

## HPLC 同时测定香蜂花药材中的 3 种有效成分

张峻颖<sup>1</sup>, 冯超<sup>2</sup>, 徐雪<sup>2</sup>, 张雷<sup>3</sup>, 吴春勇<sup>2,4\*</sup>

- (1. 中国药科大学中药制剂教研室, 南京 211198; 2. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009;  
3. 山东省食品药品检验所, 济南 250101;  
4. 药物质量与安全预警教育部重点实验室(中国药科大学), 南京 210009)

[摘要] 目的:建立一种同时测定香蜂花药材中迷迭香酸、咖啡酸和咖啡酸乙酯含量的 RP-HPLC 分析法。方法:Hanbon Megres C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 为甲酸-乙腈-水(0.5:20:80), B 为甲酸-甲醇-乙腈(0.5:40:60), 梯度洗脱(0%~25 min, 0%~45% B; 25%~30 min, 45%~100% B; 30%~30.1 min, 100%~0% B), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 330 nm。结果:迷迭香酸、咖啡酸和咖啡酸乙酯分别在 6.0~300.0, 0.15~7.5 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.15~7.5 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好, 平均加样回收率(n=6)分别为 99.48%, 99.56%, 101.7%。结论:该方法准确, 简便, 适用于香蜂花药材的质量分析检验。

[关键词] 香蜂花; 迷迭香酸; 咖啡酸; 咖啡酸乙酯; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)24-0078-04

[doi] 10.11653/syfy2013240078

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131011.1513.008.html>

[网络出版时间] 2013-10-11 15:13

## Simultaneous Determination of Three Active Components in *Melissa officinalis* by HPLC

ZHANG Jun-ying<sup>1</sup>, FENG Chao<sup>2</sup>, XU Xue<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>3</sup>, WU Chun-yong<sup>2,4\*</sup>

- (1. Department of Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China; 4. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (China Pharmaceutical University), Ministry of Education, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study is to simultaneously determine the content of rosmarinic acid, caffeic acid and ethyl caffeate in *Melissa officinalis* by RP-HPLC. **Method:** Hanbon Megres C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase consisted of formic acid-acetonitrile-water (0.5:20:80) and formic acid-methanol-acetonitrile (0.5:40:60) with gradient elution program (0-25 min, 0%-45% B; 25-30 min, 45%-100% B; 30-30.1 min, 100%-0% B). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was set at 35 °C and the detection wavelength was 330 nm. **Result:** The linear ranges of rosmarinic acid, caffeic acid and ethyl caffeate were 6.0-300.0, 0.15-7.5 and 0.15-7.5 mg·L<sup>-1</sup> respectively. The average recoveries (n=6) for the sample preparation of the markers were 99.48%, 99.56%, and 101.7% respectively. **Conclusion:** The quantitative method for rosmarinic acid, caffeic acid and ethyl caffeate by HPLC can provide the

[收稿日期] 20130717(002)

[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(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

basis for quality control of *M. officinalis*.

**[Key words]** *Melissa officinalis*; rosmarinic acid; caffeic acid; ethyl caffeate; HPLC

香蜂花又名香蜂草、柠檬香蜂草、蜜蜂花、马薄荷、马大拿、美国薄荷、长叶薄荷、野香柠檬、梦娜薄荷,为唇形科蜜蜂花属多年生草本植物。原产苏联、伊朗至地中海及大西洋沿岸,目前广泛种植于欧洲、中亚和北美地区,我国已有引种栽培<sup>[1-2]</sup>。在国外,香蜂花作为温和的镇静剂、解痉剂、抗菌剂而被广泛使用,其药用部位是叶,含酚酸类、挥发油、黄酮类等多种成分<sup>[3-6]</sup>。近年来国内外对香蜂花的药理作用研究非常火热,研究表明其具有镇静、抗肠胃气胀、解痉、抗菌和抗病毒等多种药理活性<sup>[7-9]</sup>。

目前,对于我国栽培的香蜂花的质量研究鲜有报道。2010年版《中国药典》中尚未收录香蜂花药材的质量标准,在临床使用中存在安全性和有效性问题。我们的前期研究发现迷迭香酸、咖啡酸和咖啡酸乙酯是香蜂花叶中的主要酚类成分。迷迭香酸具有抗炎抗菌活性和很强的抗氧化性;咖啡酸能抗菌抗病毒,还具有提高凝血因子的功能,可升高白细胞和血小板;咖啡酸乙酯在清除和抑制自由基、抗肿瘤、抗菌以及抗病毒等方面具有显著的作用<sup>[7-9]</sup>。为更全面评价香蜂花药材的质量,本文采用高效液相色谱法建立了同时测定香蜂花叶中迷迭香酸、咖啡酸和咖啡酸乙酯的含量测定方法,可用于香蜂花叶的定量分析,为其资源的开发利用及质量控制提供理论依据。

## 1 材料

岛津 LC-2010C 型液相色谱仪(配四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器和 CLASS-VP 色谱工作站,日本 Shimadzu 公司),KH-250DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司),AB135-S 型电子天平(梅特勒 Mettler Toledo),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)。

香蜂花叶采自云南,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,中国药品生物制品检定所),咖啡酸乙酯对照品(批号 111678-200401,中国药品生物制品检定所)。甲醇与乙腈为色谱纯(TEDIA),其他试剂均为分析纯,水为去离子水。

## 2 方法与结果

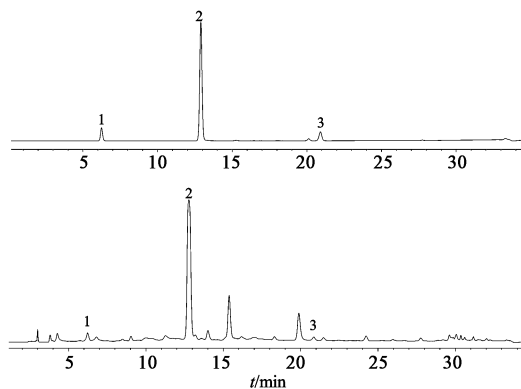
**2.1 色谱条件**<sup>[10]</sup> Hanbon Megres C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 甲酸-乙腈-水(0.5:20:80),B 甲酸-甲醇-乙腈(0.5:40:60),梯度洗脱(0% ~ 25 min, 0% ~ 45% B; 25 ~ 30 min, 45% ~ 100% B; 30 ~ 30.1 min, 100% ~ 0% B),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 330 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液** 取咖啡酸、迷迭香酸、咖啡酸乙酯对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解后作为对照品储备液。精密量取各储备液适量,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得咖啡酸、迷迭香酸、咖啡酸乙酯的质量浓度分别为 0.15, 6.00, 0.15 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取香蜂花叶样品,用粉碎机粉碎后,取约 0.1 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,精密加入 20 mL 70% 乙醇,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.3 系统适用性试验** 分别吸取混合对照品溶液和供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样,记录色谱图。结果表明,在上述色谱条件下,咖啡酸、迷迭香酸和咖啡酸乙酯的保留时间分别约为 6.2, 12.8, 20.9 min, 3 种成分分离良好,对照品和供试品的典型色谱图见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品; 1. 咖啡酸;  
2. 迷迭香酸; 3. 咖啡酸乙酯

图 1 香蜂花 HPLC

**2.4 线性关系考察** 精密量取不同体积的混合对照品溶液,用流动相 A 定量稀释,制得 6 个不同质

量浓度的混合对照品溶液,其中迷迭香酸分别为 6, 24,60,120,240,300 mg·L<sup>-1</sup>,咖啡酸与咖啡酸乙酯分别为 0.15,0.6,1.5,3,6,7.5 mg·L<sup>-1</sup>。按上述 HPLC 条件进样测定,记录色谱图。以对照品质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性关系考察,得咖啡酸的回归方程为  $A = 1.38 \times 10^5 C + 2.87 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围为 0.15 ~ 7.5 mg·L<sup>-1</sup>。迷迭香酸的回归方程为  $A = 5.87 \times 10^4 C + 8.36 \times 10^3$  ( $r = 0.9997$ ),线性范围为 6.0 ~ 300.0 mg·L<sup>-1</sup>。咖啡酸乙酯的回归方程为  $A = 1.58 \times 10^5 C + 8.80 \times 10^2$  ( $r = 1.0000$ ),线性范围为 0.15 ~ 7.5 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.5 精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液适量,按上述 HPLC 条件连续进样 6 次,测定峰面积,咖啡酸、迷迭香酸与咖啡酸乙酯峰面积的 RSD 分别为 0.78%,0.90%,1.02%,表明仪器精密度良好。

**2.6 溶液稳定性试验** 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,咖啡酸、迷迭香酸和咖啡酸乙酯峰面积的 RSD 分别为 1.63%,1.68%,1.41%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

**2.7 重复性试验** 取同一批香蜂花叶粗粉约 0.1 g,共 6 份,精密称定,按 2.2.2 项下的方法制备供试品溶液,依法测定,计算各成分的含量。结果表明,咖啡酸、迷迭香酸和咖啡酸乙酯含量的 RSD 分别为 1.25%,0.58%,1.97%,表明本方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量的同一批香蜂花叶粗粉(咖啡酸含量为 0.37 mg·g<sup>-1</sup>,迷迭香酸含量为 14.91 mg·g<sup>-1</sup>,咖啡酸乙酯含量为 0.09 mg·g<sup>-1</sup>)约 0.05 g,共 6 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 0.1 mL 混合对照品溶液(咖啡酸、迷迭香酸和咖啡酸乙酯的质量浓度分别为 0.15,6.00,0.15 g·L<sup>-1</sup>),按供试品溶液的制备方法处理,测定,计算加样回收率,结果见表 1。

**2.9 样品测定** 取各批香蜂花叶粗粉,精密称定,照 2.2.2 项下的方法制备供试品溶液,依法测定,记录峰面积。每份样品重复测定 3 次,按外标法计算样品中咖啡酸、迷迭香酸和咖啡酸乙酯的含量,结果见表 2。

### 3 讨论

曾尝试甲酸-乙腈-水和甲酸-甲醇-乙腈-水系统进行等度洗脱,发现香蜂花中成分较多,等度条件下极性较低成分洗脱时间太长,故选用梯度洗脱,可得

表 1 香蜂花药材中 3 种成分加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
咖啡酸	0.018 6	0.015	0.033 4	98.67	99.56	1.32
	0.018 5	0.015	0.033 3	98.67		
	0.019 0	0.015	0.033 9	99.33		
	0.019 6	0.015	0.034 9	102.00		
	0.018 1	0.015	0.032 9	98.67		
	0.018 6	0.015	0.033 6	100.01		
迷迭香酸	0.714 5	0.6	1.320 1	100.93	99.48	1.59
	0.707 7	0.6	1.313 9	101.03		
	0.729 8	0.6	1.321 2	98.57		
	0.750 3	0.6	1.336 5	97.70		
	0.695 2	0.6	1.282 7	97.92		
	0.714 9	0.6	1.319 1	100.70		
咖啡酸乙酯	0.004 5	0.015	0.019 8	102.00	101.7	1.42
	0.004 5	0.015	0.019 9	102.67		
	0.004 6	0.015	0.019 9	102.00		
	0.004 8	0.015	0.019 7	99.33		
	0.004 8	0.015	0.019 9	100.67		
	0.004 5	0.015	0.020 0	103.33		

表 2 香蜂花药材含量测定

批号	咖啡酸	迷迭香酸	咖啡酸乙酯
120711	0.37	14.91	0.09
120811	0.54	28.18	0.12
120817	0.72	26.54	0.11

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 0.05% ~ 1% 的甲酸,考察对峰形和分离度的影响,结果表明流动相中含有 0.5% 的甲酸时可有效抑制酚酸解离,色谱峰的峰形尖锐,并能有效地减少拖尾现象的产生。

试验中曾对比了回流提取 1 h 和超声波辅助提取 1 h 2 种提取条件,结果表明,回流提取所得迷迭香酸、咖啡酸和咖啡酸乙酯含量最高,故选择回流提取为提取方法。同时考察了 30%,50%,70% 的乙醇作为提取溶剂的情况,结果表明迷迭香酸和咖啡酸乙酯在 70% 乙醇中提取率最高,而咖啡酸在 50% 乙醇中提取率最高。香蜂花中咖啡酸的含量非常低,不足迷迭香酸的 10%,综合考虑用 70% 乙醇为提取溶剂。迷迭香酸属多酚类化合物,结构不稳定,对光照、金属离子等都比较敏感,所以提取时应避免其降解。

# 黄白甘草洗剂的 HPLC 指纹图谱研究

段渠<sup>1\*</sup>, 林俊芝<sup>1</sup>, 张定堃<sup>2</sup>

(1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:建立黄白甘草洗剂的 HPLC 指纹图谱的检测方法。方法:采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 237 nm,对 10 批黄白甘草洗剂进行 HPLC 指纹图谱检测,采用“中药色谱指纹图谱评价系统 2004 年 A 版”进行评价。结果:黄白甘草洗剂采用该方法分离效果好,确定了 20 个共有峰,10 批洗剂的相似度均 >0.9。结论:该方法重复性、稳定性好,建立的指纹图谱可为黄白甘草洗剂的质量评价提供依据。

**[关键词]** 黄白甘草洗剂; 高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度评价

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0081-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013240081

## Study on the HPLC Fingerprint of Huangbai Gancao Lotion

DUAN Qu<sup>1\*</sup>, LIN Jun-zhi<sup>1</sup>, ZHANG Ding-kun<sup>2</sup>

(1. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;  
2. Chengdu University of TCM, College of Pharmacy, Chengdu 611137, China)

**[收稿日期]** 20130812012

**[基金项目]** 四川省教育厅课题(P09304)

**[通讯作者]** \* 段渠,副研究员,硕士生导师,从事中医美容的临床实验研究及皮外科特色制剂研究,E-mail:duanqu@126.com

欧洲药典 7.0 版已收载香蜂花叶,但含量测定中仅规定迷迭香酸一种成分。我们的前期研究发现迷迭香酸,咖啡酸及咖啡酸乙酯为香蜂花的主要酚类成分。本实验建立了 RP-HPLC 法同时测定香蜂花中迷迭香酸、咖啡酸和咖啡酸乙酯的含量,实验结果表明,方法简便快速,结果准确,重复性好,可为香蜂花的质量控制提供依据。

### [参考文献]

[1] 吴征镒,李锡文. 中国植物志. 第 66 卷[M]. 北京:科学出版社,1977:214.  
[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] Adinee J, Piri K, Karami O. Essential oil component in flower of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) [J]. Am J Biochem Biotech, 2008(4):277.  
[4] Weitzel C, Petersen M. Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L [J]. Phytochemistry, 2011, 72(7):572.

[5] Basta A, Tzakou O, Couladis M. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* L. from Greece [J]. Flavour Fragr J, 2005(20):642.  
[6] 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 Env Biol, 2011,5(4):547.  
[7] 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.  
[8] Mazzanti G, 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.  
[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] 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.

[责任编辑 顾雪竹]