

菊花茎叶清除自由基动力学特性及抗氧化活性成分的在线筛选*

屠万倩¹, 卢新², 张留记^{1,2**}, 刘一菲¹, 王建霞³, 李向阳⁴, 陈晶晶²

(1. 河南省中西医结合医院 河南省道地药材综合开发工程研究中心 郑州 450004; 2. 河南中医药大学 郑州 450008; 3. 河南卫生健康干部学院 郑州 450008; 4. 河南省药品医疗器械检验院 河南省疫苗批签中心 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室 郑州 450018)

摘要:目的 本研究对菊花茎叶抗氧化活性和清除自由基动力学特性进行考察,在线筛选与清除自由基相关的活性成分。方法 采用DPPH法和ABTS法观察菊花茎叶提取物的抗氧化活性,比较了样品浓度、反应温度和反应时间等影响因素对自由基清除率的影响,测定了菊花茎叶清除自由基活性的半数清除率(IC₅₀)。以木犀草素葡萄糖醛酸苷、木犀草苷和咖啡酸等黄酮成分、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、B、C等酚酸成分为指标,采用HPLC法对反应前后菊花茎叶进行了含量测定,计算上述成分的消耗率。结果 菊花茎叶的样品浓度、反应温度和反应时间均对其对清除DPPH自由基和ABTS自由基清除率有影响;菊花茎叶清除DPPH和ABTS自由基的IC₅₀分别为0.395 mg·mL⁻¹、2.039 mg·mL⁻¹。与DPPH和ABTS自由基反应后,菊花茎叶样品中上述测定成分的含量均明显下降,推测上述成分可能是菊花茎叶抗氧化的活性成分。结论 菊花茎叶具有较好的清除自由基活性,本研究初步明确其动力学特性,在线筛选出了抗氧化活性成分,为今后菊花茎叶的综合开发提供实验依据。

关键词:菊花茎叶 自由基 动力学特征 抗氧化 活性成分 HPLC

doi: 10.11842/wst.20230609002 中图分类号: R284.1 文献标识码: A

菊花为菊科植物菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)的干燥头状花序,具有散风清热、平肝明目和清热解毒等功效^[1-3]。菊在我国分布广泛,多地均有种植生产,花序是其传统药用部位。河南焦作地区(古怀庆府)生产的怀菊花是传统道地药材“四大怀药”之一,因种植历史悠久、质量优良蜚声海内外。据报道,菊花中主要含有木犀草苷、木犀草素葡萄糖醛酸苷等黄酮类成分和绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C等酚酸类成分^[4-6],具有抗菌、消炎、抗病毒、抗诱变、抗肿瘤、扩张血管、降压以及抗衰老等多种药理作用^[7-9]。其中,抗氧化是与菊花抗肿瘤、扩张血管、降压、抗衰老、保肝

明目等药理作用相关的关键作用机制,也是菊花的研究热点之一,已有较多关于菊花及其提取物抗氧化活性的研究^[10-11],菊花抗氧化反应的动力学特性和抗氧化活性成分挖掘研究尚鲜有报道。

另外,目前菊的研究和利用多集中于花序。研究显示,菊的非药用部位如茎叶中含有与菊花花序相似的黄酮类成分和酚酸类成分,并未得到合理利用,通常作为废弃物处理,造成了巨大的资源浪费^[12-14]。为了资源利用最大化,需对其茎叶的潜在开发价值进行研究和评价。

本研究分别采用药物或天然产物体外抗氧化活性的常用评价方法1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

收稿日期:2023-06-09

修回日期:2023-12-26

* 河南省科学技术厅工程技术研究中心建设项目(2020338):河南省道地药材综合开发工程研究中心建设项目,负责人:张留记。

** 通讯作者:张留记,研究员,硕士研究生导师,主要研究方向:道地药材质量评价。

(DPPH)法和2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐(ABTS)法,观察菊花茎叶对DPPH自由基和ABTS自由基的清除能力及其主要影响因素(药物浓度、反应温度和反应时间等)对清除反应动力学的影响特性进行了研究;采用DPPH-HPLC和ABTS-HPLC法在线筛选出菊花茎叶中参与清除自由基反应的指标性成分,为今后开展菊花茎叶的抗氧化药效物质基础研究和健康产品综合开发利用提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超声波清洗器(济宁科技超声电子有限公司,型号为ASS150);高效液相色谱仪(美国沃特世公司,型号为Waters 2695);十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司,型号为AE240);万分之一天平(日本岛津公司,型号为LIBROR 160DPT);超纯水器(四川优谱超纯科技有限公司,型号为ULUP IV 10T);循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司,型号为SHZ-D III)。

1.2 材料

实验用菊花茎叶采集自河南省武陟县北郭乡蔡庄村,由河南省中西医结合医院马开副研究员鉴定为菊科植物菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)的干燥茎叶。

实验用对照品包括:新绿原酸(批号:250031-202104)、隐绿原酸(批号:250031-202104)、木犀草苷(批号:130014-202108)、异绿原酸B(批号:250035-202104)、异绿原酸A(批号:250034-202109)、异绿原酸C(批号:250036-202101),以上对照品均购自北京益尔康乐生物科技有限公司;绿原酸(批号:110753-201817)、咖啡酸(批号:110885-201703)和木犀草素葡萄糖醛酸苷(批号:111968-201602),以上均购自中国食品药品检定研究院。DPPH(批号:C10343360);过硫酸钾(批号:C13692773);ABTS(批号:C12824509),以上试剂购自上海麦克林生化科技有限公司;乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 试验方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 菊花茎叶样品储备溶液的制备

取过4号筛的菊花茎叶粉末约1 g,放入50 mL量瓶,加入无水乙醇约40 mL,超声提取60 min,冷却后

用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,以过滤液为菊花茎叶的储备液。

2.1.2 二苯基-2-苦肟(DPPH)溶液的制备

参照文献^[15-16]方法,用无水乙醇将DPPH配制成 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,避免阳光直射放置。

2.1.3 2,2'-联氨-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)储备液的制备

参照文献^[17-18]方法,用水将ABTS配制成 $7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,将硫酸钾配制成 $2.45\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,将两种溶液混合,在室温下反应,避光16 h,制备ABTS储备液。

2.2 对菊花茎叶清除DPPH自由基的动力学研究

2.2.1 不同药物浓度对DPPH清除率的影响

按“2.1.1”项下方法,取菊花茎叶制成样品储备溶液,稀释成 $0.05\text{--}0.80\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的不同生药质量浓度。取上述样品溶液各1 mL,在室温条件下,与3 mL DPPH溶液快速混合,避光光照。分别于90 min内间隔10 min于517 nm处测定吸光度,作为样品吸光度 A_s 。分别取相应浓度的菊花茎叶样品溶液1 mL,加入无水乙醇3 mL,混匀,同法测定,得到空白吸光度 A_b ,取1 mL的无水乙醇,加入3 mL的DPPH溶液,快速混合,同法测定,得到DPPH对照吸光度 A_c ,计算样品清除率:清除率(%)=[1-(A_s-A_b)/ A_c] $\times 100\%$ 。

2.2.2 温度对清除DPPH自由基动力学的影响

将菊花茎叶储备液稀释至 $0.60\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别吸取4份该溶液1 mL与DPPH溶液3 mL,快速混匀,分别放置在20、30、40、50℃的培养箱中进行反应,反应持续90 min,每隔10 min测定1次吸光度 A_s ,测定波长设为517 nm。用同样的方法测定相应的 A_b 和 A_c ,计算DPPH清除率。

2.2.3 菊花茎叶清除DPPH自由基活性半数清除率(IC_{50})的测定

按“2.2.1”项下方法,取不同稀释浓度的样品溶液与DPPH溶液快速混匀,室温避光反应30 min,测定反应后样品溶液的吸光度 A_s ,计算清除率,绘制样品浓度-清除率的对数方程,计算清除D

同浓度的样品溶液各 1 mL,在室温条件下,与 3 mL ABTS 溶液快速混合,避光光照。分别于 90 min 内,于 734 nm 处间隔 10 min 测定吸光度,作为样品吸光度 A_s 。分别取相应浓度的菊花茎叶样品溶液 1 mL,加入无水乙醇 3 mL,混匀,同法测定,得到空白吸光度 A_b ,取 1 mL 的无水乙醇加入 3 mL 的 ABTS 溶液,快速混合,测定吸光度,得到 ABTS 对照吸光度 A_c ,参照“2.2.1”项下公式计算清除率。

2.3.2 温度对清除 ABTS 自由基动力学的影响

精密吸取 4 份 1 mL 的 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菊花茎叶溶液,分别准确加入 3 mL 的 ABTS 溶液,快速混合,分别放置在 20、30、35 和 40°C 的培养箱中进行反应,每 10 min 测定 1 次吸光度,测定波长设为 734 nm,实验持续 90 min。用同样的方法测定相应的 A_b 和 A_c ,按“2.2.1”项下公式计算清除率。

2.3.3 菊花茎叶清除 ABTS 自由基活性半数清除率 (IC_{50}) 的测定

取“2.3.1”项下 1 mL 的不同稀释浓度的样品溶液与 3 mL 的 ABTS 溶液,快速混合,室温下避免光照,反应 30 min,测定 734 nm 波长处的吸光度 A_s ,计算清除率,绘制样品浓度-清除率的对数方程,计算清除 ABTS 自由基的活性半数清除率 (IC_{50})。

2.4 菊花茎叶与 DPPH 和 ABTS 反应前后多指标成分含量测定

2.4.1 色谱条件

参照文献^[19-20]方法,色谱柱为:Waters Atlantis™ T3 (4.6 mm×150 mm, 3 μm) 色谱柱,柱温 40°C ,进样体积 5 μL ,流动相为乙腈(A)和 0.5% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0-4 min, 12% A; 4-5 min, 12%-20% A; 5-15 min, 20% A; 15-15.5 min, 20%-50% A; 15.5-18 min, 50% A);流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长依次设为 0-9.5 min, 326 nm(测绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸),9.5-12.5 min, 340 nm(测木犀草素葡萄糖醛酸苷、木犀草苷),12.5-18.0 min, 326 nm(测异绿原酸 A、B、C)。

2.4.2 菊花茎叶反应前供试品溶液的制备

取“2.1.1”项下 1 mL 的菊花茎叶供试品储备溶液,加入 3 mL 的无水乙醇,充分混合,过滤,取续滤液作为 DPPH 和 ABTS 反应前的 HPLC 供试品溶液。

2.4.3 菊花茎叶反应后供试品溶液的制备

取“2.4.2”项下菊花茎叶供试品储备溶液 1 mL 两份,分别加入 3 mL 的 DPPH 溶液或 3 mL 的 ABTS 溶液,

充分混合,并在 20°C 、避光条件下反应 90 min,取过滤后的续滤液作为菊花茎叶反应后的 HPLC 供试品溶液。

2.4.4 混合对照品溶液的制备和样品测定

取木犀草苷、木犀草素葡萄糖醛酸苷、绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 适量,精密称定,用无水乙醇溶解,并配制每 1 mL 分别含有木犀草苷 0.04 mg、木犀草素葡萄糖醛酸苷 0.329 mg、绿原酸 0.577 mg、新绿原酸 0.028 mg、咖啡酸 0.019 mg、隐绿原酸 0.04 mg、异绿原酸 A 1.118 mg、异绿原酸 B 0.066 mg、异绿原酸 C 0.39 mg 的混合溶液,作为混合对照品溶液。

按“2.4.1”项下色谱条件,分别同时测定“2.4.2”和“2.4.3”项下制备的供试品溶液中木犀草素葡萄糖醛酸苷、木犀草苷、绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、B、C 的含量。计算菊花茎叶与 DPPH 和 ABTS 反应后各成分的消耗率:消耗率(%)=[(反应前含量-反应后含量)/反应前含量]×100%。

3 结果与讨论

3.1 对菊花茎叶清除 DPPH 自由基的动力学研究

3.1.1 不同浓度对清除 DPPH 自由基动力学的影响

图 1 结果表明,不同浓度的提取物清除 DPPH 自由基存在明显差异。相同时间内,随着菊花茎叶提取物浓度增加,DPPH 清除率相应提高;同一浓度下,随着反应时间的延长,菊花茎叶提取液对 DPPH 自由基的清除能力也不断提高。研究发现,不同浓度的菊花茎叶提取液的动力学曲线时存在一定差异。菊花茎叶浓度较低时,清除率随时间的变化曲线较平缓,浓度较高时清除率随时间的变化趋势明显。当菊花茎叶浓度为 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,最高清除率可达到 84.383%。

3.1.2 温度对清除 DPPH 自由基动力学的影响

结果如图 2 所示,相同浓度的菊花茎叶样品,随着反应温度的升高和反应时间的延长,对 DPPH 自由基的清除率均逐渐提高。其中,在 40°C

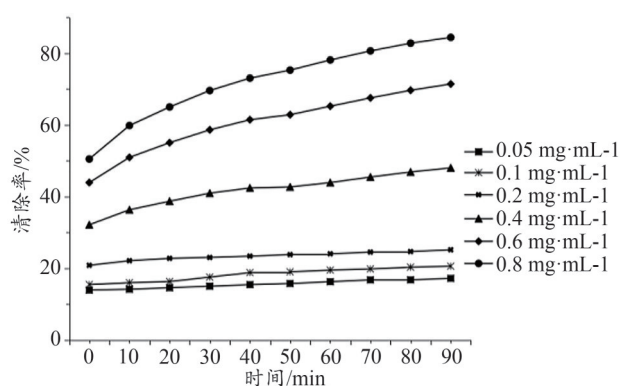


图1 不同浓度的菊花茎叶提取物对DPPH自由基清除率的时间动力学曲线

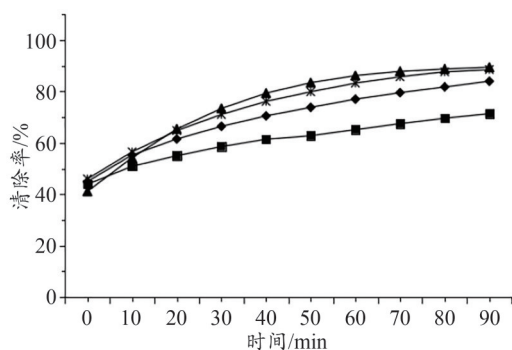


图2 菊花茎叶提取物在不同反应温度下对DPPH自由基清除率的时间动力学曲线

得到回归方程为 $Y=0.6045X+1.943$, $r=0.9954$ 。计算出当清除率为50%时,对应的菊花茎叶提取液样品的质量浓度(IC_{50})为 $0.395 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2 对菊花茎叶清除ABTS自由基的动力学研究

3.2.1 不同浓度对清除ABTS自由基动力学的影响

图3结果表明,随着菊花茎叶样品浓度的增加和反应时间的延长对ABTS清除率逐渐增加,药物浓度在 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上时对ABTS自由基的清除率明显大于低浓度($0.4, 0.8, 1.2, 1.6$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),当菊花茎叶浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,最高ABTS清除率可达97.18%。

3.2.2 温度对清除ABTS自由基动力学的影响

图4结果表明,在相同浓度下,随着反应温度的升高和时间的延长,菊花茎叶提取物对ABTS清除率不断增加。

3.2.3 菊花茎叶清除ABTS自由基活性半数清除率(IC_{50})的测定

对清除率和药液质量浓度进行对数回归,得到回归方程为 $Y=1.8696X+1.1203$, $r=0.9925$ 。当清除率为

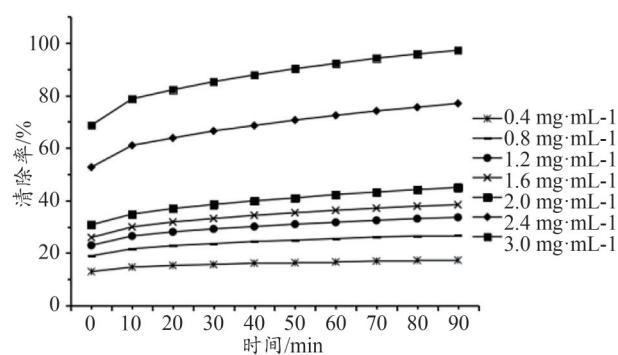


图3 不同浓度的菊花茎叶提取物对ABTS自由基清除率的时间动力学曲线

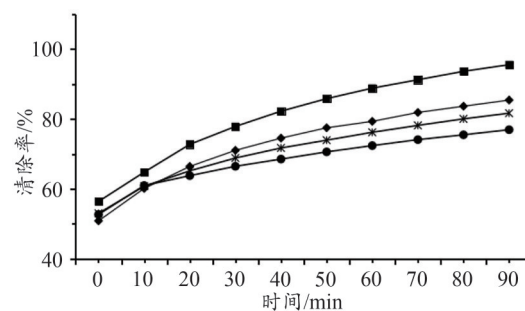


图4 菊花茎叶提取物在不同反应温度下对ABTS自由基清除率的时间动力学曲线

50%时,计算出的菊花茎叶提取液样品的质量浓度(IC_{50})为 $2.039 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 菊花茎叶与DPPH、ABTS反应前后的多指标含量测定

反应前菊花茎叶中黄酮类成分木犀草苷、木犀草素葡萄糖醛酸苷和咖啡酸的含量分别为 $326.08 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $670.07 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $4.78 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,酚酸类成分绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、A、C的含量分别为 $721.15 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5.76 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $63.90 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2.043 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $787.79 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $68.74 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (见图5)。菊花茎叶与DPPH和ABTS反应后含量消耗率见表1。

3.4 化学计量学分析

采用软件Origin 2022和IBM SPSS Statistics 21对菊花茎叶中各化学成分与DPPH和ABTS反应的消耗率数据进行聚类分析,结果见图6和图7。由图6可知,9个成分可聚合为3类,第Ⅰ类包括新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、绿原酸和异绿原酸C;第Ⅱ类包括异绿原酸A;第Ⅲ类包括木犀草素葡萄糖醛酸苷、木犀草苷和咖啡酸,与图7直观分析结果一致。

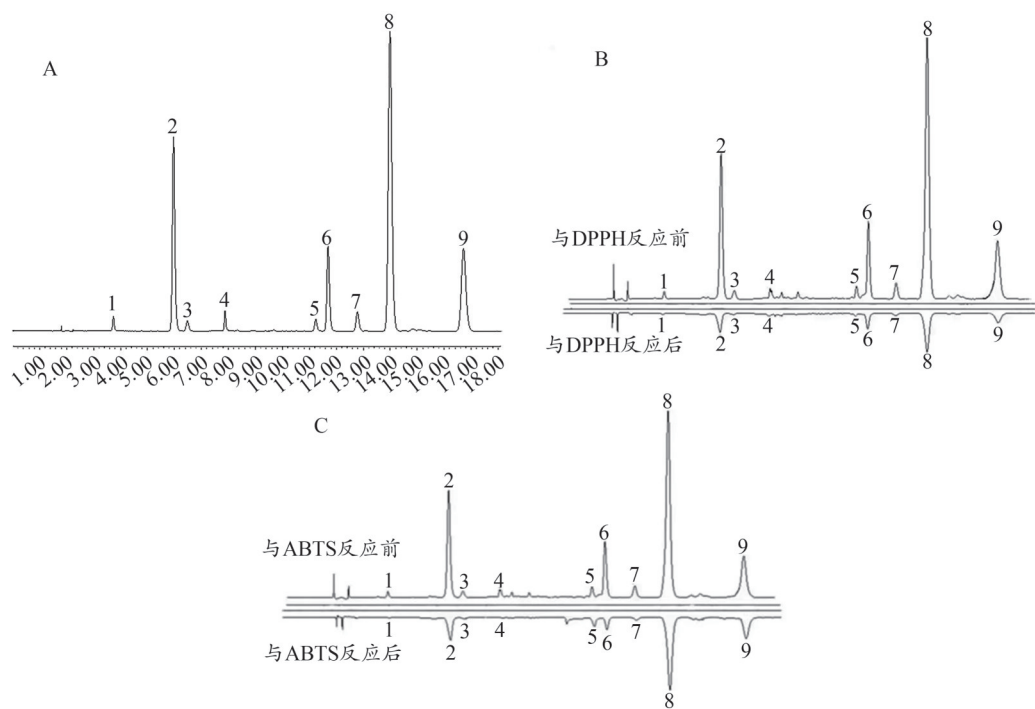


图5 菊花茎叶样品与DPPH和ABTS反应前后的HPLC色谱对比图

注:A:混合对照品;B:菊花茎叶样品与DPPH反应前后的供试品;C:菊花茎叶样品与ABTS反应前后的供试品;1:新绿原酸;2:绿原酸;3:隐绿原酸;4:咖啡酸;5:木犀草苷;6:木犀草素葡萄糖醛酸苷;7:异绿原酸B;8:异绿原酸A;9:异绿原酸C。

4 讨论与结论

4.1 菊花茎叶的体外抗氧化活性和动力学特性

自由基与生物体的脂质或蛋白质结合产生机体氧化损伤,导致蛋白变性、酶失活,引起血管硬化、高血压、肿瘤等多种疾病,清除机体内过多的自由基对相关疾病的治疗具有重要意义^[21-22]。本文采用DPPH法和ABTS法对菊花茎叶的抗氧化活性和动力学进行初步研究。结果表明,菊花茎叶具有较好的体外抗氧化活性,对DPPH和ABTS自由基的最高清除率均可达到80%以上。对自由基的清除率与菊花茎叶提取物的浓度、反应温度和反应时间等变量进行直观分析可知,菊花茎叶对自由基清除能力呈现多重依赖性,即提高菊花茎叶提取物的质量浓度、增加反应环境温度、延长反应时间均可以提高DPPH和ABTS自由基的清除能力。

4.2 菊花茎叶中多指标成分的HPLC测定和抗氧化成分的在线筛选

在实验中,采用HPLC法分别测定了菊花茎叶提取物与DPPH和ABTS反应前后的溶液中木犀草素葡萄糖醛酸苷和绿原酸等9种含量较高的黄酮和酚酸类成分的含量,并计算了参与清除自由基反应后上述成

表1 菊花茎叶与DPPH、ABTS反应后9种成分的消耗率(%)

成分	DPPH	ABTS
新绿原酸	83.30	76.56
绿原酸	81.67	78.23
隐绿原酸	83.93	75.72
咖啡酸	73.44	78.71
木犀草苷	75.98	79.92
木犀草素葡萄糖醛酸苷	66.27	79.70
异绿原酸B	81.61	74.67
异绿原酸A	71.89	62.06
异绿原酸C	80.96	68.07

分的消耗率。研究发现,菊花茎叶与DPPH和ABTS反应后,黄酮类成分木犀草素葡萄糖醛酸苷、木犀草苷和咖啡酸,酚酸类成分绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、B、C等测定指标的含量均出现不同程度的下降。这提示上述成分均参与了清除DPPH和ABTS自由基反应,推测上述成分是菊花茎叶中抗氧化活性成分。对上述成分的消耗率进行直观分析和聚类分析发现,在与DPPH和ABTS自由基反应过程中,各成分的消耗率出现一定差异,绿原酸等酚酸类成分在与DPPH反应中消耗率较高,而木犀草素葡萄糖醛酸苷等黄酮类成分则在与ABTS反应过程中消耗

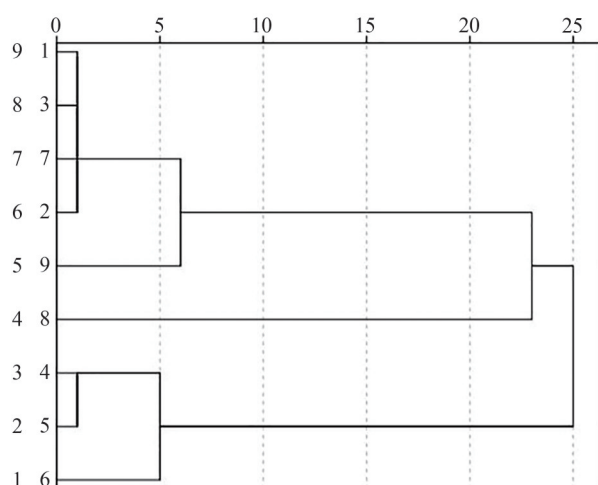


图6 菊花茎叶抗氧化活性成分的聚类分析

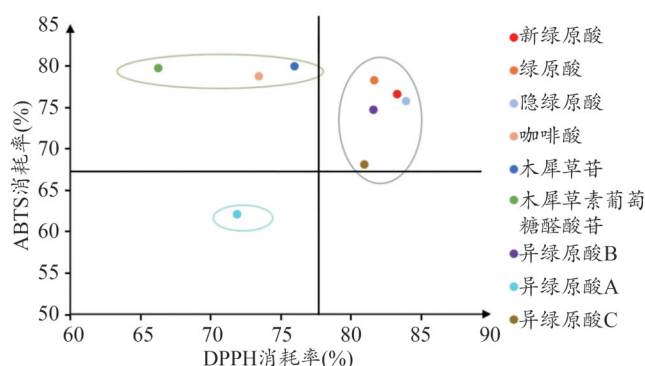


图7 菊花茎叶抗氧化活性成分的主成分得分图

较多,提示不同结构的化合物在清除不同种类的自由基反应中的作用有着明显不同。菊花茎叶中化学成分的结构多样性可能是其具有多种抗氧化活性的物质基础。

4.3 本研究特点

已有的研究报道中,对某一植物(或天然产物)的体外抗氧化活性通常以DPPH和ABTS法来评价^[23-24],多不涉及反应的动力学特性研究,较少有关于药物浓度、反应温度和反应时间等影响因素对自由基清除率影响的报道^[25-26],因而实验结果可能无法准确的反映出该植物的体外抗氧化活性。本文开展了菊花茎叶提取物清除自由基的动力学特性研究,结果表明多种因素均对自由基清除率测定结果产生影响,提示在今后的研究中,为更客观地评价体外抗氧化活性,应进行抗氧化反应动力学特性和反应条件的优选研究。

据研究报道,前人对植物提取物的抗氧化活性成分筛选,多采用不同极性的溶剂提取制备多个不同极性的化学部位提取物,测定自由基清除率并加以比较,推测抗氧化活性成分集中于某一化学部位中,进而对该部位中含量较高的化学成分进行测定,推测其为该植物或天然产物的抗氧化活性成分,这种研究方法不能直接地反映参与抗氧化反应的活性成分^[27-29]。本研究通过HPLC测定菊花茎叶提取物与DPPH和ABTS反应后多种化学成分的消耗率,筛选出参与反应的主要成分,可为今后开展更多植物(或天然产物)的抗氧化活性成分筛选提供借鉴。

4.4 小结

本文初步明确了菊花茎叶的体外抗氧化活性和清除自由基的动力学特性,在线筛选出了参与抗氧化反应的主要活性成分,为今后开展菊花茎叶的生物活性物质基础研究和综合开发研究提供实验数据。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:323-324.
- 2 冯颖, 李彬, 周春苗, 等. 神农香菊茎叶总黄酮与总酚的提取纯化和抗氧化活性研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(4):1422-1432.
- 3 陈庆蕾, 陈庆国, 赵玉荣. 菊花的功效及其产品开发. 中国果菜, 2023, 43(2):61-65.
- 4 周衡朴, 任敏霞, 管家齐, 等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析. 中草药, 2019, 50(19):4785-4795.
- 5 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. 河南大学学报(医学版), 2015, 34(4):290-300.
- 6 黄艳梅, 石岩, 胡云飞, 等. HPLC结合化学计量学对不同产地菊花中化学成分的比较分析. 药物分析杂志, 2016, 36(11):1941-1951.
- 7 王德胜, 黄艳梅, 石岩, 等. 菊花化学成分及药理作用研究进展. 安徽农业科学, 2018, 46(23):9-11, 17.
- 8 瞿璐, 王涛, 董勇喆, 等. 菊花化学成分与药理作用的研究进展. 药物评价研究, 2015, 38(1):98-104.
- 9 田硕, 苗明三. 菊花的研究及应用现状. 中医学报, 2014, 29(3):378-380.
- 10 刘垚杰, 刘莹, 李丽维, 等. 菊花对光氧化应激的缓解作用. 食品研究与开发, 2021, 42(4):55-58.
- 11 史建俊, 李伟伟, 王免, 等. 超声波协同酶法提取黄山贡菊总黄酮及其抗氧化活性. 安徽农业科学, 2020, 48(24):174-177, 180.
- 12 李孟, 张靖柯, 石静亚, 等. 怀菊花及其茎叶脂溶性成分GC-MS分析及其抗氧化活性研究. 中国医药科学, 2020, 10(19):78-82.
- 13 张敏, 李军, 李宝国. 菊花茎叶化学成分及其抗菌抗氧化活性研究进展. 山东中医药大学学报, 2015, 39(2):193-195.

- 14 石静亚, 李孟, 张靖柯, 等. 怀菊花茎叶化学成分的研究. 中成药, 2022, 44(2):439-445.
- 15 屠万倩, 张留记, 夏曼玉, 等. 杜仲叶清除 DPPH 自由基动力学特性及抗氧化活性成分筛选. 中国药理学杂志, 2022, 57(4):264-268.
- 16 王宁, 张叶韬, 芦晓芳. 黑豆异黄酮的提取分离及其对 DPPH 自由基的清除能力. 安徽农业科学, 2022, 50(1):171-176.
- 17 周贵华, 梅邢, 程超. 不同纯度藻蓝蛋白对 ABTS 阳离子自由基清除动力学研究. 湖北民族大学学报(自然科学版), 2022, 40(4):385-390, 406.
- 18 王明瑞, 侯彦喜, 叶超. ABTS 自由基显色分光光度法测定酵素中的黄酮. 化学研究, 2020, 31(3):246-251.
- 19 屠万倩, 刘晓苗, 张留记, 等. HPLC 法同时测定不同产地不同品种菊花中 8 种成分的含量. 中药材, 2018, 41(1):147-150.
- 20 张海波. 怀菊花多成分质量评价研究. 郑州: 河南中医学院硕士学位论文, 2015.
- 21 龙霖梓, 褚剑锋, 沈阿灵, 等. 中医药通过抗氧化途径防治高血压肾损害的研究进展. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(5):765-769.
- 22 高添. 菊花提取物改善肾性高血压大鼠心肌肥厚及其作用机制研究. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2016.
- 23 熊俊伟, 赵宏苏, 陈慧芳, 等. 菊花不同极性洗脱部位体外抗氧化活性研究及成分分析. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(12):40-44.
- 24 刘宏, 夏慧敏, 李娜, 等. 响应面法优化荞麦芽黄酮的提取工艺及其抗氧化性和稳定性的研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8):2870-2882.
- 25 张洋洋, 张作法, 宋婷婷, 等. 瓦尼桑黄多酚类化合物纯化及抗氧化活性. 菌物学报, 2023, 42(4):973-983.
- 26 田露露, 包永睿, 王帅, 等. 中药仙鹤草不同药用部位的体外药效学研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(3):408-412.
- 27 张亚楠, 王帅, 包永睿, 等. 知母不同药用部位体外抗肿瘤、抗炎及抗氧化的作用研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(3):424-430.
- 28 王兴伯. 透骨草抗氧化活性成分的筛选研究. 兰州: 兰州理工大学硕士学位论文, 2016.
- 29 孙雪萍, 刘振杰, 谭小明, 等. 田葱抗氧化活性组分筛选与低极性成分 GC/MS 分析. 中国医药导报, 2020, 17(13):45-49, 53.

Antioxidant Kinetic Characteristics and Online Identification of Active Compounds in Chrysanthemi Flos Stems and Leaves

TU Wanqian¹, LU Xin², ZHANG Liuji^{1,2}, LIU Yifei¹, WANG Jianxia³, LI Xiangyang⁴, CHEN Jingjing²

(1. Henan Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Henan Engineering Center of Genuine Medicinal Materials Comprehensive Development, Zhengzhou 450004, China; 2. Henan University of Chinese medicine, Zhengzhou 450008, China; 3. Henan Health Care College, Zhengzhou 450008, China; 4. Henan Institute for Drug and Medical Device Inspection, Henan Vaccine Issuance Center, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine, Chinese Materia Medica and Prepared Slices, Zhengzhou 450018, China)

Abstract: Objective To study the antioxidant activity and free radical scavenging kinetics of Chrysanthemi flos stems and leaves, and online screen the active components related to free radical scavenging. Methods Using DPPH method and ABTS method the antioxidant activity of extracts from *Chrysanthemi flos* stems and leaves was observed, and the effects of different influencing factors, such as drug concentration, reaction temperature and reaction time on free radical scavenging rate were compared, the half scavenging rate (IC_{50}) was determined. The flavonoids, such as luteolin glucuronic acid, luteolin, and caffeic acid, phenolic acids such as chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid A, B, and C in the samples before and after the reaction were chosen as indexes, and their contents were determined by HPLC. Results The drug concentration, reaction temperature and reaction time could affect the scavenging rate of DPPH free radical and ABTS. The IC_{50} of DPPH and ABTS were $0.395 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $2.039 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. After reaction with DPPH and ABTS, the contents of the analytes above all decreased significantly, which suggested that, the components above might be the antioxidant components in Chrysanthemi flos stems and leaves. Conclusions Chrysanthemi flos Stems and leaves have good free radical scavenging activity. In this study, the kinetic characteristics of scavenging DPPH and ABTS free radicals in

Chrysanthemi flos stems and leaves were preliminarily clarified, and the active components were found out. It provides an experimental basis for the future comprehensive development of Chrysanthemi flos stems and leaves.

Keywords: Chrysanthemi flos stems and leaves, Free radical, Kinetic characteristics, Antioxidation, Active compounds, HPLC

(责任编辑: 李青)