

香蜂花中迷迭香酸的提取工艺优选

张峻颖¹, 付璞², 朱孝云³, 吴春勇^{4*}

(1. 中国药科大学中药制剂教研室, 南京 211198; 2. 青岛市市立医院药学部, 山东 青岛 266000;
3. 上海医药工业研究院, 上海 200040; 4. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

[摘要] 目的: 优选香蜂花中迷迭香酸的提取工艺。方法: 以迷迭香酸含量为指标, 通过单因素试验考察提取溶剂、提取方式、提取时间及溶剂用量对工艺的影响, 采用正交试验考察提取次数、提取时间和加醇量对迷迭香酸含量的影响, 优选香蜂花的提取工艺。采用 HPLC 测定迷迭香酸含量, 色谱条件为 Hanbon Megres C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲酸-乙腈-水 (0.5:20:80, A) 与甲酸-甲醇-乙腈 (0.5:40:60, B) 梯度洗脱 (0~25 min, 0%~45% B; 25~30 min, 45%~100% B), 检测波长 330 nm, 进样量 20 μL。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h; 迷迭香酸平均提取量达 25.27 mg·g⁻¹。结论: 优选的工艺稳定可行, 为香蜂花的资源开发提供参考。

[关键词] 香蜂花; 迷迭香酸; 提取工艺; 单因素试验; 正交试验; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)23-0007-04

[doi] 10.11653/syfy2013230007

Optimization of Extraction Technology for Rosmarinic Acid in *Melissa officinalis* L.

ZHANG Jun-ying¹, FU Ying², ZHU Xiao-yun³, WU Chun-yong^{4*}

(1. Department of Pharmacellitics of Traditional Chinese Medicines,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Department of Pharmacy, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000, China;

3. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China;

[收稿日期] 20130729(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81102819); 江苏省自然科学基金项目 (BK2012358); 中央高校基本科研业务费专项基金 (JKQ2011023)

[第一作者] 张峻颖, 博士, 讲师, 从事中药新剂型及质量分析研究, Tel:025-86185252, E-mail:ivy366300@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 吴春勇, 博士, 副教授, 从事药物分析研究, Tel:025-83271269, E-mail:analysis99@126.com

- [4] 程文明, 张明, 李俊, 等. 大孔树脂纯化野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(9):1508.
- [5] 孟兆青, 丁岗, 柳子介, 等. 异长春花苷内酰胺大孔树脂纯化研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8):1007.
- [6] 丁轲, 崔莹, 陆晶晶, 等. SP700 大孔树脂纯化酸枣仁中三萜总皂苷的研究[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(1):33.
- [7] 王锋, 刘雪松, 陈勇, 等. 酸枣仁皂苷大孔树脂纯化工艺及 HPLC-ELSD 测定方法研究[J]. 中药材, 2010, 33(8):1343.
- [8] 杨军宣, 吴天骄, 尹蓉莉, 等. 正交设计法优选酸枣仁皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12):63.
- [9] 李果, 王静, 李祖伦. 大孔树脂纯化酸枣仁皂苷工艺研究[J]. 中国药房, 2006, 17(15):1191.
- [10] 崔瑛, 刘菊, 张卫娜. 大孔树脂纯化酸枣仁醇提取物工艺研究[J]. 中成药, 2009, 31(7):1035.
- [11] 丁轲, 谷禹, 陆晶晶, 等. 酸枣仁黄酮组分提取纯化工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(4):62.
- [12] 王勇, 魏娜, 朱智云. 酸枣仁药材总黄酮提取工艺研究[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(7):882.

[责任编辑 仝燕]

4. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] Objective: To optimize extraction technology of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*.

Method: With the content of rosmarinic acid as index, based on single factor tests, effects of extraction time, extraction times and the amount of ethanol on extraction technology were investigated by orthogonal test. HPLC was employed to determine the content of rosmarinic acid and the chromatographic conditions were as follows: Hanbon Megres C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of formic acid-acetonitrile-water (0.5:20:80, A) and formic acid-methanol-acetonitrile (0.5:40:60, B) with gradient elution program (0-25 min, 0% -45% B; 25-30 min, 45% -100% B), detection wavelength 330 nm, injection volume 20 μL. Result: Optimal extraction technology was as following: extracted 3 times with 10 times the amount of 70% ethanol, 1 h each time; Yield of rosmarinic acid was up to 25.27 mg · g⁻¹. Conclusion: Optimized technology was stable and feasible to provide a reference for resource development of *M. officinalis*.

[Key words] *Melissa officinalis*; rosmarinic acid; extraction technology; single factor test; orthogonal test; HPLC

香蜂花又名香蜂草、蜜蜂花,其茎叶具有独特的柠檬芳香,含有较高的营养价值,并具有药用功效。香蜂花原产于地中海沿岸,在欧洲、中亚、北美、亚洲均可找到,我国已有引种栽培^[1-2]。香蜂花在国外常作为温和的镇静剂、解痉剂、抗菌剂被广泛使用,并收载于《欧洲药典》。其叶中含酚酸类、挥发油、黄酮类等多种成分^[3-6],具有镇静、抗肠胃气胀、解痉、抗菌和抗病毒等多种药理活性^[7-9]。

2010年版《中国药典》尚未收录香蜂花药材,其主要活性成分迷迭香酸的提取工艺研究尚未见报道。迷迭香酸具有很强的抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、免疫抑制等作用^[10],被广泛用于食品、化妆品、医药等产业,《欧洲药典》将迷迭香酸含量作为香蜂花药材的质量评价指标。本实验采用热回流技术从香蜂花中提取迷迭香酸,通过单因素试验和正交试验优化迷迭香酸的提取工艺,为香蜂花药材的综合开发利用提供实验依据。

1 材料

LC-2010C 型高效液相色谱仪 (CLASS-VP 型色谱工作站,日本岛津公司), AB135-S 型电子分析天平 (梅特勒-托利多公司), Milli-Q 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司), 旗箭 Q-250A3 型高速多功能粉碎机 (上海冰都电器有限公司)。

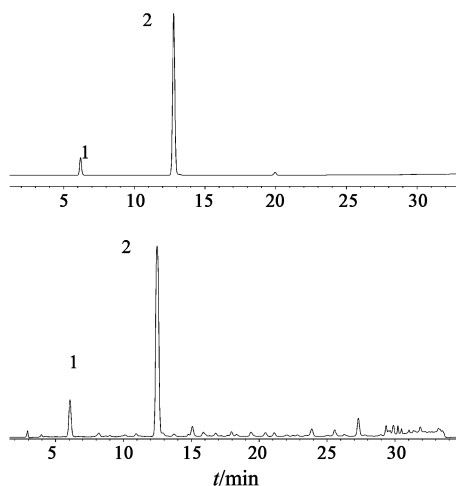
香蜂花叶 (购自云南,经中国药科大学中药学院黄罗生副教授鉴定为香蜂花 *Melissa officinalis* L. 的新鲜叶,采收后自然阴干), 迷迭香酸对照品 (批号 120809,纯度 > 98%,南京泽郎医药科技有限公司), 咖啡酸对照品 (批号 110885-200102,中国食品药品检定研究院), 甲醇、乙腈为色谱纯,水为去离

子水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 迷迭香酸的含量测定

2.1.1 色谱条件^[11-12] Hanbon Megres C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲酸-乙腈-水 (0.5:20:80, A) 与甲酸-甲醇-乙腈 (0.5:40:60, B) 梯度洗脱 (0 ~ 25 min, 0% ~ 45% B; 25 ~ 30 min, 45% ~ 100% B), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 330 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 咖啡酸; 2. 迷迭香酸

图 1 香蜂花 HPLC

2.1.2 溶液的制备

2.1.2.1 对照品溶液 取迷迭香酸对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释,得迷迭香酸质量浓度 6.0 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.2.2 供试品溶液 取香蜂花叶样品,粉碎成粗粉,取约 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加一定量

70%乙醇浸泡 30 min,加热回流提取,过滤,取续滤液并定容至 100 mL,即得。

2.1.3 线性关系考察 精密量取不同体积的对照品溶液,用流动相 A 定量稀释,制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样,记录色谱图,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 5.87 \times 10^4 X + 8.36 \times 10^3$ ($r = 0.9997$),线性范围 6.0 ~ 300.0 mg·L⁻¹。

2.1.4 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD 0.90%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,于室温下密闭避光保存,分别在 0,2,4,8 h 进样分析,记录峰面积,计算 RSD 0.87%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批香蜂花叶粗粉约 0.5 g,共 6 份,精密称定,按 2.1.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样,结果表明迷迭香酸含量的 RSD 1.28%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 取已知含量的同一批香蜂花叶粗粉约 0.25 g,共 6 份,精密称定,置圆底烧瓶中,分别精密加入对照品溶液(迷迭香酸质量浓度 6.0 g·L⁻¹)0.5 mL,按 2.1.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果迷迭香酸的加样回收率 102.0%,RSD 1.87%。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取溶剂 精密称定香蜂花叶粗粉适量,共 4 份,分别加入 10 倍量水和体积分数为 30%,50%,70%的乙醇溶液浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次 1 h,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果表明以 70%乙醇作为提取溶剂时所得迷迭香酸含量最高。

2.2.2 提取方式 精密称定香蜂花叶粗粉适量,共 2 份,各加入 10 倍量 70%乙醇浸泡 30 min,分别进行回流提取 1 h 和超声波辅助提取 1 h,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果表明回流提取所得迷迭香酸含量较高。

2.2.3 提取时间 精密称定香蜂花叶粗粉适量,共 4 份,各加入 10 倍量 70%乙醇浸泡 30 min,分别回流提取 1,1.5,2,2.5 h,按 2.1.2.2 项下方法制备供试品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果显示提取 1 h 所得迷迭香酸的含量最高,而提取 2 h 后,迷迭香酸含量稍有下降,

故提取时间选择 0.5,1,1.5 h 共 3 个水平。

2.2.4 溶剂用量 精密称定香蜂花叶粗粉适量,共 5 份,分别加入 6,8,10,12,15 倍量 70%乙醇浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次 1 h,按 2.1.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果表明迷迭香酸含量随乙醇用量的增加而增加,以 12 倍量 70%乙醇为提取溶剂时迷迭香酸含量最高,故溶剂用量选取 8,10,12 倍量进行考察。

2.3 正交试验优选 在单因素试验基础上,以迷迭香酸含量为考察指标,选取提取次数、提取时间、加醇量为考察因素,每个因素设 3 个水平,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验筛选最优处方,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 香蜂花中迷迭香酸的提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取数/次	B 提取时间/h	C 加醇量/倍
1	1	0.5	8
2	2	1.0	10
3	3	1.5	12

表 2 香蜂花中迷迭香酸的提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	迷迭香酸/mg·g ⁻¹
1	1	1	1	9.99
2	1	2	2	13.04
3	1	3	3	11.17
4	2	1	2	20.07
5	2	2	3	21.73
6	2	3	1	14.82
7	3	1	3	21.85
8	3	2	1	19.80
9	3	3	2	23.19
K ₁	11.400	17.303	14.870	
K ₂	18.873	18.190	18.767	
K ₃	21.613	16.393	18.250	
R	10.213	1.797	3.897	

表 3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	167.670	2	83.835	34.465	<0.05
B	4.842	2	2.421	0.995	>0.05
C	26.875	2	13.438	5.524	>0.05
D(误差)	4.87	2	2.435		

从直观分析可知,各因素对迷迭香酸含量的影响顺序为 A > C > B。方差分析结果表明提取次数对迷迭香酸含量的影响具有显著性差异,而提取时

间和加醇量则对迷迭香酸含量的影响无显著性差异,确定最佳水平为 $A_3B_2C_2$,即加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。

2.4 验证试验 称取香蜂花叶粗粉 3 份,每份 0.5 g,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,结果迷迭香酸平均提取量 $25.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 0.6%,说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

目前,各版《中国药典》和各地方药材标准中均未见香蜂花药材的质量标准,而前期研究发现迷迭香酸和咖啡酸是香蜂花叶中主要酚类成分,但咖啡酸含量较低,不足迷迭香酸的 10%,故仅选取迷迭香酸含量为考察指标优选香蜂花的提取工艺。

香蜂花中成分较多,等度条件下极性较弱成分的洗脱时间太长,故选用梯度洗脱,可得到分离度好、出峰时间适宜的各组分色谱峰;在流动相中加入 0.5% 甲酸时可有效抑制酚酸解离,使色谱峰的峰形尖锐,并能有效减少拖尾现象的产生。

迷迭香酸属多酚类化合物,结构不稳定,对光照、金属离子等均比较敏感^[13],故在提取过程中,宜采取避光条件、使用去离子水等措施。在单因素试验考察中,发现提取 1 h 所得迷迭香酸含量最高,而提取 2 h 后迷迭香酸含量反而稍有下降,这可能与长时间回流提取导致小部分迷迭香酸发生降解有关,与文献报道的温度对迷迭香酸稳定性略有影响的观点一致^[13],因此在回流提取过程中提取时间不宜过长;曾尝试使用超声波提取法,但该法所得迷迭香酸的含量较低,故不适合作为香蜂花中迷迭香酸的提取方法。

[参考文献]

[1] Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, et al. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 25(4): 2753.
[2] 陈银龙. 香蜂花的组织培养与快速繁殖 [J]. *植物生*

理学通讯, 2007, 43(3): 513.
[3] Sharafzadeh S, Khosh-khui M, Javidnia K. Aroma profile of leaf and stem of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown under greenhouse conditions [J]. *Adv Environ Biol*, 2011, 5(4): 547.
[4] Basta A, Tzakou O, Couladis M. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* L. from Greece [J]. *Flavour Fragr J*, 2005, 20(6): 642.
[5] Weitzel C, Petersen M. Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. [J]. *Phytochem*, 2011, 72(7): 572.
[6] Adinee J, Piri K, Karami O. Essential oil component in flower of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) [J]. *Am J Biochem Biotech*, 2008, 4(3): 277.
[7] Serrilli A M, Battinelli L, Pompeo C, et al. Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. extract on *Herpes simplex virus type 2* replication [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(16): 1433.
[8] Sousa A C, Gattass C R, Alviano D S, et al. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(5): 677.
[9] 郑辉申, 万祥荆, 颖艾莎, 等. 香蜂草药学研究进展 [J]. *心血管病防治知识: 学术版*, 2012(4): 50.
[10] Moreno S, Scheyer T, Romano C S, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(2): 223.
[11] 王琿, 张振秋. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5): 116.
[12] 厉瑶, 郭正泰, 龚行楚, 等. 丹参红花混煎液中丹参素、羟基红花黄色素 A、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸 B 的 HPLC 测定方法 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(11): 1653.
[13] 侯建春, 吕晓玲, 周平, 等. 迷迭香酸的稳定性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(3): 44.

[责任编辑 全燕]