

# 夏枯草中活性成分迷迭香酸的提取分离、 结构鉴定与富集

林丽美<sup>1</sup>, 许招懂<sup>1</sup>, 闫积彪<sup>2</sup>, 刘菊妍<sup>3</sup>, 王智民<sup>4\*</sup>

(1. 广州星群(药业)股份有限公司, 广东 广州 510288; 2. 中国铝业公司青海分公司, 青海 西宁 810108;  
3. 广州医药集团有限公司, 广东 广州 510130; 4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立夏枯草中活性成分迷迭香酸的快速分离、结构鉴定与富集的方法。方法: 采用回流提取, 硅胶柱粗砍断, 反相柱细分, 半制备柱纯化样品得到目标化合物迷迭香酸, 再利用化合物的理化性质, 质谱和核磁等波谱学技术鉴定结构。结果: 快速地从夏枯草中分离、鉴定和富集到迷迭香酸。结论: 该方法简单, 可重复性强, 为下一步进行夏枯草的质量标准和迷迭香酸的药效研究奠定基础。

[关键词] 夏枯草; 迷迭香酸; 活性成分

[中图分类号] R284.2 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)08-0035-03

## The Extraction, Preparation and Identification of Active Component of Rosmarinic Acid from *Prunella vulgaris*

LIN Li-mei<sup>1</sup>, XU Zhao-dong<sup>1</sup>, YAN Ji-biao<sup>2</sup>, LIU Ju-yan<sup>3</sup>, WANG Zhi-min<sup>4\*</sup>

(1. Guangzhou Xingqun Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Guangzhou 510288, China;

2. Qinghai Branch China Aluminium Co., Ltd., Qinghai Xining 810108, China;

3. Guangzhou Pharmaceutical Holdings Ltd., Guangdong Guangzhou 510130, China;

4. Institute of Materia Chinese Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of quick extraction, preparation and identification for rosmarinic acid from *Prunella vulgaris*. **Methods:** Rosmarinic acid were prepared from the flower of *Prunella vulgaris* L. by silica gel

夏枯草为唇形科夏枯草属植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗, 具有清火、明目、散结、消肿之功效<sup>[1]</sup>。迷迭香酸是夏枯草的主要活性成分之一, 具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎活性和免疫抑制活性、抗血栓、抑制黄嘌呤氧化酶、抗抑郁活性、保护神经元细胞等作用<sup>[2]</sup>。因此, 本文报道夏枯草中主要活性成分迷迭香酸的快速分离, 结构鉴定与富集, 为继续深入研究夏枯草的质量标准和迷迭香酸的药效奠定基础。

## 1 仪器、试剂和样品

**1.1 仪器** 提取分离: SHZ-D 循环水式真空泵(河南巩义市英峪华中仪器厂); RE-85A 型旋转蒸发仪(巩义市英峪华仪器厂); 10000ML 电热套(天津市泰斯特仪器公司); Semi-preparative HPLC 使用 Waters 510 型泵, Ezchrom 工作站, Waters 2487 UV 检测器, Altech ODS(7  $\mu\text{m}$ , 10.7 mm  $\times$  250 mm) 半制备柱。结构鉴定: Bruker AM-500 型核磁共振仪; Zabspec E 型质谱仪。

**1.2 试剂** 氯仿、乙酸乙酯、甲醇、石油醚等均为分析纯(北京化工厂), 薄层层析硅胶所用 GF<sub>254</sub> 普通薄层板为青岛海洋化工厂产品, 反相薄层板为 Merck 公司产品; 柱层析硅胶(60~100 目, 100~200 目)为青岛海洋化工厂, 球形反相硅胶为 40~70  $\mu\text{m}$ (Fuji 公司); Sephadex LH-20 凝胶(Pharmacia 公司); 半制备高效液相所用乙腈(Tedia 公司), 冰醋酸为分析级, 水为娃哈哈纯净水。显色剂为 1% 香草醛浓硫酸。

**1.3 样品** 夏枯草药材 10 kg 购于安国药材市场, 经湖南中医药大学学生药室刘塔斯教授鉴定为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法

**2.1.1 提取** 夏枯草药材 10 kg, 用 5 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 冷却后滤出药液, 回收至干。

**2.1.2 分离** 将回收干的样品用水捏溶, 用石油醚萃取, 弃去萃取液; 水部分继续用氯仿萃取, 再弃去

萃取液。然后将水部分浓缩至干, 60~100 目硅胶拌样, 上硅胶柱, 分别用氯仿、氯仿: 甲醇(9: 1)、氯仿: 甲醇: 水(65: 35: 10) 冲柱, 得到 Part1, Part2, Part3 部分。Part3 上球形填料大小为 40~70  $\mu\text{m}$  的反相柱, 用甲醇: 水(30: 70~60: 40) 梯度冲柱, 分别得到 Fr1., Fr2., Fr3., Fr4.。

**2.1.3 TLC 和 HPLC 对应关系寻找** 样品分离过程中使用 TLC 和 HPLC 两种方法同步检测。其中 TLC 使用展开剂为氯仿: 甲醇: 水(65: 35: 10), 365 nm 紫外分析仪检测和 1% 香草醛浓硫酸显色(图 1); HPLC 的洗脱剂为乙腈: 0.1% 甲酸水(18: 82), 检测波长是 329 nm, 流速是 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>(图 2)。

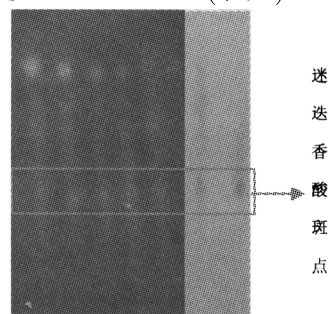


图 1 样品分离过程中 TLC 图谱

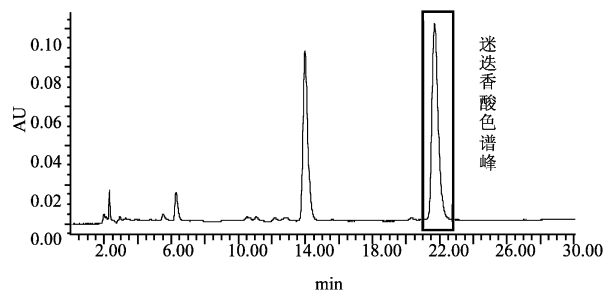


图 2 样品分离过程中 HPLC 图谱

**2.1.4 样品纯化** 将含迷迭香酸粗品的 Fr3. 上半制备液相, 液相条件是乙腈: 0.1% 甲酸水(18: 82), 检测波长是 329 nm, 流速是 3.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 出峰后 20 s 开始接收, 得到化合物纯品(9) 5 g。分离示意图(图 3)如下。液相检测分离所得化合物纯度 > 98% (图 4)。

**2.1.5 结构分析** MS 采用 ESI 离子源, 负离子模

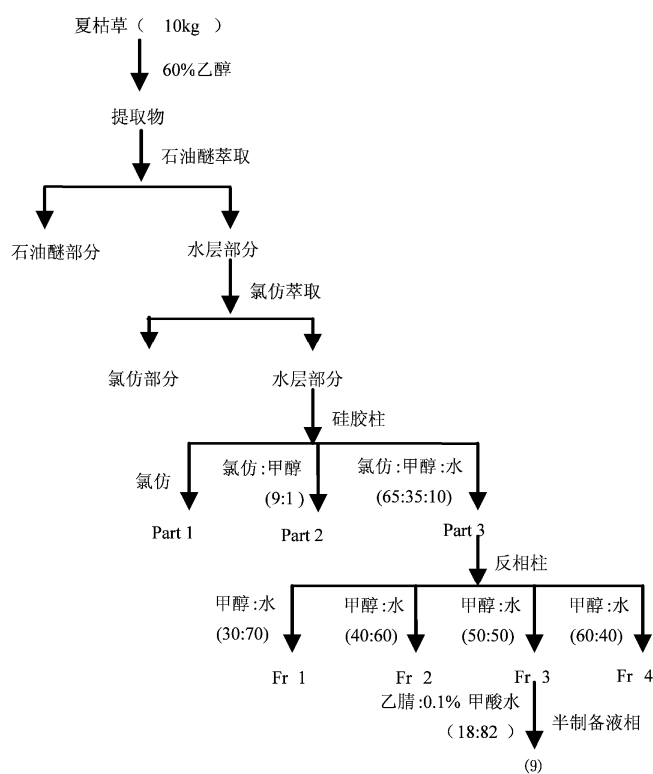


图 3 化合物(9)分离示意图

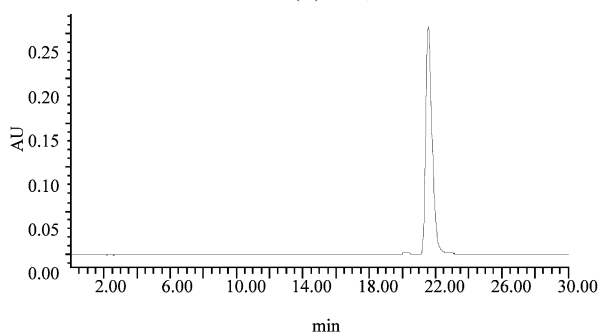


图 4 分离所得化合物(9)纯度检测

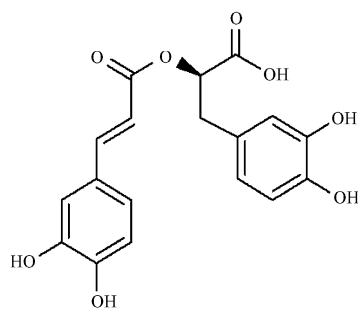


图 5 化合物(9) — 迷迭香酸

式; NMR 选用氘代试剂 DMSO, 采集频率为 500 MHz。

## 2.2 结果

**2.2.1 TLC 和 HPLC 对应关系的确定** TLC 中  $R_f$  值约 0.4 的主要荧光点或显色斑点与 HPLC 中 21.5 min 的色谱峰为同一目标化合物迷迭香酸。

**2.2.2 结构确定** 白色无定形粉末, 三氯化铁-铁氰化钾及溴酚蓝显色均为阳性, 香荚兰醛显粉红色。

ESI-MS  $m/z$ : 359[ $M-H$ ] $^-$ 。 $^1H$ -NMR (DMSO, 500 MHz)  $\delta$ : 7.05 (1H, s, H-2), 6.76 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5), 6.99 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-6), 7.44 (1H, d,  $J=15.5$  Hz, H-7), 6.22 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-2'), 6.62 (1H, d,  $J=7.5$  Hz, H-5'), 6.51 (1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-6'), 3.00 (1H, m, H-7'), 2.88 (1H, m, H-7'), 5.00 (1H, br d,  $J=8.5$  Hz, H-8')。 $^{13}C$ -NMR (DMSO, 500 MHz)  $\delta$ : 125.3 (C-1), 113.6 (C-2), 145.5 (C-3), 148.5 (C-4), 115.3 (C-5), 124.0 (C-6), 145.6 (C-7), 114.9 (C-8), 165.9 (C-9), 127.8 (C-1'), 116.6 (C-2'), 144.9 (C-3'), 143.9 (C-4'), 115.8 (C-5'), 121.4 (C-6'), 36.3 (C-7'), 73.4 (C-8'), 171.1 (C-9')。 $^1H$ -NMR 和  $^{13}C$ -NMR 数据与文献[3-4]类似, 故鉴定为迷迭香酸(图 5)。

## 3 讨论

**3.1 选择分离迷迭香酸的依据** 国内外夏枯草化学成分研究主要涉及其脂溶性成分, 对其水溶性成分研究较少。本课题组在摸索夏枯草主要化学成分的过程中, 发现迷迭香酸是夏枯草 TLC 中最明显的斑点, HPLC 中最主要的色谱峰, 且文献报道迷迭香酸是一个活性非常强的化合物。因此选择对夏枯草中迷迭香酸进行分离、富集和结构鉴定。

**3.2 提取溶剂的选择** 本实验比较了不同的提取溶剂甲醇, 95% 乙醇, 60% 甲醇, 60% 乙醇, 结果发现甲醇, 60% 甲醇, 60% 乙醇提取效果相当, 从实验成本 and 安全性出发, 选用 60% 乙醇作为提取溶剂。

**3.3 迷迭香酸分离过程的跟踪** 在迷迭香酸分离的过程中, 采用夏枯草药材进行跟踪确认, 建立了迷迭香酸薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)之间的一个对应关系, 确保目标化合物分离过程的准确性。

**3.4 结构鉴定** 由于选用的做 NMR 的试剂不一样, 所以得到化合物的 NMR 图谱有所差异, 因此在确定结构时不仅应参考文献, 还需仔细归属。

## [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 197.
- [2] 陈立亚. 迷迭香酸的研究概况[J]. 中国药事, 2007, 21(11): 926-927.
- [3] 郑晓珂, 李 钦, 冯卫生. 冬凌草中酚酸类化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(5): 335.
- [4] ZhuJu Wang, YuYing Zhao, Bin Wang, et al, Depsides from *Prunella vulgaris* [J]. Chinese Chemical Letters, 2000, 11(11): 997.