

# 红花叶总黄酮提取纯化工艺优化及抗急性肝损伤活性研究

马梦鸽<sup>1</sup>, 宋忠兴<sup>2</sup>, 陈琳<sup>2\*</sup>, 唐志书<sup>1,2,3\*</sup>, 孔鑫<sup>2</sup>, 段金赓<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 长春中医药大学药学院, 长春 130117;

<sup>2</sup> 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心 陕西省创新药物研究中心, 咸阳 712083;

<sup>3</sup> 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; <sup>4</sup> 南京中医药大学, 南京 210023

**摘要:**通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化红花叶总黄酮 (total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. leaf, TFCTLL) 的提取、纯化工艺。以总黄酮提取率为评价指标, 考察料液比、乙醇浓度、提取时间和提取次数四个提取因素的最佳水平。并采用 AB-8 大孔树脂对获得的 TFCTLL 进一步富集纯化。结果确定最佳提取工艺为料液比 1:27、乙醇浓度 80%、提取时间 65 min、提取次数 2 次。纯化工艺确定选用 AB-8 大孔树脂、用 95% 乙醇洗脱、pH = 7, 富集纯化后得到的 TFCTLL 纯度为 61.42%。采用 UPLC-TOF-Q-MS 法共鉴定了 TFCTLL 中木犀草苷等 4 个化学成分。以 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠急性肝损伤模型, 实验结果表明 TFCTLL 给药组小鼠血清中 ALT、AST 和 TBA 含量较模型组显著降低, 小鼠肝组织病变程度减轻。证明其具有抗急性肝损伤的药效活性。本研究可为红花非药用部位资源的充分利用提供数据支撑。

**关键词:**红花叶; 总黄酮; 提取纯化工艺; 响应面; 急性肝损伤

中图分类号: R284.2; R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)1-0108-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.1.012

## Optimization of extraction and purification process of total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. leaf and its anti-acute liver injury activity

MA Meng-ge<sup>1</sup>, SONG Zhong-xing<sup>2</sup>, CHEN Lin<sup>2\*</sup>, TANG Zhi-shu<sup>1,2,3\*</sup>, KONG Xin<sup>2</sup>, DUAN Jin-ao<sup>4</sup>

<sup>1</sup> College of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

<sup>2</sup> Shaanxi University of Chinese Medicine Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xianyang 712083, China;

<sup>3</sup> Chinese Medicine Resource Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

<sup>4</sup> Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract:** The extraction and purification process of total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. leaf (TFCTLL) were optimized by single factor test and Box-Behnken response surface method. Taking the extraction rate of total flavonoids as the evaluation index, the optimal level of four extraction factors, namely, the solid-liquid ratio, the ethanol concentration, the extraction time and the extraction times. The obtained TFCTLL was further enriched and purified with AB-8 macroporous resin. The optimum extraction conditions were as follows: the solid-liquid ratio was 1:27, ethanol concentration was 80%, the extraction time was 65 min, and the extraction times were twice. The purification process is determined to select AB-8 macroporous resin, elute with 95% ethanol, pH = 7, eluted with 95% ethanol, pH = 7, and The purity of TFCTLL obtained after enrichment and purification is 61.42%. Four chemical constituents including luteolin-7-glucoside in TFCTLL were identified by UPLC-TOF-Q-MS method. CCl<sub>4</sub> was used to induce acute liver injury model in mice. The experimental results showed that the contents of ALT, AST and TBA in serum of mice in TFCTLL administration group were significantly lower than those in model group, Lesion degree of liver tissue in mice is reduced, It is proved that it has pharmacodynamic activity against acute liver injury. This study can provide data support for the full utilization of non-medicinal parts of *Carthamus tinctorius* L.

收稿日期: 2022-07-21

接收日期: 2022-12-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81904047); 现代农业产业技术体系建设专项基金 (CARS-21); 陕西省科技统筹创新工程计划 (2016KTTSSF01-06-01); 陕西省千人计划区域青年人才项目 (2018)

\* 通信作者: Tel: 86-29-38182205; E-mail: chanlin24@sina.com, tzs6565@163.com

**Key words:** total flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. leaf; total flavonoids; extraction and purification process; response surface; acute liver injury

菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥花是中国传统的珍贵药材,也是蒙医临床应用最广泛的药材之一。本药性凉,味微苦,归心、肝经,是活血通经,去瘀止痛之良药<sup>[1-3]</sup>。一直以来,对植物红花的使用和研究只集中于其药花,但是植物红花的花产量很低,这就使得其药用部位—“花”采收后产生的大量的叶子被弃掉,从而出现资源浪费的现象。有学者对红花地上部分的化学成分进行了研究,但大多集中在生物碱和萜类<sup>[3-5]</sup>。但对其黄酮类化合物的研究较少,黄酮类化合物具有抗氧化、抗病毒、保肝、抗癌、抗炎等药理活性<sup>[6,7]</sup>,并且植物源黄酮类化合物具天然低毒的特点,在开发高效安全的天然药物、护肤品、保健品等方面具有广阔前景。目前未见对红花叶黄酮类提取纯化工艺和生物活性的研究。相关研究表明,红花茎醇提取物具有明显的抗 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤作用<sup>[3]</sup>,那么红花叶提取物是否也具有肝保护作用值得探讨。故本实验从充分利用红花非药用部位资源的角度出发,通过提取、纯化工艺优化得 TFCTLL,并进一步探究其保肝作用,为红花非药用部位资源的充分利用及其药理活性研究提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

本实验所用红花叶采摘自新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州,由经陕西中医药大学刘世军高级工程师鉴定为红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥叶。水飞蓟素(上海源叶生物科技有限公司,批号:S25549);羧甲基纤维素钠(天津天士力圣特制药有限公司,批号:QHG3-2161-96)。芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:HR17513S1)。橄榄油(山东鲁花集团);四氯化碳(CCl<sub>4</sub>,天津市天力化学试剂有限公司,批号:20210102);丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT,批号:140120014)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST,批号:140220008)、总胆汁酸(total bile acid, TBA,批号:143222001)检测试剂盒(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);HPD-600、HPD-100、D-101、HP-20、AB-8型大孔吸附树脂(西安蓝晓科技新材料股份有限公司);其他试剂(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

### 1.2 动物

SPF级雄性昆明小鼠,50只,4周龄,体质量(20±2)g。购于成都达硕实验动物有限公司(SCXK(川)2020-030),饲养于陕西省中药资源产业化创新中心SPF级动物实验室(SYXK(陕)2017-004),每天光照和黑暗各12h,适宜温度设置在20℃~24℃范围内,室内保持55%~65%的相对湿度。动物实验开始前先经过1周的适应性喂养。本实验经陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准(SUCMDL20220612001)。

### 1.3 仪器

Acquity H-CLASS型超高效液相色谱(UPLC,美国沃特世科技有限公司)串联Triple TOFTM 5600+质谱仪(美国爱博才思公司);液相配置:二元超高压溶剂系统、FTN自动进样管理器、PDA检测器和Empower3色谱工作站。全自动血清生化仪(深圳迈瑞生物医疗电子有限公司);UV-2600型紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 样品前处理

将红花地上部分茎、叶分离,去杂质,置于通风阴凉处阴干后,备用。

#### 1.4.2 总黄酮含量测定

##### 1.4.2.1 标准曲线的绘制

采用NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-NaOH比色法测定总黄酮含量。用65%乙醇溶解芦丁对照品后制得0.2mg/mL的对照品溶液。精确吸取不同体积对照品溶液(0.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0mL)于25mL量瓶中,加5%NaNO<sub>2</sub>溶液1.0mL,摇匀静置6min,加10%Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>溶液1.0mL,摇匀静置6min,加4%NaOH溶液10.0mL,加蒸馏水定容至刻度,摇匀静置15min,于510nm处测定吸光度值。以芦丁质量浓度为横坐标(X),吸光度值为纵坐标(Y),绘制标准曲线并计算回归方程为:Y=12.706X-0.0026(r=0.9994),表明芦丁在0.008~0.056mg/mL浓度下吸光度线性关系良好。

##### 1.4.2.2 样品溶液中总黄酮含量的测定

将红花叶粉碎后过50目筛,真空干燥至恒重,得到样品粉末。精密称取粉末10.0g,加入适量溶剂进行加热回流提取,分别考察不同乙醇浓度、料液

比、提取时间和提取次数对 TFCTLL 提取率影响,根据“1.4.2.1”项下的线性方程计算总黄酮浓度并根据下列公式<sup>[8]</sup>计算总黄酮提取率。

$$\text{总黄酮提取率} = (C \times V \times D) / m \times 100\%$$

式中:  $C$  为标准曲线中计算出的总黄酮浓度, mg/mL;  $V$  为提取液体积, mL;  $D$  为稀释倍数;  $m$  为取样量, mg。

#### 1.4.3 提取工艺单因素试验

分别考察乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)、料液比(1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL)、提取时间(30、60、90、120、150 min)和提取次数(1、2、3、4、5次)对总黄酮提取率的影响。每个因素平行实验3次。

#### 1.4.4 提取工艺响应面水平选取与设计

在单因素实验基础上,固定提取次数2次的条件下,选取料液比、乙醇浓度、提取时间作为 Box-Behnken 试验设计的3个因素,以 TFCTLL 提取率为评价指标,结合响应面法的设计原理,采用3因素3水平的设计方案,共17组实验,响应面法实验的因素与水平见表1。

表1 响应面分析因素及水平

Table 1 Factor and level of response surface experiment

水平 Level	因素 Factor		
	料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	提取时间 Extraction time (min)
-1	1:15	70	30
0	1:25	80	60
1	1:35	90	90

#### 1.4.5 总黄酮的富集和纯化

##### 1.4.5.1 红花叶提取液前处理

称取适量干燥至恒重的红花叶药材,照响应面法的最佳提取工艺提取,提取液减压浓缩至无醇味。上柱之前采用抽滤法过滤大量杂质、蛋白质、黏液以及色素。

##### 1.4.5.2 大孔树脂的筛选和预处理

总黄酮化合物大都呈非极性至弱极性,而其所用的大孔吸附树脂也大都非极性至弱极性之间。故本试验选取 AB-8 型<sup>[9]</sup>、HPD-100 型<sup>[10]</sup>、HPD-600 树脂<sup>[11]</sup>、D101 型<sup>[12]</sup>和 HP-20 型<sup>[12]</sup>5种适合富集总黄酮的大孔吸附树脂用于纯化 TFCTLL,使用4%的 HCl 浸泡24 h,蒸馏水洗涤至中性;4%的 NaOH 浸泡24 h,蒸馏水洗涤至中性;无水乙醇浸泡24 h,蒸

馏水洗涤至无醇味,备用。将大孔树脂用95%的乙醇浸泡24 h后进行湿法装柱,精密称取一定量大孔树脂对红花叶提取液进行吸附。

##### 1.4.5.3 大孔树脂型号的筛选

将已处理好的大孔树脂 HPD-600、HPD-100、D-101、HP-20、AB-8 各称取10 g,分别置于150 mL 锥形瓶中,向每个锥形瓶中加入预处理后的红花叶提取液40 mL,置于25℃恒温水浴摇床上以110 r/min 的速度震荡2 h,静置8 h,使各个型号大孔树脂达到饱和吸附,并吸收上等红花叶提取液对黄酮类物质浓度进行测定。比较不同型号树脂对 TFCTLL 的吸附率。将载样树脂移入150 mL 锥形瓶中,加入40 mL 的95%乙醇,置于25℃恒温水浴摇床振摇2 h 过滤,静置8 h 即得解吸液,比较不同型号树脂对红花叶总黄酮的解吸率,根据吸附率和解析率结果选出大孔吸附树脂。吸附率和解析率的计算公式<sup>[13]</sup>如下:

$$\text{吸附率} = (C_0 V_0 - C_1 V_1) / C_0 V_0 \times 100\%$$

$$\text{解吸率} = (C_2 V_2) / (C_0 V_0 - C_1 V_1) \times 100\%$$

式中,  $C_0$  为吸附前样品液中总黄酮质量浓度, mg/mL;  $V_0$  为吸附前样液体积, mL;  $C_1$ : 吸附后残液中总黄酮质量浓度, mg/mL;  $V_1$  为吸附后残液体积, mL;  $C_2$  为解吸液中总黄酮质量浓度, mg/mL;  $V_2$  为解吸液体积, mL。

##### 1.4.5.4 纯化工艺单因素考察

###### 1.4.5.4.1 不同 pH 的红花叶提取液

称取10 g 经过预处理后的树脂,用去离子水对其进行清洗,置于150 mL 的三角瓶中,分别加入40 mL pH 为2、4、7、10、12 的红花叶提取液震荡吸附4 h。静置12 h,检测其中总黄酮含量,计算出吸附率,选出最佳 pH 值。

###### 1.4.5.4.2 最大吸附量

准确称取已处理好的大孔树脂100 g,采取湿法装柱,取红花叶提取液进行上样,分段收集流出液,每份40 mL,收集10份流出液,测定黄酮含量。流出液中黄酮浓度如果达到上样液浓度的10%时,称为泄漏点,当流出液中黄酮浓度达到上样液浓度的100%时,称为饱和点,收集流出液,测定流出液中总黄酮的含量。

###### 1.4.5.4.3 不同浓度洗脱溶剂

准确量取10 g 吸附总黄酮达到饱和状态的树脂,用去离子水对其进行清洗,置于150 mL 的三角瓶中,分别加入浓度为20%、40%、60%、80%、95%

乙醇 40 mL,震荡洗脱 2 h。静置 8 h,检测其中总黄酮含量,计算出解吸率,由解吸率得出最适乙醇浓度。

#### 1.4.6 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测 TFCTLL 化学成分

##### 1.4.6.1 质谱条件

离子源:ESI 离子源;正、负离子模式采集数据,源喷射电压(IVF)分别为 5 500、-4 500V,裂解电压(DP)  $\pm 80$  V,碰撞能量(CE)  $\pm 10$  eV,GS1 和辅助气、GS2 都为氮气、344.74 kPa(50 psi),气帘气(CUR):241.32 kPa(35psi),雾化温度(TEM) 500  $^{\circ}\text{C}$ ,采用信息依赖采集(IDA)、动态背景扣除(DBS)和高灵敏度模式;母离子(TOF-MS)、子离子的扫描范围都为  $m/z$  100 ~ 2000。

##### 1.4.6.2 液相色谱条件

采用 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>(100 mm  $\times$  2.1 mm,1.7  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱,使用 0.1% 甲酸水溶液(A) 溶液-乙腈(B) 作为流动相进行梯度洗脱条件:0 ~ 10 min,5%  $\rightarrow$  12% B;10 ~ 30 min,12%  $\rightarrow$  30% B;30 ~ 50 min,30%  $\rightarrow$  50% B;50 ~ 52 min,50%  $\rightarrow$  80% B;52 ~ 55 min,80%  $\rightarrow$  80% B;55 ~ 57 min,80%  $\rightarrow$  5% B;57 ~ 62 min;5%  $\rightarrow$  5% B 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ ;流量 0.3 mL/min;进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.4.7 TFCTLL 抗小鼠急性肝损伤动物实验

##### 1.4.7.1 受试药物的制备

按最佳提取、纯化工艺获得的 TFCTLL,用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液分别配置成 5、10 mg/mL,水飞蓟素用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配置成 10 mg/mL,4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷藏备用。

##### 1.4.7.2 分组、造模及给药

实验选取 50 只健康雄性昆明小鼠,将小鼠随机分为空白组(control,C)、模型组(model,M)、水飞蓟素组(阳性对照组,silymarin,S)、TFCTLL 低剂量组(T-L)和 TFCTLL 中剂量组(T-M),每组各 10 只。T-L 和 T-M 组分别给予 TFCTLL 提取物 50、100 mg/kg,S 组给予水飞蓟素 100 mg/kg,空白组和模型组灌胃给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,每天一次,连续灌胃给药 14 天。第 14 天末,除空白组腹腔注射等量的橄榄油溶液外,模型组和给药组小鼠均腹腔注射含 0.1%  $\text{CCl}_4$  的橄榄油溶液 10 mL/kg。小鼠末次给药后间隔 24 h,眼球取血后处死,分取肝脏及脾脏并称取其重量,计算小鼠的肝脏指数及脾脏指数;收集血清,采用全自动生化分析仪检测

小鼠血清中 ALT、AST 和 TBA 含量。

#### 1.4.7.3 动物体重变化及相关脏器指数测定

每周监测并记录小鼠体重,试验结束后摘取各组小鼠肝脏、脾脏,生理盐水清洗后用滤纸吸干,记录肝脏和脾脏湿重并计算脏器指数。

#### 1.4.7.4 血清生化指标的测定

通过全自动生化仪检测各组小鼠血清 AST、ALT 和 TBA 的含量。

#### 1.4.7.5 肝组织病理学观察

各组小鼠肝脏在 4% 多聚甲醛固定液中固定,肝脏组织进行石蜡包埋并切片(5  $\mu\text{m}$ ),常规方式脱蜡,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,显微镜下观察肝组织损伤的病理变化。

#### 1.4.8 统计分析

结果分析采用 IBM SPSS Statistics 20 和 Graph-Pad Prism 5 进行分析统计,数值用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 T 检验, $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 提取工艺单因素试验结果

提取次数、提取时间、料液比、乙醇浓度对总黄酮提取率的影响。单因素结果见图 1。综合考虑时间和经济成本,选择提取次数为 2 次,料液比为 1:25,提取溶剂为 80% 乙醇,单次提取时间为 60 min。

### 2.2 提取工艺响应面试验结果

根据单因素试验结果,固定提取次数 2 次的条件下,选取料液比、乙醇浓度、提取时间 3 个因素为变量,以红花叶总黄酮提取率  $R$  为响应值,采用 Box-Behnken 法设计三因素三水平响应面试验。使用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验数据进行二次响应面回归分析,得到如下多元二次回归方程  $R = 4.89 + 0.1449A + 0.061B + 0.0588C + 0.0774AB + 0.0831AC + 0.0399BC - 0.4463A^2 - 0.5328B^2 - 0.2238C^2$ 。对回归模型进行方差分析,结果见表 2,该模型显著性检验的  $P$  值为  $< 0.0001$ ,表明该模型具有统计学意义,失拟项  $P > 0.05$ 。说明回归模型拟合较好,能较准确反映 3 个因素对 TFCTLL 提取率的影响。方差来源中的  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $AB$ 、 $AC$ 、 $BC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  的  $P$  值表明 3 个因素对 TFCTLL 提取率有显著影响,且料液比的影响极大。乙醇浓度和提取时间的影响作用较大。结果见图 2、图 3 和图 4,各因素两两交互作用的 3D 响应面图曲线坡度陡峭程度

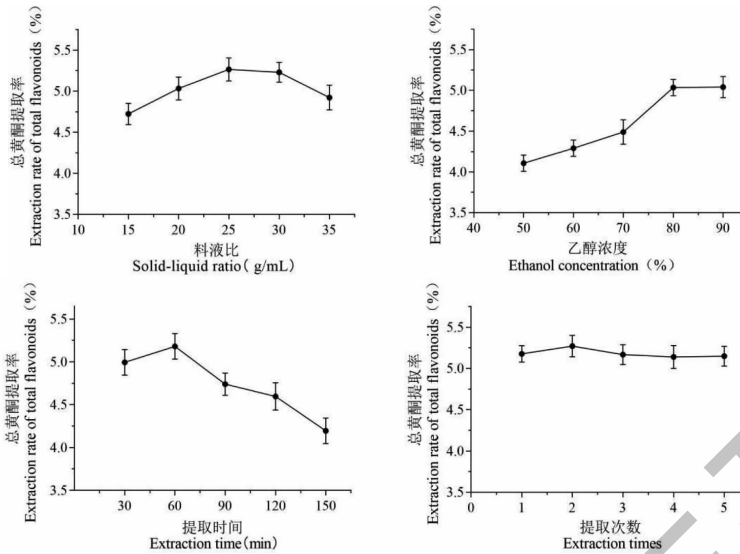


图1 不同因素对 TFCTLL 提取率的影响

Fig. 1 Effect of different factors on the extraction rate of TFCTLL

上得到了验证,料液比的曲面最为陡峭;另外乙醇浓度和提取时间、料液比和提取时间均有一定的交互作用,而料液比和乙醇浓度的等高线为椭圆形,3D响应面几乎无曲度,说明二者几乎无较大的交互作用。由此可知各因素对 TFCTLL 提取率的影响大小为料液比 > 乙醇浓度 > 提取时间。

根据响应面分析得到最优提取条件为:料液比

1:26.852,乙醇浓度 80.776%,提取时间 65.175 min,此条件下 TFCTLL 的提取率理论值可达 4.907%。考虑到实际可操作性,对最佳提取条件优化为料液比 1:27,乙醇浓度 80%,提取时间 65 min,得到实际提取率为 4.921%,与理论值差 0.014%,说明此模型预测较好且稳定,可用于 TFCTLL 的提取。

表2 方差分析结果

Table 2 The results of variance analysis

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	2.760 0	9	0.306 2	66.87	<0.000 1
A	0.167 9	1	0.167 9	36.66	0.000 5
B	0.029 7	1	0.029 7	6.50	0.038 2
C	0.027 7	1	0.027 7	6.04	0.043 6
AB	0.023 9	1	0.023 9	5.23	0.056 1
AC	0.027 6	1	0.027 6	6.03	0.043 8
BC	0.006 4	1	0.006 4	1.39	0.277 0
A <sup>2</sup>	0.838 6	1	0.838 6	183.13	<0.000 1
B <sup>2</sup>	1.200 0	1	1.200 0	260.96	<0.000 1
C <sup>2</sup>	0.211 0	1	0.211 0	46.07	0.000 3
残差 Residual	0.032 1	7	0.004 6		
失拟项 Lack of fit	0.020 3	3	0.006 8	2.31	0.218 5
纯误差 Pure error	0.011 7	4	0.002 9		
总回归 Cor total	2.790 0	16			

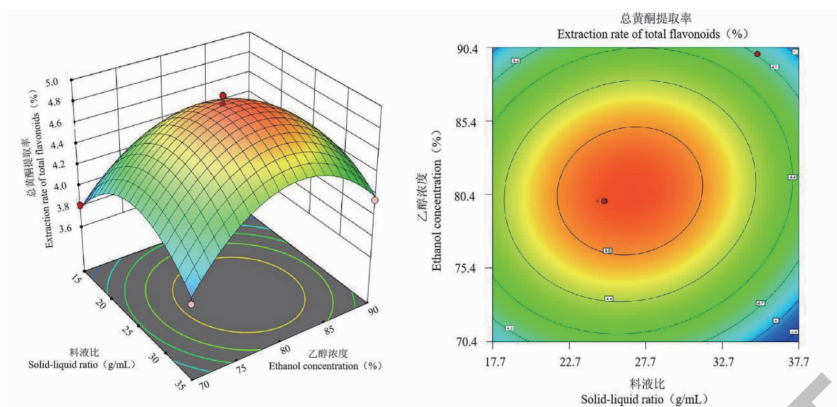


图 2 乙醇浓度和料液比对 TFCTLL 提取率影响的响应面图和等高线图  
 Fig. 2 Effect of ethanol concentration and solid-liquid ratio on the extraction of TFCTLL by response surface methodology and contour map

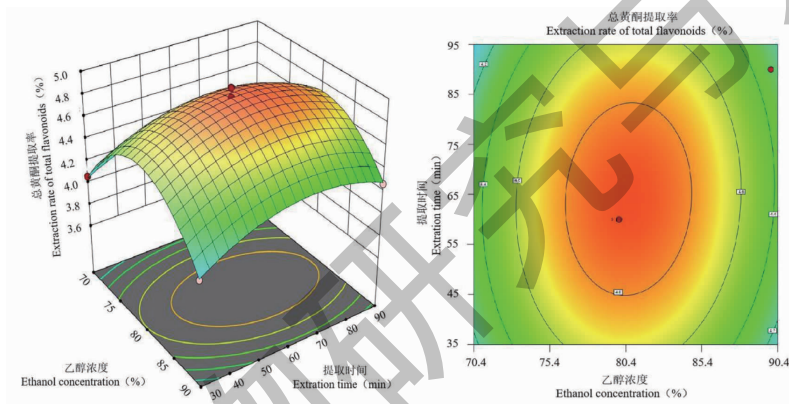


图 3 乙醇浓度和提取时间对 TFCTLL 提取率影响的响应面图和等高线图  
 Fig. 3 Effect of ethanol concentration and extraction time on the extraction of TFCTLL by response surface methodology and contour map

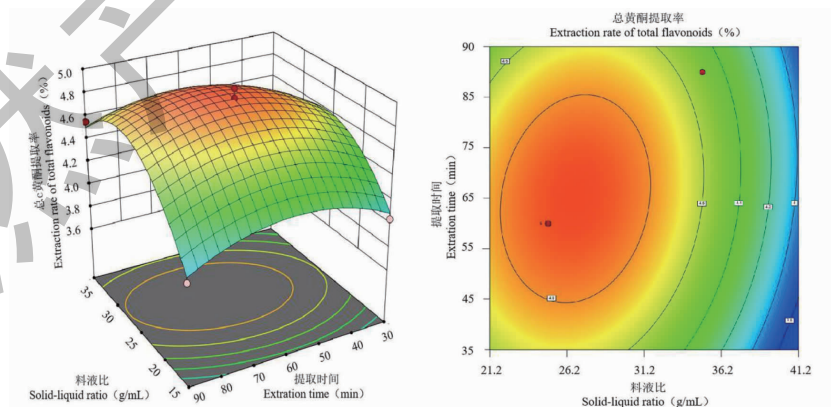


图 4 料液比和提取时间对 TFCTLL 提取率影响的响应面图和等高线图  
 Fig. 4 Effect of Solid-liquid ratio and extraction time on the extraction of TFCTLL by response surface methodology and contour map

### 2.3 总黄酮富集纯化

#### 2.3.1 不同大孔树脂的吸附率和解析率

试验结果见表 3,以总黄酮的吸附率及解吸率

为考察指标来筛选最佳树脂类型,结果显示 AB-8 大孔树脂吸附率及解吸率较高,故本实验选用此做为吸附树脂。

表3 吸附率及解析率结果

Table 3 Adsorption rate and desorption rate results

大孔树脂种类 Type of macroporous resin	吸附率 Adsorption rate (%)	解析率 Desorption rate (%)
HP-20	58.02	70.77
HPD-100	58.92	73.67
HPD-600	56.68	63.17
D-101	51.91	72.72
AB-8	62.74	75.18

### 2.3.2 不同 pH 红花叶提取液的吸附率

结果见图 5A, pH 为 7 时,大孔树脂对红花叶总黄酮的吸附率达到最大。在酸碱环境中,吸附率都较低,可能由于酸碱性的条件下红花叶提取液中成分发生变化。酸碱性也可能导致大孔树脂对 TFCTLL 的吸附性发生变化。从结果得出,在 pH 为 7

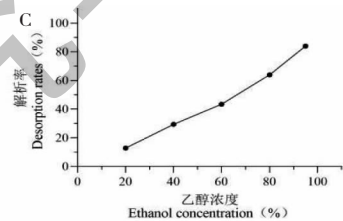
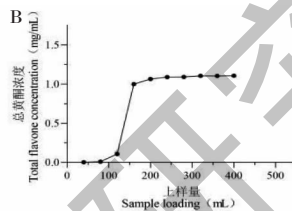
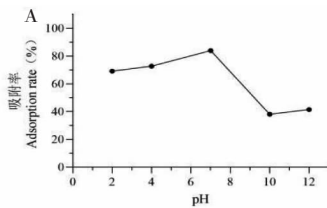


图5 TFCTLL 纯化工艺的考察结果

Fig. 5 Investigation results of TFCTLL purification process

### 2.3.5 纯化富集最优工艺

将提取最优工艺下的提取液减压浓缩至无醇味,并调节 pH 值为 7,吸附于预处理过的大孔树脂色谱柱 AB-8,用 95% 乙醇洗脱,收集 95% 洗脱液浓缩为干浸膏,采用“1.4.2”项下方法进行黄酮含量测定。结果显示经过 AB-8 大孔树脂富集纯化后得到的 TFCTLL 纯度达到 61.42%。

的条件下,大孔树脂对 TFCTLL 的吸附率最好,所以选择 pH = 7 的红花叶提取液进行大孔树脂的洗脱实验。

### 2.3.3 最大吸附量

结果见图 5B,上样提取液达到 120 mL 时,达到上样浓度的 10%,已经达到理论上的泄漏点,这时已经达到了大孔树脂的饱和和吸附量。对加入的红花叶提取液已经无法全部吸附,在上样液达到 160 mL 时,已经达到饱和点。超过 160 mL 之后红花叶提取液就开始泄露。

### 2.3.4 不同乙醇浓度的解吸率

结果见图 5C。从结果看出 95% 的乙醇浓度达到较高的解吸率,当乙醇浓度从 20% 乙醇浓度到 80% 乙醇浓度时,对 TFCTLL 的解吸率持续上升。当选择 95% 乙醇浓度时解析率最高,对 TFCTLL 的解吸效果最好,故此条件下进行洗脱实验。

## 2.4 成分鉴定

TFCTLL 成分表征的负离子模式的总离子流图见图 6,通过 PeakView 2.2 软件对化合物进行鉴定表征,经文献查阅及结构解析<sup>[14-16]</sup>,共推断出木犀草素、槲皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草苷、牡荆苷等 4 个成分见表 4。

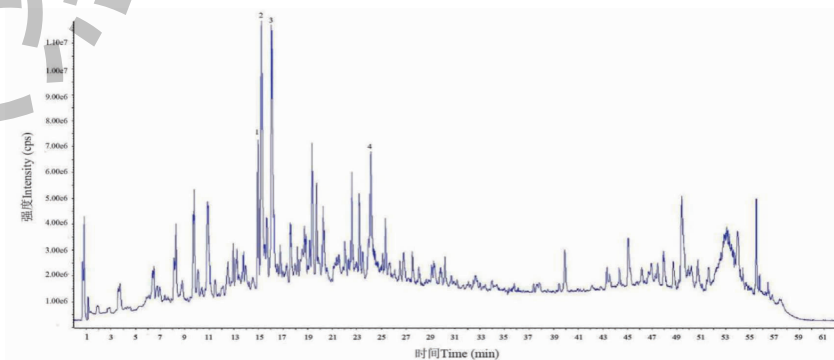


图6 TFCTLL 成分表征的负离子模式的总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatogram for the characterization of TFCTLL composition under negative ion mod

表4 TFCTLL 成分表征结果

Table 4 TFCTLL composition characterization results

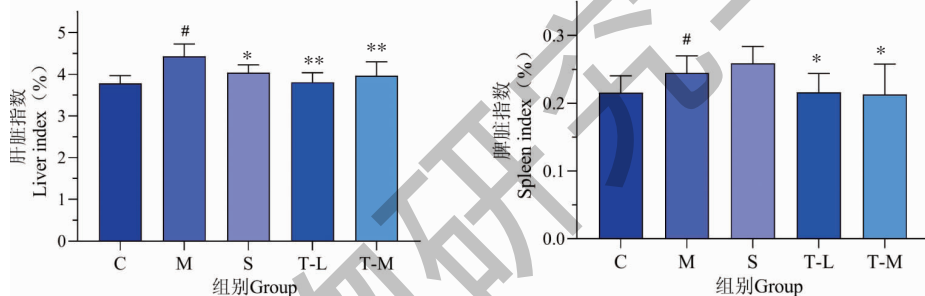
编号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	母离子 Parent ion ( $m/z$ )	保留时间 $t_R$ (min)
1	牡荆苷 Vitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432.38	14.98
2	槲皮素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 Quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.38	15.26
3	木犀草苷 Luteolin-7-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.38	16.03
4	木犀草素 Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	286.24	24.15

## 2.5 TFCTLL 抗小鼠急性肝损伤动物实验

### 2.5.1 TFCTLL 对急性肝损伤小鼠肝、脾脏器指数的影响

空白组小鼠毛色光滑,精神状态较好。与空白组相比,模型组小鼠精神萎靡不振,食欲下降,体重明显减轻,其余给药组小鼠毛色、精神状态和摄食等

明显优于模型组。结果见图7,与空白组相比,模型组小鼠的肝脏、脾脏器指数升高具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比,水飞蓟素药组肝脏指数显著降低 ( $P < 0.05$ ),T-L、T-M 肝、脾脏器指数在不同程度上降低 ( $P < 0.05$ )。

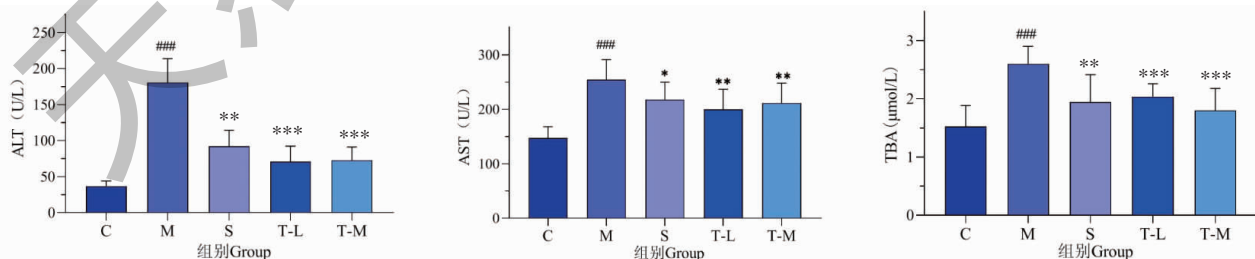
图7 TFCTLL 对急性肝损伤小鼠肝、脾脏器指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Fig. 7 Effect of TFCTLL on the index of liver and spleen in mice with acute liver injury ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

注:与C组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与M组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。Note:Compared with C group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;Compared with M group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

### 2.5.2 TFCTLL 对急性肝损伤小鼠血清生化指标的影响

小鼠血清生化指标结果见图8,与空白相比,模型组小鼠 ALT、AST、TBA 水平显著升高 ( $P <$

0.001)。说明模型组小鼠出现肝功能损伤。与模型组相比,水飞蓟素和 TFCTLL 低、中剂量组小鼠的 ALT、AST、TBA 均显著降低 ( $P < 0.05$ ),表明 TFCTLL 可以较好改善急性肝损伤小鼠的肝功能。

图8 TFCTLL 对急性肝损伤小鼠血清生化指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Fig. 8 Effect of TFCTLL on serum biochemical indexes in mice with acute liver injury ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

注:与C组相比,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与M组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。Note:Compared with C group,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;Compared with M group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .



### 2.5.3 TFCTLL 对急性肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

HE 染色结果见图 9,空白组小鼠肝组织结构正常,肝细胞无坏死、排列整齐,大小均匀,以中央静脉为中心呈放射状排列,细胞核位于细胞中央,圆整、边界清晰,肝小叶结构完整;模型组小鼠肝细胞排列

紊乱,纤维结缔组织增生,汇管区炎性细胞及坏死细胞增多,出现大量的脂肪变性及肝细胞坏死,明显的炎症细胞浸润;水飞蓟素组和 TFCTLL 低、中剂量组小鼠肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润的现象较模型组显著改善。

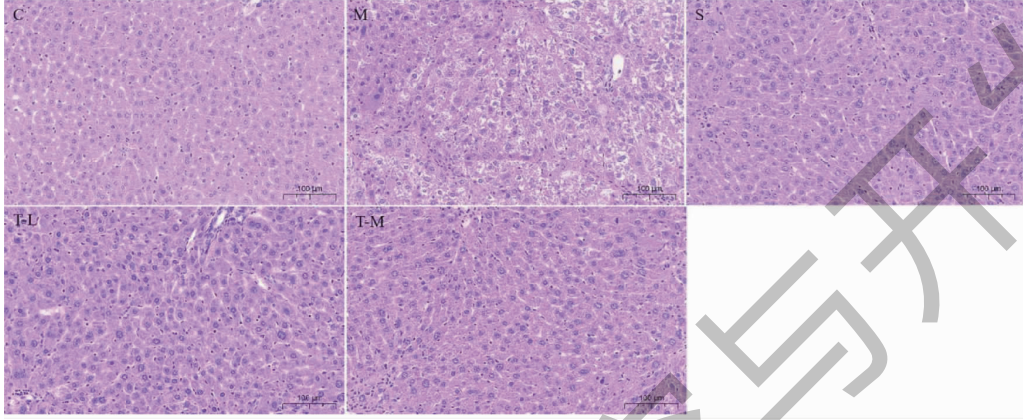


图 9 TFCTLL 对急性肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

Fig. 9 Effect of TFCTLL on the pathological changes of liver tissue in mice with acute liver injury

### 3 讨论与结论

本研究首次以红花废弃物红花叶为试验材料,采用加热回流法对红花叶总黄酮进行提取,在单因素试验基础上,设计 Box-Behnken 响应面试验,优化提取红花叶总黄酮的最佳提取工艺,确定料液比 1:27,乙醇浓度 80%,提取时间 65 min,得到实际提取率为 4.921%,与理论值差 0.014%,并且对单因素和响应面结果进行了统计学分析,发现二者并没有显著性差异  $P > 0.05$ 。说明此模型预测较好且稳定,可用红花叶中总黄酮的提取。由于经过最优提取工艺得到的是含有红花叶总黄酮的粗提物,且提取率较低,因此需要对粗提物进一步地富集纯化,以便后续的活性研究。

大孔树脂近年来普遍运用于天然产物的分离纯化中,特别是黄酮类成分的富集,因其纯化工艺具有操作简单、无污染、能耗小且分离效果好等特点,在黄酮类化合物的纯化研究中得到广泛使用<sup>[9]</sup>。大多黄酮类化合物呈弱极性,故弱极性和非极性的树脂对黄酮类化合物的纯化效果较好。Hou 等<sup>[17]</sup>研究大孔吸附树脂富集纯化玳玳花总黄酮,通过静态吸附实验考察 NKA-9、HPD100、HPD400、HPD600、AB-8、D101、X-5、DM301 大孔吸附树脂对总黄酮的吸附、解吸能力,结果表明 AB-8 大孔吸附树脂吸附、解吸能力最佳。相关文献也报道了 HPD-100

型<sup>[10]</sup>、HPD-600 型树脂<sup>[11]</sup>、D101 型<sup>[12]</sup>和 HP-20 型<sup>[12]</sup>4 种大孔吸附树脂,在富集黄酮类成分中吸附和解吸能力较其他型号树脂具有明显的优势,故本试验选取 AB-8 型、HPD-100 型、HPD-600 型树脂、D101 型和 HP-20 型 5 种适合富集总黄酮的大孔吸附树脂用于纯化 TFCTLL。得出最优纯化工艺后,将提取最优工艺下的红花叶提取液吸附于预处理过的大孔树脂色谱柱 AB-8,用 95% 乙醇洗脱,其总黄酮纯度达到 61.42%,收集洗脱液浓缩为干浸膏。为后续的活性研究提供基础。

相关研究表明,红花茎醇提取物具有明显的抗  $\text{CCl}_4$  致急性肝损伤作用<sup>[3]</sup>,红花叶提取物是否也具有肝保护作用? 本研究共鉴定了 TFCTLL 中木犀草素、槲皮素-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、木犀草苷、牡荆苷等 4 个黄酮类化合物。相关研究结果证明<sup>[18-21]</sup>其具有特异性的抗炎、抗氧化和抗纤维化作用,可以降低血清 ALT、AST 活性、抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子水平、抑制抗氧化酶的活化和 NF- $\kappa$ B 通路激活,通过调节脂质代谢、抗氧化、抗炎、减少铁沉积、调控肿瘤细胞增殖、抗凋亡、促进自噬等多种途径减轻对肝脏的损伤,常被用于治疗急性肝损伤等相关的疾病。

急性肝损伤<sup>[22-24]</sup>是一种在短期内因各种原因而引起的肝功能突发异常疾病,其临床预后较差,如果不加以积极干预和治疗,可能会进一步发展为肝

硬化与肝癌,威胁人体生命健康。造成肝损伤的因素多种多样,其中包括化学性肝损伤、细菌和病毒引起的生物性肝损伤。 $\text{CCl}_4$  是实验动物研究中诱导化学性肝损伤最常用的肝毒素<sup>[24]</sup>,一次给药  $\text{CCl}_4$  便可制备肝细胞损伤型的 ALI。可造成肝细胞结构和功能受损,导致胞内 ALT 和 AST 溢出进入血液,导致血液中 ALT 和 AST 活性升高,其升高水平与肝损伤程度呈正相关,因此 ALT 和 AST 活性常作为评价肝损伤程度的指标。本研究动物实验结果表明,腹腔注射  $\text{CCl}_4$  后,血清中 ALT、AST 和 TBA 活性显著升高,并且发生肝组织病变,表明成功建立  $\text{CCl}_4$  诱导的急性肝损伤小鼠模型。经 TFCTLL 干预后,小鼠血清中 ALT、AST 和 TBA 活性显著降低,肝组织病变程度减轻,表明 TFCTLL 对  $\text{CCl}_4$  诱导的急性肝损伤小鼠具有保护作用。

本研究从红花药材资源的角度出发,将中药传统非药用部位等废弃物及副产物转化研制成资源性药物,对红花药材充分利用,并对其红花叶进行了保肝作用的探索性研究。结果表明提取纯化后得到的 TFCTLL 对急性肝损伤小鼠具有作用。本研究可为 TFCTLL 的后续开发利用提供参考,也对红花资源的高值化利用具有重要意义。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典;第一部)[M]. Beijing: China Media Science Press, 2020:240.
- 2 Ran CY, Wu XY, Tang XH, et al. Safflower's origin and changes of producing areas[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42: 2219-2222.
- 3 Han XJ, Shuang R, Bai MR, et al. Study on the mechanism of hepatoprotective effect of safflower alcohol extract[J]. Inner Mongolia J Tradit Chin(内蒙古中医药), 2014, 4: 101-102.
- 4 Ma MX, Wu SJ, Li G, et al. Simultaneous determination of four flavonoids in *Carthamus tinctorius* of different varieties by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2019, 41: 2694-2700.
- 5 Zhang DB, Song ZX, Tang ZS, et al. A new alkaloid isolated from leaves of *Carthamus tinctorius*[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2019, 50: 22-24.
- 6 Le SJ, Tang YP, Wang LY, et al. Separation and evaluation of antioxidant constituents from *Carthamus tinctorius*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39: 3295-3300.
- 7 Fan L, Zhao HY, Pu R, et al. Study on flavonoids in the flower of *Carthamus tinctorius* L[J]. Chin Pharm J(中国药学杂

- 志), 2011, 46: 333-337.
- 8 Tang WW, Chen H. Optimization of extraction process of total flavonoids from stems and leaves of *Codonopsis pilosula* and the evaluation of their antioxidation activities[J]. Jiangsu Agric Sci(江苏农业科学), 2021, 49: 171-177.
- 9 Liu YJ, Sun SM, Wang XM, et al. Study on separation of flavone from Nanguo pear with AB-8 macroporous resin[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2008: 68-70.
- 10 Li P, Peng XJ, Yang XJ, et al. Progress in the application of macroporous adsorption resin in the purification process of the TCM[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2010, 6: 117-120.
- 11 Li YC, Me XJ, Li XH, et al. Purification process of total flavonoids from blueberry leaves with macroporous resins[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵专业), 2008, 1: 133-137.
- 12 Sun KF, Chen YR, Xu WF, et al. Optimization of separation and purification of total flavonoids from *Graminosa rubra* by macroporous adsorption resin[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2022, 44: 2619-2623.
- 13 Shi GF, Wang HY, Chen YF, et al. Purification of total flavonoids from stevia rebaudiana waste[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2013, 25: 104-109.
- 14 Chen XB. Studies on the chemistry efficacy and pharmacology of stems and leaves of safflower without thorns[D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine(云南中医药大学), 2008.
- 15 Han W, Yang YL, Kang TG. Determination of luteolin-7-O-glucoside and Luteolin in overground portion of *Carthamus tinctorius* L. by HPLC[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28: 1315-1317.
- 16 Yi LN, JING J, Te RGL, et al. Determination the content of three kinds of chemical composition in safflower stem leaf of *Carthamus tinctorius* L by HPLC[J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2017, 17: 111-112.
- 17 Hou MY, Hu WB, Xiu ZL, et al. Enrichment and purification of total flavonoids in *Citrus aurantium* flowers by macroporous adsorption resin[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2021, 43: 16-21.
- 18 Yang XM, Zhang KY, Wang Y, et al. Study on protective effect of luteolin on rats with severe acute pancreatitis-related acute liver injury by reducing CYP2E1 expressions[J]. New Chin Med(新中医), 2020, 52: 4-7.
- 19 Hu J, Wang H, Pan C, et al. Isoviteixin alleviates liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine by activating Nrf2 and inhibiting NF- $\kappa$ B activation[J]. Microb Pathogenesis, 2018, 119: 86-92.