

枇杷悬浮细胞中熊果酸的超声提取及 HPLC 测定

李惠华*, 刘小英, 陈 淳, 苏明华, 林建忠

福建省亚热带植物研究所, 厦门 361006

摘要:以枇杷悬浮细胞培养物为材料,通过单因素、正交实验,采用方差分析方法,探索枇杷细胞收集方法、熊果酸提取及测定工艺。结果表明:适宜的收集方法为枇杷悬浮培养细胞液经 4 层医用纱布布式漏斗抽滤收集。超声波提取条件为:95% 乙醇为提取剂,超声功率 50 W,超声时间 25 min,料液比 1:40,超声次数 2 次。HPLC 色谱条件为:流动相由甲醇和水-冰乙酸-三乙胺 = 10:0.03:0.06(V:V:V) 两相组成,两相体积比为 83:17;流速是 1.0 mL/min;检测波长是 203 nm;柱温是 30 ℃。在此条件下,平均加样回收率为 99.3%。

关键词:枇杷;细胞悬浮培养;熊果酸;超声提取;高效液相色谱

中图分类号:R667.3

文献标识码:A

Extraction and HPLC Analysis of Ursolic Acid in Cell Suspensions of *Eriobotrya japonica*

LI Hui-hua*, LIU Xiao-ying, CHEN Chun, SU Ming-hua, LIN Jian-Zhong

Fujian Institute of Subtropical Botany, Fujian Xiamen 361006, China

Abstract: Single factor, orthogonal experiments and variance analysis were adopted to determine the process of the cells collection, extraction and content assaying of UA from loquat suspension cell cultures. The results showed that: the appropriate collection method was filtering through four-layer gauze using Buchner funnel. Ultrasonic extraction conditions were: 95% ethanol as extraction solvent, ultrasonic power 50 W, ultrasonic time 25 min, solid-liquid ratio 1:40, ultrasonic 2 times. HPLC chromatographic conditions: mobile phase consisted of methanol and water-acetic acid-triethylamine = 10:0.03:0.06 (volume ratio), with volume ratio of 83:17; flow rate 1.0 mL/min; detection wavelength was 203 nm; column temperature was 30 ℃. The average recovery rate for the determination of ursolic acid was up to 99.3%.

Key words: *Eriobotrya japonica*; cell suspension; ursolic acid; ultrasonic extraction; HPLC

枇杷 (*Eriobotrya japonica*), 蔷薇科枇杷属。研究发现,枇杷叶中主要的药用三萜酸类成分——熊果酸(UA)曾被证明有望成为低毒、有效的新型天然抗癌药物^[1,2],对其药理病理及分子机制的研究也引起科研人员的重视^[3],目前市场十分紧缺。生产上以成熟枇杷叶采用溶剂回流法提取,提取流程长、耗能多、且存在产品质量不稳定及环境污染等问题^[4,5]。实验室枇杷叶中熊果酸的提取方法有溶剂萃取法、超声提取法、超临界流体萃取法等,其中超声提取法具有简便灵敏提取率高的优势^[5-8]。日趋完善的植物细胞悬浮培养技术(植物细胞生长的微生物化)在药用植物枇杷上的应用已得到关注。利用植物细胞悬浮培养技术生产枇杷细胞以提取熊果

酸,具有可周年生产,通过人工控制含量可能比原植物高,可能产生新的更符合生理活性需要的化合物等优势^[10,11]。本研究基于正在进行的枇杷细胞悬浮培养以提取 UA 的试验,针对枇杷细胞培养物的特点,探讨在悬浮培养液中的枇杷细胞如何快速简便收集、提取、测定 UA 的含量,以期为今后枇杷细胞悬浮培养规模化生产 UA 奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料与试剂

枇杷悬浮培养细胞,由早钟 6 号幼胚中诱导到愈伤组织,建立其悬浮细胞系,由本实验室保存。

甲醇 (Amethyst Chemicals, 色谱纯);熊果酸标准品 (中国食品药品检定研究院,批号 110742-201220)。

1.2 仪器

宁波新芝超声波细胞粉碎机 (JY92-IIIN), 高速

收稿日期:2013-09-24 接受日期:2014-02-17

基金项目:福建省自然科学基金(2012J05047);福建省公益类科研院所专项(2011R1012-1);厦门市科技计划(3502Z20132004)

* 通讯作者 Tel:86-018606000811; E-mail:66350136@qq.com

冷冻离心机 (BECKMAN), Alliance HPLC (Waters), 电子天平 (DENVER INSTRUMENT)。

2 实验方法

2.1 枇杷悬浮培养细胞收集方法比较

2.1.1 离心收集(方法 A)

100 mL 枇杷悬浮培养细胞液移入适合的离心管, 常温 8000 g, 离心 10 min, 去上清, 滤纸吸干水份, 收集。

2.1.2 离心结合水冲洗收集(方法 B)

100 mL 枇杷悬浮培养细胞液移入适合的离心管, 常温 8000 g, 离心 10 min, 去上清, 无菌水冲洗,

重复离心—水冲洗—去上清操作, 直至表面无胶状物, 滤纸吸干水份, 收集。

2.1.3 纱布过滤收集(方法 C)

100 mL 枇杷悬浮培养细胞液经 4 层医用纱布布式漏斗抽滤, 收集。

通过以上三种方法收集悬浮细胞后, 50 °C 烘干至恒重, 充分研磨粉碎。

2.2 超声法提取

以 95% 乙醇为溶剂, 采用超声提取功率、提取时间、料液比、提取次数单因素试验, 每个试验设 3 次重复, 取平均值; 在单因素试验的基础上开展 4 因素 3 水平的正交试验(表 1)。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Level	(A) 功率 Ultrasonic power (W)	(B) 时间 Extraction duration (min)	(C) 料液比 Liquid/solid ratio (mL/g)	(D) 次数 Times of extraction
1	50	15	1:20	1
2	100	25	1:40	2
3	150	35	1:60	3

2.3 加酸提取

以 95% 乙醇为溶剂, 以离心法(方法 A)采集样品, 采用正交试验确定的组合条件下, 研究盐酸浓度(0~0.5%)对熊果酸含量的影响。

2.4 高效液相法测定 UA

2.4.1 HPLC 条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 由甲醇(A)和水-冰乙酸-三乙胺(10:0.03:0.06, V:V:V)(B)两相组成, A:B 为 83:17 (V:V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 30 °C; 进样体积: 20 μL。

2.4.2 对照品溶液制备

精密称取熊果酸标准品 10 mg, 至于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 浓度 1 mg/mL。精密吸取上述溶液 1 mL, 置于 10 mL 容量瓶, 加甲醇定容, 得终浓度为 0.1 mg/mL 的熊果酸对照品储备液。将对照品储备液进一步稀释为 50、100、200、300、400 μg/mL 的对照品工作液。

2.4.3 标准曲线的绘制

精密吸取上述配制好的熊果酸对照品工作液(50、100、200、300、400 μg/mL), 进样 20 μL, 在 2.4.1 所述色谱条件下测定峰高(A), 以峰高为纵坐标, 以对照品的量为横坐标, 分别绘制标准曲线。

2.4.4 样品的制备

超声提取后回收溶剂, 常温 8000 g 离心 10 min, 上清转移至 50 mL 的蒸馏瓶中, 40 °C 水浴旋干, 甲醇溶解并定容, 摇匀, HPLC 上样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得样品待测溶液。

2.4.5 熊果酸含量计算方法

熊果酸含量按以下公式计算:

$$Y = (V \times X) / G \times 10^{-3}$$

式中, Y: 熊果酸含量, mg/g; V: 定容体积, mL; X: 熊果酸质量浓度, μg/mL; G: 枇杷细胞样品干重, g。

2.4.6 样品加样回收率测定

称取 0.5 g 样品, 加入 1.0 mg 的 UA(标记为 F), 标记为 D 样品。同批 0.5 g 样品, 标记为 E 样品。加样回收率(%) = (D₀ - E₀) / F × 100%, 其中, D₀ 为 D 样品测得的熊果酸含量, E₀ 为 E 样品测得的熊果酸含量, F 为加入标样的量。

3 结果与分析

3.1 收集方法

将收获期的枇杷细胞悬浮培养物(100 mL)分别按 2.1 项下三种收集方法收集(提取检测参考文献中枇杷叶的方法)^[7]。收集所耗费的时间, 收集

物的状态, 50 °C 烘干至恒重时收集物的状态, 以及 每克干重样品中 UA 的含量, 如下表所示:

表 2 不同收集方法的比较

Table 2 Comparison of different collection methods

收集方法 Collection methods	耗时 Time consumed (min)	收集物的状态 Status of the collections	烘干后收集物的状态 Status of the collections after drying	UA 的含量 Content of UA (mg/g · DW, $\bar{x} \pm s$)
A 离心	15	表面有胶状物	灰白色, 疏松; 团状; 表面少量胶状物呈黑褐色	9.014 ± 0.095 Bb
B 离心结合水冲洗	50	淡黄色	灰白色, 疏松	10.862 ± 0.114 Aa
C 纱布过滤	10	淡黄色, 呈豆沙状	灰白色, 疏松	10.661 ± 0.553 Aa

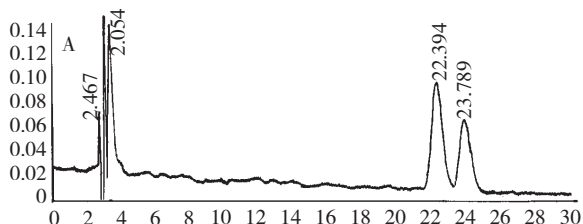
注: 邓肯新复极差法, 字母标记法表示均值的显著性差异(相同字母没有显著性差异, 不同字母有显著性差异, 大写字母表示 1% 差异水平, 小写字母表示 5% 的差异水平), 下同。

Note: Duncan's multiple range test. Letter notation indicated a significant difference in the mean (The same letter indicated no significant differences, different letters indicated significantly different. The capital letters indicated differences at the level of 1%, the lower case letters indicated differences at the level of 5%), same as below.

分析表明, 方法 B、C 与方法 A 中 UA 含量存在显著性差异。A 中收集物表面有胶状物质(可能为培养液中细胞代谢的多糖), 烘干后仍存在, 每克干重中 UA 的含量少于方法 B 和 C 中。方法 B 比 C 中的 UA 含量略高, 但没有显著性差异, 方法 C 比 B 节约时间 40 min。综上, 枇杷细胞悬浮培养物的收获宜采用方法 C, 既能保证 UA 含量, 同时省时简便。

3.2 HPLC 测定方法考察

图 1 为 UA 及 OA(齐墩果酸与熊果酸结构非常



相似的物质, 也存在于枇杷细胞培养物中) 的标样图(A)及枇杷悬浮细胞提取物色谱图(B), UA、OA 的标样在 203 nm 左右有最大吸收峰, 均能被准确检测到。在甲醇(A)和水: 乙酸: 三乙胺 = 10: 0.03: 0.06 (V: V: V)(B) 配比为 83: 17(V: V) 时, UA 和 OA 能有效地洗脱, 且分离度较好 ($R > 1.5$)。在流速为 1 mL/min 时, OA 和 UA 的保留时间分别为 22.4 min、23.8 min。

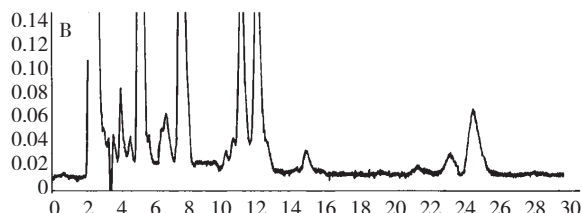


图 1 对照品(A)及枇杷悬浮细胞提取物(B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of standard (A) and loquat suspension cell extract (B)

该体系能很好地检测和分离枇杷细胞培养物中的 UA 和 OA。以峰高度对相应组分浓度进行线性回归, 回归方程分别为: 熊果酸 $Y = 1.74 \times 10^2 X + 1.69 \times 10^2$ ($R^2 = 0.9995$)。表明 UA 线性关系良好, 适用于枇杷细胞 UA 的定量分析。取同一对照品溶液, 重复进样 6 次, 以熊果酸峰高度计算相对标准偏差(RSD), 为 1.8%, 表明该方法精密度良好。取同一份供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h, 测定熊果酸的峰高度, 计算 RSD 为 0.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。取同一批枇杷干粉, 按上述供试液方法平行制备份供试品溶液。分别取 20 μ L 按上述色谱条件进行测定。结果熊果酸峰高度的 RSD 为 1.2%, 表明该法重复性良好。

3.3 超声提取单因素试验

固定提取时间 40 min, 料液比 1: 30, 提取次数 1 次(参考枇杷叶片超声提取法预先设定, 下同), 考察提取功率对熊果酸提取量的影响, 试验结果如图 2(A)所示, 随着提取功率的增加, 熊果酸的提取量先上升后下降, 在提取功率为 100 W 时, 熊果酸提取量即可达最大, 与其它几个处理 UA 的含量有显著性的差异, 功率 50 W 与 200 W、400 W 时 UA 的提取量没有显著性差异。

固定提取功率 250 W, 料液比 1: 30, 提取次数 1 次, 考察提取时间对熊果酸提取量的影响, 试验结果如图 2(B)所示, 提取时间为 20 ~ 40 min 时, 熊果酸的提取量缓慢上升, 无显著性差异, 但在提取时间大

于 40 min, 提取量急剧下降, 与前三个处理时间熊果酸的提取量有显著性差异, 可能长时间的超声对熊果酸结构产生破坏。

固定提取功率 250 W, 提取时间 40 min, 提取次数 1 次, 考察提取料液比对熊果酸提取量的影响, 试验结果图 2(C) 所示: 在原料量一定时, 提取溶剂量增大, UA 的浸出量增大。料液比在 1:15 到 1:30 期间, UA 提取量以 1.001 倍增加, 方差分析表明在料液比 1:15 到 1:30 时 UA 的提取量没有显著差异; 料液比在 1:30 到 1:45 之间, UA 的提取量上升幅度较大, 为前者的 1.107 倍, 两者有显著性差异; 料液

比在 1:45 到 1:60 之间, UA 的提取量上升幅度较缓和, 为前者的 1.011 倍, 两者没有显著性差异。考虑溶剂成本, 选择料液比 1:45。

固定提取功率 250 W, 料液比 1:30, 提取时间 40 min, 考察提取次数对熊果酸提取量的影响, 试验结果如图 2(D) 所示: 提取次数为 2 次时, 与提取次数 1 次比有 10.5% 的增加, 两者有显著性差异, 提取次数为 3 次时的提取量比 2 次时仅增加了 0.7%, 两者没有显著性差异。因而, 提取次数为 2 次时熊果酸基本提取完全, 即可满足试验需求。

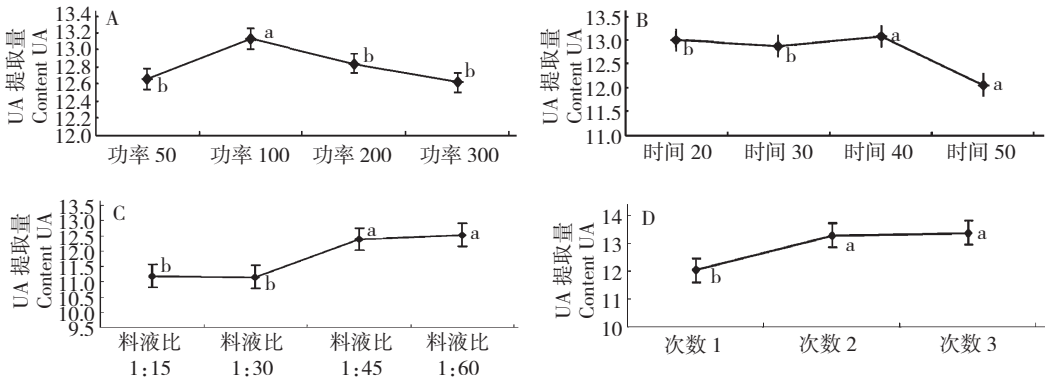


图 2 提取功率 (A)、提取时间 (B)、料液比 (C)、提取次数 (D) 对熊果酸提取量的影响

Fig. 2 Effects of ultrasonic power (A), extraction duration (B), solid/liquid ratio (C) and times of extraction (D) on the extraction yield of UA

3.4 超声提取的正交试验

在单因子的试验结果基础上, 设计 4 因素 3 水

平的正交试验, 正交试验的方案及结果见表 2。

表 2 正交试验结果及极差分析

Table 2 Design and result of orthogonal tests for the optimization of UA extraction conditions and range analysis

试验序号 No.	A 功率 Ultrasonic power (W)	B 时间 Extraction duration (min)	C 料液比 Solid / Liquid ratio (g/mL)	D 提取次数 Times of extraction (t)	UA 含量 UA content (mg/g)
1	50	15	1:20	1	10.534
2	50	25	1:40	2	13.046
3	50	35	1:60	3	13.086
4	100	15	1:40	3	12.840
5	100	25	1:60	1	11.936
6	100	35	1:20	2	11.630
7	150	15	1:60	2	12.330
8	150	25	1:20	3	11.512
9	150	35	1:40	1	11.594
K ₁	36.666	35.702	33.676	34.064	
K ₂	36.406	36.494	37.480	37.006	
K ₃	35.436	36.310	37.352	37.438	
\bar{K}_1	12.222	11.901	11.225	11.355	

\bar{K}_2	12.135	12.165	12.493	12.335
\bar{K}_3	11.812	12.103	12.451	12.479
R	0.410	0.264	1.268	1.124

从极差分析表可知,以熊果酸为考察因子,不同因素水平综合评分: $A_1 > A_2 > A_3, B_2 > B_3 > B_1, C_2 > C_3 > C_1, D_3 > D_2 > D_1$,4个因素的极差大小顺序为 $R_C > R_D > R_A > R_B$,影响枇杷悬浮细胞中熊果酸提取因素的显著性次序为料液比>提取次数>提取功率>提取时间。因而在试验设计的范围内,最佳的试验方案为 $A_1B_2C_2D_2$,即为第2组试验。即枇杷细胞中提取熊果酸的最佳试验方案为:超声功率50 W,超声时间25 min,料液比1:40,超声次数2次。

3.5 试验最佳方案的加样回收率分析

本试验精确称量了1.0 mg UA 加入到0.5 g 样品中,按正交筛选的提取方法进行提取、检测、分析。样品测定平均值为5.035 mg,增加了0.5 g 标样的样品测定平均值为6.028 mg,该方法的平均加样回收率为99.3%。

3.6 加盐酸浓度对 UA 提取量的影响

以95%乙醇为提取剂,以收集方法A采集样品,超声功率50 W,超声时间25 min,料液比1:40,超声次数2次。该条件下,研究盐酸浓度对样品中UA提取量的影响。

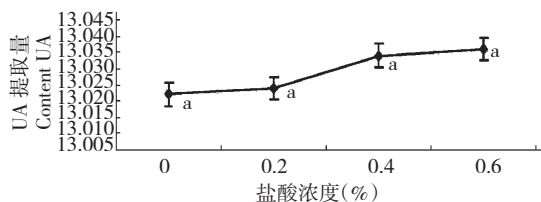


图3 盐酸浓度对 UA 提取量的影响

Fig. 3 Effect of HCl concentration on UA content

注:邓肯新复极差法,5%差异水平

Note: Duncan's multiple range test at 5% level

如图3所示,随着盐酸浓度的增加,样品中UA提取量变化缓和,数据经分析没有显著性差异,可以认为在提取溶剂中加入盐酸并没有显著影响UA的提取量。

4 讨论

4.1 枇杷细胞悬浮培养产物中的熊果酸主要以游离态存在

研究表明:熊果酸在植物中主要以游离态或者

以糖苷化合物存在^[2]。枇杷叶中熊果酸主要以游离态形式存在^[7]。枇杷细胞悬浮培养物通过离心收集(方法A)表面有胶状物,可能为多糖,通过水洗或过滤(方法B和C)收集的培养物表面没有胶状物,方法A的UA含量显著低于方法B和C。收集到的培养物(表面有胶状物,可能为多糖)经加盐酸提取UA含量没有显著变化。即,方法A表面的胶状物质(可能为多糖)在样品中占有一定质量,但没有UA含量,经酸破坏糖苷键后,UA含量仍无显著差异。说明枇杷细胞悬浮培养产物中的熊果酸主要也以游离态存在。

4.2 悬浮培养液中的枇杷细胞收集、提取、测定 UA 含量的工艺

研究表明:试验室中,枇杷材料的熊果酸提取方法主要有超临界二氧化碳萃取、亚临界水萃取、回流法、索氏提取、超声法等^[5-8]。这些方法各具一定优缺点。超临界二氧化碳萃取与亚临界水萃取优点为溶剂无污染,其缺点是需一定设备,有噪音,得率稍低。索氏提取、回流法,较耗时间。相较而言,超声法较便捷。本试验在枇杷材料超声波提取方法(乙醇浸泡1~2 h,提取时间30~40 min,料液比1:30~1:40,40 KHz;50~75 °C,提取次数2~3次,原料药中熊果酸的含量在0.2%~0.9%)^[7-11]的基础上,以枇杷悬浮细胞培养物为材料,与其它枇杷材料相比,悬浮培养的枇杷细胞易于干燥研磨,可能少含或不含脂类、树脂类、叶绿素等成分。研究表明:悬浮培养的植物细胞具有均匀,同质,可调控的优点,是各种试验的优质材料,在转基因、植物载体表达目的蛋白等研究领域有着重要地位^[10,11]。通过单因素及正交试验探讨了悬浮培养液中的枇杷细胞快速简便收集、提取、测定UA的含量。其适宜的收集方法为枇杷悬浮培养细胞液经4层医用纱布布式漏斗抽滤收集,50 °C烘干至恒重,研磨。其适宜的超声波提取条件为:以95%乙醇为提取剂,超声功率50 W,超声时间25 min,料液比1:40,超声次数2次。其适宜的HPLC色谱条件为:流动相由甲醇和水-冰乙酸-三乙胺=1:0.03:0.06(体积比)两相组成,两相体积比为83:17;流速是1.0 mL/min;检测波长是203 nm;柱温是30 °C;进样体积是20 μL。该条件

下,熊果酸的加样回收率为 99.3%。与其它枇杷材料超声波提取方法相比,本方法无需浸泡,加热,缩短了超声时间,降低了超声功率,虽料液比较高,一方面溶剂可以回收重复利用,另一方面说明悬浮培养的枇杷细胞中 UA 的得率较其它枇杷材料更高。本研究的方法可满足实验室对悬浮培养液中的枇杷细胞快速简便收集、提取、UA 含量的检测。今后放大培养以及工厂化培养的枇杷细胞悬浮培养物需要结合其它方法进一步研究。

参考文献

- Huang J(黄镜),Sun Y(孙燕). The anti tumor activity of ursolic acid. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志),1997,6:101-104.
- Cheng W(陈武),Xiong XJ(熊筱娟),Li KQ(李开泉),*et al.* Research on chemistry, pharmacology and clinic about ursolic acid. *J Yichun Med Coll*(宜春医专学报),2001,13:123-126.
- Zhao ZD(赵志栋),Gao N(高宁). Advances of molecular mechanism of ursolic acid-mediated anti-cancer activity. *Chin J Can Prev Treat*(中华肿瘤防治杂志),2011,18:1969-1972.
- Wu L(吴梨),Zhao W(赵伟),Yang RJ(杨瑞金). Progress of isolation and purification of ursolic acid from *Eriobotrya japonica*. *J Beijing Tech Bus Univ, Natl Sci Ed*(北京工商大学学报,自科版),2011,29(6):50-53.
- Xiang YY(相延英),Yang X(杨昕),Yang G(杨光),*et al.* Extraction technology of ursolic acid from loquat leaves with alcohol. *Her Med*(医药导报),2005,24:144-145.
- Zhang J(张静),Liu Y(刘艺),Yin F(殷飞),*et al.* Study on the conditions of extracting ursolic acid from loquat leaves. *Food Ind*(食品工业),2005,3:22-24.
- Li KQ(李开泉),Xiong ZX(熊知行). Study on ultrasonic extraction effect of ursolic acid from loquat leaf. *Jiang Su Agri Sci*(江苏农业科学),2009,2:251-252.
- Zhang HE(张慧恩),Zhang FQ(张飞强),Wang CX(王彩霞),*et al.* Optimization of supercritical fluid extraction of ursolic acid from *Follum eriobotryae* by response surface methodology. *J Chin Med Mater*(中药材),2011,34:1600-1604.
- Ho HY, Liang KY, Lin WC, *et al.* Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl. *J Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110:588-592.
- Mustafa NR, *et al.* Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc*, 2011, 6:715-742.
- Sivanandhan G, *et al.* A promising approach on biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.). *Dunal Protoplasma*, 2013, 250:885-898.