

## Extraction and analysis of Ursolic Acid from Spica Prunellae

LI Kai-quan<sup>1,2</sup>, YE Wen-feng<sup>1,2</sup>, XIAO Dao-an<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun Jiangxi, China;

<sup>2</sup>Chemistry & Bioengineering College of Yichun University, Yichun Jiangxi, China

Received: Jul 30, 2014

Accepted: Aug 12, 2014

Published: Sep 25, 2014

DOI: 10.14725/gjicmwm.v2n3a664

URL: <http://dx.doi.org/10.14725/gjicmwm.v2n3a664>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Objective:** To study the extract technology of Ursolic Acid from Spica Prunellae, and to build the method of determining its content. **Methods:** Adopting the method of ethanol extract and agglutination separate to isolate Ursolic Acid. The content of Ursolic Acid in sample is determined by HPLC with Methanol-H<sub>2</sub>O-Glacial acetic acid-Triethylamine (83:17:0.04:0.02) as mobile phase at a flow rate of 1.0ml/min, and detection wavelength at 210nm. Beckman ODS 150mm×4.6mm column is used at 25°C. **Results:** The product is recognized to be Ursolic Acid by physicochemical contents and thin layer chromatography. Peak area normalization method was used for counting. The extraction rate is 99.8%. **Conclusion:** The technology of isolating and preparation Ursolic Acid is advanced、practical、reasonable and feasible. It can be applied in industrial production. The purity of Ursolic Acid is high with good safety. The analytical method is simple and accurate. It can be adapted to evaluate the quality of Ursolic Acid.

### Key word

Prunella vulgaris; Ursolic Acid; Ethanol extract and agglutination separate; HPLC

## 夏枯草中熊果酸的提取分离及含量测定\*

李开泉<sup>1,2</sup>, 叶文峰<sup>1,2</sup>, 肖道安<sup>2</sup>

<sup>1</sup>江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西宜春, 中国

<sup>2</sup>宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春, 中国

通讯作者: 李开泉 Email: [lkq541024@163.com](mailto:lkq541024@163.com)

\*基金项目: 国家“863”计划项目“中药 I 类新药乌索酸及其制剂的研究开发” [2002AA2Z3217]

**【摘要】**目的 研究从夏枯草中提取分离熊果酸的工艺, 并建立其含量测定的方法。方法 采用“醇提凝析法”分离制备熊果酸, 用 HPLC 法测定其含量。色谱柱为 Beckman 公司 ODS150mm×4.6mm, 5 μm, 柱温 25°C, 流动相: 甲醇:水:冰醋酸:三乙胺 (83:17:0.04:0.02), 流速: 1.0ml/min, 检测波长: 210nm。结果 产品理化常数和薄层色谱鉴定确证为熊果酸; 含量计算采用峰面积归一化法, 含量为 99.8%。结论 “醇提凝析法”分离制备熊果酸工艺先进合理, 实用可行, 有利于工业化生产。熊果酸纯度高, 安全性好。HPLC 法快速简便, 精密度高, 可用于控制熊果酸产品质量。

**【关键词】**夏枯草; 熊果酸; 醇提凝析法; 高效液相色谱法

夏枯草 (*Prunella vulgaris* L.) 是一种常用的传统中药, 属唇形科植物, 主产于江苏、安徽、河南等地。夏枯草性寒, 味辛、苦, 功能清泄肝火、消肿止痛, 用于肝火上炎、清肝明目、散结消肿、头痛眩晕、淋巴结核、高血压等症<sup>[1]</sup>。现代研究发现熊果酸具有抗肝炎、抗肿瘤、抗菌消炎、降血糖血脂等多种生物活

性,有着重要的药用开发价值<sup>[2-4]</sup>。夏枯草对免疫有较好的双向调节作用,其煎膏剂对痢疾杆菌、伤寒杆菌、绿脓杆菌等均有抑制作用,对巴豆油所致的小鼠耳肿胀有抑制作用,抗炎效果显著<sup>[2]</sup>;水煎剂及30%乙醇浸出物均有降压作用<sup>[2]</sup>。夏枯草的主要活性成分为熊果酸,由于熊果酸结构复杂,难以用合成法获得。因此,研究从植物中提取熊果酸的生产工艺,具有较大的经济价值和较好的社会效应。近年来,采用HPLC法对江西盛产的30种天然药用植物中的熊果酸含量进行了测定分析,发现夏枯草中熊果酸含量相对较高<sup>[5]</sup>。为了寻找熊果酸的药物资源,对夏枯草中熊果酸进行了提取分离及含量测定,现将结果报告如下。

## 1 材料与试剂

1.1 材料 原料采自宜春市,经本院天然药物研究室鉴定为唇形科植物夏枯草 (*Prunella vulgaris* L.)。

1.2 仪器 126/168型高效液相色谱仪(美国贝克曼库尔特公司);WZZ-1S数字式自动旋光仪(上海);Boetius显微熔点测定仪测定,温度未校正;Perkin-Elmer傅立叶变换红外光谱仪(美国)。

1.3 试剂 90%乙醇(食用级,广西糖厂);甲醇为色谱纯(上海陆忠试剂厂);“YCU-1号”除杂剂(自制);活性炭为分析纯(上海豪申化学试剂生产);硅胶G板(青岛海洋化工厂);熊果酸对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号:110742-200314)。

## 2 实验方法

2.1 提取分离 采用“醇提凝析法”提取分离<sup>[6]</sup>,将干燥后的夏枯草800g粉碎成粗粉(20目),用温水湿润后,加入原料干重0.5%的复合酶制剂,于室温酶解处理48h,滤除酶解液。用8倍量质量分数为90%的乙醇加热回流提取2次,每次1.5h。将提取液减压回收乙醇得浸膏。浸膏加水充分洗涤,放置令其自然沉降,过滤。沉淀用加“YCU-1号”除杂剂处理2次,过滤得沉淀。沉淀用乙醇加热溶解,调节pH值,加适量活性炭煮沸脱色30min,过滤,滤液再调节pH值,经凝析分离,纯化精制,得无色针状结晶为熊果酸。夏枯草中熊果酸提取分离工艺流程见图1。

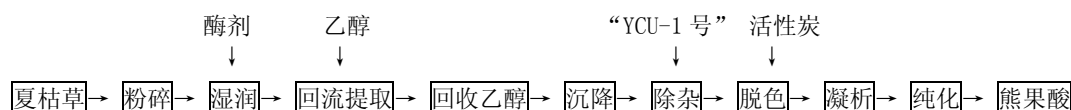


图1 夏枯草中熊果酸的提取分离工艺流程

取夏枯草干粉800g,共5份,照上述工艺条件进行提取,结果熊果酸产量在2.5~2.8g,均值为2.65g,RSD为1.89%(n=5),其纯度均达99%以上。表明工艺条件对制备夏枯草中熊果酸是比较稳定的。

### 2.2 样品检测分析

2.2.1 理化常数测定 熊果酸为无色针状结晶,不溶于水和石油醚。 $(\alpha)_D^{20} + 65^\circ$  (C0.095, EtOH), mp285~287°C,与熊果酸对照品混合,其熔点不下降。

2.2.2 薄层层析鉴定 取样2mg,加1ml质量分数95%乙醇溶解,点样于硅胶G板上,同时用熊果酸对照品作对照,用展开剂环己烷:丙酮(3:1)展开,展距约10cm,取出挥干溶剂,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105°C加热5~10min,在365nm紫外灯下,在与对照品相应的位置上显相同颜色的斑点。

2.2.3 Liebermann-Burchard反应 取样品少许,用95%乙醇溶解。吸取上述溶液1滴,置试管中,加醋酐试剂1ml,摇匀,沿试管壁缓缓加入浓硫酸试剂1ml,在醋酐与浓硫酸界面上呈紫红色圆环。

2.2.4 红外光谱鉴定 取标准样品约2mg,与KBr混合并研磨均匀,压片,测定其红外光谱(图2),结果: $\nu_{\text{KBr maxcm}^{-1}}$ : 3434 (-OH), 2968, 2927, 2871 (C-H), 1694 (C=O), 1456, 1384 (-CH<sub>3</sub>), 1031 (C-O),与熊果酸对照品的红外光谱完全一致。

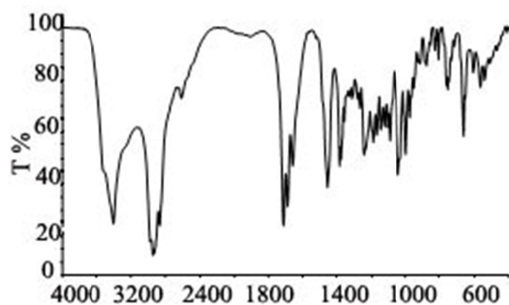


图2 熊果酸红外光谱图

### 2.3 样品含量测定

2.3.1 色谱条件 样品用乙腈溶解，质量分数为 5mg/ml，进样量 10 $\mu$ l。色谱柱：Beckman 公司 ODS150mm $\times$ 406mm，5 $\mu$ m，室温 25 $^{\circ}$ C；流动相：甲醇:水:冰醋酸:三乙胺 (83:17:0.04:0.02)；灵敏度：0.05AUFS；流速：1.0ml/min。

2.3.2 波长的选择 取熊果酸对照品溶液，在 190~500nm 进行光谱扫描，流动相中熊果酸最大吸收波长为 202nm (图 3)，由于溶剂甲醇在此短波长处也有一定的吸收，为减少干扰又不至影响其灵敏度，故选 210nm 作为检测波长。

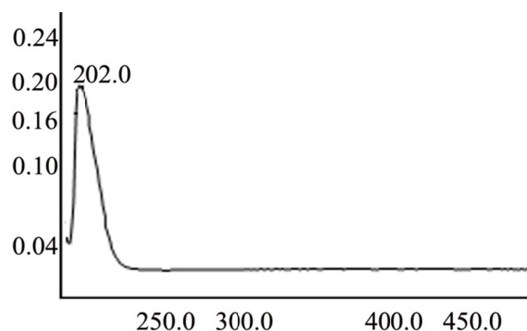


图3 熊果酸 UV 光谱图

### 2.3.3 溶液的配制

2.3.3.1 供试品溶液的配制 精密称取熊果酸样品 5.25mg 置于 5ml 容量瓶中，加甲醇（色谱纯）溶解并稀释至刻度，摇匀，用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过作为供试品溶液。

2.3.3.2 对照品溶液的配制 精密称取熊果酸对照品 9.8mg，置于 10ml 容量瓶中，用甲醇（色谱纯）溶解并稀释至刻度，摇匀，即为对照品溶液。

2.3.4 线性关系 分别吸取熊果酸对照品溶液 4、8、12、16、20  $\mu$ l，按“2.3.1”项下色谱条件进样，测定峰面积。以峰面积为纵坐标，进样量为横坐标进行线性回归，得回归方程为： $Y=1.42 \times 10^5 X + 2.19 \times 10^4$ ， $r=0.9999$ ，即熊果酸进样量在 3.9~19.6  $\mu$ g 之间时，具有良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密吸取熊果酸对照品溶液 10  $\mu$ l 进样，重复 5 次，测得其峰面积 RSD 为 0.80% (n=5)，表明其精密度良好。

2.3.6 重现性试验 精密称取同批熊果酸样品 5 份,按“2.3.3.1”项下方法配制样品溶液,吸取 10  $\mu$ l 进样测定,测得样品的峰面积 RSD 为 1.12% (n=5),表明该方法的重现性良好。

2.3.7 稳定性试验 精密吸取熊果酸样品 10  $\mu$ l 进样测定,再分别于 0.5、1、2、4、8、16、32、48h 时重复测定一次。测得其峰面积的 RSD 为 1.18% (n=5),表明熊果酸样品溶液在 48h 内稳定。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取含量已知的熊果酸样品 5 份,分别加入适量熊果酸对照品,按“2.3.3.1”项下方法配制成样品溶液,进行熊果酸含量分析,结果测得其平均回收率为 99.32%,RSD 为 0.70%(n=5)。

2.3.9 样品含量测定 吸取样品溶液 10  $\mu$ l 进样分析,重复测定 5 次,用面积归一法计算,结果熊果酸平均含量为 99.8%,RSD 为 0.82%。

2.3.10 熊果酸对照品及样品 HPLC 色谱图 熊果酸对照品及样品 HPLC 色谱图见图 4。

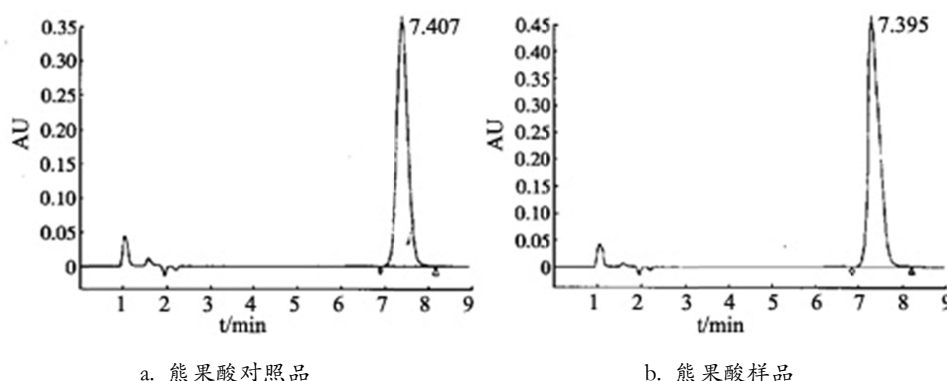


图 4 熊果酸对照品及样品 HPLC 色谱图

### 3 结论

对于熊果酸的提取分离,目前国内外仍普遍采用硅胶柱层析法进行<sup>[7-11]</sup>,存在设备要求高,溶剂价格贵且有毒,样品得量小,难以规模化生产等缺点。本研究应用的“醇提凝析法”生产熊果酸的工艺技术,仅用 90%的乙醇为溶剂对药材进行回流提取,经除杂脱色,凝析分离即可获得高纯度熊果酸产品。不仅简化了操作程序,降低了生产成本,而且为熊果酸的规模化生产创造了条件。

本工艺有利于提高原料的利用率。本工艺采用加复合酶制剂对原料进行预处理,能加速熊果酸及其苷与植物细胞壁的分离,同时使熊果酸苷转化为苷元,提高熊果酸的利率。另外也能将一些脂类等杂质转化为小分子水溶性物质而被除去。

本工艺用自身发明的“YCU-1 号”除杂剂对所得浸膏进行除杂处理,不仅可大量除去水溶性杂质,更重要的是能与熊果酸共存的同分异构体齐墩果酸分开,经活性炭脱色,凝析分离,即可得纯度高达 99.8% 的无色针状结晶熊果酸。

本实验应用高效液相色谱法测定熊果酸的含量,经方法学研究表明,此法可靠,操作简便,分离效果好,准确性高。克服了以往因熊果酸与齐墩果酸结构近似,极性几无差异,用薄层扫描法无法准确测定其含量的难题。

### 【参考文献】

- [1] 梅全喜.现代中药药理与临床应用手册[M].北京:中国中医药出版社,2008:234.
- [2] 邓子煜,徐先祥,张小鸿,等.夏枯草药理学研究进展[J].安徽医学,2012,33(7):937-939.  
<http://dx.doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2012.07.061>

- [3] 张美华,刘忠伟,杜菊香.夏枯草口服液治疗亚急性甲状腺炎的临床效果[J].临床合理用药, 2011,4:53-54.  
<http://dx.doi:10.3969/j.issn.1674-3296.2011.12.031>
- [4] 赵先礼,孙成堂.夏枯草治疗急性黄疸型传染性肝炎 75 例的临床观察[J].山东医刊, 1964:39-41.
- [5] 邹盛勤,陈武,李开泉,等.30 种省产天然植物中熊果酸含量的 HPLC 测定[J].江西农业大学学报, 2005,27(1):22-24.
- [6] 李开泉,陶华蕾.酶法辅助提取迷迭香中三萜酸的工艺研究[J].江西农业大学学报, 2012,34(5):1049-1051.  
<http://dx.doi:10.3969/j.issn.1000-2286.2012.05.035>
- [7] 李明明,周富强,刘军海.熊果酸提取工艺的研究进展[J].氨基酸和生物资源, 2009,31(1):33-36.
- [8] 相延英,杨光.常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J].中国医院药学杂志, 2004,24(5):316-318.  
<http://dx.doi:10.3321/j.issn:1001-5213.2004.05.043>
- [9] 小静,张永利.熊果酸的提取工艺研究[J].实用药物与临床, 2006,9(6):342-343.  
<http://dx.doi:10.3969/j.issn.1673-0070.2006.06.005>
- [10] 润喜,阎彩萍,孙晓飞.山楂中熊果酸高效液相色谱分析[J].药物分析杂志, 1994,14(2):30-31.
- [11] 谢莹,杭太俊,程赞,等.HPLC 法测定中药中齐墩果酸和熊果酸含量[J].中药杂志, 2001,6(9):615-617.