

文章编号: 1000-5692(2007)02-0239-03

超声波与回流技术对枇杷叶中乌索酸的提取效果

李开泉, 周兰姜, 张影华

(宜春学院 化学与生物工程学院 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000)

摘要: 以枇杷 *Eriobotrya japonica* 叶为原料, 乙醇为介质, 研究超声波和回流 2 种提取方法对乌索酸的提取效果。用相同原料和相同介质, 采用超声波和回流 2 种方式进行提取, 再经滤过、定容、离心和微孔滤膜过滤后测定, 用外标法计算质量分数。建立了枇杷叶中乌索酸质量分数的高效液相色谱定量方法; 超声波提取的效率为热回流法的 2.63 倍。枇杷叶用超声波提取时, 对乌索酸的提取效率远优于热回流法。超声波具有独特的机械、空化和热效应, 能使介质分子的运动速度加大, 穿透力增强, 从而使有效成分充分溶出。图 3 表 2 参 7

关键词: 植物学; 枇杷叶; 超声波; 回流技术; 乌索酸; 提取效果

中图分类号: S718.4; R284.2 **文献标志码:** A

乌索酸(ursolic acid)系存在于许多天然植物中的三萜酸类化合物, 具有抗肝炎、抗肿瘤和抗菌等多种生物活性, 有着重要的医药开发价值^[1-3]。枇杷 *Eriobotrya japonica* 叶含有多种三萜酸类成分, 其中以乌索酸为最多^[4,5]。对于乌索酸的提取, 通常以乙醇为介质, 采用加热回流方式进行, 结果并不十分满意。鉴于超声波提取技术在中药制剂生产中的应用越来越广泛, 对枇杷叶中乌索酸采用超声波与热回流技术进行了提取效果的比较研究, 现报告其结果。

1 材料、试剂与仪器

材料采自赣西地区的宜春市, 经宜春学院周秀玲副教授鉴定为蔷薇科 Rosaceae 枇杷之干燥叶。乌索酸及齐墩果酸对照品为中国药品生物制品检定所提供。Waters 高效液相色谱仪(美国, 515 泵, 2996 光电二极管矩阵检测器); KS-150D 型超声清洗器, 功率 150 W, 频率 40 Hz (中国宁波科声仪器厂)。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Nova Pak C₁₈ 柱(3.9 mm×300 mm, 5 μm), 美国 Waters 公司, 检测波长 λ=210 nm, 柱温 25 °C, 流动相为甲醇:水(88:12, 体积比), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 用外标法定量分析。

2.2 标准曲线绘制

分别精确称取乌索酸对照品 11.4 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含乌索酸 1.14 g·L⁻¹ 的对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 2, 5, 8, 11, 14 μL 进样, 平行 3 次, 求其峰面积的平均值, 以峰面积和对照品的进样量作图, 得标准曲线。测得乌索酸线性回归方程为: $y = 5.99 \times 10^5 x - 1.09 \times 10^4$, $r = 0.9999$; 表明当乌索酸进样量在 2.28 ~ 15.96 μg 时, 线性关系良

收稿日期: 2006-05-24; 修回日期: 2006-11-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2002AA2Z3217)

作者简介: 李开泉, 研究员, 教授, 从事天然药物化学与新药研究。E-mail: lkq541024@sina.com

好, 理论塔板数大于 10 000。

2.3 精密度试验

以同一对照品溶液重复进样 5 次, 每次 10 μL , 分别测定峰面积。结果乌索酸峰面积变异系数为 0.31%, 表明仪器精密度良好。

2.4 重现性试验

精密称取干燥至恒量的同一批枇杷叶样品 5 份(每份 2.0 g), 用乙醇回流提取。提取液处理后进样。进样量为 15 μL , 测定峰面积。结果乌索酸峰面积为 1.82%, 表明样品处理方法重现性好。

2.5 加样回收率测定

精密称取已知乌索酸质量分数的枇杷叶 5 份, 每份 2.0 g, 加入乌索酸对照品适量。用乙醇为溶剂超声提取 1 h, 提取液经离心、0.45 μm 微孔滤膜过滤处理后进样, 进样量 15 μL , 用外标法计算乌索酸质量分数。结果得乌索酸的平均回收率为 99.6%, 乌索酸峰面积为 1.34%。

3 样品处理

3.1 超声波提取时间的确定

精密称取枇杷叶干粉 3 g, 置具塞三角烧瓶中, 加入体积分数为 95%乙醇 40 mL, 超声波提取^[6]。于 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h 取样, 分别过滤, 定量转移至 50 mL 容量瓶中, 用乙醇定容至刻度。摇匀后取滤液 2 mL 于离心机(3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)中离心 5 min, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得样品溶液, 进样 15 μL , 测定乌索酸峰面积, 用外标法计算其质量分数。结果见表 1。

结果显示, 超声波提取 1 h 后, 乌索酸质量分数基本不变, 故确定提取时间为 1 h。

3.2 处理方法及结果

回流法按优选的最佳工艺条件进行^[7]。精密称取枇杷叶 3 份, 每份 3 g, 置圆底烧瓶中, 加入体积分数为 95%乙醇 20 mL, 加热, 从沸腾起计时, 回流提取 1 h, 过滤, 残渣再用 20 mL 乙醇提取 1 h, 合并提取液浓缩到约 30 mL; 另取枇杷叶 3 份, 每份 3 g, 置具塞三角烧瓶中, 加入体积分数 95%乙醇 40 mL, 置超声波清洗池中提取 1 h, 过滤。将上述 2 种方法提得的提取液分别定量转移至 50 mL 容量瓶, 乙醇定容至刻度。摇匀后, 分别取滤液 2 mL 于离心机(3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)中离心处理 5 min, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得样品溶液。各进样 15 μL , 测定乌索酸峰面积, 用外标法计算质量分数(表 2)。图 1~3 为 HPLC 对 2 种方法提取物的分析典型谱图。

4 讨论

建立了枇杷叶中乌索酸质量分数的高效液相色谱定量分析方法, 利用二极管阵列检测器对乌索酸峰纯度进行了检测。样品经预处理后可直接进行 HPLC 分析, 乌索酸平均回收率为 99.6%, 变异系数为 1.3%($n=5$)。此方法操作简便, 结果准确, 线性范围宽, 重现性好, 适用于对含有乌索酸的天然植物进行检测及质量控制。

回流法提取的效率较差, 可能是乌索酸被结合并包裹于植物细胞壁内, 乙醇难于使之脱离溶解出来, 即便增加提取次数, 效果仍不理想。可采用纤维素酶进行预发酵处理后, 再回流可提高其得率。

实验结果表明, 枇杷叶采用超声波提取时, 对乌索酸的提取效果远优于回流法, 这是由于超声波

表 1 乌索酸质量分数测定结果

Table 1 Determination results of ursolic acid ($n=3$)

取样时间/min	乌索酸平均质量分数/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
30	5.63
60	8.18
90	8.20
120	8.22

表 2 枇杷叶中乌索酸的质量分数

Table 2 Content of ursolic acid in loquat leaf

方法	样号	乌索酸质量分数/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均质量分数/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	变异系数/%
回流提取	1	3.23	3.22	1.86
	2	3.28		
	3	3.16		
超声波提取	1	8.34	8.21	1.49
	2	8.10		
	3	8.18		

具有特殊的机械、空化及热效应, 加大了介质分子的运动速度, 从而增强介质的穿透力, 使有效成分得以充分溶出的缘故, 其提取效率为热回流法的 2.63 倍, 从而进一步证明超声波在天然药物有效成分提取中的优越性。

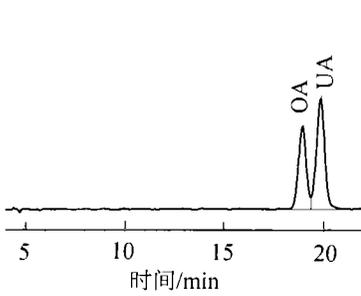


图 1 乌索酸(UA) + 齐墩果酸(OA) 对照品

Figure 1 Standard samples (UA, OA)

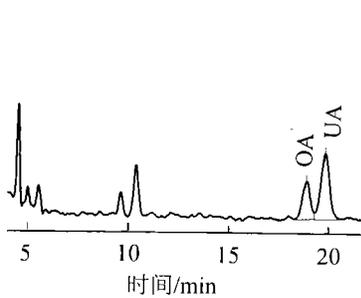


图 2 回流 2 次后超声波提取

Figure 2 Ultrasonic extraction behind reflux two times

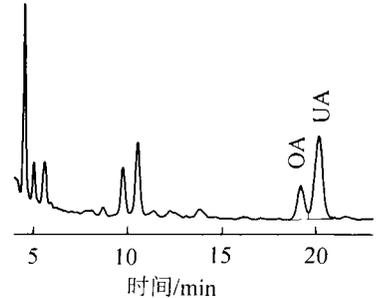


图 3 原药加乙醇超声提取

Figure 3 Ultrasonic extraction medicinal material with ethanol

参考文献:

- [1] 李开泉, 陈武, 熊筱娟. 乌索酸的化学、药理及临床应用[J]. 中成药, 2002, 24(9): 709-780.
- [2] 陈武, 李开泉, 熊筱娟, 陆英. 抗肝炎活性成分的研究[J]. 南昌大学学报, 2001, 25(2): 165-167, 178.
- [3] 陈武, 熊筱娟, 李开泉. 乌索酸治疗急性病毒性肝炎的临床研究[J]. 宜春医学, 2001, 13(1): 1-3.
- [4] 王远红, 吕志华, 姜廷福等. 梅花参中多糖提取工艺及含量测定的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(6): 987-990.
- [5] 丁彩梅, 曾荣华, 丘泰球, 等. 香椿叶黄酮类化合物超声强化提取研究[J]. 中成药, 2005, 27(12): 1370-1372.
- [6] 邹盛勤, 刘传安, 陈武. 枇杷叶及其药渣中乌索酸和齐墩果酸含量比较[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(8): 1437-1438.
- [7] 李开泉, 陈武, 熊筱娟, 陆英. 中乌索酸提取工艺的正交优选[J]. 中草药, 2003, 34(9): 791-792.

Ultrasonic and backflow technologies to extract ursolic acid from *Eriobotrya japonica* leaves

LI Kai-quan, ZHOU Lan-jiang, ZHANG Ying-hua

(Jiangxi Provincial Key Laboratory for Active Ingredients in Natural Medicines, Chemistry & Bioengineering School, Yichun College, Yichun 336000, Jiangxi, China)

Abstract: The conventional methods to extract ursolic acid is not satisfied. Ethyl alcohol with ultrasonic waves and backflow were used to extract ursolic acid from *Eriobotrya japonica* (loquat) leaves to determine the methods' effects. A single raw material source (*E. japonica* dry leaves) and medium (ethyl alcohol) were filtered, centrifuged, and filtered again with a micropore filter diaphragm; then, two different methods, ultrasonic waves and backflow, were used to extract ursolic acid which was quantified using high performance liquid chromatography (HPLC) with the external standard method. The extracting efficiency of ultrasonic waves was 2.63 times greater than hot backflow. The ultrasonic waves had unique mechanical, cavitating, and thermal reactions, which increased the speed and penetration of the medium molecules, thereby enabling greater extraction of the ursolic acid. [Ch, 3 fig, 2 tab, 7 ref.]

Key words: botany; *Eriobotrya japonica* (loquat) leaf; ultrasonic technology; backflow technology; ursolic acid; extract effect