取野菊花粉末约 5 g,加 80 mL 95% 乙醇回流提取 2 h,抽滤。滤渣再加 80 mL 95% 乙醇,回流提取 2 h,抽滤,合并 2 次滤液,减压回收乙醇至滤液仅剩 25 mL 左右为止,放置于 250 mL 容量瓶中,用 60% 乙醇稀释至刻度,得样品液^[10-11]。

1.2.2 标准曲线的绘制 精确称取干燥至恒重的芸香苷标准品 20.0 mg,加乙醇溶解并定容至 50 mL,配成 0.4 mg/mL 芸香苷标准溶液。准确吸取标准品溶液 0.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00、8.00、9.00 mL,分别加乙醇补至 10.00 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1.5 mL,摇匀,静置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 15 mL,用乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 15 min,在波长 510 nm 处测定吸光度,以芸香苷浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度(D)为纵坐标,绘制标准曲线^[12]。

1.2.3 野菊花总黄酮含量的测定 精确吸取样品液 0.50 mL,置于 10 mL 容量瓶中,根据标准曲线的制备方法测定吸光度 D ,线性回归计算野菊花中总黄酮的含量 $C^{[13]}$ 。

1.2.4 野菊花总黄酮清除羟自由基($\cdot\text{OH}$) 采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法^[14]。取 8 支 15 mL 的离心管并编号为 1~8,其中 1 号为未损伤管,2 号为损伤管,在 8 支离心管中依次加入 5 mmol/L 邻二氮菲 1 mL,pH 值 7.4 10 mmol/L PBS 4 mL,在 3~7 号管中依次加入不同体积的野菊花总黄酮提取液,再在 1~8 号管中加 7.5 mmol/L FeSO_4 1 mL,最后在 2~7 号管中加入 0.1% H_2O_2 1 mL,蒸馏水定容至 10 mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,在 512 nm 处分别测定各管的吸光度,平行测定 3 次。以相同浓度的维生素 C 和柠檬酸作对照,按下式计算羟自由基的清除率。

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率} = (D_{\text{样品}} - D_{\text{损伤}}) / (D_{\text{未损}} - D_{\text{损伤}}) \times 100\%$$

1.2.5 野菊花总黄酮清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$) 采用

邻苯三酚自氧化法^[15]。取 6 支 15 mL 的离心管,各管中加入 0.1 mol/L pH 值 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 5.0 mL,置于 37 ℃ 水浴中预热 10 min,在各管依次加入不同体积的野菊花总黄酮提取液,再立即加入在 37 ℃ 水浴下中预热的 3 mol/L 邻苯三酚 0.1 mL,于 30 s 蒸馏水定容至 10 mL,置于 25 ℃ 的水浴中准确反应 4 min,立即用 8 mmol/L 盐酸 2 滴终止反应,于 420 nm 分别测定各管的吸光度 $D_{\text{样品}}$,平行测定 3 次。相同试验条件下,不加任何提取液的吸光度为 $D_{\text{空白}}$,野菊花总黄酮本身的吸光度为 D_0 ,以相同浓度的维生素 C 和柠檬酸作对照,按下式计算对超氧阴离子自由基的清除率。

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率} = [D_{\text{空白}} - (D_{\text{样品}} - D_0)] / D_{\text{空白}} \times 100\%。$$

1.2.6 野菊花总黄酮清除 ABTS 自由基正离子 ($ABTS^+ \cdot$)

采用 ABTS 法^[16]。ABTS 先用超纯水配制为 7 mmol/L,然后加入 2.45 mmol/L 过硫酸钾,室温置于黑暗中反应 12 ~ 16 h,制成 ABTS 自由基正离子;乙醇稀释 ABTS 自由基正离子,使其在 734 nm 处的吸光度为 0.7 ± 0.01 ;加入不同体积的野菊花总黄酮提取液于上述调制好的自由基溶液中,于 30 ℃ 水浴放置 10 min,在 734 nm 处测定吸光度 D_x ,以不加抗氧化剂测定的吸光度为 D_0 ,无水乙醇较零,平行测定 3 次。

$$ABTS^+ \cdot \text{清除率} = (D_0 - D_x) / D_0 \times 100\%。$$

1.2.7 野菊花总黄酮还原能力的测定 采用 Oyaizu 的方法^[17]测定野菊花总黄酮的还原能力。于 1.0 mL 不同浓度的野菊花总黄酮提取液中分别加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 值 6.6) 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 5 mL,混合均匀后置 50 ℃ 水浴中反应 20 min,然后加入 10% 三氯乙酸溶液 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液 2.5 mL,加入蒸馏水 2.5 mL 和 0.1% 三氯化铁溶液 0.5 mL。在 700 nm 处测定样品的吸光度。以与样品同浓度的乙醇溶液为空白,吸光度越大,表示其还原能力越强。

2 结果与分析

2.1 芸香苷标准曲线

按“1.2.2”节方法绘制标准曲线,得到回归方程为 $D = 10.618C - 0.0036$, $r = 0.9996$ 。

2.2 野菊花总黄酮含量的测定

精确吸取野菊花提取液 0.50 mL,置于 10 mL 容量瓶,按标准曲线的制备方法测定吸光度 $D = 0.520$,根据回归方程 $D = 10.618C - 0.0036$,计算野菊花提取液中总黄酮的含量为 0.25 mg/mL。

2.3 野菊花总黄酮对羟自由基 ($\cdot OH$) 的清除效果

羟自由基 ($\cdot OH$) 是生物体代谢产生的破坏性强的自由基,可直接破坏细胞膜组成成分 (如糖类、氨基酸、和磷脂等) 的结构,也可通过氧化碱基,尤其是氧化鸟嘌呤,导致细胞 DNA 结构的改变^[18]。因此,羟自由基的检测在自由基损伤研究具有重要意义。

从图 1 可以看出,随着样品浓度升高,野菊花总黄酮对 $\cdot OH$ 的清除活性逐渐增强,当总浓度为 0.025 mg/mL 时,其对 $\cdot OH$ 的清除率为 106.8%,而相同浓度下的维生素 C 与柠檬酸对 $\cdot OH$ 的清除率分别为 29.3%、18.4%,说明野菊花对 $\cdot OH$ 的清除存在明显的量效关系,其清除效率优于维生素 C 与柠檬酸。

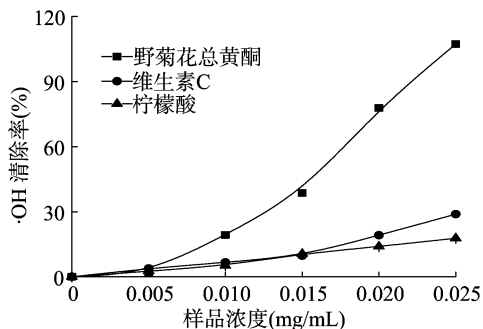


图1 野菊花总黄酮、维生素 C 和柠檬酸对 $\cdot OH$ 的清除率

2.4 野菊花总黄酮对超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 的清除效果

超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 是机体代谢过程中产生的活性自由基之一,它可在短时间内引发自由基链式反应,产生活性自由基,如 $\cdot OH$ 、过氧亚硝酸根等^[19]。这些活性自由基可以造成机体氧化性损伤,如细胞膜损伤、细胞代谢障碍等,并影响细胞信号转导。此外,细胞内 $O_2^{\cdot-}$ 的累积还可引起线粒体膜通透性的改变,造成细胞色素 C 的大量释放,从而引起细胞凋亡^[20]。因此,清除代谢产生的过量 $O_2^{\cdot-}$ 有助于维持机体的氧化还原平衡,保证机体代谢正常有序地进行。

本研究采用邻苯三酚自氧化法,在弱碱性条件下,邻苯三酚自氧化生成 $O_2^{\cdot-}$ 和有色中间产物,该有色物质于 420 nm 处有特征吸收峰。当存在自由基清除剂时,清除剂能够有效地清除 $O_2^{\cdot-}$,抑制有色中间产物的生成,从而使 420 nm 处的吸光度降低。

由图 2 可知,随着样品浓度升高,清除 $O_2^{\cdot-}$ 活性逐渐增强,并且存在良好的线性关系。当样品浓度为 0.025 mg/mL 时,野菊花总黄酮对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为 89.4%,而相同浓度条件下的维生素 C 和柠檬酸的清除率分别为 9.3%、4.3%。结果表明,野菊花清除 $O_2^{\cdot-}$ 活性优越于常规自由基清除剂维生素 C 和柠檬酸。

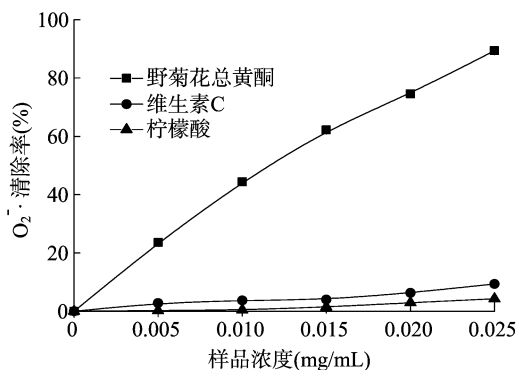


图2 野菊花总黄酮、维生素 C 和柠檬酸对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率

2.5 野菊花总黄酮对 ABTS 自由基正离子 ($ABTS^+ \cdot$) 的清除效果

$ABTS^+ \cdot$ 是一个相对稳定的自由基正离子,广泛应用于评价天然产物的自由基清除活性。本试验以野菊花提取液为反应液,随着样品浓度升高,其清除 $ABTS^+ \cdot$ 的活性逐渐增强,并且存在良好的线性关系,当加入野菊花提取液 50 μL 时,其对 $ABTS^+ \cdot$ 清除率为 83.4%。配制相同浓度的维生素 C 和柠檬酸为参照,当加入常规抗氧化剂维生素 C 20 μL 时,

对 ABTS^+ 清除率小于 5%, 随着样品浓度升高, 清除活性逐渐增强, 50 μL 时, 对 ABTS^+ 清除率为 42.9%; 柠檬酸对 ABTS^+ 清除活性最弱, 50 μL 时对 ABTS^+ 清除率才达到 11.1% (图 3)。

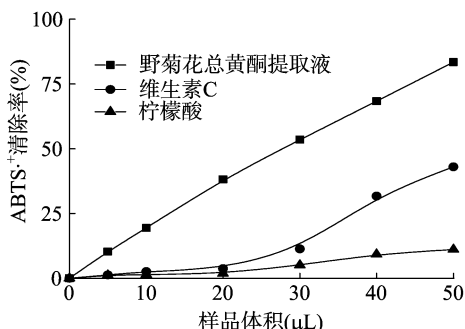


图3 野菊花总黄酮、维生素C和柠檬酸对 ABTS^+ ·的清除率

2.6 野菊花总黄酮还原能力的测定结果

测定野菊花的还原力, 实质上是检验野菊花是否为良好的电子供应者, 进一步证实野菊花为良好的自由基清除剂。抗氧化剂是通过自身的还原作用给出电子, 从而清除自由基, 还原力越强, 自由基清除活性越强, 抗氧化性越强, 因此可通过测定还原力来说明其抗氧化活性的强弱。本试验中利用野菊花总黄酮被铁氰化钾氧化来表征还原力, 700 nm 处的吸光度越大, 还原力越强。由图 4 可知, 随着样品浓度升高, 野菊花和维生素 C 于 700 nm 处的吸光度逐渐增大, 并且存在良好的线性关系, 表明其还原能力逐渐增强; 野菊花总体还原能力优越于常规抗氧化剂维生素 C, 进一步解释了野菊花为什么具有较强的自由基清除活性, 也进一步证实了野菊花是良好的自由基清除剂; 柠檬酸总体还原能力几乎为 0, 证实其为什么具有较弱的自由基清除活性。

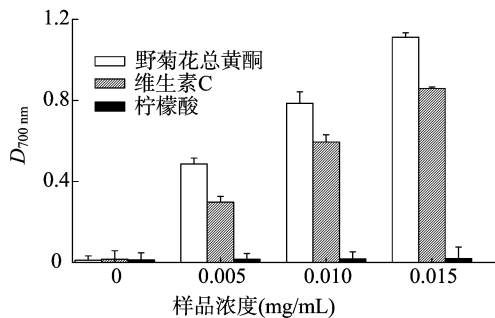


图4 野菊花总黄酮与维生素 C 和柠檬酸的还原能力比较

3 结论

本研究通过乙醇提取、芸香苷标定, 确定野菊花提取液的总黄酮含量为 0.25 mg/mL。野菊花具有较强的还原能力, 对 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和 ABTS^+ 都具有良好的清除活性, 清除效率优于常规抗氧化剂维生素 C 和柠檬酸, 清除 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和 ABTS^+ 的 EC_{50} 值分别为 0.016、0.012 mg/mL 和 6.95 $\mu\text{g/mL}$ 。野菊花资源丰富, 分布广泛, 本研究证实其为

良好的自由基清除剂, 为野菊花的生物活性研究和资源开发提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 郭美兰, 敬应春, 蔡国琴. RP-HPLC 同时测定野菊花中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的含量[J]. 中国现代中药, 2012, 14(4): 10-13.
- [2] 赵秀玲. 野菊花的功效因子、保健作用及其开发利用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 429-431, 434.
- [3] 陈惠芳. 植物活性成分词典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 542.
- [4] 申海进, 郭巧生, 房海灵. 野菊花 60% 乙醇提取物的酚类成分组成及其清除自由基和防霉变能力分析[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(1): 20-25.
- [5] 彭 朋, 程雪梅, 刘 力, 等. 野菊花提取物的质量标准研究[J]. 中国药事, 2010, 24(7): 650-654.
- [6] 李贵荣. 野菊花多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(3): 269-270.
- [7] 严亦慈, 姜小娥, 蒋惠娣. 野菊花水提液抗氧化作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学, 1999, 16(6): 16-18.
- [8] 褚福红, 于 新. 野菊花提取物清除自由基作用的研究[J]. 食品工业, 2010(5): 1-3.
- [9] 申海进, 郭巧生, 房海灵. 野菊花乙醚提取物的理化性质及抗氧化能力[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 43-47.
- [10] 韩荣生, 李 鹏, 李金辉. 野菊花中总黄酮的提取工艺研究[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(6): 49-51.
- [11] 刁兴彬, 蒋海强. 野菊花黄酮类抗氧化成分的提取工艺研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2010, 12(6): 31-34.
- [12] 马燕妮, 张清华, 刘玉红, 等. 桑叶黄酮与鬼针草黄酮组分配伍抗氧化协同作用研究[J]. 食品与药品, 2013, 15(3): 160-161.
- [13] 冯东辉, 褚宏山, 曹露露, 等. 比色法测定野菊花中总黄酮含量[J]. 吉林医药学院学报, 2009, 30(5): 268-270.
- [14] 金 鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [15] 韩少华, 朱靖博, 王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J]. 中国酿造, 2009, 6(6): 155-157.
- [16] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(9/10): 1231-1237.
- [17] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction - antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 40(44): 307-315.
- [18] 王建英, 任引哲, 王迎新. 氧自由基与人体健康[J]. 化学世界, 2006, 47(1): 61-63.
- [19] Buetler T M, Krauskopf A, Ruegg U T. Role of superoxide as a signaling molecule[J]. Physiology, 2004, 19(3): 120-123.
- [20] Shen H M, Yang C F, Ding W X, et al. Superoxide radical - initiated apoptotic signalling pathway in selenite - treated HepG₂ cells: mitochondria serve as the main target[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2001, 30(1): 9-21.