

月季花总黄酮两种提取方法的比较研究^{*}

张敏娜¹ 朱 军² 王光辉³ 丁瑞芳¹ 张华丽¹

(¹ 济宁医学院药学院, 山东 日照 276826; ² 济宁医学院科研处, 济宁 272067; ³ 济宁医学院基础医学与法医学院, 济宁 272067)

摘 要 **目的** 比较不同方法提取月季花中总黄酮的效益。**方法** 分别以双水相提取法和回流提取法对月季花药材进行提取, 芦丁为对照品, 采用分光光度法测定月季花总黄酮含量。**结果** 双水相提取法得到的总黄酮含量较高。**结论** 双水相提取法方法简便, 适用于月季花总黄酮的提取。

关键词 月季花; 总黄酮; 提取方法; 比较

中图分类号: R284.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2012)02-018-03

Comparing two kinds of methods for extraction of the total flavonoids from *Rosa Chinensis*

ZHANG Min-na, ZHU Jun, WANG Guang-hui, et al

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical Univerisity, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To make a comparison with the extraction technology of total flavones from *Flos Rosae Chinensis*. **Methods** Total flavones from *Flos Rosa Chinensis* were separated respectively by two-phase aqueous system extraction and heating reflux extraction. The content of total flavonoids was determined by spectrophotometry with rutin as reference substance. **Results** High content of total flavones was obtained by two-phase aqueous system extraction relatively. **Conclusion** The two-phase aqueous system extraction is simple and can be used as extracting total flavones from *Flos Rosa Chinensis*.

Key words: *Flos Rosa Chinensis*; Total flavonoids; Extraction methods; Comparison

月季花(*Flos Rosae Chinensis*)又名四季花、月月红、月季红等,是蔷薇科植物月季的干燥花蕾或初开放的花,具有活血调经、消肿解毒之功效。研究表明,月季花含有较丰富的黄酮类成分,黄酮类化合物具有抗癌、抗菌、抗病毒、抗氧化以及免疫调节等广泛的药理活性^[1]。

文献报道的月季花总黄酮提取方法有回流提取法、索氏提取法和溶剂浸提法等^[2-4]。近年来,双水相分离技术在生物活性成分及天然产物有效成分的提取分离方面引起了人们的研究兴趣^[5]。双水相分离技术与水-有机相萃取原理相似,是利用不同物质在特定的体系中有不同的分配系数,当物质进入双水相体系后,在上相和下相间进行选择分配,表现出一定的分配系数,从而达到分离纯化的目的,具有活性损失小、分离步骤少、操作条件温和,易于工艺放大和连续操作等优点^[6]。本文采用

双水相提取法和传统的回流提取法提取月季花总黄酮,以芦丁为对照品,采用分光光度法测定总黄酮含量,比较两种提取方法的提取效果,以期为月季花总黄酮提取方法的改进提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UV-1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用公司)、KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 材料与试剂

月季花药材购于各地,用研钵磨成细粉备用;芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100080-200406);亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇、硫酸铵均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

* [基金项目] 济宁医学院 2008 年青年科学基金资助项目

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 样品前处理 取月季花药材适量置研钵中磨成细粉,过 80 目筛,过筛粉末用石油醚脱脂备用。

2.1.2 双水相提取法 双水相体系的制备:低级醇-盐双水相体系参考文献^[7-8]制备,其中水溶性有机溶剂选择乙醇,成相盐选择硫酸铵,通过改变乙醇与水的比例及硫酸铵的用量控制双水相体系的形成。本文选择的双水相体系乙醇与水体积之比为 0.6,硫酸铵浓度为 0.27 g/ml (每 1ml 水 0.27 g 硫酸铵)。

2.1.3 月季花总黄酮的提取 准确称取脱脂的月季花粉末 1.0000 g 于具塞锥形瓶中,加入乙醇-硫酸铵双水相溶液 50 ml,超声提取 50 min,于分液漏斗中静置,分取上层乙醇相清液,水浴蒸干,残渣用 60%乙醇溶解并定容至 25 ml,即得。

2.1.4 回流提取法 准确称取脱脂的月季花粉末 1.0000 g 置圆底烧瓶中,加 95%乙醇 50 ml,加热回流提取 2 h,过滤,用 95%乙醇洗涤滤饼,与滤液合并,水浴蒸干,残渣用 60%乙醇溶解并定容至 25 ml,即得。

2.2 标准曲线的绘制

精密称取芦丁对照品 20.01 mg 用 60%乙醇溶解并定容于 100 ml 量瓶中,得 0.2001 mg/ml 芦丁对照品溶液。精密量取该对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 ml 于 25 ml 量瓶中,加入 5%NaNO₂ 溶液 1 ml,静置 6 min,加入 10%Al(NO₃)₃ 溶液 1 ml,静置 6 min,再加入 4%NaOH 溶液 10 ml,用水定容至刻度,摇匀,静置 15 min,以相应试剂为空白,分别于 511 nm 处测定吸光度。以浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为: $A=13.3C+0.0384$ ($r=0.9995$)。结果表明,该方法在 8.004~56.03 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.3 精密度试验

精密量取 2.2 项下对照品溶液 2.0 ml,置 10 ml 量瓶中,按 2.2 项下方法显色并测定吸光度,重复测定 6 次,RSD=1.05%,表明仪器的精密度良好。

2.4 稳定性试验

精密量取 2.1 项下方法制备的样品溶液 0.5 ml,按 2.2 项下方法显色,分别于 0、10、20、30、40、60 min 测定吸光度,双水相提取法和回流提取法的 RSD 分别为 0.59%和 1.08%,表明样品溶液在

60 min 内稳定。

2.5 回收率试验

取已知含量的月季花粉末 10 份,按 2.1 项下方法制备样品溶液,每组 5 份,分别准确量取 0.5 ml 样品溶液置 25 ml 量瓶中,各加入芦丁对照品溶液 1.0 ml,按 2.2 项下方法显色并测定吸光度,结果得双水相提取法和回流提取法的回收率分别为 93.22%和 95.68%,RSD 分别为 1.97%和 2.05%。

2.6 样品总黄酮含量测定

分别精密量取 2.1.2、2.1.3 项下所得溶液 0.5 ml,按“2.2”项下方法显色并测定吸光度,将吸光度代入回归方程计算样品溶液中的总黄酮含量,根据稀释倍数及样品质量换算出样品中总黄酮的含量,结果见表 1。

表 1 两种提取方法月季花总黄酮测定结果

来源	双水相提取法 总黄酮含量/%	回流提取法 总黄酮含量/%
济宁广联药店	4.42	3.89
日照同仁堂药店	4.02	3.56
日照润生堂药房	3.68	3.13
安徽亳州药材市场	2.86	2.07
山东百味堂药店	3.95	3.29

3 讨论

本文采用单因素试验和正交试验考察双水相提取法提取月季花总黄酮的实验条件,最终确定乙醇与水体积比为 0.6,料液比为 1:50,硫酸铵浓度为 0.27 g/ml 的条件下超声 50 min 为最佳提取条件。

目前,传统回流提取法在中药总黄酮提取中还占主导地位,但提取所需时间较长,热能消耗大,样品长时间受热易破坏黄酮类化合物的结构。本文采用双水相提取法与回流提取法对月季花总黄酮提取效果进行比较,含量测定结果表明,双水相提取法较回流提取法提取效率高,耗时短,提取条件温和,可用于月季花总黄酮的提取。

参考文献:

- [1] 张曦,吴锡信.月季花的药理及临床应用探讨[J].吉林中医药,2004,24(4):47.
- [2] 张沛,薛莹,青琳森,等.月季花的化学成分研究[J].中草药,2010,41(10):1616-1618.
- [3] 王浩江,孙体健,曹晓峰.月季花中总黄酮含量测定[J].山西医科大学学报,2007,38(4):318-319.

(下转第 23 页)

过氧化物的增加是细胞损伤的主要病理过程之一。正常生理状态下,自由基生成与清除处在动态平衡中,在缺血再灌注时出现氧自由基形成和清除失衡。氧自由基对细胞的损害作用是引起生物膜上不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,造成生物膜结构和功能的破坏。细胞膜发生脂质过氧化反应、膜磷脂被破坏降解可使细胞膜对钠、钙及大分子物质通透性增加,发生细胞毒性水肿,线粒体破坏,功能丧失^[9],攻击细胞内的 RNA 和 DNA,影响细胞的基因转录和蛋白表达过程^[10]。中枢神经系统含有大量的不饱和脂肪酸,最易发生脂质过氧化反应,生成大量的过氧化脂。MDA 是脂质过氧化反应的稳定代谢物,因而测定 MDA 含量可反映组织中自由基的含量和自由基引发的脂质过氧化反应程度,间接反映细胞损伤的程度。

组织中存在能清除超氧阴离子自由基的 SOD,可通过歧化作用清除氧自由基减少细胞损伤,还可抑制缺血导致的 APE/Ref-1 下调和 DNA 裂解。研究发现 SOD 还能通过阻断细胞色素 c 依赖的线粒体凋亡途径保护细胞^[11],在其它细胞上也发现 SOD 活性提高能够抑制缺氧引起的细胞凋亡^[12]。因而 SOD 活性可间接反映机体清除氧自由基的能力。脑缺血时脂质过氧化活跃,MDA 生成增多,SOD 则因消耗而减少。

本实验的研究采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,结果显示 TSG 预处理后,SOD 活性增强、MDA 含量降低,细胞凋亡率显著降低,接近正常水平。提示 TSG 可能通过抑制自由基产生、减少抗氧化剂的消耗从而减少细胞凋亡,对缺氧、缺糖所致脑 AS 的损伤起到保护作用。由于 AS 的功能状态对损伤应激中神经元的存活起到关键作用,所以如何有效地抑制 AS 凋亡成为缺血缺氧性脑病新的治疗策略。本实验只是初步探讨了 TSG 对氧糖剥夺 AS 的抗凋亡保护作用,其具体的分子机制和信号

通路尚需进一步的研究,以便为缺血性脑病的临床干预提供更多的理论依据。

参考文献:

- [1] Jiang Z,Zhang Y,Chen XQ,et al. Apoptosis and activation of Erk1/2 and Akt in astrocytes postischemia[J]. *Neurochem Res*,2003,28(6):831-837.
- [2] Dienel GA,Hertz L. Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia[J]. *Glia*,2005,50(4): 362-388.
- [3] Gibson CL,Coughlan TC,Murphy SP. Glial nitric oxide and ischemia[J]. *Glia*,2005,50(4):417-426.
- [4] Wang X,Zhao L,Han T,et al. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene -2-O-beta-D-glucoside,an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb on experimental colitis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*,2008,578(2-3): 339-348.
- [5] 田汝芳,龙石银,田英,等. 二苯乙烯苷抗动脉粥样硬化的药理作用[J]. *现代生物医学进展*,2010,10(2): 1193-1197.
- [6] 张伟,王春华,李锋. 二苯乙烯苷对大鼠动脉硬化模型的 MMP-2,9 表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*,2008,24(2):134-138.
- [7] Gabryel B,Chalimoniuk B,Stolecka A,et al. Activation of cPLA2 and sPLA2 in astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro[J]. *Cell Biology International*,2007,31(9):958-965.
- [8] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的体外抗氧化研究[J]. *食品科学*,2007,28(1):313-316.
- [9] Naoi M,Maruyama W,Yi H,et al. Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival[J]. *J Neural Transm*,2009,116(11): 1371-1381.
- [10] Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders[J]. *Indian J Biochem Biophys*,2009,46(1): 9-15.
- [11] Siren AL,Fratelli M,Brines M,et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98(7):4044-4049.
- [12] K Koshimura, Y Murakami, M Sohmiya, et al. Effects of erythropoietin on neuronal activity[J]. *J Neurochem*,1999,72(6):2565-2572.

(收稿日期 2011-12-23)

(上接第 19 页)

- [4] 徐文昭. 月季花花瓣的黄酮类成分的研究[J]. *南京中医药大学学报*,2000,16(4):225-226.
- [5] 戈延茹,曹恒杰. 双水相萃取技术及其在药物提取分离中的应用近况[J]. *中国现代应用药学*,2009,26(8):623-627.
- [6] 吴敏. 双水相萃取技术在药物提取与分离中的应用[J]. *中成*

药,2006,28(10):1505-1508.

- [7] 王志辉,朱建航,郑楠,等. 葛根素在乙醇/硫酸铵两水相体系中的分配特性[J]. *时珍国医国药*,2008,19(1):13-15.
- [8] 高云涛,吴立生,王伟. 丙醇-硫酸铵-水液-液体系萃取分离铂、钼、铈和金[J]. *分析化学*,2001,29(8):901-903.

(收稿日期 2011-11-25)