

[制剂工艺]

金莲花总黄酮提取纯化工艺优化及其抗光老化作用评价

朱林娇¹, 陈志伟¹, 胡俊杰^{1,2}, 张鹏^{3*}, 石召华^{3,4*}

(1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065; 3. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430061; 4. 湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 湖北 武汉 430065)

摘要: **目的** 优化金莲花总黄酮提取纯化工艺, 并评价其抗光老化作用。**方法** 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取温度为影响因素, 总黄酮得率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。以上样质量浓度、径高比、上样体积流量、洗脱液(乙醇)体积分数、洗脱体体积流量、洗脱体积为影响因素, 总黄酮纯度为评价指标, 单因素试验优化纯化工艺。再测定 DPPH·、ABTS⁺·、OH·、O₂⁻· 自由基清除率及弹性蛋白酶抑制率, 建立中波紫外线(UVB)诱导人原代真皮成纤维细胞(HDF)光老化模型, 检测细胞存活率, ROS、MDA、IL-6、MMP-1、COL-1 水平及 SOD 活性。**结果** 最佳提取工艺为乙醇体积分数 70%, 料液比 1:9, 提取时间 110 min, 提取温度 75 °C, 总黄酮得率为 12.47%。最佳纯化工艺为上样质量浓度 0.3 mg/mL, 径高比 1:9, 上样体积流量 1.5 BV/h, 乙醇体积分数 30%, 洗脱体体积流量 3 BV/h, 洗脱体积 4 BV, 总黄酮纯度为 89.33%。总黄酮对 4 种自由基的 IC₅₀ 值分别为 13.52 μg/mL、5.608 μg/mL、5.103 mg/mL、28.11 mg/mL, 清除率呈剂量依赖性。弹性蛋白酶抑制率呈剂量依赖性, 总黄酮质量浓度为 2 mg/mL 时达 49.78%。与模型组比较, 25、50、100 μg/mL 总黄酮组细胞存活率、SOD 活性升高 ($P<0.01$), MMP-1 水平降低 ($P<0.01$), ROS 产生被抑制; 50、100 μg/mL 总黄酮组 MDA、IL-6 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), COL-1 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取纯化抗光老化作用较强的金莲花总黄酮。

关键词: 金莲花; 总黄酮; 提取纯化工艺; 抗光老化作用; 中波紫外线(UVB); 人原代真皮成纤维细胞(HDF); Box-Behnken 响应面法; 单因素试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)02-0384-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.005

Optimization of extraction and purification process for total flavonoids from *Trollius chinensis* and evaluation of their anti-photoaging effect

ZHU Lin-jiao¹, CHEN Zhi-wei¹, HU Jun-jie^{1,2}, ZHANG Peng^{3*}, SHI Zhao-hua^{3,4*}

(1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China; 3. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 4. Ministry of Education Key Laboratory for Chinese Materia Medica Resources and Formulae, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction and purification process for total flavonoids from *Trollius chinensis* Bge., and to evaluate their anti-photoaging effect. **METHODS** With ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature as influencing factors, total flavonoids yield as an evaluation index, the extraction process was optimized by Box-Behnken response surface method on the basis of single factor test. With sample loading concentration, height-to-diameter ratio, sample loading volumetric flow rate, eluent (ethanol) concentration, elution volumetric flow rate and elution volume as influencing factors, total flavonoids purity as an evaluation index, the purification process was optimized by single factor test. Subsequently, the scavenging rates of

收稿日期: 2025-06-27

基金项目: 湖北省自然科学基金委员会重点项目(2023AFD127); 湖北省教育厅计划项目(T2023014)

作者简介: 朱林娇(1996—), 女, 硕士, 从事中药资源开发及其高值转化研究。E-mail: 2648920766@qq.com

*通信作者: 张鹏(1984—), 男, 硕士, 副主任药师, 硕士生导师, 从事中药制剂及其质量控制研究。E-mail: 289189201@qq.com

石召华(1978—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药资源开发及其高值转化研究。E-mail: zhshi78@hbuicm.edu.cn

DPPH·, ABTS⁺·, OH·, O₂⁻· free radicals and inhibitory rate of elastase were determined, after which the ultraviolet radiation B (UVB) -induced human dermal fibroblasts (HDF) photoaging model was established, the cell survival rate, ROS, MDA, IL-6, MMP-1, COL-1 levels and SOD activity were detected. **RESULTS** The optimal extraction process was determined to be 70% for ethanol concentration, 1 : 9 for solid-liquid ratio, 110 min for extraction time, and 75 °C for extraction temperature, the total flavonoids yield was 12.47%. The optimal purification process was determined to be 0.3 mg/mL for sample loading concentration, 1 : 9 for height-to-diameter ratio, 1.5 BV/h for sample loading volumetric flow rate, 30% for eluent concentration, 3 BV/h for elution volumetric flow rate, and 4 BV for elution volume, total flavonoids purity was 89.33%. The IC₅₀ values of total flavonoids on 4 free radicals were 13.52 μg/mL, 5.608 μg/mL, 5.103 mg/mL, 28.11 mg/mL, respectively, and the scavenging rates demonstrated a dose-dependent manner. The inhibitory rate of elastase demonstrated a dose-dependent manner, which reached 49.78% when the total flavonoids concentration was 2 mg/mL. Compared with the model group, the 25, 50, 100 μg/mL total flavonoids groups displayed increased cell survival rate and SOD activity ($P < 0.01$), decreased MMP-1 level ($P < 0.01$) and inhibited ROS production; the 50, 100 μg/mL total flavonoids groups displayed decreased MDA, IL-6 levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and increased COL-1 level ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the extraction and purification of total flavonoids from *T. chinensis* with strong anti-photoaging effect.

KEY WORDS: *Trollius chinensis* Bge.; total flavonoids; extraction and purification process; anti-photoaging effect; ultraviolet radiation B (UVB); human dermal fibroblasts (HDF); Box-Behnken response surface method; single factor test

金莲花为毛茛科金莲花属植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花, 始载于《本草纲目拾遗》, 其性寒, 味苦, 无毒, 具有明目、解岚瘴等功效, 主治口疮喉肿、浮热牙宣等症^[1], 广泛分布于我国河北省及东北地区, 在临床上可治疗上呼吸道感染^[2]、扁桃体炎^[3]等疾病。黄酮、有机酸等化合物是金莲花主要成分, 具有抗菌、抗氧化、抗炎等多种药理作用^[4-5], 相关制剂已被 2025 年版《中国药典》一部收载, 例如金莲花片、金莲花胶囊等^[6]。

近年来研究表明, 黄酮类成分具有潜在的抗光老化潜力, 能通过多种途径来减轻紫外线引起的皮肤损伤^[7-10]。目前, 国内关于金莲花黄酮类成分的研究涵盖抗氧化、抗炎等方面^[4-5], 但尚未涉及抗光老化。因此, 本实验优化金莲花总黄酮提取纯化工艺, 并评价该类成分对中波紫外线 (UVB) 诱导人原代真皮成纤维细胞 (HDF) 光老化的保护作用, 从而为其进一步开发利用奠定基础。

1 材料

1.1 试剂与药材 硝酸钠 (批号 7631-99-4, 纯度 ≥ 99%)、氢氧化钠 (批号 1310-73-2, 纯度 ≥ 96%)、亚硝酸钠 (分析纯, 批号 7632-00-0, 纯度 ≥ 99%)、D101 大孔吸附树脂 (批号 9060-05-3)、维生素 C (批号 20220224)、水杨酸 (分析纯, 批号

20220602)、焦性没食子酸 (分析纯, 批号 20220621) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 2, 2-联苯基-1-苦基胍基 (DPPH, 批号 C15568523) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 硫酸亚铁 (分析纯, 批号 J20HT174643) 购自上海源叶生物科技有限公司; 30% 过氧化氢 (分析纯, 批号 20231130) 购自广东光华科技股份有限公司; Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2, 批号 202401146) 购自上海博尔森生物科技有限公司; 2, 2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS, 批号 B2308190) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 水为超纯水。金莲花购于河北安国, 经湖北中医药大学药学院生药教研室李娟教授鉴定为正品。

1.2 仪器 UV-1800PC 紫外可见分光光度计 [翱艺仪器 (上海) 有限公司]; 振荡培养箱、倒置生物显微镜 (上海润度生物科技有限公司); 二氧化碳培养箱、真空冷冻干燥机 (青岛永合创信电子科技有限公司)。

1.3 细胞 人原代真皮成纤维细胞 (HDF, 批号 HUM-CELL-0132, 武汉原生原代生物医药科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 参照文献 [11] 报道, 精

密称取药材 20.0 g, 置于圆底烧瓶中, 加入 120 mL 70% 乙醇, 加热回流提取 30 min, 称定质量, 放冷至室温, 70% 乙醇补足减失的质量, 混匀, 过滤, 取滤液, 即得。

2.2 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 10.0 mg, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加入一定量甲醇, 水浴溶解, 放冷至室温, 甲醇定容至刻度, 轻微摇晃混匀, 精密移取 5 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀, 即得 (每 1 mL 含 0.2 mg 该成分)。

2.3 总黄酮含量测定 以芦丁为对照品, 采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 显色体系^[12]。分别精密量取对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加入 1 mL 5% 亚硝酸钠溶液, 混匀, 静置 6 min, 加入 1 mL 10% 硝酸铝溶液, 混匀, 静置 6 min, 加入 10 mL 5% 氢氧化钠溶液, 加水定容至刻度, 混匀, 静置 15 min, 以第 1 管 (相应试剂) 为空白对照, 在 504 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标 (A), 对照品质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A = 9.4791X + 0.007$ ($R^2 = 0.9984$), 在 0.008~0.048 mg/mL 范围内线性关系良好, 再计算总黄酮得率, 公式为 $W = \frac{\rho \times v \times n}{m} \times 100\%$, 其中 W 为总黄酮提取率, n 为稀释倍数, ρ 为总黄酮质量浓度, V 为提取液体积, m 为药材质量。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 精密量取“2.1”项下对照品溶液 1.0 mL, 按“2.3”项下方法测定吸光度 6 次, 测得其 RSD 为 0.24%, 表明仪器精密密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密量取“2.1”项下对照品溶液 0.5 mL, 共 6 份, 按“2.3”项下方法测定吸光度, 测得总黄酮含量 RSD 为 1.86%, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 精密量取“2.1”项下对照品溶液 0.5 mL, 按“2.3”项下方法每隔 2 h 测定 1 次吸光度, 共 6 次, 测得其 RSD 为 1.87%, 表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.4 加样回收率试验 精密量取“2.1”项下对照品溶液 0.5 mL, 共 6 份, 精密加入 0.5 mL 0.500 0 mg/mL 对照品溶液, 按“2.3”项下方法测定吸光度, 计算回收率。结果, 总黄酮平均加样回收率为 98.18%, RSD 为 0.99%。

2.5 单因素试验 本实验分别考察了乙醇体积分

数 50%、60%、70%、80%、90%, 料液比 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14, 提取温度 50、60、70、80、90 °C, 提取时间 0.5、1、1.5、2、3 h, 提取次数 1、2、3、4 次, 每个因素重复 3 次, 取平均值。

由图 1A 可知, 总黄酮得率随着乙醇体积分数增加而升高, 为 60% 时达最大值, 之后降低, 可能是因为乙醇体积分数过高时可促进杂质溶出, 降低组织通透性, 导致部分总黄酮溶解或分解, 故确定为 60%。由图 1B 可知, 总黄酮得率随着液料比增加而先升后降, 为 1:10 时达到最大值, 之后杂质逐渐溶出, 影响总黄酮得率, 故确定为 1:10。由图 1C 可知, 总黄酮得率随着提取温度增加而升高, 可能是因为分子扩散增强, 细胞壁破坏, 但温度过高时由于黄酮热不稳定性而导致其结构被破坏, 得率降低, 故确定为 70 °C。由图 1D 可知, 总黄酮得率随着提取时间延长而升高, 为 2 h 时达到最大值, 之后降低, 可能是因为前期溶剂对总黄酮的提取作用增强, 但后期溶剂过度提取时杂质溶出, 导致其得率下降, 故确定为 2 h。由图 1E 可知, 提取次数为 3 次时总黄酮得率接近最大值, 之后趋缓, 同时增加了生产成本, 故确定为 3 次。

2.6 提取工艺优化 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C)、提取时间 (D) 为影响因素, 总黄酮得率 (Y) 为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺, 因素水平见表 1, 结果见表 2。另外, 由于提取次数为非连续变量, 不宜作为影响因素, 故将其固定为 3 次。

表 1 Box-Behnken 响应面法因素水平

Tab. 1 Factors and levels for Box-Behnken response surface method

水平	A 乙醇体积分数/%	B 料液比	C 提取时间/h	D 提取温度/°C
-1	50	1:8	1	60
0	60	1:10	2	70
1	70	1:12	3	80

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行回归分析, 得方程为 $Y = 12.01 + 0.79A - 0.37B + 0.21C + 0.31D - 0.063AB + 0.33AC - 1.0 \times 10^{-2}AD - 0.078BC - 0.19BD - 1.35CD - 0.70A^2 - 0.42B^2 - 0.61C^2 - 1.44D^2$, 方差分析见表 3。由此可知, 模型 $P < 0.01$, 具有高度显著性; 相关系数 R^2 为 0.9314, 表明预测值与实验值之间存在显著相关性, 拟合度良好; 失拟项 $P > 0.05$, 表明实验误差

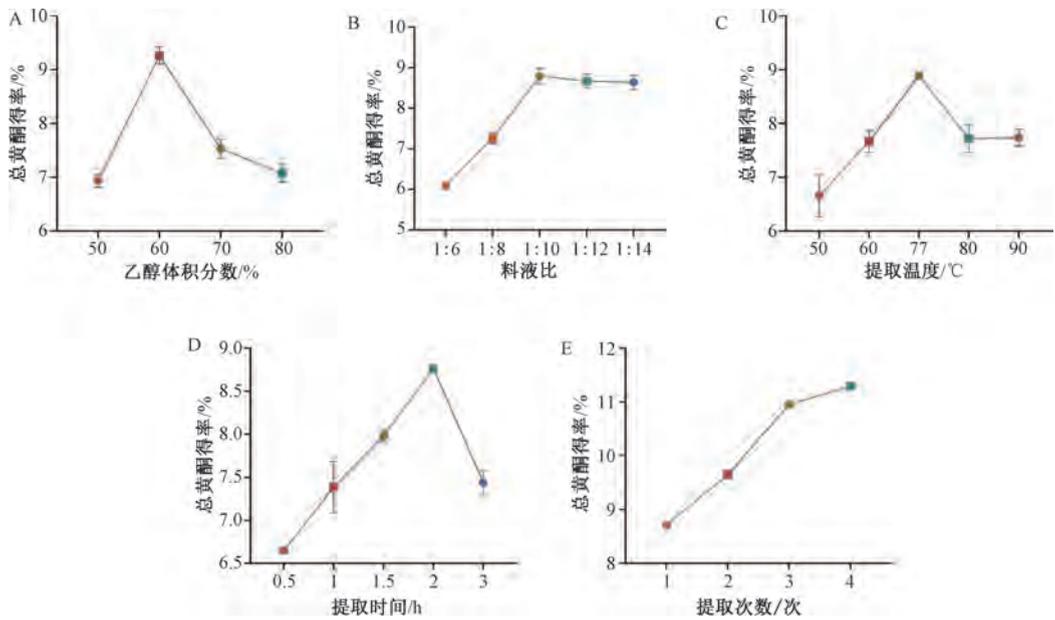


图1 各因素对总黄酮得率的影响 (n=3)

Fig. 1 Effects of various factors on total flavonoids yield (n=3)

表2 Box-Behnken 响应面法设计与结果

Tab. 2 Design and results for Box-Behnken response surface method

试验号	A	B	C	D	Y 总黄酮得率/%
1	1	-1	0	0	12.24
2	0	1	-1	0	10.94
3	0	0	-1	1	11.32
4	0	-1	1	0	11.32
5	-1	0	0	1	9.15
6	0	1	0	1	9.99
7	-1	0	1	0	9.42
8	-1	0	-1	0	9.82
9	-1	-1	0	0	10.87
10	1	0	0	1	10.76
11	0	0	0	0	12.40
12	1	0	0	-1	10.78
13	-1	0	0	-1	9.13
14	0	0	0	0	12.50
15	-1	1	0	0	9.78
16	0	0	0	0	11.66
17	0	0	1	1	9.51
18	0	-1	0	1	11.08
19	0	0	-1	-1	7.83
20	1	1	0	0	10.90
21	0	1	0	-1	9.31
22	0	0	1	-1	11.43
23	0	0	0	0	11.76
24	0	-1	-1	0	11.08
25	0	-1	0	-1	9.65
26	1	0	1	0	11.97
27	0	0	0	0	11.71
28	1	0	-1	0	11.04
29	0	1	1	0	10.87

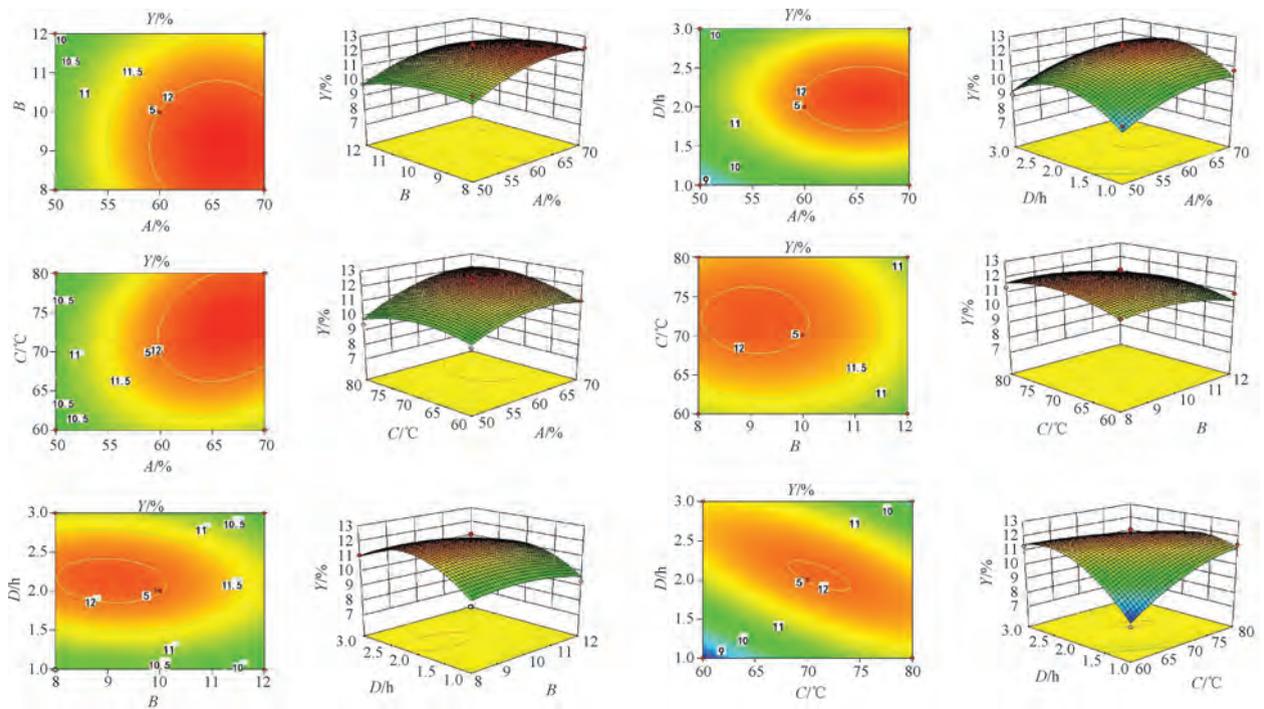
表3 方差分析结果

Tab. 3 Results for analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	33.87	14	2.42	13.57	<0.000 1
A	7.55	1	7.55	42.35	<0.000 1
B	1.65	1	1.65	9.25	0.008 8
C	0.52	1	0.52	2.90	0.110 8
D	1.13	1	1.13	6.33	0.024 7
AB	0.016	1	0.016	0.088	0.771 6
AC	0.44	1	0.44	2.48	0.137 6
AD	4.0×10 ⁻⁴	1	4.0×10 ⁻⁴	2.243×10 ⁻³	0.962 9
BC	0.024	1	0.024	0.13	0.719 1
BD	0.14	1	0.14	0.79	0.389 5
CD	7.32	1	7.32	41.03	<0.000 1
A ²	3.13	1	3.13	17.57	0.000 9
B ²	1.17	1	1.17	6.53	0.022 8
C ²	2.40	1	2.40	13.48	0.002 5
D ²	13.36	1	13.36	74.91	<0.000 1
残差	2.50	14	0.18	—	—
失拟项	1.83	10	0.18	1.10	0.506 4
纯误差	0.67	4	0.17	—	—
总回归	36.37	28	—	—	—

较小; 各因素影响程度依次为 A>B>D>C。响应面分析见图 2。

采用 Design-Expert 8.0.6 软件, 确定最优工艺为乙醇体积分数 70%, 提取温度 76.8 °C, 料液比 1 : 8.94, 提取时间 1.82 h, 总黄酮得率为 12.37%, 为了便于后期实际操作, 将其修正为乙醇体积分数 70%, 料液比 1 : 9, 提取温度 75 °C, 提取时间 110 min。再按上述优化工艺进行 3 批验证试验, 测得总黄酮平均得率为 12.47%, 与预测



注：A、B、C、D、Y分别为乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间、总黄酮得率。第1、3列为等高线图，第2、4列为三维曲面图。

图2 各因素响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors

值 12.37% 接近（相对误差为 0.75%），表明该模型拟合效果良好。

2.7 纯化工艺优化

2.7.1 大孔吸附树脂筛选 参照文献 [13] 报道，选择 D-101 树脂进行后续实验。

2.7.2 样品溶液制备 按“2.6”项下最优工艺提取，减压浓缩至上样质量浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5 g/mL 的溶液，即得。

2.7.3 吸附率、解吸率计算 公式分别为 $Q = \frac{(C_0 - C_1) \times V_{\text{吸附}}}{C_0 \times V_{\text{吸附}}} \times 100\%$ 、 $D = \frac{C_2 \times V_{\text{解吸}}}{(C_0 - C_1) \times V_{\text{解吸}}} \times 100\%$ ，

其中 Q 为吸附率， D 为解吸率， C_0 为粗提液初始质量浓度， C_1 为吸附液中总黄酮质量浓度， C_2 为解吸液中总黄酮质量浓度， $V_{\text{吸附}}$ 为吸附液体积， $V_{\text{解吸}}$ 为解吸液体积。

2.7.4 单因素试验 取经预处理的 60~90 目 D-101 树脂 10 g，湿法装入层析柱中并使树脂表面平齐。取“2.7.2”项下样品溶液适量，以上样质量浓度（0.2、0.3、0.4、0.5 g/mL）、径高比（1:3、1:6、1:9、1:12）、上样体积流量（1、1.5、2、2.5 BV/h）、洗脱液（乙醇）体积分数（20%、30%、40%、50%）、洗脱体积流量（1、2、3、4 BV/h）、洗脱体积（1、2、3、4、5、6、

7、8 BV）为影响因素，平行 3 次。

由图 3A 可知，上样质量浓度为 0.2~0.3 mg/mL 时总黄酮吸附率升高，为 0.3 mg/mL 时达到最大值，之后呈下降趋势，可能是因为总黄酮质量浓度较高时树脂吸附过饱和，上样液随之流出，使馏分中其含量降低，之后随着上样质量浓度增加树脂吸附率逐渐降低。最终确定，最佳上样质量浓度为 0.3 g/mL。

由图 3B 可知，径高比为 1:3~1:9 时总黄酮吸附率升高，可能是因为随着径高比增加样品流过树脂的路径变长，导致其吸附停留时间更长，有利于充分吸附，但进一步增加径高比时样品停留在树脂中的时间过长，可能导致吸附的总黄酮又被解吸下来，导致其吸附率下降。最终确定，最佳径高比为 1:9。

由图 3C 可知，上样体积流量为 1~1.5 BV/h 时总黄酮吸附率升高，为 1.5 BV/h 时达到最大值，之后呈下降趋势，可能是因为起初上样液在萃取柱上的停留时间较长，有利于分子与树脂充分作用和强化吸附，但体积流量过小时固相孔隙易堵塞，反而导致吸附效果变差，而超过 1.5 BV/h 后上样液停留时间较短，分子与树脂接触较少，导致吸附效率下降。最终确定，最佳上样体积流量为 1.5 BV/h。

由图 3D 可知，洗脱液体积分数为 20%~30%

时总黄酮解吸率升高,为30%时达到最大值,之后总黄酮难以解吸附,导致其解吸率降低。最终确定,最佳洗脱液体积分数为30%。

由图3E可知,洗脱体积流量为1~3 BV/h时总黄酮解吸率升高,为3 BV/h时达到最大值,之后呈

下降趋势。最终确定,最佳洗脱体积流量为3 BV/h。

由图3F可知,洗脱体积为2~4 BV时总黄酮解吸率升高,为4 BV时达到最大值,为5 BV时趋于平衡,之后呈下降趋势。最终确定,最佳洗脱体积为4 BV。

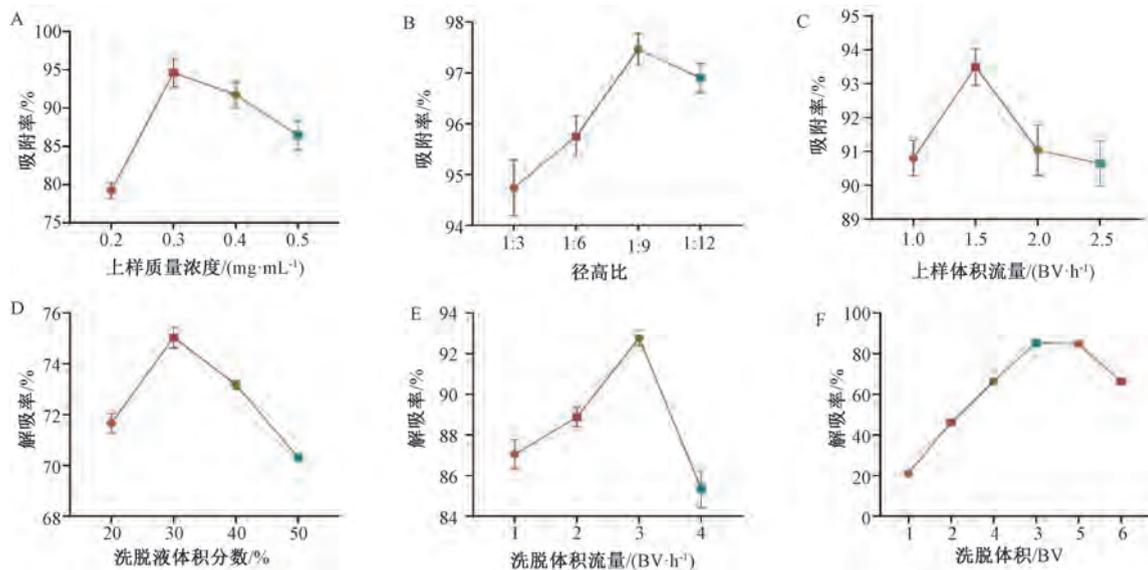


图3 各因素对D101大孔吸附树脂吸附、解吸的影响 (n=3)

Fig. 3 Effects of various factors on the adsorption and desorption of D101 macroporous adsorption resin (n=3)

2.7.5 验证试验 按“2.7.4”项下结果,得到最优工艺为上样质量浓度0.3 mg/mL,径高比1:9,上样体积流量1.5 BV/h,乙醇体积分数30%,洗脱体积流量3 BV/h,洗脱体积4 BV。再按上述优化工艺进行3批验证试验,测得总黄酮平均纯度为89.33%,与纯化前相比增加了4.07倍,表明该工艺稳定可靠。

2.8 抗氧化活性研究

2.8.1 DPPH·自由基清除实验 参照文献[14]报道,实验组取样品、维生素C溶液(两者质量浓度一致)各100 μL,置于96孔板中,加入0.2 mmol/L DPPH乙醇溶液,轻微振荡混匀,25℃避光处理并静置30 min,在517 nm波长处测定吸光度A₁;空白组以等体积去离子水代替样品溶液,其他操作同实验组,在517 nm波长处测定吸光度A₂;对照组以等体积乙醇代替DPPH乙醇溶液,其他操作同实验组,在517 nm波长处测定吸光度A₀,平行3次,计算DPPH·自由基清除率,公式为清除率=[1-(A₁-A₀)/A₂]×100%,结果见图4A。由此可知,随着总黄酮质量浓度增加清除率升高,IC₅₀值为13.52 μg/mL,清除能力略弱于维生素C(IC₅₀值为8.040 μg/mL)。

2.8.2 ABTS⁺·自由基清除实验 参照文献[15]报道,实验组取样品、维生素C溶液(两者质量浓度一致)各50 μL,置于96孔板中,加入150 μL ABTS溶液,轻微振荡混匀,25℃避光静置8 min,在734 nm波长处测定吸光度A₁;空白组以等体积去离子水代替样品溶液,其他操作同实验组,在734 nm波长处测定吸光度A₂;对照组以等体积去离子水代替ABTS溶液,其他操作同实验组,在734 nm波长处测定吸光度A₀,平行3次。按“2.8.1”项下公式计算ABTS⁺·自由基清除率,结果见图4B。由此可知,随着总黄酮质量浓度增加清除率升高,IC₅₀值为5.608 μg/mL,清除能力略弱于维生素C(IC₅₀值为5.119 μg/mL)。

2.8.3 OH·自由基清除实验 参照文献[16]报道,实验组取样品、维生素C溶液(两者质量浓度一致)各50 μL,置于96孔板中,加入适量9 mmol/L FeSO₄溶液、适量水杨酸乙醇溶液、4.4 mmol/L H₂O₂及100 μL蒸馏水,轻微振荡混匀,37℃静置60 min,在510 nm波长处测定吸光度A₁;空白组以等体积去离子水代替样品溶液,其他操作同实验组,在510 nm波长处测定吸光度A₂;对照组以等量去离子水代替H₂O₂,其他操作同实

实验组, 在 510 nm 波长处测定吸光度 A_0 , 平行 3 次, 按“2.8.1”项下公式计算 OH· 自由基清除率, 结果见图 4C。由此可知, 随着总黄酮质量浓度增加清除率升高, IC_{50} 值为 5.103 mg/mL, 清除能力明显弱于维生素 C (IC_{50} 值为 0.169 5 mg/mL)。

2.8.4 O_2^- 自由基清除实验 参照文献 [17] 报道, 实验组取适量 0.05 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl) 缓冲液 (pH 8.2), 置于 96 孔板中, 加入样品、维生素 C (两者质量浓度一致)、25 mmol/L 邻苯三酚溶液各 25 μ L, 轻微振荡混匀, 25 $^{\circ}$ C 水浴反应 3 min, 加入 25 μ L 10 mol/L 盐酸终止反应, 在 325 nm 波长处测定吸光度 A_1 ; 空白组以等体积去离子水代替样品溶液, 其他操作同实验组, 在 325 nm 波长处测定吸光度 A_2 ; 对照组以等体积蒸馏水代替邻苯三酚溶液, 其他操作同实验组, 在 325 nm 波长处测定吸光度 A_0 , 平行 3 次, 按“2.8.1”项下公式计算 O_2^- 自由基清除率, 结果见图 4D。由此可知, 随着总黄酮质量浓度增加清除率升高, IC_{50} 值为 28.11 mg/mL, 清除能力明显弱于维生素 C (IC_{50} 值为 0.060 8 mg/mL)。

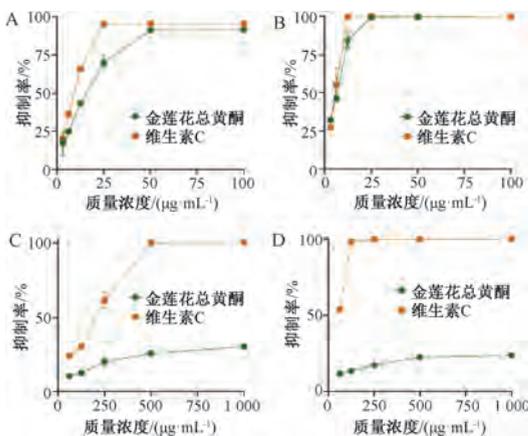


图 4 总黄酮对自由基的清除能力 ($n=3$)

Fig. 4 Scavenging capacities of total flavonoids various on free radicals ($n=3$)

2.9 弹性蛋白酶抑制实验 参照文献 [18] 报道, 取不同质量浓度样品溶液各 50 μ L, 置于 96 孔板中, 依次加入 25 μ L 弹性蛋白酶溶液、100 μ L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2), 在 25 $^{\circ}$ C 下孵育 20 min, 再加入 25 μ L 底物 [N -琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸-对硝基苯胺 (NAAAPN)], 振荡混匀, 在 405 nm 波长处测定吸光度 A , 然后在相同条件下孵育 10 min, 测定吸光度 A' , 计算 ΔA , 公式为 $\Delta A = A' - A$, 以及弹性蛋白酶抑制率, 公式为抑制率 = $[1 - (\Delta A_1 - \Delta A_0) / \Delta A_2] \times 100\%$, 其中 ΔA_1

为实验组吸光度, ΔA_2 为空白组吸光度, ΔA_0 为对照组吸光度, 平行 3 次, 结果见图 5。由此可知, 随着总黄酮质量浓度增加抑制率升高, 前者为 2 mg/mL 时后者达 49.78%, 而阳性药 [西维来司钠 (15 μ g/mL)] 为 95.32%。

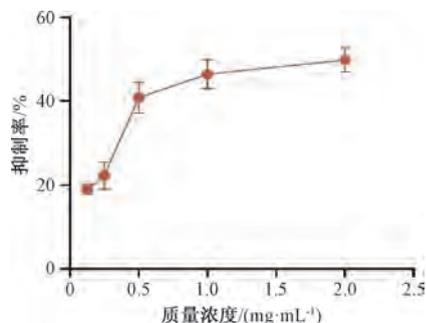


图 5 总黄酮对弹性蛋白酶的抑制作用 ($n=3$)

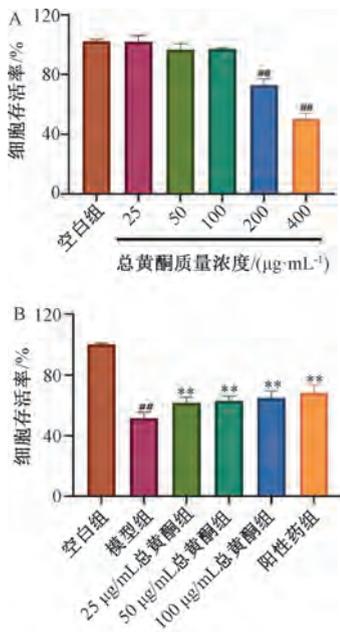
Fig. 5 Inhibitory effect of total flavonoids on elastase ($n=3$)

2.10 抗老化作用研究

2.10.1 细胞培养 将 HDF 细胞接种于含 10% FBS、1% 双抗、1% 添加剂的培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温恒湿培养箱中培养, 其间始终保持培养基充足, 于细胞生长至 70%~80% 时分别以 1×10^4 、 1×10^5 个/孔的密度接种于 96、6 孔板, 用于后续实验。

2.10.2 细胞存活率测定 HDF 细胞贴壁后, 设置实验组 (6.25、12.5、25、50、100、200 μ g/mL)、空白组、对照组, 每组 3 个复孔, 置于细胞培养箱中培养 24 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续孵育 1 h, 在 450 nm 波长处测定吸光度 A , 计算细胞存活率, 公式为存活率 = $[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$, 结果见图 6A。由此可知, 与空白组比较, 50、100、200 μ g/mL 总黄酮组细胞活性无明显变化 ($P > 0.05$), 最终选择 100 μ g/mL 进行后续实验。

2.10.3 模型建立与给药 参照课题组前期研究结果, 除空白组外, 其余各组给予 UVB 照射, 即用 UVB 灯管平行放置于 HDF 细胞上方 6 cm 处, 照射总强度为 60 mJ/cm^2 [19-20], 照射时用磷酸盐缓冲液覆盖细胞, 其中实验组、阳性组在照射前 24 h 分别给予 25、50、100 μ g/mL 样品溶液处理, 而对照组用锡纸包住, 照射结束后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 按“2.10.2”项下方法计算细胞存活率, 结果见图 6B。由此可知, 与空白组比较, 模型组细胞存活率降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 25、50、100 μ g/mL 总黄酮组和阳性药组 (5 mmol N -乙酰半胱氨酸) 细胞存活率升高 ($P < 0.01$)。



注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图6 总黄酮对UVB诱导HDF细胞活性的影响 ($n=3$)

Fig. 6 Effect of total flavonoids on viability of UVB-induced HDF cells ($n=3$)

2.10.4 细胞衰老检测 HDF细胞按“2.10.1”项下方法培养并接种于6孔板中，按“2.10.3”项下方法造模，24 h后按β-半乳糖苷酶染色试剂盒说明书固定细胞，进行SA-β-gal染色，转移至37℃、无CO₂培养箱中孵育过夜，在荧光显微镜下观察，结果见图7。由此可知，与对照组比较，模型组染蓝细胞显著增加，并且长梭型变为铺展型、无定型；与模型组比较，25、50、100 µg/mL总黄酮组和阳性药组细胞由铺展型、无定型转变为长梭型，表明总黄酮能延缓细胞衰老。

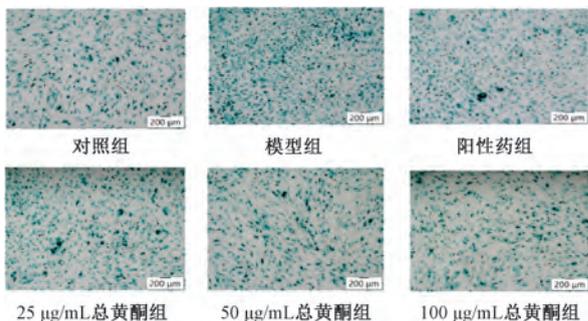


图7 各组UVB诱导HDF细胞SA-β-gal染色图 ($n=3$)

Fig. 7 SA-β-gal staining images of UVB-induced HDF cells in each group ($n=3$)

2.10.5 ROS水平检测 HDF细胞按“2.10.1”项下方法培养并接种于6孔板中，按“2.10.3”项下方法造模，24 h后吸去培养基，磷酸盐缓冲

液清洗2次，依据ROS试剂盒检测说明书，每孔加入至少1 mL稀释至10 µmol/L的无血清活性氧荧光探针(DCF-DA)，转移至培养箱中，37℃孵育避光，30 min后吸去培养基，磷酸盐缓冲液清洗多余的荧光探针，在荧光显微镜下观察，结果见图8。由此可知，与对照组比较，模型组细胞ROS荧光强度增加；与模型组比较，25、50、100 µg/mL总黄酮组细胞ROS荧光强度逐渐降低，为100 µg/mL时与空白组一致，表明总黄酮能抑制细胞内过量ROS产生，从而减轻氧化应激反应。

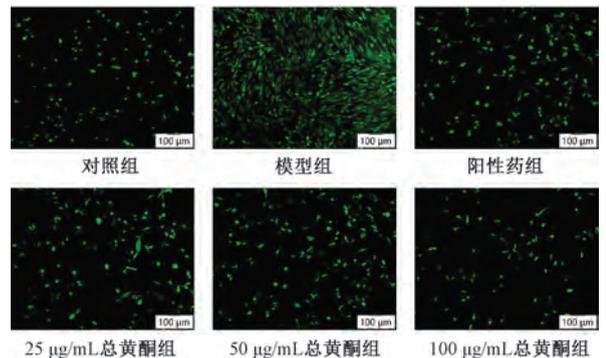
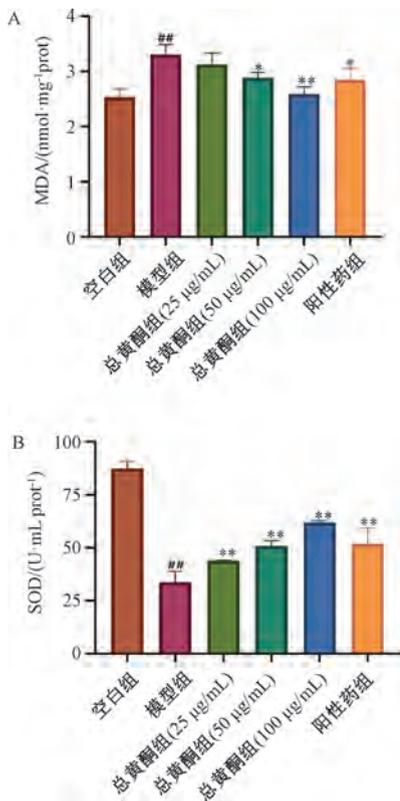


图8 总黄酮对UVB诱导HDF细胞ROS水平的影响 ($n=3$)

Fig. 8 Effect of total flavonoids on ROS level in UVB-induced HDF cells ($n=3$)

2.10.6 MDA水平、SOD活性检测 HDF细胞按“2.10.1”项下方法培养并接种于6孔板中，按“2.10.3”项下方法造模，24 h后消化细胞，置于离心管中，室温下5 000 r/min离心5 min，收集底部细胞沉淀，按照相关试剂盒说明书检测MDA水平、SOD活性，结果见图9。由此可知，与对照组比较，模型组MDA水平升高($P < 0.01$)，SOD活性降低($P < 0.01$)；与模型组比较，50、100 µg/mL总黄酮组和阳性药组MDA水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)，25、50、100 µg/mL总黄酮组和阳性药组SOD活性升高($P < 0.01$)。

2.10.7 IL-6、MMP-1、COL-1水平检测 HDF细胞按“2.10.1”项下方法培养并接种于6孔板中，按“2.10.3”项下方法造模，24 h后按照相应酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书，在450 nm波长处测定吸光度，检测IL-6、MMP-1、COL-1水平，结果见图10。由此可知，与对照组比较，模型组IL-6、MMP-1水平升高($P < 0.01$)，COL-1水平降低($P < 0.01$)；与模型组比较，50、100 µg/mL总黄酮组和阳性药组IL-6水平降低($P < 0.01$)，COL-1水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)，



注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

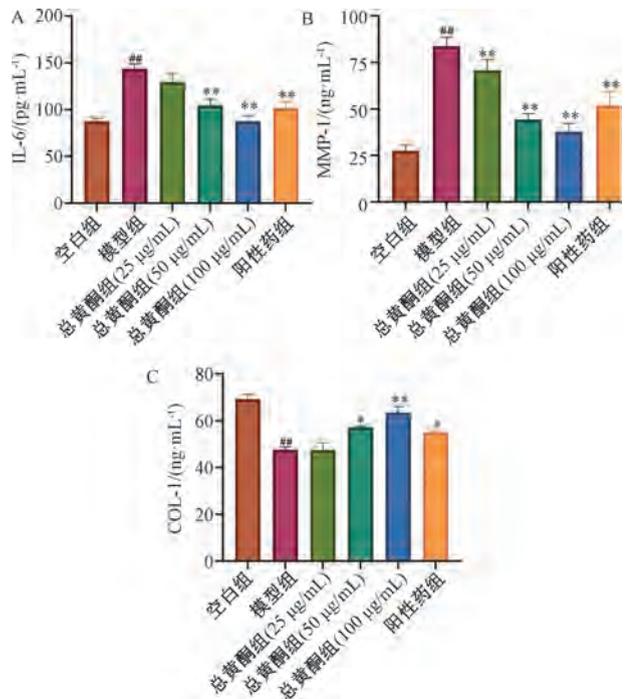
图9 总黄酮对UVB诱导HDF细胞MDA水平(A)、SOD活性(B)的影响($n=3$)

Fig. 9 Effects of total flavonoids on MDA level (A) and SOD activity (B) in UVB-induced HDF cells ($n=3$)

25、50、100 µg/mL总黄酮组和阳性药组MMP-1水平降低($P < 0.01$)。

3 讨论与结论

本实验在单因素试验基础上采用Box-Behnken响应面法，确定金莲花总黄酮最优提取工艺为乙醇体积分数70%，料液比1:9，提取温度70℃，提取时间110 min，提取次数3次，总黄酮得率为12.47%；最优纯化工艺为上样质量浓度0.3 mg/mL，径高比1:9，上样体积流量1.5 BV/h，洗脱体积流量3 BV/h，洗脱体积4 BV，乙醇体积分数30%，总黄酮纯度为89.33%。抗光老化作用研究结果显示，金莲花总黄酮能有效清除DPPH·、ABTS⁺·、OH·、O₂⁻·自由基，对机体起到一定保护作用；SOD活性升高，表明该成分能增强抗氧化能力，清除光老化所致过多自由基；MDA水平降低，表明该成分能减弱细胞膜脂质过氧化程度，维持细胞结构完整性；COL-1合成增加，MMP-1表达抑制，表明该



注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

图10 总黄酮对UVB诱导HDF细胞IL-6(A)、MMP-1(B)、COL-1(C)水平的影响($n=3$)

Fig. 10 Effects of total flavonoids on IL-6 (A), MMP-1 (B) and COL-1 (C) levels in UVB-induced HDF cells ($n=3$)

成分能缓解皮肤中胶原蛋白代谢失衡；IL-6水平降低，表明该成分能抑制炎症，促进皮肤修复和再生。

综上所述，本实验优化金莲花总黄酮提取纯化工艺，并证实该类成分具有对UVB诱导光老化HDF细胞的保护作用，可改善皮肤皱纹、松弛等问题，在相关领域应用潜力巨大，后续将对其物质基础、作用机制作进一步研究。

参考文献：

- [1] 赵学敏. 本草纲目拾遗[M]. 北京：人民卫生出版社，1963：480.
- [2] 杨宏桂. 金莲花颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染疗效观察[J]. 中国实用医药，2015，10(22)：148-149.
- [3] 徐克菲. 金莲花软胶囊联合头孢替安治疗儿童急性化脓性扁桃腺炎的临床研究[J]. 现代药物与临床，2020，35(10)：2033-2036.
- [4] 刘艺苑，刘传敏，李新朋，等. 金莲花黄酮类成分抗菌及抗氧化活性研究[J]. 药学研究，2023，42(4)：228-231；242.
- [5] 司丽君，王林林，黄 华，等. 阿尔泰金莲花有效成分抗炎作用的研究[J]. 中药药理与临床，2021，37(5)：49-54.

- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2025年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
- [7] Franco J G, Cefali L C, Ataide J A, et al. Effect of nanoencapsulation of blueberry (*Vaccinium myrtillus*): A green source of flavonoids with antioxidant and photoprotective properties[J]. *Sustain Chem Pharm*, 2021, 23: 100515.
- [8] Lv M W, Yang Y F, Choisy P, et al. Flavonoid components and anti-photoaging activity of flower extracts from six *Paeonia* cultivars[J]. *Ind Crop Prod*, 2023, 200(Part B): 116707.
- [9] Kim K J, Xuan S H, Park S N. Licoricidin, an isoflavonoid isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fisher, prevents UVA-induced photoaging of human dermal fibroblasts[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2017, 39(2): 133-140.
- [10] Xu S S, Sun X L, Zhu Z T, et al. The extract of buds of *Chrysanthemum morifolium* ramat alleviated UVB-induced skin photoaging by regulating MAPK and Nrf2/ARE pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 332: 118352.
- [11] 白云娥, 漆小梅, 高品一, 等. 金莲花水-醇提取工艺比较[J]. 中成药, 2007, 29(10): 1521-1523.
- [12] 徐秀泉, 许源, 汤建, 等. 响应面法优化金莲花总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 35-38.
- [13] 刘洋, 周鸿立, 马先红, 等. 大兴安岭金莲花总黄酮纯化工艺研究[J]. 食品科技, 2016, 41(12): 163-168.
- [14] 胡露, 魏瑞敬, 聂艳峰, 等. 毛豆提取物的体外抗衰老活性研究[J]. 广东化工, 2021, 48(7): 28-30.
- [15] 冯娇, 肖海鸿. 不同产地银柴胡黄酮含量及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(5): 8-12.
- [16] 姚新成, 刘谢英, 张玉姗, 等. 新疆两色金鸡菊模拟茶饮自由基清除、胰脂肪酶活性抑制及成分分析[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(13): 1353-1357.
- [17] 王兰英, 姜玲, 赵静, 等. 发酵虫草多糖提取工艺优化及其体外抗氧化、免疫活性研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(6): 80-88.
- [18] Apraj V D, Pandita N S. Evaluation of skin anti-aging potential of *Citrus reticulata* Blanco peel[J]. *Pharmacognosy Res*, 2016, 8(3): 160-168.
- [19] 陈志伟, 周磊, 王殷杰, 等. 五倍子水提物对UVB诱导光老化成纤维细胞的保护作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2024, 38(11): 1193-1202.
- [20] Xu J, Zhang X F, Song Y, et al. Heat-killed *Lactocaseibacillus paracasei* ameliorated UVB-induced oxidative damage and photoaging and its underlying mechanisms[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(10): 1875.

宽体金线蛭产地加工方法筛选

卢明悦¹, 王星智¹, 姜秋¹, 闫庆庆², 胡晶红¹, 张永清^{1*}

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东康源堂药业股份有限公司, 山东 微山 277600)

摘要: 目的 筛选宽体金线蛭产地加工方法。方法 分别采用吊干、水烫、酒闷、盐渍、碱制进行产地加工, 测定出干率、抗凝血酶活性、可溶性蛋白含量。建立角叉菜胶诱导大鼠尾血栓模型, 48只大鼠随机分为空白组、模型组、阿司匹林组(40 mg/kg)、吊干组、水烫组、酒闷组、盐渍组、碱制组, 每组6只, 其中后5组灌胃给予药材混悬液(0.54 g/kg), 检测黑尾率、PT、APTT、TT及FIB、FDP、D-dimer、P-selectin水平。再通过熵权TOPSIS法进行多维度决策分析。结果 各产地加工方法综合评价依次为盐渍>碱制>酒闷>水烫>吊干。其中, 盐渍抗凝血酶活性为24.67 U/g, 黑尾率为49.21%, 可溶性蛋白含量为13.30 mg/g, TT、PT明显延长; 吊干FIB水平、出干率较低, 抗凝成分留存明显不足。结论 盐渍是最优的宽体金线蛭产地加工方法。基于“成分-药效-产量”多维标准, 熵权TOPSIS法可为建立该药材产地加工技术体系提供可量化、可推广的评价范式。

关键词: 宽体金线蛭; 产地加工; 抗血栓作用; 熵权TOPSIS法

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)02-0393-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.006

收稿日期: 2025-11-07

基金项目: 山东省高等学校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心项目(CYLXTCX2021-15); 山东茂晟药业有限公司横向课题(2024-11)

作者简介: 卢明悦(2002—), 女, 硕士, 研究方向为中药资源。E-mail: 1911402804@qq.com

* 通信作者: 张永清(1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源及其质量控制。E-mail: zyq622003@126.com