

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.04.005

连翘花中齐墩果酸超声提取工艺的研究

李艳芝 王建安 付英杰 韩 伟

(济宁医学院药学院, 山东 日照 276826)

摘 要 **目的** 研究连翘花中齐墩果酸的最佳超声提取工艺。**方法** 本研究采用正交试验设计,分别考察了提取时间、乙醇浓度、溶剂用量、提取次数对连翘花中齐墩果酸提取率的影响。**结果** 影响连翘花中齐墩果酸超声提取率的主次因素依次为:乙醇浓度>提取次数>溶剂用量>提取时间,其中提取次数和乙醇浓度有显著影响,最佳超声提取工艺条件为:用12倍量的85%乙醇,超声提取3次,每次60 min。**结论** 超声波法是提取连翘花中齐墩果酸的一种有效方法,简便可行,可应用于连翘花的资源开发。

关键词 连翘花;齐墩果酸;超声提取;正交试验

中图分类号:R284.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2012)08-248-03

Studies on the process for extracting oleanic acid by ultrasound from forsythia suspensa flowers

LI Yan-zhi, WANG Jian-an, FU Ying-jie, et al

(College of Pharmaceutical Science, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To optimize the ultrasonic extraction process of oleanic acid from Forsythia Suspensa flowers. **Methods** The ultrasonic extraction conditions for extracting the oleanic acid of Forsythia Suspensa flowers were studied by the orthogonal design and the effects of extraction time, ethanol concentration, solvent consumption and extraction times on oleanic acid yield were examined. **Results** Ultrasonic extraction times and ethanol concentration had the most significant effect. The factors affecting oleanic acid yield was in the order of ethanol concentration, ultrasonic extraction times, solvent consumption, extraction time and the best ultrasonic extraction process was to extract 3 times with twelve times of 85% ethanol for 60 minutes each time. **Conclusion** The extraction process is simple with good extract result.

Key words: Flowers of Forsythia Suspensa; Oleanic acid; Ultrasonic extraction; Orthogonal test

连翘(*Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl)为木犀科连翘属落叶灌木,在我国分布很广,主产于山西、陕西、山东、河南等地,除华南地区外,其他各地均有栽培。连翘传统入药部位为果实,为常用中药连翘,始载于《神农本草经》,具有清热解毒、散结消肿、保肝护心等功效,主治温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬、小便淋闭等症^[1]。现代研究表明,连翘主要含有木脂素类化合物、黄酮类化合物、三萜类化合物等^[2],具有抗菌、抗氧化、降血脂等多种药理作用^[3]。其中五环三萜类化合物主要为齐墩果酸,具有较好的抗炎、镇静,强心,利尿,增强免疫力,降低谷丙转氨酶,促进肝细胞生长等作用^[4]。近年有关连翘和连翘叶有效成分和药理作用的研究较多,但对连翘花的研究很少。迄今为止,未见连翘花中

齐墩果酸提取工艺研究的报道。

连翘每年3~4月份开花,花期长、花量大,并存在大量脱落的现象,可将其收集起来加以利用。超声波提取因其独特的提取机制及优于常规法的提取效果在中药化学成分的提取中显示出明显的优势,与传统方法相比,它具有提取时间短、耗能低、效率高、不破坏有效成分等特点。为更好地开发利用连翘花资源,本研究采用正交试验法对连翘花中齐墩果酸超声提取工艺进行研究,为连翘花资源的开发利用提供参考依据。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有

限公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);KQ3200B 型超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);FW135 型中药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂与药品

连翘花采于济宁医学院日照校区本草园内,经济宁医学院中药学教研室鉴定为木犀科植物连翘(*Forsythia suspense*(Thunb). Vahl)的花,洗净,40℃烘干,粉碎过 40 目筛,备用;齐墩果酸标准品(中国药品生物制品检定所,批号 110709-200704);无水乙醇、甲醇、硫酸、冰醋酸、盐酸等均为国产分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 连翘花中齐墩果酸的提取

取新鲜连翘花,洗净,40℃烘干,粉碎过 40 目筛,备用。准确称取连翘花粉末 2.0 g,置于 250 ml 锥形瓶中,加入 2% 的活性炭脱色,按要求加入一定量的提取溶剂,浸泡 1 h,超声波提取一定时间,抽滤,减压回收溶剂,定容于 100 ml 容量瓶中,作为样品溶液。

2.2 连翘花中齐墩果酸含量的测定及提取率的计算

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取 105℃干燥至恒重的齐墩果酸对照品 4.60 mg,置于 10 ml 容量瓶中,加适量甲醇溶解,定容,摇匀,得 0.46 mg/ml 的齐墩果酸对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取“2.1”项中样品溶液 2 ml 于 25 ml 容量瓶中,甲醇定容,摇匀,为供试品溶液。

2.2.3 测定波长的确定 分别取对照品溶液和供试品溶液,按标准曲线的制备方法显色,于 400~800 nm 波长之间扫描,结果表明,两者均在 532 nm 波长处有最大吸收,与王立业等^[5]测定的结果一致,故选择 532 nm 为测定波长。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 0.0(空白对照)、0.1、0.4、0.8、1.2、1.6 ml 置于 10 ml 容量瓶中,加入 5 % 香草醛-冰醋酸溶液 0.5 ml,再加入 5 ml 60%硫酸,60℃水浴加热 20 min,取出后用冷水终止反应 10 min。以不加对照品的溶液作空白对照,在 532 nm 波长处测定吸光度,以齐墩果酸对照品浓度 C 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,得到标准曲线的回归方程: $A = 6.6575C$

+0.2925, $r = 0.9996$,表明齐墩果酸对照品在 0.0046~0.0736 mg/ml 范围内呈良好的线性关系。

2.2.5 样品含量测定 精密吸取“2.2.2”项中供试品溶液 1 ml,按 2.2.4 项下方法显色,在 532 nm 处测定吸光度,根据标准曲线回归方程计算各样品齐墩果酸浓度。

2.3 正交试验设计

为系统考察超声波提取连翘花中齐墩果酸的工艺参数,在单因素试验和已有文献的基础上,选用提取时间、乙醇浓度、溶剂用量、提取次数作为考察因素,以齐墩果酸提取率为参考指标进行正交试验,确定连翘花中齐墩果酸超声提取的最佳工艺参数,因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A 提取时间(min)	B 乙醇浓度	C 料液比	D 提取次数
1	30	60%	1:10	1
2	40	70%	1:12	2
3	60	85%	1:16	3

按表 2 所列各工艺制备样品,加乙醇后均浸泡 1 h 后超声提取,提取物定容至 100 ml 容量瓶中,在 532 nm 下测定其吸光度值,计算齐墩果酸含量。正交试验结果和直观分析见表 2,方差分析见表 3。由分析结果可知影响齐墩果酸提取率的主次因素依次为乙醇浓度>提取次数>溶剂用量>提取时间,其中提取次数和乙醇浓度有显著影响,最佳提取方案为 $A_3B_3C_2D_3$,即用 12 倍量的 85%乙醇,超声提取 3 次,每次 60 min,提取率为 3.9382%。

表 2 正交实验结果和直观分析

No	A	B	C	D	齐墩果酸提取率(%)
1	1	1	1	1	0.6806
2	1	2	2	2	2.3517
3	1	3	3	3	3.7505
4	2	1	2	3	2.4643
5	2	2	3	1	1.5533
6	2	3	1	2	3.1403
7	3	1	3	2	0.4129
8	3	2	1	3	3.2435
9	3	3	2	1	3.9382
K1	2.261	1.186	2.355	2.057	
K2	2.386	2.383	2.918	1.968	
K3	2.532	3.610	1.906	3.153	
R	0.271	2.424	1.012	1.185	

表3 方差分析数据表

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P
A	0.110	2	1.000	误差
B	8.812	2	80.109	<0.05
C	1.544	2	14.036	>0.05
D	2.611	2	23.736	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

2.4 验证实验

按照所得最佳提取方案我们进行了3批药材的提取,所得齐墩果酸提取率分别为4.4640%,4.4546%,4.4640%,平均含量为4.4608%,高于正交实验中最高的提取率3.9382%,RSD为0.12%。由此我们验证了提取方案 $A_3B_3C_2D_3$,即用12倍量的85%乙醇,超声提取3次,每次60min为连翘花中齐墩果酸的最佳超声提取工艺。

3 讨论

作为资源丰富的连翘花,花期长,花量大,研究表明连翘花中的有效成分含量高于传统入药部位果实^[3]。齐墩果酸是目前治疗肝炎较好的一种药物,对急性黄疸型肝炎和慢性病毒性肝炎疗效显著,且毒性低,副作用少,临床使用安全。超声波辅助提取作为一种现代提取方法,其所具有的空化效

应、机械效应及其他次级效应诸如热效应、扩散效应、击碎效应等使细胞破碎而加速有效成分溶出,加之具有省时、节能、提取率高等优点,使其在提取方面得到了广泛的应用。本研究通过正交试验确定了连翘花中齐墩果酸最佳超声波提取工艺,即用12倍量的85%乙醇,超声提取3次,每次60min,提取率为4.4608%,高于连翘的传统入药部位果实^[6]。此方法的确定不仅为合理开发和利用丰富的连翘花资源提供了重要的参考依据,而且为原料有限的齐墩果酸扩大了药源。

参考文献:

[1] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中药材, 2000,23(10):657-660.
[2] 李倩,冯卫生. 连翘的化学成分研究进展[J]. 河南中医学院学报,2005,20(117):78-80.
[3] 曹晓燕,王东浩,思培峰,等. 连翘不同部位连翘苷含量的比较[J]. 中成药,2009,31(4):642-644.
[4] 邓世星,孙志勇,周卿,等. 紫外光谱法测定齐墩果酸含量[J]. 遵义医学院学报,2003,26(6):556-557.
[5] 王立业,贾强,阎玺庆,等. 紫外分光光度法测定七叶莲中总皂苷的含量[J]. 中国药房,2008,19(15):1175-1177.
[6] 余淑娟,熊世权. 正交优选连翘中齐墩果酸的提取工艺[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):1117-1118.

(收稿日期 2012-04-11)

(上接第234页)

[12] Friedman S. Isolation and culture of hepatic nonparenchymal cells. In: Tyson C, Frazier J, editors. In Vitro Biological Systems. Vol. 1. San Diego, CA: Academic Press, 1993:292-310.
[13] Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients[J]. The Multivire Group Hepatology, 1999,30:1054-1058.
[14] Garba M, Pilcher C, Bingham A, et al. HIV antigens can induce TGFβ1-producing immunoregulatory CD8⁺ T cells[J]. J Immunol, 2002,168(5):2247-2254.
[15] Beld M, Penning M, Lukashov V, et al. Evidence that both

HIV and HIV-induced immunodeficiency enhance HCV replication among HCV seroconverters[J]. Virology, 1998, 244: 504-512.
[16] Qurishi N, Kreuzberg C, Luchters G, et al. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection[J]. Lancet, 2003, 362: 1708-1713.
[17] Bruno R, Galastri S, Sacchi P, et al. The HIV envelope protein GP120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis[J]. Gut, 2010, 59: 513-520.

(收稿日期 2012-06-28)

