

凌霄花总三萜的超声辅助提取工艺优化

叶晓萌 王保国 张春燕 张熙雅 张静 刘玉凤

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 目的 优化凌霄花总三萜类化合物的超声辅助提取工艺。方法 以总三萜提取率为评价指标,考察料液比、乙醇浓度、超声时间、超声功率等因素对提取率的影响,采用单因素试验和正交试验优化提取工艺。结果 凌霄花总三萜的最佳提取工艺为:料液比 1/40($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),乙醇浓度 60%,超声时间 40min,超声功率 100W。该条件下,凌霄花总三萜平均提取率为 4.11%。结论 本研究优化了凌霄花总三萜的超声辅助提取工艺,该工艺稳定,提取效率较高,适合该药材三萜类化学成分提取。

关键词 凌霄花;单因素试验;正交试验;总三萜;超声辅助提取

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2024)10-373-04

Optimization of ultrasonic-assisted extraction process of total triterpenoid from campsis flos

YE Xiaomeng, WANG Baoguo, ZHANG Chunyan, ZHANG Xiya, ZHANG Jing, LIU Yufeng

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To optimize the ultrasonic-assisted extraction process of total triterpenoid from Campsis Flos. **Methods** The effects of the material-liquid ratio, ethanol concentration, ultrasonic time and ultrasonic power were investigated on the extraction rate of total triterpenoid. The extraction process was optimized by single factor experiments and orthogonal experiments. **Results** The optimum extraction conditions were as follows: the material-liquid ratio was 1/40 ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), the ethanol concentration was 60%, the ultrasonic time was 40 min and the ultrasonic power was 100W. Under these conditions, the average extraction rate of total triterpenoid from Campsis Flos was 4.11%. **Conclusion** This study optimized the ultrasound-assisted extraction process for total triterpene from Campsis grandiflora. The optimized ultrasonic-assisted extraction process was stable and suitable for the extraction of triterpenoid from Campsis Flos.

Keywords: Campsis Flos; Single factor experiments; Orthogonal experiments; Total triterpenoid; Ultrasonic-assisted extraction

凌霄花为紫葳科植物凌霄 *Campsis grandiflora* (Thunb.) K. Schum. 或美洲凌霄 *Campsis radicans* (L.) Seem. 的干燥花,味甘、酸,性寒,有活血通经,凉血祛风的功效,用于治疗月经不调、经闭癥瘕、产后乳肿、风疹发红、皮肤瘙痒、痤疮等病症^[1]。凌霄花含有多种类型的化学成分,如三萜

类^[2-3]、环烯醚萜类^[4]、黄酮类^[5]、环己乙醇类^[6-7]、甾体类^[8]等。凌霄花提取物及单体成分具有改善血液循环、抑制血栓形成^[5,9]、抗炎^[10]、抗氧化^[10-11]、减轻脑缺血再灌注损伤^[12-14]、抗生育^[5]、抗抑郁^[11]、胰岛素增敏活性^[15]、抑制 1 型群体感应^[16]等药理作用。目前,针对凌霄花三萜的研究主要集中在单体的分离与分析上^[3,17],关于总三萜提取工艺的报道较少。本文利用紫外-可见分光光度法测定总三萜的含量,采用单因素试验和正交试验优选凌霄花总三萜的超声辅助提取工艺,为凌霄花的开发利用奠定了一定的研究基础。

[基金项目] 济宁医学院大学生创新训练计划项目 (cx2021119, cx2019048)

[通信作者] 刘玉凤, E-mail: lyf19790408@163.com

王保国, E-mail: bjr20081001@163.com

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料与试剂

凌霄花(长春市方一堂经贸有限公司,产地江苏,干燥,粉碎,过 14 目筛,备用),齐墩果酸对照品(上海吉至生化科技有限公司,HPLC $\geq 98\%$),无水乙醇(分析纯,北京高纯科技有限公司),冰醋酸、乙酸乙酯(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司),高氯酸(分析纯,天津政成化学制品有限公司)、香草醛(分析纯,合肥千盛生物科技有限公司)。

1.2 仪器

DE-100g 万能高速粉碎机(浙江红景天工贸有限公司)、S2 Pipette 单道可调移液器(国药集团化学试剂有限公司)、BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、SB25-12DTD 超声波清洗仪(宁波新艺超声波设备有限公司)、EVELA N-1300 旋转蒸发器(东京理化器械株式会社)、HWSY11-K 数显电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司)、SHZ-D(Ⅲ)循环水式多用真空泵(上海贝仑仪器设备有限公司)、UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法与结果

2.1 凌霄花总三萜的含量测定

2.1.1 齐墩果酸对照品溶液的配制 精密称取齐墩果酸对照品 0.0050g,用无水乙醇溶解,配制成浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。

2.1.2 吸收波长的确定 于 10mL 比色管中,加入上述对照品溶液 200 μL ,置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中蒸干,再加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 200 μL ,高氯酸溶液 800 μL ,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 15min,冰水浴 5min,最后加入乙酸乙酯 4mL,在 400~800nm 波长范围内扫描,并用不加对照品的溶液为空白对照,确定齐墩果酸的检测波长为 560nm。

2.1.3 标准曲线的绘制 用移液器分别吸取对照品溶液 100、150、200、250、300、350、400、450 μL ,置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中蒸干,再加 5% 香草醛-冰醋酸溶液 200 μL ,高氯酸溶液 800 μL ,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 15min,冰水浴 5min,最后加乙酸乙酯 4mL,在 560nm 处测定吸光度,以对照品浓度 x ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标,以吸光度 y 为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $y = 0.0569x - 0.0567$ ($R^2 = 0.9997$),表明

齐墩果酸在 4~18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内呈良好的线性关系。

2.1.4 供试品溶液制备及含量测定 精密称取粉碎后的凌霄花粗粉 2.0000g,根据实验条件,按规定的乙醇浓度、料液比、超声时间与超声功率进行提取,提取液经抽滤、减压浓缩后,浓缩液用无水乙醇定容于 50mL 容量瓶中,备用。

用移液器吸取凌霄花供试品溶液 50 μL ,按 2.1.3 项下方法测定吸光度,代入回归方程,计算总三萜的质量浓度。按公式 $W(\%) = 5 \times c \times D \times 10^{-4} / M$ 计算凌霄花中总三萜的提取率。其中, W 为提取率(%), c 为总三萜的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), D 为溶液的稀释倍数, M 为提取的凌霄花粗粉的重量(g)。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比的影响 精密称取凌霄花粗粉 2.0000g 5 份,分别按照料液比 1/10、1/20、1/30、1/40、1/50,乙醇浓度 60%,超声时间 40min,超声功率 125W,按 2.1.4 项下方法制备供试液,测定吸光度并计算凌霄花总三萜提取率,见图 1。凌霄花总三萜提取率随料液比的增大先上升后下降,在料液比为 1/30 时,达到最大值 3.08%。因此,确定最佳提取料液比为 1/30。

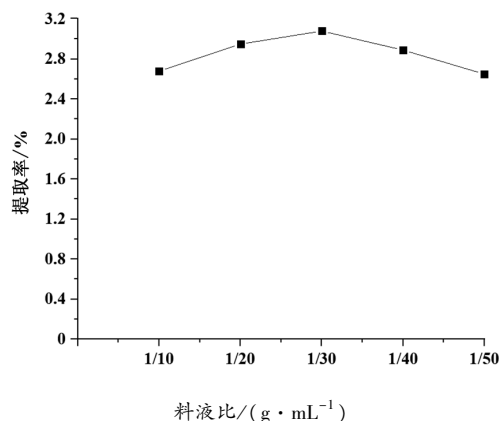


图 1 凌霄花总三萜提取率与料液比的关系

2.2.2 乙醇浓度的影响 精密称取凌霄花粗粉 2.0000g 5 份,分别按照乙醇浓度 20%、40%、60%、80%、100%,料液比 1/30,超声时间 40min,超声功率 125W,按 2.1.4 项下方法制备供试液,测定吸光度并计算凌霄花总三萜提取率。随着乙醇浓度的升高,凌霄花总三萜提取率先上升后下降,并且在乙醇浓度为 60% 时,达到最大值 3.05%。而乙醇浓度超过 80% 时,提取率显著下降,说明凌霄花三萜类

成分在高浓度乙醇中溶解度降低。因此,确定凌霄花中总三萜最佳提取乙醇浓度为 60%。见图 2。

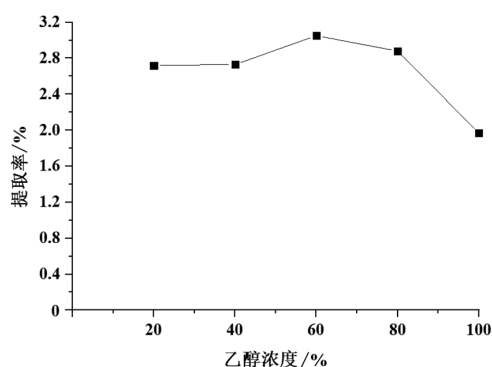


图 2 凌霄花总三萜提取率与乙醇浓度的关系

2.2.3 超声时间的影响 精密称取凌霄花粗粉 2.0000g 5 份,按照超声时间 20、30、40、50、60min,料液比 1/30,乙醇浓度 60%,超声功率 125W,按 2.1.4 项下方法制备供试液,测定吸光度并计算凌霄花总三萜提取率,见图 3,凌霄花总三萜提取率随着超声时间的延长先上升后下降,超声时间为 50min 时,达到最大值 2.69%。随着时间的延长,可能其它杂质成分的溶出增加,与三萜成分产生了吸附或反应,导致提取率降低^[18],因此确定凌霄花中总三萜最佳提取时长为 50min。

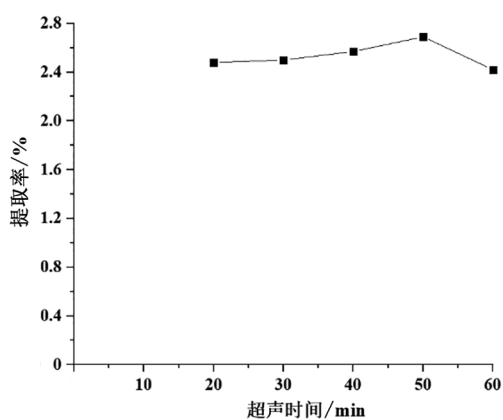


图 3 凌霄花总三萜提取率与超声时间的关系

2.2.4 超声功率的影响 精密称取凌霄花粗粉 2.0000g 5 份,按照超声功率 75、100、125、150、175W,料液比 1/30,乙醇浓度 60%,超声时间 50min,按 2.1.4 项下方法制备供试液,测定吸光度并计算凌霄花总三萜提取率。凌霄花中总三萜提取率随着超声功率的升高先上升后下降,当超声功率为 100W 时。达到最大值 3.13%。因此确定凌

霄花中总三萜最佳超声功率为 100W。见图 4。

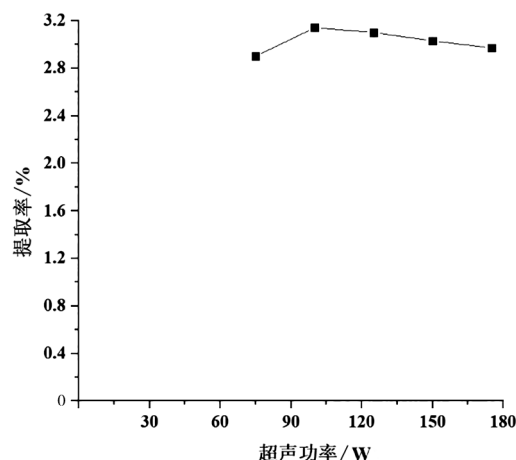


图 4 凌霄花总三萜提取率与超声功率的关系

2.3 正交试验设计

根据上述单因素试验结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,按 2.1.4 项下方法制备供试液,测定吸光度并计算凌霄花总三萜提取率。因素水平表见表 1,正交试验结果见表 2。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	A 料液比	B 乙醇浓度/%	C 超声时间/min	D 超声功率/W
1	1/20	50	40	75
2	1/30	60	50	100
3	1/40	70	60	125

表 2 正交试验结果

试验号	因素				提取率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.73
2	1	2	3	2	3.25
3	1	3	2	3	2.39
4	2	1	3	3	2.81
5	2	2	2	1	2.76
6	2	3	1	2	3.24
7	3	1	2	2	3.32
8	3	2	1	3	3.24
9	3	3	3	1	2.73
k1	2.79	2.95	3.07	2.74	
k2	2.94	3.08	2.82	3.27	
k3	3.10	2.79	2.93	2.81	
R	0.31	0.29	0.25	0.53	

由极差 R 可知 4 个实验因素对凌霄花中三萜

提取率的影响强弱顺序为 D(超声功率)>A(料液比)>B(乙醇浓度)>C(超声时间)。由 k 值可知,凌霄花中三萜类化合物提取的最佳条件为 A₃B₂C₁D₂,即料液比为 1/40,乙醇浓度为 60%,超声时间为 40min,超声功率为 100W。

2.4 方法适应性考察

2.4.1 精密度试验 用移液器精密吸取 400 μ L 齐墩果酸对照品溶液 6 份,按 2.1.3 项下方法测定吸光度并计算 RSD 值为 1.65%,证明本方法具有良好的精密度。

2.4.2 稳定性试验 用移液器精密吸取 400 μ L 齐墩果酸对照品溶液 1 份,按 2.1.3 项下方法测定吸光度,每间隔 10min 测定一次,计算 100min 内 RSD 值为 1.14%,证明本方法在 100min 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批次的凌霄花粗粉 2.0000g 6 份,按最佳工艺条件提取,按 2.1.3 项下方法测定吸光度并计算 RSD 值为 2.74%。

2.4.4 加样回收率试验 用移液器精密吸取凌霄花供试品溶液 5 份,每份 30 μ L,分别加入齐墩果酸标准品溶液 100 μ L,按 2.1.3 项下方法测定其吸光度并计算回收率。得回收率在 97.03%~102.19%,平均回收率为 99.20%,RSD=1.88%。

2.4.5 最佳工艺验证 精密称取凌霄花粗粉 2.0000g 3 份,分别按照 A₃B₂C₁D₂ 条件进行超声辅助提取,按 2.1.4 项下方法测定吸光度并计算凌霄花总三萜提取率,分别为 4.14%、4.10%、4.09%,平均提取率为 4.11%,说明所选条件为最佳的工艺条件。

3 结论

本文通过单因素试验和正交试验优化,得到凌霄花总三萜的最佳提取工艺为:以 40 倍量的 60% 乙醇为溶剂,100W 功率超声提取 40min。经过实验验证,在最佳工艺条件下,凌霄花中总三萜平均提取率可达 4.11%,该工艺稳定,提取效率高,适合凌霄花三萜类化学成分的提取。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:299.
- [2] 李融,韩海燕,孙群,等. UHPLC-Q-TOF/MS 分析美洲凌霄花

与秋鼠曲草的化学成分[J]. 中国民族医药杂志,2018,24(6):44-47. DOI:10.3969/j.issn.1006-6810.2018.06.033.

- [3] 韩海燕. 美洲凌霄花化学成分研究[D]. 苏州:苏州大学,2013.
- [4] Han XH, Oh JH, Hong SS, et al. Novel iridoids from the flowers of *Campsis grandiflora*[J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(2):327-332. DOI:10.1007/s12272-012-0213-9.
- [5] 金晓琴,沈建飞,盛一梁,等. 凌霄花化学及临床应用研究进展[J]. 中国处方药, 2021, 19(2):18-20. DOI:10.3969/j.issn.1671-945X.2021.02.009.
- [6] Kim DH, Oh YJ, Han KM, et al. Development of biologically active compounds from edible plant sources XIV. Cyclohexylethanoids from the flower of *campsis grandiflora* K. Schum[J]. Agric Chem Biotechnol, 2005, 48(1):35-37.
- [7] Kim DH, Han KM, Bang MH, et al. Cyclohexylethanoids from the flower of *campsis grandiflora*[J]. Bull Korean Chem Soc, 2007, 28(10):1851-1853.
- [8] Park MH, Kim JH, Chung YH, et al. Bakuchiol sensitizes cancer cells to TRAIL through ROS- and JNK-mediated upregulation of death receptors and downregulation of survival proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(2):586-592. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.03.127.
- [9] Oku H, Iwaoka E, Shinga M, et al. Effect of the dried flowers of *campsis grandiflora* on stagnant blood syndrome[J]. Nat Prod Commun, 2019, 14(9):1-5. DOI:10.1177/1934578X19873445.
- [10] Cui XY, Kim JH, Zhao X, et al. Antioxidative and acute anti-inflammatory effects of *Campsis grandiflora* flower[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103(2):223-228. DOI:10.1016/j.jep.2005.08.007.
- [11] Yu HC, Wu J, Zhang HX, et al. Antidepressant like and antioxidative efficacy of *Campsis grandiflora* flower[J]. J Pharm Pharmacol, 2016, 67(12):1705-1715. DOI:10.1111/jphp.12466.
- [12] 方晓艳,吴宿慧,王琳琳,等. 凌霄花总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16):109-113. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.2016160109.
- [13] 方晓艳,栗俞程,刘丹丹,等. 凌霄花总黄酮对脑缺血大鼠脑组织中炎症因子及趋化因子的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9):3481-3483.
- [14] 方晓艳,左艇,王灿,等. 凌霄花总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B/iNOS-COX-2 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(8):3321-3324.
- [15] Jung SH, Ha YJ, Shim EK, et al. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator[J]. Biochem J, 2007, 403(2):243-250. DOI:10.1042/BJ20061123.
- [16] Zhang JM, Xu FH, Yao LL, et al. Ethanol extract of *campsis grandiflora* flower and its organic acid components have inhibitory effects on autoinducer type 1 quorum sensing[J]. Molecules, 2020, 25(20):4727-4741. DOI:10.3390/molecules25204727.
- [17] 李洁,杨玉兰,任爱农,等. 凌霄花 HPLC-ELSD 指纹图谱的研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4):632-638. DOI:10.16155/j.0254-1793.2016.04.12.
- [18] 邹思,易骏,吴岩斌,等. 虎奶菇菌核总三萜提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 海峡药学, 2020, 32(1):25-29.

(收稿日期 2023-03-28)

(本文编辑:石俊强)