

山楂中熊果酸与齐墩果酸提取和 纯化工艺的研究

李 钊, 王亚楠, 万梓龙, 张学文, 丛培江
(青岛大学生物系, 山东 青岛 266071)

摘 要: 采用 $L_9(3^4)$ 的正交试验设计, 采用乙醇浸提, 以加乙醇量、提取时间、提取次数作为主要考查因素, 确定了山楂中熊果酸与齐墩果酸提取的最佳提取工艺为: 用80%的乙醇回流提取三次, 每次加10倍量、提取2.5h, 其中回流数是主要影响因素, 提取率达92.9%。在此基础上, 采用硅胶柱色谱分离纯化, 最终山楂中熊果酸与齐墩果酸(熊果酸计)转移率可达92%。

关键词: 山楂; 熊果酸; 齐墩果酸; 提取; 纯化; 高效液相色谱

Study on Extraction and Purification of Ursolic Acid and Oleanolic Acid from Hawthorn Fruits

LI Shan, WANG Ya-nan, WAN Zi-long, ZHANG Xue-wen, CONG Pei-jiang
(Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: The optimum extracting process of ursolic acid and oleanolic acid from hawthorn fruits by ethanol method was obtained after using $L_9(3^4)$ orthogonal test plan. We selected three elements—ethanol amounts, extraction hours, and extraction times respectively to observe their effects on the extraction of ursolic acid and oleanolic acid from hawthorn fruits. The orthogonal test results showed that the optimum conditions are as follows: the ethanol used 10 times of hawthorn fruits, refluxed and extracted 3 times, sustained for 2.5 h each time with extraction rate up to 92.9%. The major factor affecting the content of ursolic acid and oleanolic acid is the reflux times. On the basis of these experiments, silica gel column chromatography was used to purify the extraction and the final extraction rate of ursolic acid and oleanolic acid is up to 92%.

收稿日期: 2007-04-16

作者简介: 李钊(1964-), 女, 副研究员, 研究方向为食品科学与工程。

素等, 在短时间内对糙米发芽也有显著的提高作用, 也可以加速糙米发芽。

参考文献:

- [1] 康彬彬, 陈团伟, 张鑫桐, 等. 发芽糙米的营养价值及开发利用[J]. 中国食物与营养, 2005(11): 21-22.
- [2] KAYAHARA H, KIKUCHI T. Flavor, health and nutritional quality of pre-germinated brown rice[C]//International Chemical Congress of Pacific Basin Societies in Hawaii. 2000.
- [3] MIYOSHI K, SATO T. The effects of ethanol on the germination of seeds of Japonica and Indica rice (*Oryza sativa* L.) under anaerobic and aerobic conditions[J]. Annals of Botany, 1997, 79: 391-95.
- [4] 顾振新, 陈志刚, 段颖, 等. 外源 Ca^{2+} 对糙米发芽力及贮藏物动员的影响[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(4): 97-100.
- [5] 顾振新, 陈志刚, 蒋振晖. 赤霉素处理对糙米发芽力及其主要成分变化的影响[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(1): 74-77.
- [6] 吴辛芳, 周卫川, 陈宏, 等. H_2O_2 对蔬菜种子活力影响的研究[J]. 福建省农科院学报, 1996, 11(2): 25-30.
- [7] TAYLORSON R B, HENDRICKS S B. Overcoming dormancy in seeds with ethanol and other anesthetics[J]. Planta, 1979, 145: 507-510.
- [8] ADKINA S W, SIMPSON G M, NAYLOR J M. The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua* VI. Respiration and the stimulation of germination by ethanol[J]. Physiologia Plantarum, 1984, 62: 148-152.
- [9] FIDLER J C. The metabolism of acetaldehyde in plant tissues[J]. Journal of Experimental Botany, 1968, 58: 41-51.
- [10] LARONDELLE Y, CORBINEAU F, DETHIER M, et al. Fructose 2, 6-bisphosphate in germinating oat seeds. A biochemical study of seed dormancy[J]. European Journal of Biochemistry, 1987, 166: 605-610.
- [11] DAUSSANT J, MIYATAS M, ITSUI T, et al. Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds[J]. Plant Physiol, 1983, 71(1): 88-95.

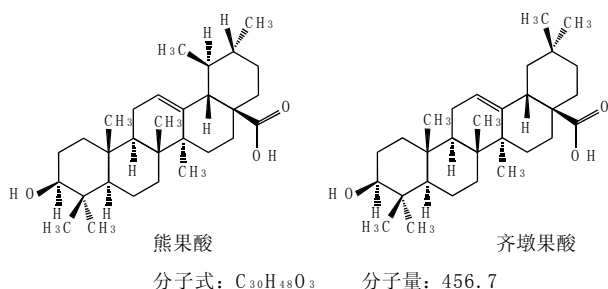
Key words hawthorn fruits; ursolic acid; oleanolic acid; extraction; purification; HPLC

中图分类号: Q946.81

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0141-04

山楂来源于蔷薇科植物山里红(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.)或山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)的干燥成熟果实。秋季果实成熟时采收,切片,干燥。目前,国内对山楂的化学成分和药理、临床等方面的研究都已取得了较好的成果,尤其是山楂中熊果酸与齐墩果酸的降血脂和抗动脉粥样硬化方面的作用受到人们广泛关注,熊果酸和齐墩果酸的结构式如下图所示。我国的山楂资源丰富,如对其进行进一步开发利用,将会具有非常广阔的前景。



我们通过对山楂的提取进行考察发现,水提法是最古老最常用的方法,操作简单,溶剂成本低,山楂中黄酮苷类成分和糖类成分提取率较好,但在水提液中未检出熊果酸,说明熊果酸不能通过水提的方法提出。醇提法多采用80%以上的乙醇作为提取溶剂,乙醇的浓度越高,熊果酸的溶解度越大,但穿透能力越弱,并且山楂中的黄酮苷类成分提取率下降,不利于山楂的综合利用。本研究中采用80%乙醇对山楂进行提取,再用硅胶柱层析纯化,得到熊果酸与齐墩果酸组分,以薄层层析和HPLC方法测定提取物中的熊果酸与齐墩果酸含量。结果表明所用提取纯化方法经济实用,为山楂的综合利用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

山楂(饮片)(批号为040911) 山东华龙中药饮片厂。

1.2 试剂

氢氧化钠、95%乙醇、乙酸乙酯、乙酸铵、冰醋酸、石油醚、正丁醇、均为分析纯;甲醇为色谱纯。柱色谱硅胶 青岛海洋化工厂。

1.3 对照品

熊果酸对照品(含量测定用化学对照品,批号为0736-200015) 中国药品生物制品检定所。

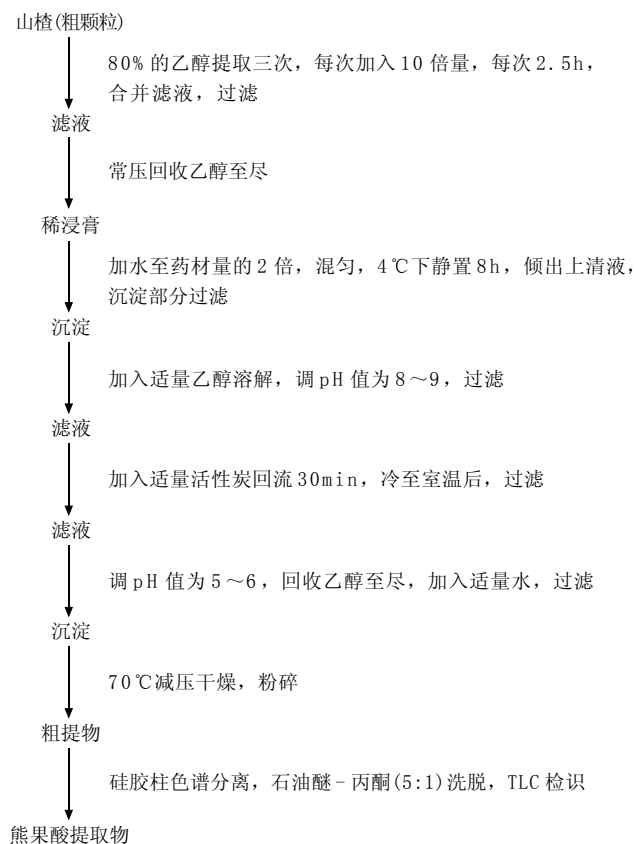
1.4 仪器与设备

ZK-82B型真空干燥箱;可调万用电炉;TDA-8002

型电子恒温水浴锅;A型玻璃仪器气流烘干器;102型电热恒温干燥箱;FW100型高速万能粉碎机;AB54-METTLER TOLEDO电子天平;RE-52旋转蒸发器;SHB-III循环水式多用真空泵;KDM型控温电热套;KQ-250E型医用超声波清洗器;TGL-16C飞鸽牌离心机;LC-10AT高效液相色谱仪。

1.5 方法

1.5.1 工艺流程



1.5.2 实验步骤

1.5.2.1 山楂饮片粒度选择

设定两个粒度水平,山楂饮片(1~2mm薄片)、粗颗粒(0.3~0.8cm),分别取60g,加入8倍80%乙醇回流提取两次,每次1h,用HPLC测定熊果酸和齐墩果酸总量(以熊果酸计)。

1.5.2.2 水溶液中熊果酸的检测

取水沉液的上清液20ml,三氯甲烷溶解残渣提取两次,每次20ml,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加乙醇5ml使溶解,离心,取上清液,作为样品溶液。另取熊果酸对照品,加乙醇制成每1ml含1mg的溶液,作

为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典2005年版一部附录VI B)试验,吸取上述两种溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-甲醇-甲酸(38.5:1.5:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在80℃加热至斑点显色清晰。

1.5.2.3 熊果酸和齐墩果酸的精制

(1) 溶剂法初步纯化

a. 碱沉法:取适量沉淀用95%乙醇溶解,用碱溶液调pH至8~9,有大量沉淀产生,滤过,分别取上清液和沉淀适量,进行TLC检测。结果沉淀中未检出熊果酸斑点,并且溶液颜色明显变浅,说明碱沉工艺是合理的。

b. 活性炭脱色:取碱沉后滤液,加入适量活性炭,回流30min,放冷,滤过。

c. 回收乙醇、二次水沉:取脱色后的滤液调pH值至5~6,回收乙醇至尽,加入适量水,置4℃下静置4h,滤过,沉淀70℃减压干燥,得粗提物。

(2) 柱色谱精制

a. 柱色谱条件的预示:用薄层层析的方法确定柱层析洗脱剂石油醚-丙酮的比例。即以不同比例的石油醚-丙酮为硅胶G薄层板的展开剂,以10%硫酸乙醇溶液为显色剂。经比较确定石油醚-丙酮(5:1)较为合适。

b. 湿法装柱:取适量已活化的硅胶,加入石油醚(60~90℃)至流动性良好,搅拌无气泡,缓缓倒入色谱柱中,使硅胶柱均匀。

c. 干法上样:取粗提物适量,用无水乙醇溶解于蒸发皿中(可适当加热),加入硅胶至吸附饱和,干燥,缓缓加入色谱柱的顶端。

d. 洗脱:用石油醚-丙酮(5:1)洗脱,分段收集,同时用TLC方法检识,合并熊果酸和齐墩果酸的洗脱液,蒸干,得到产品,经HPLC方法检测熊果酸与齐墩果酸的含量(以熊果酸计)为92%。

1.5.2.4 提取物中熊果酸与齐墩果酸总量的检测

实验过程中,以熊果酸与齐墩果酸的含量作为工艺考察的主要控制指标。根据文献资料与实际条件,结合熊果酸与齐墩果酸的性质,选用反相液相色谱法进行测定。

检测方法:熊果酸与齐墩果酸总含量(以熊果酸计)以高效液相色谱法(中国药典2005年版一部附录VI D)测定。色谱柱:Luna 5 μ C₁₈(2),250mm \times 4.6mm;Shim-pack VP-ODS,150mm \times 4.6mm,5 μ m;检测波长为215nm;流动相为甲醇-0.1mol/L冰醋酸(85:15)。

对照品溶液的制备:准确称取熊果酸对照品适量,加乙醇制成每1ml含0.1mg的溶液。

样品溶液的制备:准确称取待测品于50ml容量瓶中,加乙醇至刻度,超声处理(250W,40kHz)20min,

摇匀,取续滤液。

因熊果酸和齐墩果酸为三萜酸类同分异构体,结构相似,分离困难,受实验室条件和时间的限制,未能将两者完全分开,故以熊果酸与齐墩果酸的总峰面积计算含量。实验表明本方法结果稳定,重现性较好。测得最终提取物中熊果酸与齐墩果酸总含量为92%。

2 结果与分析

2.1 山楂粒度选择

材料的粒度对有效成分的提取效果有很大影响,若材料粒度过小,会造成生产过程中滤过的困难,因此需对材料的粒度进行筛选。

表1 不同粒度的比较
Table 1 Comparison of different granularity

有效成分	粒 度	
	饮片	粗颗粒
熊果酸的量(mg)	131.2	142.9

由上述实验可知:两种粒度水平测得的熊果酸和齐墩果酸总量(以熊果酸计),颗粒组提取量高于饮片组,故提取前应将山楂粉碎成粗颗粒。

2.2 醇提正交试验

以加入80%乙醇量、回流次数、回流时间等作为考察因素,结合生产实际,每个因素设计三个水平,试验方案见表2。

表2 L₉(3⁴)正交试验设计的因素水平
Table 2 Factors and levels table of L₉(3⁴) orthogonal test

水平	因素		
	加乙醇量(倍)	回流次数(次)	回流时间(h)
	A	B	C
1	6	1	1.5
2	8	2	2.0
3	10	3	2.5

根据因素水平表,选择L₉(3⁴)的正交表进行试验,该表最多可安排四个三水平因素,本试验只有三个因素,随机安排于表上,余下第四列为空列。将试验项目的因素、水平对号入座,每次取60g山楂进行试验,结果填入表3,以熊果酸和齐墩果酸(以熊果酸计)的提取量作为评价指标,并对试验结果进行方差分析,结果见表4。

试验表明各因素对试验结果的影响次序为B>C>A,且B因素有极显著差异,因素C和A因素差异不显著;根据表3和表4确定最佳提取工艺为:A₃B₃C₃,即用80%的乙醇回流提取三次,每次加10倍量,提取2.5h,按此工艺重复试验两次,测得熊果酸和齐墩果酸总量(以熊果酸计)的提取率达92.9%,进一步证明本工艺

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果分析
Table 3 Result analysis of orthogonal test $L_9(3^4)$

水平	因素				熊果酸和齐墩果酸的量(mg)
	加乙醇量 A	回流次数 B	回流时间 C	空白 D	
1	1	1	1	1	150
2	2	2	2	1	201
3	3	3	3	1	208
4	1	2	3	2	198
5	2	3	1	2	202
6	3	1	2	2	169
7	1	3	2	3	201
8	2	1	3	3	167
9	3	2	1	3	195
K_1	549	486	547	559	
K_2	570	594	571	569	
K_3	572	611	573	563	
R	23	125	26	10	

注: 试验结果方差分析, 查F检验的临界 F_F 表为 $F_{0.05}(2, 2)=19.0$, $F_{0.01}(2, 2)=99.0$ 。

表4 熊果酸和齐墩果酸含量的方差分析表
Table 4 ANOVA of content of ursolic acid and oleanolic acid

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	显著性
A	107.8	2	53.9	6.5	差异不显著
B	3063.8	2	1531.9	184.5	差异极显著
C	139.2	2	69.6	8.4	差异不显著
误差e	16.5	2	8.3		

是合理可行的。

2.3 熊果酸对照品及样品的HPLC图谱

将经过硅胶色谱柱分离纯化的样品与熊果酸对照品进行HPLC检测, 结果见图1和图2。由于熊果酸和齐墩果酸为三萜酸类同分异构体, 结构相似, 很难分离, 故将两者并为一个组分。测得最终提取物中熊果酸与齐墩果酸总含量为92%。

3 结论

由于熊果酸和齐墩果酸为同分异构体, 结构中仅有一个甲基的位置不同, 故在薄层色谱中两者的分离较难, TLC检验却只显示一个斑点。由于在山楂中同时含有熊果酸和齐墩果酸, 常规方法很难将两者分离。如需得到纯度较高的熊果酸, 可用毛泡桐叶(几乎不含齐墩果酸)作为原料提取高纯度的熊果酸。

本研究采用 $L_9(3^4)$ 的正交试验设计, 采用乙醇浸提, 以加乙醇量、提取时间、提取次数作为主要考查因素, 确定了山楂中熊果酸与齐墩果酸提取的最佳提取工艺为: 用80%的乙醇回流提取三次, 每次加10倍量、提取2.5h, 其中回流次数是主要影响因素, 熊果酸与齐墩果酸的提取率达92.9%。

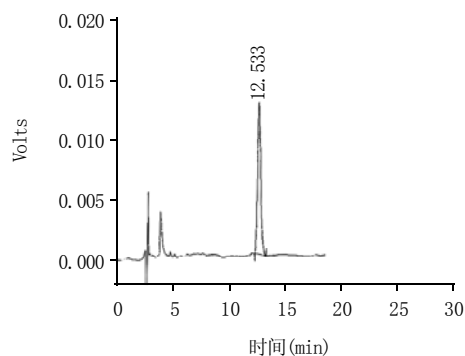


图1 熊果酸对照品的HPLC图谱
Fig.1 HPLC of ursolic acid standards

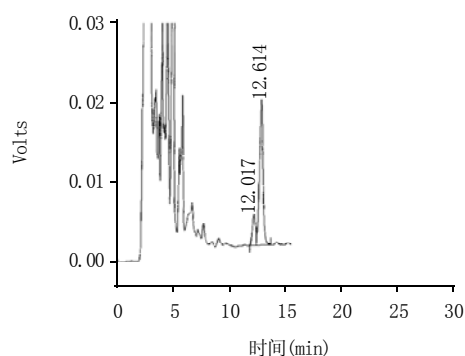


图2 样品的HPLC图谱
Fig.2 HPLC of sample

在熊果酸的精制工艺中采用碱沉、活性炭脱色、二次水沉等工艺, 使产品由原来的浅褐色变为淡黄色, 并且熊果酸的含量大幅度提高。通过对柱色谱条件的摸索, 得出柱色谱的分离条件, 即用石油醚-丙酮(5:1)洗脱, 熊果酸和齐墩果酸的总含量(以熊果酸计)达92%。建立了产品中熊果酸与齐墩果酸总量的HPLC测定方法, 实验表明, 该方法操作简便, 重现性好, 结果较准确。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 1部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 22.
- [2] 张春桃, 蒋孟良, 赵碧清. 正交设计优选山楂的醇提工艺[J]. 湖南中医学院学报, 2002, 22(1): 38-39.
- [3] 何改. 山楂叶黄酮类化合物最佳提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(1): 15-17.
- [4] 冯凤莲. 山楂的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 1997, 18(6): 383-384.
- [5] 时岩鹏, 丁杏苞. 山楂化学成分的研究[J]. 中草药, 2000, 31(3): 173-174.
- [6] 廖广群. 正交试验法筛选山楂的提取工艺[J]. 中药材, 2002, 25(9): 611-612.
- [7] 高光跃, 冯毓秀, 秦秀芹. 山楂类果实的化学成分分析及其质量评价[J]. 医学学报, 1995, 30(2): 138-143.