

福白菊总黄酮抗氧化活性及谱效关系分析

冉佩灵^{1,2}, 李蓉¹, 黄业传^{1*}, 李凤², 阮军³, 李硕芳³

(1. 荆楚理工学院生物工程学院, 湖北荆门 448000) (2. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000) (3. 湖北钟祥聚瑞食品有限公司, 湖北荆门 431900)

摘要: 福白菊是药食兼用型湖北道地中药材, 富含黄酮类化合物。以体外化学抗氧化法、体内秀丽隐杆线虫模型法为评价方法, 以自由基清除率、抗氧化酶活力及线虫荧光强度等为指标, 探究福白菊黄酮化合物的抗氧化能力。将15个不同品牌的福白菊黄酮指纹图谱中所标示的共有峰与抗氧化活性相联系, 以探明福白菊黄酮与抗氧化活性间的谱效关系。结果表明, 福白菊黄酮提取物最大DPPH自由基清除率为83.14%, ABTS⁺自由基最大清除率为75.32%。福白菊黄酮提取物能显著提高线虫内抗氧化酶活力, 增强线虫的抗氧化应激抗性。福白菊黄酮指纹图谱中8个特征共有峰对抗氧化活性均有一定的相关性, 尤其是3号峰对抗氧化活性作用相关性最显著, 可能是木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷; 4号峰对ABTS⁺自由基清除率作用相关性最显著, 可能是木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷。以上研究结果表明, 福白菊黄酮提取物具有良好的抗氧化活性, 可为福白菊后续开发成抗氧化剂等提供参考依据。

关键词: 福白菊; 总黄酮; 抗氧化; 线虫; 谱效关系

文章编号: 1673-9078(2025)08-112-121

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0827

Analysis of Total Flavonoid Antioxidant Activity and Spectrum-effect Relationships in Fubaiju

RAN Peiling^{1,2}, LI Rong¹, HUANG Yechuan^{1*}, LI Feng², RUAN Jun³, LI Shuofang³

(1. Institute of Agricultural and Biotechnology, Jingchu Institute of Technology, Jingmen 448000, China)
(2. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China) (3. Hubei Zhongxiang Jurui Food Co. Ltd., Jingmen 431900, China)

Abstract: The authentic Hubei Chinese medicinal and edible herb Fubaiju, *Chrysanthemum morifolium*, is rich in flavonoids. An evaluation method based on an *in vitro* chemical antioxidant assay and an *in vivo* *C. elegans* model was proposed to investigate the antioxidant capacities of flavone compounds, using the free-radical-scavenging rate, antioxidant enzyme activity, and nematode fluorescence intensity as indicators. The common peaks indicated in the spectral fingerprints of flavonoids from 15 different brands of Fubaiju Chrysanthemum were assessed to investigate the spectrum-effect relationship between Fubaiju Chrysanthemum flavonoids and their antioxidant activities. The maximum DPPH and the ABTS⁺ free-radical-scavenging rates of the flavonoid extract of Fubaiju were 83.14% and 75.32%, respectively. Moreover, the flavonoid extract significantly improved the antioxidant enzyme activity in nematodes and enhanced their oxidative stress

引文格式:

冉佩灵, 李蓉, 黄业传, 等. 福白菊总黄酮抗氧化活性及谱效关系分析[J]. 现代食品科技, 2025, 41(8): 112-121.

RAN Peiling, LI Rong, HUANG Yechuan, et al. Analysis of total flavonoid antioxidant activity and spectrum-effect relationships in Fubaiju [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 112-121.

收稿日期: 2024-06-12

基金项目: 湖北省科技计划项目 (2022BEC031)

作者简介: 冉佩灵 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 现代食品加工, E-mail: 995908379@qq.com

通讯作者: 黄业传 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 现代食品加工, E-mail: huangyc@jcut.edu.cn

resistance. Eight characteristic common peaks in the flavonoid spectral fingerprint profile all showed a certain correlation with antioxidant activity, especially peak 3, which had the most significant correlation and may represent luteolin-7-O- β -D-glucoside. Peak 4 showed the most significant correlation with ABTS⁺ free-radical scavenging and may represent luteolin-7-O- β -D-glucuronide. The flavonoid extract from Fubaiju *Chrysanthemum* exhibited promising antioxidant activity, providing a reference for the subsequent derivation and development of antioxidants.

Key words: Fubaiju; total flavonoids; antioxidant; nematode; spectrum-effect relationship

菊花为菊科植物菊（*Chrysanthemum morifolium* Ramat.）的干燥头状花序^[1]。福白菊 *Chrysanthemum morifolium* cv. ‘Fubaiju’）主要分布在湖北省麻城市福田河镇，因此也被称为麻城福白菊，福白菊朵大花白、清香味甘，具有清火、解毒、养肝等功效^[2]。福白菊富含黄酮和绿原酸，是湖北省重要道地药材，也是药食兼用型中药材^[3,4]。福白菊富含有多种生物活性成分，包括酚酸、类黄酮、萜类、不饱和脂肪酸和多糖等^[5]。刘引等^[6]测定建立了 29 批不同品种菊花的中药指纹图谱，综合菊花中三种主要有效成分含量和指纹图谱峰多样性来看，认为特色种质资源福白菊的品质比较优质。许多学者^[7-12]研究发现，福白菊拥有显著的抗炎、抗氧化、抑菌作用。Liu^[13]和 Cui^[14]等研究发现，福白菊总黄酮有抗肿瘤、预防白内障、调节肠道菌群的作用。Zhang 等^[15]从福白菊中分离得到一种新型菊花多糖，研究发现福白菊多糖具有良好的乳化性质和乳化稳定性，可作为一种天然乳化剂用于未来的应用。薛淑静^[16]、尹怀宁等^[17]研制了一种福白菊饮品，制备成的饮品兼具福白菊和酒饮的独特风味，并具有一定的抗氧化性。目前各领域与福白菊的相关研究较少，因此福白菊的研究有较大研究潜力和发展空间。

秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）是科研领域中一种理想的模式生物，具有成本低、易培养、世代短、子代多，信号通路和基因同人类高度相似等诸多优点，被广泛应用于遗传生物学、基因功能、衰老、药物筛选、食品营养评价等众多领域^[18]。中药指纹图谱技术凭借高精度度，在药材特征峰和共有峰的辨识上表现出色^[19]。药效学研究药物对人体的具体作用机制，而谱效学研究则是在此基础上，结合化学成分分析来评估药物效果的一种方法^[20]。目前，福白菊相关研究较少，主要集中在福白菊种植及少量福白菊功能性物质提取优化研究，还未有全面性评价福白菊黄酮抗氧化功能性及谱效关系的研究。本文在对福白菊进行黄酮提取优

化的基础上，通过测定福白菊黄酮提取物的体外抗氧化指标，结合线虫模型测定体内抗氧化指标，全面评价福白菊黄酮提取物的抗氧化作用，建立福白菊黄酮指纹图谱，探究福白菊黄酮共有峰与抗氧化活性间的谱效关系，以期全面认识福白菊黄酮类物质的功效作用及为深入开发利用提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表 1 15个不同品牌的福白菊
Table 1 15 different brands of Fubaiju *Chrysanthemum*

编号	菊花品牌
1	茶之友真空铁罐福白菊
2	茶之友散装福白菊花王
3	福菊王麻城福白菊
4	麻城福田河头茬胎菊王
5	麻城金利峰胎菊王
6	金丹福白菊花茶
7	金丹罐装福白胎菊
8	金丹盒装优质福白菊花茶
9	新奇一福白菊胎菊王
10	新奇一麻城福白菊
11	新奇一贡品胎菊王
12	巴河福白胎菊王
13	麻城福白菊花饼
14	麻城一级福白菊头茬花
15	麻城特产福白菊花

15 个不同品牌福白菊，购于电商；野生型线虫株系 N2、CF1553、LD1171，购自明尼苏达大学秀丽隐杆线虫遗传学中心 *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC)；大肠杆菌 *E. coli* OP50，本课题组实验室保存；芦丁标准品，北京索莱宝科技有限公司；福林酚、ABTS 试剂（98%），上海麦克林生化科技股份有限公司；DPPH 试剂，北京博奥拓达科技有限公司；超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase，

SOD)测定试剂盒、谷胱甘肽 (Glutathione, GSH)测定试剂盒,南京建成生物科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限公司;色谱级甲醇,天津市科密欧化学试剂有限公司;乙腈,西陇化工股份有限公司;分析级无水乙醇,成都科隆化学品有限公司。

1.2 仪器与设备

KQ-100DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;TU-190 紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;SW-CJ-3F 超净工作台,上海沪静医疗器械有限公司;XFH-50CA 全自动高压灭菌锅,浙江新丰医疗器械有限公司;WL 荧光显微镜,微特视界科技(深圳)有限公司;RE20 旋转蒸发仪,郑州长城科工贸有限公司;EnSpire 酶标仪,美国 PerkinElmer 公司;Waters E2695 HPLC 液相色谱仪,美国 Waters 公司。

1.3 福白菊实验材料制备

挑选朵大、无虫害的优质福白菊花朵,将福白菊于 40℃ 烘箱干燥至恒重,用粉碎机打碎成粉末状,收集福白菊粉末保存至干燥器内备用。经单因素和响应面优化福白菊黄酮提取实验得到最佳提取条件为:固定福白菊用量为 1 g,当超声提取温度 58℃,时间 70 min,甲醇体积为 49 mL 时,福白菊黄酮提取率最高。将福白菊甲醇超声辅助提取后,于 40℃ 低温旋转蒸发至不再有甲醇蒸出,再于烘箱 40℃ 低温烘干成粉末状,迅速收集样品,避光保存于干燥器内。

1.4 体外抗氧化活性测定

1.4.1 DPPH 自由基清除率测试

福白菊总黄酮的抗氧化活性采用 DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)在体外清除自由基的能力来评价,DPPH 自由基清除率实验方法参考蔡跃月等^[21]和刘星雨等^[22]。将福白菊提取液梯度量取于 96 孔板中,加入 100 μL 浓度 0.1 mol/mL 的 DPPH 溶液,用甲醇补至 200 μL 混合均匀,避光于 25℃ 孵育 30 min 后在 517 nm 处测定吸光度,通过公式计算福白菊样品 DPPH 自由基清除率。

$$C = (1 - \frac{A-B}{X_1}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

C——DPPH 自由基清除率,%;

X_1 ——甲醇+DPPH 溶液的吸光度;

A——样品+DPPH 溶液的吸光度;

B——样品+甲醇的吸光度。

1.4.2 ABTS⁺自由基清除率测试

ABTS⁺ 自由基清除能力参照文献^[23]方法,将摩尔浓度 7 mmol/L 的 ABTS⁺ 溶液和摩尔浓度 1.4 mmol/L 过硫酸钾溶液等量混合,避光 12~16 h,使用时用甲醇调节吸光度值为 0.7±0.02 即可获得 ABTS⁺ 工作液,向 96 孔板中加入 100 μL ABTS⁺ 工作液和不同质量浓度梯度福白菊黄酮提取液,用甲醇补至 200 μL 混合均匀,置于避光处在 25℃ 反应 10 min,于 734 nm 波长处测定吸光度值,通过所测得的吸光度值计算 ABTS⁺ 的清除率。

$$D = (1 - \frac{E-F}{X_2}) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D——ABTS⁺ 自由基的清除率,%;

X_2 ——甲醇+ABTS⁺ 溶液的吸光度;

E——样品+ABTS⁺ 溶液的吸光度;

F——样品+甲醇的吸光度。

1.5 体内抗氧化活性测定

1.5.1 线虫培养

线虫的扩增培养过程:先将一定量的 *E. coli* OP50 菌液均匀地涂抹在 NGM 培养基的中央区域,然后在超净工作台上晾干,将其倒置在 37℃ 的培养箱中倒置培养。当培养基上的细菌生长完成后,冷却至室温,使用线虫挑针挑选所需的线虫株系品种,将其转移到新的 NGM 培养基上,并在 20℃ 下的环境中继续培养。当培养基上布满线虫时,使用火焰消毒过的金属勺切割含有线虫的培养基部分,并将其转移到新的 NGM 培养基上,继续在 20℃ 下培养。

线虫同步化:在线虫产卵阶段,将线虫从 NGM 培养基上用 M9 缓冲液洗至 1.5 mL 的离心管中,而后用 M9 缓冲液清洗三次去除线虫表面的细菌。在最后一次清洗后,向离心管中加入 1 mL 的线虫裂解液,经过 15 min 的剧烈振荡使线虫完全裂解,然后在 24 200×g 的速度下离心 1 min,去除上清液。沉淀物用 M9 缓冲液清洗四次,最后将含有线虫卵的 M9 缓冲液滴在涂有 *E. coli* OP50 的 NGM 培养基上,晾干后在 20℃ 的培养箱中培养,以获得同步生长的线虫后代^[24]。

表 2 仪器精密性测定

Table 2 Instrument precision determination

共有峰	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次	平均值	RSD/%
波峰 1	3.301 78	3.470 875	3.089 728	3.531 794	3.409 121	3.362 395	3.360 949	0.17
波峰 2	14.730 96	14.406 96	15.128 97	15.349 86	15.083 98	14.382 43	14.847 19	0.34
波峰 3	27.142 1	27.244 68	26.732 99	27.520 75	27.136 07	27.293 05	27.178 27	0.25
波峰 4	28.367 46	28.949 35	28.733 9	25.694 94	26.340 23	27.081 04	27.527 82	1.41
波峰 5	30.006 06	29.908 99	28.158 2	30.452 07	31.139 26	29.849 65	29.919 04	1.05
波峰 6	31.971 42	31.786 41	32.588 39	31.827 28	31.051 08	31.946 49	31.861 85	0.54
波峰 7	39.631 76	40.574 9	40.017 39	40.093 77	37.728 68	40.217 86	39.710 73	1.67
波峰 8	56.300 6	52.541 07	57.600 23	57.066 3	50.449 19	56.337 02	55.049 07	3.23

表 3 样品重复性测试

Table 3 Sample repeatability test

共有峰	第 1 份	第 2 份	第 3 份	第 4 份	第 5 份	第 6 份	平均值	RSD/%
波峰 1	3.273 22	3.512 064	3.207 005	3.419 372	3.499 065	3.120 046	3.338 462	0.21
波峰 2	14.676 73	14.653 6	14.221 18	13.887 64	14.733 57	15.601 34	14.629 01	0.97
波峰 3	27.127 59	27.342 98	28.088 06	26.816 35	27.378 66	26.291 96	27.174 27	0.69
波峰 4	28.347 75	27.447 03	27.817 53	29.001 12	27.908 15	28.086 33	28.101 32	0.74
波峰 5	31.933 24	31.290 8	33.759 76	33.429 55	31.053 63	30.457 67	31.987 44	1.17
波峰 6	34.456 24	35.629 5	37.106 52	34.555 93	35.104 82	36.054 08	35.484 52	1.38
波峰 7	39.673 35	41.465 02	45.562 17	40.061 18	38.881 39	41.374 35	41.169 58	2.24
波峰 8	56.296 67	58.949 46	54.799 42	63.739 18	60.310 33	54.620 64	58.119 28	3.51

1.5.2 秀丽隐杆线虫抗氧化酶活测定

同步化至 L4 期的线虫幼虫，使用 96 孔培养板进行培养。每个孔中加入 100 μL 的 S-complete 培养基，并同时设置空白对照组以及不同质量浓度的福白菊提取物处理组。当线虫发育至 L4 阶段时，使用线虫挑针将它们转移到 S-complete 液体培养基中，每个孔中含有 10~15 条线虫，培养 3 d 后，收集各实验组的线虫样本，使用 M9 缓冲液冲洗三次，然后在冰上研磨以磨碎线虫。接着，在 4 ℃ 条件下以 24 200×g 的速度离心 2 min，取上清液，并根据 SOD 酶活性、BCA 和 GSH 测定试剂盒的操作说明进行相应的测定^[25]。

1.5.3 氧化应激抗性测定

在线虫同步化至 L4 期时，采用 96 孔培养板进行后续培养，使用挑针将线虫小心地转移到 S-complete 培养基中，每个孔中注入 100 μL 的 S-complete 培养基，每个孔中放置 10~15 条线虫，并在其中设置空白对照组和不同质量浓度的福白菊提取物处理组。为在培养至第 7 天时，从各处理组中收集线虫样本，随机挑取线虫并将其转移到新的

96 孔板中，每孔事先加入 M9 缓冲液，每个孔中有 10~15 条线虫，且每个处理组的线虫总数不少于 50 条。最后，在每孔中加入过氧化氢溶液，使线虫暴露在摩尔浓度 1 mol/L 的过氧化氢溶液中，并在 20 ℃ 的条件下，每间隔 2 h 记录一次线虫的生存状态，直到所有线虫死亡为止。实验结束后，使用 GraphPad 软件来处理绘制线虫的生存曲线，并通过 log-rank (Mantel-Cox) 统计分析方法对实验数据进行分析^[26]。

1.5.4 抗氧化蛋白 SOD-3 荧光可视化定量

选用带有 GFP 报告基因的 CF1553 (SOD-3::GFP) 和 LD1171 (GCS-1::GFP) 两种线虫株系测定抗氧化蛋白的表达水平。预先对线虫进行同步化处理，将处于 L1 期的幼虫在 S-complete 培养基（不含 FuDR）中分别培养 3 d，直至它们发育到成虫早期。收集不同处理组的线虫样本，使用 M9 缓冲液清洗三次以去除线虫表面的杂质。随后，利用 NaN3 溶液使线虫进入麻醉状态，并通过荧光显微镜对线虫进行成像。采集到的图像将通过 Image J 软件进行后续处理和分析^[27]。

表 4 样品稳定性测试
Table 4 Sample stability test

共有峰	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	平均值	RSD/%
波峰 1	3.264 35	3.296 496	3.211 782	3.256 574	3.364 262	3.166 451	3.259 986	0.08
波峰 2	14.678 76	14.632 57	14.536 03	14.725 38	14.781 31	14.684 22	14.673 04	0.12
波峰 3	25.342 33	24.848 4	24.507 33	24.763 69	24.675 31	24.541 17	24.779 71	0.84
波峰 4	27.129 57	26.897 64	28.165 72	27.033 18	26.834 27	27.286 95	27.224 55	0.45
波峰 5	31.978 86	32.068 45	32.262 37	31.961 88	32.285 86	32.311 37	32.144 8	0.48
波峰 6	36.435 03	35.494 05	37.145 74	36.578 62	36.598 13	35.586 03	36.306 27	1.57
波峰 7	42.396 74	39.502 2	41.858 28	46.724 73	42.186 24	42.771 93	42.573 35	1.35
波峰 8	56.308 79	55.875 54	59.702 63	58.519 71	53.536 24	56.859 26	56.800 36	2.27

1.6 福白菊黄酮指纹图谱建立

将 15 个不同品牌的福白菊按照福白菊黄酮最佳提取工艺提取后，样液在 4 ℃下 4 260×g 离心 5 min，取上清液。将样品通过 0.22 μm 的微孔滤膜滤过于样品瓶即为供试样品。

1.6.1 色谱条件

色谱柱为 Feinigen XPeonyx C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为质量分数 0.1% 磷酸－水溶液 (A) 和乙腈 (B)；梯度洗脱 (0~10 min : 5%→15% B ; 10~16 min : 15%→18% B ; 16~35 min : 18%→18.5% B ; 35~55 min : 18.5%→31% B ; 55~90 min : 31%→45% B)；流量 1.0 mL/min；进样量 10 μL；柱温 35 ℃；检测波长 257 nm。

1.6.2 仪器精密度试验

将供试样品连续进样 6 次，结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<3.23%。表明仪器精密度良好。

1.6.3 重复性试验

平行制备 6 份供试品溶液，进样分析，结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<3.51%。表明方法重复性良好。

1.6.4 稳定性试验

将供试品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样。结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<2.27%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

1.6.5 指纹图谱建立

将 15 个不同品牌的福白菊黄酮色谱图导入《中国色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)。将色谱峰峰形较明显、信号强度较好的 S1 号样品醇提

物的色谱图作为参照色谱图，运用全谱峰匹配法和中位数法，将时间窗设置为 0.1。经过多点校正后，自动匹配 HPLC 叠加指纹图谱和对照图谱。保留时间为 X 轴，吸收峰强度为 Y 轴。

1.7 谱效关系分析

1.7.1 抗氧化活性测定

按照 1.5.1 和 1.5.2 中实验方法测定 15 个不同品牌的福白菊黄酮抗氧化活性指标 DPPH 和 ABTS⁺。

1.7.2 灰色关联度分析

灰色关系度分析是一种对影响目标序列的相关因素进行定量分析的模型，可以分析多个自变量与因变量之间关联程度的大小。采用 SPSS 软件研究福白菊黄酮 15 个批次与其清除 DPPH 自由基这一抗氧化活性的 IC₅₀ 的相关性，计算灰色关联系数和等级。

1.7.3 偏最小二乘法

偏最小二乘法是一种数学优化技术，它通过最小化误差的平方和找到一组数据的最佳函数匹配。得到的回归系数的正、负表明自变量与因变量是正相关或负相关，回归系数绝对值的大小表明自变量对因变量的贡献大小。选择 15 个指纹图谱共有峰的峰面积数据作为自变量，各样品的 IC₅₀ 值作为因变量，利用 SIMCA-P14.1 软件采用偏最小二乘回归分析方法进行谱－效关系分析，探讨各成分与药效的关系。

1.8 数据处理及分析

每组试验平行测定 3 次，数据利用软件 SPSS 27 和 Excel 处理。

表 5 福白菊延长线虫在氧化应激条件下的寿命

Table 5 Prolonged lifespan of nematodes under oxidative stress conditions by Fubaiju <i>Chrysanthemum</i>				
组别	平均寿命 (hours±SEM)	增加百分比	线虫条数	P 值
对照组	12.04±0.34 ^a	—	152	—
福白菊黄酮提取物质量浓度 120 μg/mL	13.99±0.41 ^{bc}	16.20%	151	0.000 2
福白菊黄酮提取物质量浓度 240 μg/mL	14.93±0.44 ^c	24.00%	148	<0.000 1
福白菊黄酮提取物质量浓度 360 μg/mL	13.86±0.35 ^b	15.12%	165	0.000 3

注: 表中不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2 结果和讨论

2.1 DPPH和ABTS⁺自由基清除率实验

福白菊总黄酮提取物的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率实验结果如图 1 所示。结果表明，自由基清除率随着福白菊黄酮提取物的质量浓度增加而提高，自由基的清除率呈现浓度依赖性。福白菊黄酮 DPPH 自由基清除率的最大值为 83.14%，IC₅₀ 为 35.80 μg/mL；福白菊黄酮 ABTS⁺ 自由基清除率的最大值为 75.32%，IC₅₀ 为 48.36 μg/mL。对比怀菊花总黄酮 DPPH 自由基清除率最大值为 57.89%^[28]，雪菊总黄酮对 ABTS⁺ 自由基的半数清除率 139.3 μg/mL^[29]，同比即福白菊总黄酮提取物表现出清除自由基的强抗氧化能力。为进一步验证福白菊总黄酮提取物的抗氧化活性，应结合线虫模型进行体内抗氧化活性实验。

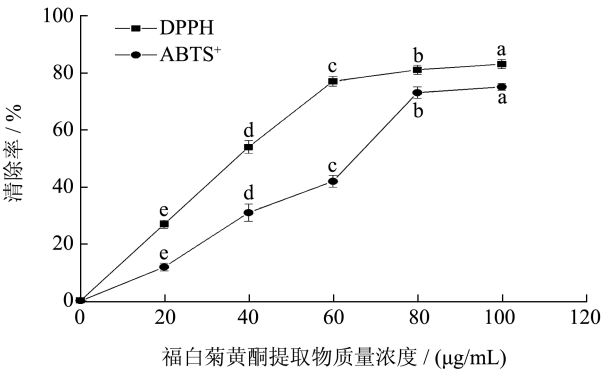


图 1 福白菊黄酮 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率
Fig.1 DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging rates of flavonoids from Fubaiju *Chrysanthemum*

注: 图中不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下同。

2.2 体内抗氧化活性测定

2.2.1 线虫抗氧化酶活性测定

抗氧化防御系统为机体发挥抗氧化性重要的组

成部分^[30]。机体内抗氧化酶活性水平可以反映其体内的生长发育状态，当衰老过程中受到抗氧化应激时，细胞内抗氧化酶活性会降低，使氧自由基过度积累从而引发氧化应激而加速衰老。图 2、图 3 中，与空白对照组相比，样品组体内 SOD 酶活性、GSH 活性明显增加，中剂量组效果显著，且可以看出呈现低浓度促进，高浓度抑制的作用。说明福白菊黄酮提取物可能通过提高线虫体内抗氧化酶活性水平从而增强线虫的抗氧化能力。

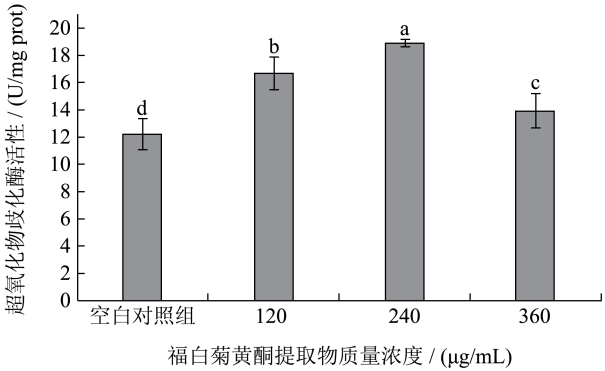


图 2 福白菊黄酮提取物对线虫超氧化物歧化酶 SOD 活性影响

Fig.2 The effect of Fubaiju *Chrysanthemum* flavonoid extract on the activity of SOD in nematodes

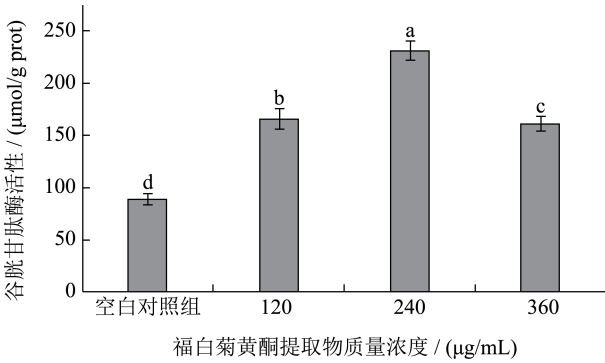


图 3 福白菊黄酮提取物对线虫谷胱甘肽 GSH 活性影响
Fig.3 The effect of Fubaiju *Chrysanthemum* flavonoid extract on the activity of GSH in nematodes

2.2.2 氧化应激抗性测定

如图4所示，在H₂O₂急性氧化胁迫下，福白菊黄酮提取物使线虫生存曲线向右移。由表5可知，与空白对照组相比，福白菊黄酮提取物样品组的秀丽隐杆线虫平均寿命均得到极显著延长 ($P<0.01$)，其中中剂量组平均寿命最长，与空白对照组比较，呈现倒U型。说明福白菊黄酮提取物具有提高线虫的抗氧化应激的潜力。

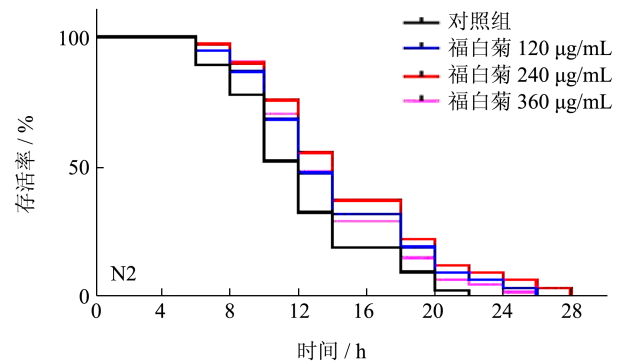


图4 福白菊对线虫氧化应激抗性的影响
Fig.4 Effect of Fubaiju *Chrysanthemum* on oxidative stress resistance of nematodes

2.2.3 抗氧化蛋白SOD-3、GCS-1荧光可视化定量

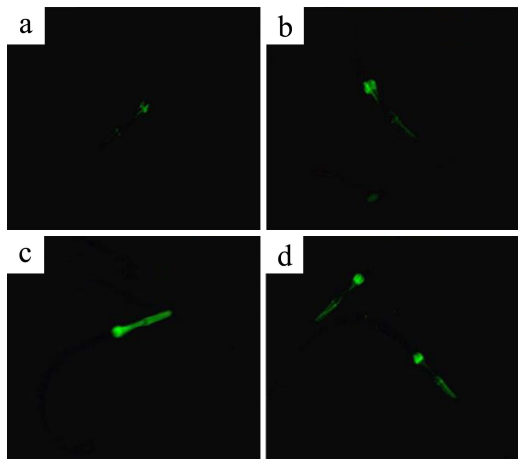


图5 CF1553 株系线虫各剂量代表图片
Fig.5 Comparison of different doses of CF1553 strain nematodes

注：a 为 LD1171 空白对照，b 为 LD1171 120 µg/mL，c 为 LD1171 240 µg/mL，d 为 LD1171 360 µg/mL。

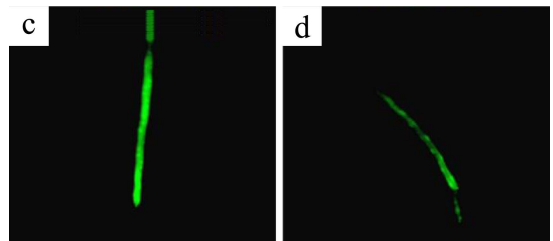
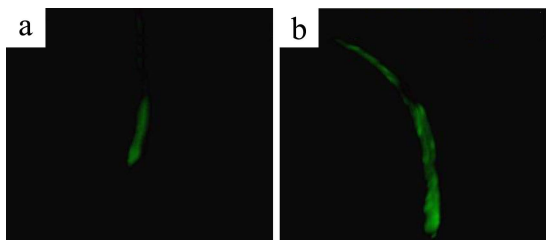


图6 LD1171 株系线虫各剂量对比代表图片
Fig.6 Comparison of different doses of LD1171 strain nematodes

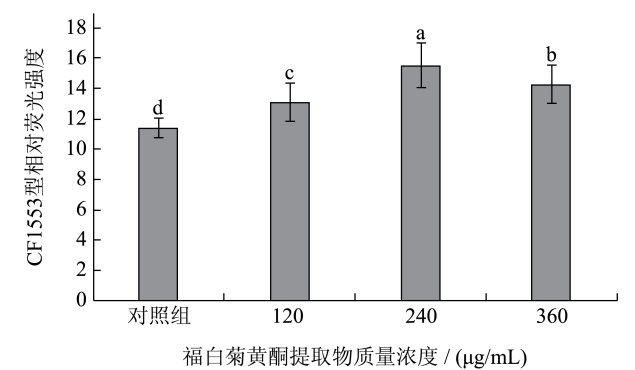


图7 抗氧化蛋白 SOD-3、GCS-1 荧光可视化定量
Fig.7 Fluorescence visualization of antioxidant protein SOD-3 and GCS-1

抗氧化防御系统主要作用是维持氧化还原平衡，清除体内累积的 ROS。线虫体内 SOD-3、GCS-1 是 DAF-16 的转录靶点之一，编码线粒体内清除自由基的超氧化物歧化酶 Mn-SOD^[31]。实验发现两种线虫在添加福白菊黄酮提取物后，两种线虫的荧光强度均增加见图 5、6。线虫若体内含有抗氧化活性成分时，暴露于蓝光照射时，其线虫的抗氧化蛋白高度表达区域会发出明亮的绿色荧光，而如果抗氧化蛋白的表达水平较低，或者活性成分的含量不充足，或者过高时会不显现绿色或者绿色颜色较浅。图 7 实验数据表明福白菊黄酮提取物中剂量组效果显著，且可以看出呈现低浓度促进，高浓度

抑制的作用。说明福白菊黄酮提取物可增强线虫的抗氧化能力。

2.3 福白菊黄酮指纹图谱的构建

将 15 个福白菊黄酮样品的 HPLC 色谱图导入到《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版软件，绘制不同批次福白菊黄酮对照指纹图谱图 8。选择稳定性及分离度较好的 8 个色谱峰标记为共有峰，以生成的对照指纹图谱为参照，共有峰峰面积及相对保留时间等相关系数为指标，对其样品指纹图谱进行相似度分析，由表 6 可知，各批样品的相似度均介于 0.783~1.000，相似度良好，说明不同批次的福白菊的组成和含量相对一致，但含量并不完全相同。HPLC 法初步建立了福白菊黄酮的指纹图谱，该方法精密度高、稳定性好、重复性好，能够同时检测福白菊黄酮的有效成分。

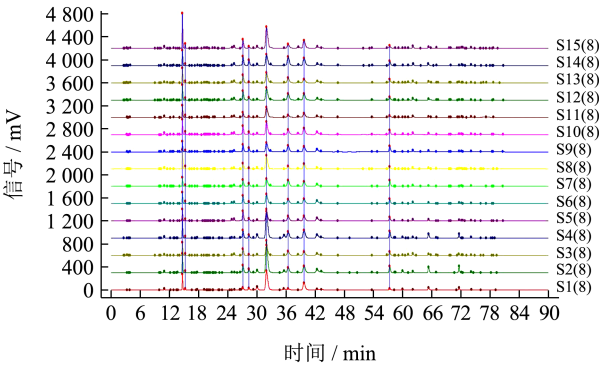


图 8 15 个不同品牌福白菊黄酮指纹图谱
Fig.8 Fingerprint of flavonoids in 15 different batches of Fubai Chrysanthemum

表 6 15 个不同品牌福白菊黄酮指纹图谱相似度
Table 6 Similarity of flavonoids fingerprints of 15 different batches of Fubai Chrysanthemum

编号	相似度（参照）	编号	相似度（参照）
S1	1.000	S9	0.831
S2	0.979	S10	0.905
S3	0.909	S11	0.969
S4	0.975	S12	0.890
S5	0.833	S13	0.888
S6	0.868	S14	0.807
S7	0.783	S15	0.970
S8	0.967		

2.4 谱效关系分析

测定 15 个不同品牌的福白菊黄酮对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率，其 IC₅₀ 如表 7 所示。

表 7 15 个不同品牌福白菊黄酮对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率 IC₅₀

Table 7 DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging rate IC₅₀ of 15 batches of Fubaiju flavonoids

编号	DPPH IC ₅₀ /(μg/mL)	ABTS ⁺ IC ₅₀ /(μg/mL)
1	32.85±0.96	44.82±1.31
2	33.50±0.40	44.93±0.56
3	31.58±0.26	46.15±1.32
4	33.09±1.58	44.34±0.83
5	33.19±1.72	46.64±1.01
6	33.26±1.90	46.06±0.45
7	32.75±1.02	45.91±1.33
8	32.05±1.56	46.49±1.05
9	32.63±1.46	46.67±0.97
10	34.12±0.25	44.97±0.87
11	31.82±1.09	45.19±1.21
12	33.08±1.67	45.84±1.51
13	32.61±1.53	43.80±1.00
14	31.06±0.46	45.54±0.89
15	33.13±1.75	44.87±0.91

2.4.1 灰色关联度分析

以 15 批福白菊黄酮对 DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺ 自由基清除率的 IC₅₀ 为母序列，15 批福白菊黄酮指纹图谱 8 个共有峰的峰面积为子序列，经过无量纲化、求差序列、两极最大值最小值、计算关联度等处理，分辨系数取 0.5，所得关联度大小见表 8。样品黄酮 8 个共有峰与 DPPH 自由基清除率的关联度在 0.598~0.883 之间，说明福白菊黄酮发挥清除 DPPH 自由基是其多成分综合作用的结果，对 DPPH 自由基清除率贡献最大的为 2 号共有峰，其关联度为 0.883。从表 8 可知，福白菊黄酮各特征成分对 DPPH 自由基清除率贡献的大小顺序为 2 号峰>4 号峰>1 号峰>3 号峰>8 号峰>7 号峰>5 号峰>6 号峰。样品黄酮 8 个共有峰与 ABTS⁺ 自由基清除率的关联度在 0.477~0.851 之间，说明福白菊黄酮发挥清除 ABTS⁺ 自由基清除率是其多成分综合作用的结果，对 ABTS⁺ 自由基清除率贡献最大的为 8 号共有峰，其关联度为 0.851。从表 8 可知，福白菊黄酮各特征成分对 ABTS⁺ 自由基清除率贡献的大小顺序为 8 号峰>2 号峰>4 号峰>3 号峰>1 号峰>7 号峰>5 号峰>6 号峰。

表 8 福白菊黄酮指纹图谱共有峰与抗氧化活性的关联度
Table 8 Correlation between common peaks in the flavonoids fingerprint of Fubaiju *Chrysanthemum* and DPPH free radical clearance rate

共有峰	DPPH	ABTS ⁺
1 号峰	0.872	0.787
2 号峰	0.883	0.834
3 号峰	0.867	0.791
4 号峰	0.882	0.817
5 号峰	0.719	0.642
6 号峰	0.598	0.477
7 号峰	0.773	0.742
8 号峰	0.855	0.851

2.4.2 偏最小二乘法分析

选择 15 个批次的福白菊黄酮的峰面积数据作为自变量，15 个样品的福白菊黄酮对以 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率 IC₅₀ 作为因变量，利用 SIMCA 14.1 软件采用偏最小二乘回归分析方法进行谱效分析，研究福白菊黄酮对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除能力。VIP 值越大，表示贡献率越高，VIP 值大于 1.0，表示有显著贡献^[32]。如图 9 所示，在对福白菊黄酮对 DPPH 自由基清除的分析中，贡献度大小依次是峰 3、6、7；在对福白菊黄酮对 ABTS⁺ 自由基清除的分析中，贡献度大小依次是峰 7、6、4；说明福白菊黄酮对 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基抑制的作用主要是多种成分共同作用的结果^[33]。说明这些峰所代表的化学成分在自由基清除作用中发挥重要作用，添加福白菊黄酮提取物中的多种活性成分能有效地增强自由基清除能力。

在 2.4.1 灰色关联度分析法中，共有峰对 DPPH 自由基清除率的相关性排序前四为 2 号峰>4 号峰>1 号峰>3 号峰，这四个共有峰关联度相近，结合偏最小二乘法分析可得到，3 号峰对 DPPH 自由基清除率贡献度最大。灰色关联度分析法中，共有峰对 ABTS⁺ 自由基清除率的相关性排序前三依次为 8 号峰>2 号峰>4 号峰，这四个共有峰关联度相近，结合偏最小二乘法分析可得到，4 号峰对 ABTS⁺ 自由基清除率贡献度最大。

15 个不同品牌的福白菊总黄酮提取物的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率实验结果与 2.1 中体外抗氧化活性验证中实验结果接近，2.1 中体内抗氧化活性 DPPH 自由基清除率与 2.4 中 15 个不同品牌福白菊 DPPH 自由基清除率标准偏差为 1.05，ABTS⁺

自由基清除率标准偏差为 1.07，表明福白菊黄酮抗氧化活性稳定。根据出峰时间和保留时间对比文献^[34]，推测对 DPPH 自由基清除率作用相关性最显著的 3 号峰可能是木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷；对 ABTS⁺ 自由基清除率作用相关性最显著的 4 号峰可能是木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷。

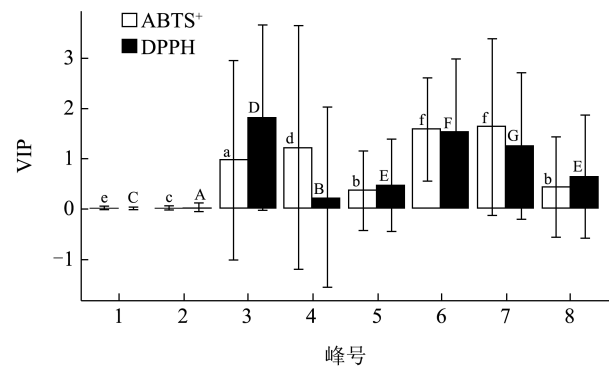


图 9 各特征峰对抗氧化活性的 VIP 贡献
Fig.9 VIP contribution of each characteristic peak to antioxidant activity

3 结论

实验结果表明，福白菊黄酮 DPPH 自由基清除率的最大值为 83.14%，IC₅₀ 为 35.80 μg/mL；福白菊黄酮 ABTS⁺ 自由基清除率的最大值为 75.32%，IC₅₀ 为 48.36 μg/mL。福白菊黄酮提取物能显著提高线虫内抗氧化酶 SOD 活力、GSH 含量，提高线虫的抗氧化应激的潜力，促进线虫体内抗氧化蛋白的表达。联合评价了 15 个批次福白菊黄酮指纹图谱中所标示的共有峰与活性的关系。不同品牌批次的福白菊黄酮都显示了较强的对 DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺ 自由基清除率即抗氧化活性，然而通过灰色关联度和偏最小二乘法结合分析，发现 8 个特征共有峰对抗氧化活性均有一定的相关性，其中 3 号峰对 DPPH 自由基清除率作用相关性最显著，可能是木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷；4 号峰对 ABTS⁺ 自由基清除率作用相关性最显著，可能是木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷。以上实验表明，福白菊黄酮提取物具有良好的抗氧化活性，为福白菊后续开发成抗氧化剂等提供参考依据，具有应用于食品加工行业的潜力。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010年版.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2010.
[2] 徐雷,谢彩香,胡志刚,等.湖北道地药材福白菊产地生态适

- 宜性数值区划研究[J].时珍国医国药,2016,27:954-957.
- [3] 罗光军,陈科力.麻城福白菊的历史文化渊源及本草考证[J].湖北农业科学,2011,50:3781-3784.
- [4] 凌礼潮.麻城福白菊种植历史考证[J].亚太传统医药,2012,8:193-194.
- [5] 卢琪,薛淑静,杨德,等.不同干燥条件下福白菊菊花茶风味品质的比较分析[J].食品科学,2020,41:249-255.
- [6] 刘引,龚文玲,鲍五洲,等.湖北菊花HPLC指纹图谱建立及其品种间有效成分比较研究[J].中国中药杂志,2019,44:3711-3717.
- [7] LI Y, HAO Y, GAO B, et al. Chemical profile and *in vitro* gut microbiota modulatory, anti-inflammatory and free radical scavenging properties of *Chrysanthemum morifolium* cv. Fubaiju [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 58: 114-122.
- [8] SUN D Y, WU M, XU H H, et al. The bioactive properties and quality attributes of *Chrysanthemum morifolium* Ramat as affected by pulsed vacuum drying [J]. Drying Technology: An International Journal, 2022, 40(14): 3021-3035.
- [9] 汪诗沁,刘丹,叶晓川,等.UPLC-Q-TOF-MS/MS结合网络药理学探讨福白菊药效物质基础及其抗炎作用机制[J].中国中药杂志,2022,47:4190-4201.
- [10] XIAO M Z, ASIMUGULI R, ZHONG J K, et al. Traditional Chinese medicine compounds containing *Lonicera japonica*, *Chrysanthemum morifolium*, and *Siraitia grosvenorii* inhibits the growth of streptococcus mutans [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2022: 5802343.
- [11] ZHAN J F, HE F, CAI H M, et al. Composition and antifungal mechanism of essential oil from *Chrysanthemum morifolium* cv. Fubaiju [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104746.
- [12] YI M H, YAN F L, JIE L, et al. Protective effect of *Chrysanthemum morifolium* cv. Fubaiju hot-water extracts against ARPE-19 Cell oxidative damage by activating PI3K/Akt-Mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 648973.
- [13] YING H L, XIN M, DI Y Z, et al. Extraction of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* and antitumor activity *in vitro* [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2018, 15(2): 1203-1210.
- [14] NAI Y C, SHU L, ZHONG Z, et al. The chemical profile of Fubai *Chrysanthemum* (Fubaiju) and its mechanism in preventing cataract based on ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and network pharmacology [J]. Journal of Separation Science, 2022, 45(13): 2406-2414.
- [15] ZHANG Y, LI K X, CHEN M B, et al. A novel polysaccharide prepared from *Chrysanthemum morifolium* cv. Fubaiju tea and its emulsifying properties [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(6): 3385-3399.
- [16] 薛淑静,肖卓,杨德,等.黄酒浸提福白菊活性成分工艺优化及无醇饮品的研制[J].食品工业,2021,42:57-60.
- [17] 尹怀宁,李振,李可心,等.菊花米酒发酵工艺[J].食品工业,2021,42:40-44.
- [18] 杨番,夏程程,钟晓凌,等.秀丽隐杆线虫模型在食品营养评价中的应用研究进展[J].食品科学,2019,40:268-276.
- [19] 徐犇.万年蒿质量标准的建立及模式识别研究[D].长春:长春中医药大学,2019.
- [20] 曾令军,林兵,宋洪涛.中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J].中国中药杂志,2015,40:1425-1432.
- [21] 蔡跃月,麦尔哈巴·阿布拉,高路,等.滇红玫瑰发酵过程中酚类物质含量及其抗氧化和抗炎活性分析[J].食品工业科技,2024,45(11):213-221.
- [22] 刘星雨,曹素芳,朱秋轶,等.牛乳源促睡眠肽的体外抗氧化活性评价及对秀丽隐杆线虫的体内抗氧化作用[J].食品科学,2022,43:151-157.
- [23] 刘芸,仇农学,杨玺玉.葡萄皮渣提取物总酚含量及体外抗氧化活性、抑菌活性[J].食品科学,2011,32:5-9.
- [24] 陈可欣,石林凡,任中阳,等.球参酶解物馏分对秀丽隐杆线虫抗衰老和抗氧化的作用[J].食品科学,2024, 45(11):144-151.
- [25] 朱秋轶,宋玉,刘星雨,等.羊乳酪蛋白酶解物对秀丽线虫衰老的改善作用[J].现代食品科技,2023,39(6):1-9.
- [26] LIU H, WANG Y, ZHANG W, et al. Lentinan extends lifespan and increases oxidative stress resistance through DAF-16 and SKN-1 pathways in *Caenorhabditis elegans* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 202: 286-295.
- [27] 吴梦思,金建宇,尚书游,等.卷丹百合黄酮提取物抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2024,50(15):163-169.
- [28] 李金凤,刘华敏,谷令彪,等.怀菊花中总黄酮的提取及其抗氧化性研究[J].食品工业科技,2018,39:211-218.
- [29] 邱佳俊,高飞,李雅丽,等.雪菊总黄酮抗氧化活性研究[J].中国现代中药,2015,17:435-439.
- [30] TOREN F, J. H N. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247.
- [31] NEMOTO-SASAKI Y, KASAI K. Deletion of lec-10, a galectin-encoding gene, increases susceptibility to oxidative stress in *caenorhabditis elegans* [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2009, 32(12): 1973-1977.
- [32] 王艳,杨锡金,何婷,等.基于谱效关系的火棘果酚类化合物抗氧化活性分析[J].食品科技,2023,48:176-184.
- [33] 舒宇航,简析盼,郑宇锟,等.基于灰色关联度与正交偏最小二乘法分析的黄连抗菌谱效关系研究[J].时珍国医国药,2023,34:2298-2302.
- [34] 李君彦,范氏英,孙中宣,等.福白菊化学成分LC-MS~n定性分析及HPLC-UV法多成分含量测定[J].中国药科大学学报,2019,50:565-571.