

## 迷迭香叶中鼠尾草酸的提取工艺研究

魏静<sup>1)</sup>, 王尚文<sup>2)</sup>, 于浩飞<sup>1)</sup>, 赵荣华<sup>3,4)</sup>, 王扣<sup>1)</sup>, 张荣平<sup>1,4)</sup>

(1) 昆明医科大学药学院暨云南天然药物药理重点实验室; 2) 法医学院, 云南昆明 650500; 3) 云南中医学院中药学院, 云南昆明 650500; 4) 南药协同创新中心, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 优选迷迭香叶中鼠尾草酸的提取工艺. **方法** 以鼠尾草酸提取率为定量指标, 确定最佳提取溶剂和提取方法. 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察提取时间、料液比和提取次数对鼠尾草酸提取率的影响. **结果** 采用乙酸乙酯为溶剂, 超声提取, 料液比 1:14, 提取 4 次, 每次 75 min, 在此条件下鼠尾草酸平均提取率达 2.479%. **结论** 优选的鼠尾草酸提取工艺稳定, 重复性好.

**[关键词]** 鼠尾草酸; 提取工艺; 迷迭香

**[中图分类号]** R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 01-0058-04

## Study on the Extraction Process for Carnosic Acid from *Rosmarinus officinalis* Linn

WEI Jing<sup>1)</sup>, WANG Shang-wen<sup>2)</sup>, YU Hao-fei<sup>1)</sup>, ZHAO Rong-hua<sup>3,4)</sup>, WANG Kou<sup>1)</sup>, ZHANG Rong-ping<sup>1,4)</sup>

(1) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University; 2) School of Forensic Medicine; 3) Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine; 4) The Collaborative Innovation Center of South China Medicinal Plants, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To optimize the extraction process for carnosic acid from leaves of *Rosmarinus officinalis* Linn. **Methods** With the extraction rate of carnosic acid as quantitative index, the best extraction solvent and extraction method were identified by single factor experiments. And then, the effects of extraction time, solid-liquid ratio and extraction times on extraction rate of carnosic acid were investigated by orthogonal tests. **Results** The optimal extraction technology was as follows: ethyl acetate extracting with material and solvent ratio of 1:14, ultrasonic extraction for 4 times, wand 75 min each time. Under these conditions, the average extraction rate of carnosic acid was up to 2.479%. **Conclusion** The optimal extraction process for carnosic acid from *R. officinalis* was reproducible and stable.

**[Key words]** Carnosic acid; Extraction process; *Rosmarinus officinalis*

迷迭香 (*Rosmarinus officinalis* Linn.) 系唇形科 (Labiata) 迷迭香属植物, 性温、味辛, 主要利用部位为叶片, 具有芳香健胃、提神醒脑、镇静安神等功效, 对神经、消化及呼吸系统疾病有一定的治疗作用, 也是传统的香料和食品添加剂. 现代药理学研究表明, 迷迭香叶提取物具有抑菌、抗癌、抗炎、抗氧化、抗艾滋、降血脂、抗衰

老、保肝等活性<sup>[1]</sup>, 鼠尾草酸是其主要活性成分之一<sup>[2]</sup>. 近年来针对鼠尾草酸的研究不少, 其在预防阿尔茨海默病、血管生成、改善记忆力、抗肥胖、神经保护等方面有较好的表现<sup>[3-7]</sup>. 鼠尾草酸结构中含有不稳定的邻二酚羟基, 加热、光照及溶液状态下容易发生氧化、降解<sup>[8]</sup>, 现有的迷迭香提取方法大都采用含水乙醇提取, 但鼠尾草酸在含

**[基金项目]** 云南省天然药物药理重点实验室开放研究基金资助项目 (2013G013)

**[作者简介]** 魏静 (1988~), 女, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 主要从事植物资源开发利用研究工作.

**[通讯作者]** 王扣. E-mail: wangk@clas.ac.cn; 张荣平. E-mail: zhrpkm@163.com

水的环境中较易降解而影响提取物的活性<sup>[9]</sup>。为减少提取过程中鼠尾草酸的降解,本实验采用无水溶剂提取,以鼠尾草酸提取率为指标,在单因素试验基础上,采用正交试验优选鼠尾草酸提取工艺,为迷迭香的深入开发利用提供物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器** P680型高效液相色谱系统(美国戴安公司);MS204型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多);超声清洗仪(深圳市洁盟清洗设备有限公司,JP-040S)。

**1.1.2 试剂** 迷迭香购自昆明奥深生物科技有限公司,经昆明医科大学药学院张荣平教授鉴定为唇形科迷迭香属植物迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)的地上部分;鼠尾草酸对照品(批号20130402,质量分数98.0%)购自南京康满林化工实业有限公司,乙腈为色谱纯(德国Merck公司),纯净水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱:Thermo Scientific ODS C18色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相:乙腈-2.5%甲酸水=65:35,检测波长:284 nm,柱

$$\text{提取率}(\%) = \frac{59.08 \times \text{干浸膏质量} \times (\text{峰面积} + 0.025)}{\text{取浸膏质量}} \times 100\%$$

**1.2.4 提取溶剂和提取方法** 称取4份迷迭香叶5 g,分别加入50 mL的甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮,超声提取30 min后按“1.2.3”项处理样品并按“1.2.1”项含量测定确定提取溶剂;称取6份迷迭香叶5 g,均加入乙酸乙酯50 mL,分别超声提取30、45、60 min,75℃回流提取30、45、60 min,提取3次,按“1.2.3”项处理样品并按“1.2.1”项含量测定确定提取方法。

**1.2.5 单因素试验** 按照“1.2.3”项下方法,乙酸乙酯超声提取,其他条件固定不变,分别考察提取时间、料液比、提取次数对鼠尾草酸提取率的影响。A:提取时间(min);B:料液比;C:提取次数(次)。

**1.2.6 正交试验法优化鼠尾草酸提取工艺** 在单因素试验结果的基础上,以鼠尾草酸提取率为指标,选取提取时间、料液比、提取次数为考察因素,各因素3水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,试验因素水平设计见表1。

**1.2.7 精密度试验** 精密量取同一对照品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件重复进样6次,结果峰

温35℃,流速1.0 mL/min,进样量20 μL,样品经0.45 μm微孔滤膜过滤,鼠尾草酸色谱峰与其他色谱峰基线分离,阴性试验结果表明阴性无干扰,方法学考察结果显示此条件适用于迷迭香中鼠尾草酸的含量测定,对照品及样品HPLC图谱见图1。

**1.2.2 标准曲线制备** 精密称取鼠尾草酸对照品10.100 mg,置10 mL容量瓶中,甲醇溶解定容,精密量取0.1、0.3、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 mL,分别置于10 mL容量瓶中,用甲醇定容,在“1.2.1”项色谱条件下分别进样,以对照品含量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),建立标准曲线,得到鼠尾草酸对照品的回归方程为 $Y=4.232X-0.025$ , $r=0.9997$ ,表明鼠尾草酸在0.20~4.04 μg范围内与峰面积呈良好线性关系。

**1.2.3 供试品溶液的制备及鼠尾草酸提取率的测定** 称取迷迭香样品5 g,精密称定,按设定的提取条件(提取方法、提取溶剂、液料比、提取次数、提取时间)进行提取,待提取完成后,滤去残渣,滤液于45℃减压真空装置下浓缩干燥,精密称定,精密称定干浸膏20 mg,甲醇定容于25 mL容量瓶中,过0.45 μm微孔滤膜过滤,进样测定鼠尾草酸含量,计算鼠尾草酸提取率:

面积的RSD 0.37%,表明仪器精密度良好。

**1.2.8 稳定性试验** 精密吸取同一份供试品溶液,分别于0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h按“1.2.1”项色谱条件进样,结果峰面积分值的RSD 1.79%,表明供试品溶液在3 h内稳定。

**1.2.9 重复性试验** 取同一提取物,按“1.2.3”项下方法制备6份供试品溶液,按“1.2.1”项下色谱条件进样,结果峰面积的RSD 1.34%。

**1.2.10 加样回收率试验** 称取样品6份,每份5 g,制成提取物,按“1.2.3”项下制成供试品,分别吸取1 mL精密加入0.064 mg/mL的鼠尾草酸对照品溶液2 mL,按“1.2.1”项下色谱条件进样,结果测得鼠尾草酸平均加样回收率100.38%,RSD=1.86%。

## 2 结果

### 2.1 提取溶剂对提取率的影响

分别考察甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮提取溶剂对提取率的影响,其他条件固定为超声提取时

间 30 min, 料液比 1:10, 提取 1 次. 结果表明, 用乙酸乙酯提取时提取率较高, 且其他杂质相对较少.

## 2.2 提取方法对提取率的影响

分别考察超声提取、回流提取 30 min、45 min、60 min 对提取率的影响, 其他条件固定为料液比 1:10, 提取 3 次, 回流提取温度 75℃. 结果表明, 超声提取的提取率均高于回流提取.

## 2.3 提取时间对提取率的影响

分别采用 15、30、45、60、75、90 min 条件下考察提取时间对提取率的影响, 其他条件固定为乙酸乙酯超声提取, 料液比 1:10, 提取 1 次. 提取率分别为 1.068%、1.698%、1.965%、2.010%、2.098%、2.210%, 表明在 90 min 提取率最高, 考虑到实际情况, 采用 60 min 提取.

## 2.4 料液比对提取率的影响

分别考察料液比 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14、1:16 对提取率的影响, 其他条件固定为乙酸乙酯超声提取, 提取时间 60 min, 提取 1 次. 提取率分别为 1.852%、2.032%、2.099%、2.141%、2.244%、2.133%. 结果表明, 料液比为 1:14 是提取率最高.

## 2.5 提取次数对提取率的影响

分别提取 1、2、3、4 次, 考察提取次数对提取率的影响, 其他条件固定为乙酸乙酯超声提取, 料液比 1:14, 提取时间 60 min. 提取率分别为 2.264%、2.304%、2.383%、2.214%, 结果表明提取 3 次时其提取率最高.

## 2.6 正交试验设计与结果分析

按照正交试验设计, 并将鼠尾草酸率填于正交软件中进行方差分析, 结果见表 2、表 3.

由方差分析结果 (表 3) 可知, 以鼠尾草酸提取率为指标, 各因素影响顺序为 C>B>A. 其中 C 即提取次数对鼠尾草酸的提取影响最大; 直观分析结果显示, 鼠尾草酸最佳提取工艺为 A3B2C3, 即料液比 1:14, 提取 4 次, 每次 75 min.

## 2.7 验证试验

精密称取迷迭香叶药材 20 g, 按正交试验结果优选参数提取方案, 平行操作 3 次, 按“1.2.3”项下制备供试液, 并按“1.2.1”项下色谱条件进样, 结果鼠尾草酸提取率分别为 2.457%、2.489%、2.491%, RSD 0.770%. 表明按最佳提取工艺取得的鼠尾草酸提取率稳定, 故确定的工艺稳定可行.

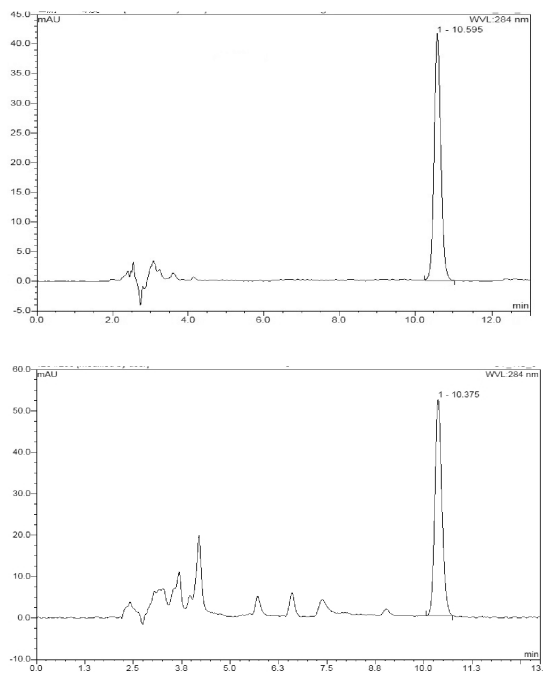


图 1 对照品和迷迭香提取物 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC spectrums of carnosic acid and *R. officinalis* extract

表 1  $L_9(3^4)$  因素水平表

Tab. 1  $L_9(3^4)$  orthogonal factor level table

水平	因素		
	A 提取时间 (min)	B 料液比	C 提取次数 (次)
1	45	1:12	2
2	60	1:14	3
3	75	1:16	4

表 2 正交试验结果

Tab. 2 The result of orthogonal test

试验号	因素			鼠尾草酸提取率 (%)
	A	B	C	
1	1	1	1	2.031
2	1	2	2	2.401
3	1	3	3	2.350
4	2	1	2	2.184
5	2	2	3	2.442
6	2	3	1	2.216
7	3	1	3	2.351
8	3	2	1	2.292
9	3	3	2	2.434
K1	6.782	6.566	6.539	
K2	6.842	7.135	7.019	
K3	7.077	7.000	7.143	
R	0.098	0.190	0.201	

表 3 方差分析结果

Tab. 3 The result of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.016	2	0.008	4.790	
B	0.059	2	0.029	17.419	
C	0.068	2	0.034	20.055	$P < 0.05$

### 3 讨论

传统的提取方法如热水浸提法、回流法、压滤法等均有一定缺点如提取时间过长、能耗过高、热敏性组分易被破坏等, 随着中草药有效成分的提取研究方法越来越多, 超声提取方法因其操作简便快捷、无需加热、提取率高、速度快、提取物的结构不被破坏, 且能耗低、效率高、省时等优点也成为近年来国内学者研究的热点<sup>[10]</sup>. 在本研究中, 笔者对比了热回流提取方法超声提取方法, 结果也表明, 超声提取方法优于回流提取.

鼠尾草酸是迷迭香叶的主要成分但是易转化为鼠尾草酚<sup>[8]</sup>. 研究表明, 新鲜采割的迷迭香叶, 几乎不含鼠尾草酚. 但是在迷迭香干燥、储存、提取和水蒸气蒸除迷迭香精油后, 鼠尾草酸的含量有所减少而鼠尾草酚含量增加. 迷迭香叶仅在干燥前后, 鼠尾草酚的含量就会由 1% 增加至 2%, 所以由此推测, 迷迭香及其提取物中迷迭香酚、迷迭香二酚和其它二萜酚类都可能是通过鼠尾草酸的氧化而来<sup>[2]</sup>. 而上述情况是由于鼠尾草酸含有的活性基团邻二酚羟基的结构在加热、光照及溶液状态下发生氧化、降解所造成的<sup>[8,11]</sup>.

为了避免鼠尾草酸的降解, 笔者全部采用无水溶剂进行提取, 以迷迭香叶中鼠尾草酸提取率为考察指标, 通过单因素和正交试验, 优选得到最佳提取工艺条件为: 乙酸乙酯超声提取、料液比 1:14、提取 4 次、每次 75 min. 该优选工艺稳定, 鼠尾草酸平均提取率为 2.479%, 研究结果可为迷迭香药材的开发利用提供依据.

### [参考文献]

[1] 齐锐, 董岩. 迷迭香的化学成分与药理作用研究进展.

[J]. 广州化工, 2012, 40(11): 43 - 44, 66.

- [2] 刘先章, 赵振东, 毕良武, 等. 天然迷迭香抗氧化剂的研究进展[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(增刊): 132 - 138.
- [3] HYOSHIDA, PMENG, TMATSUMIYA, et al. Carnosic acid suppresses the production of amyloid- $\beta$  1-42 and 1-43 by inducing an alpha-secretase TACE/ADAM17 in U373MG human astrocytoma cells [J]. Neurosci Res, 2014, 79(2): 83 - 93.
- [4] MOZAROWSKI, PLMIKOLAJCZAK, ABOGACZ, et al. R-osmarinus officinalis L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain [J]. Fitoterapia, 2013, 91(2): 261 - 271.
- [5] MROMO VAQUERO, RGARCIA VILLALBA, MLARRO - SA, et al. Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: metabolic profile in the intestine, liver, plasma, and brain of Zucker rats [J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(10): 1834 - 1846.
- [6] JHCHEH, HPOU, CYLIN, et al. Carnosic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells via mediation of glutathione synthesis [J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(9): 1893 - 1901.
- [7] TKAYASHIMAK. Matsubara. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(1): 115 - 119.
- [8] YZHANG, JPSMUTS, EDODBIBA, et al. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(9): 3305 - 3314.
- [9] NMULINACCI, MINNOCENTI, MBELLUMORI, et al. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study [J]. Talanta, 2011, 85(1): 167 - 176.
- [10] 南占东, 农国富, 杨爱明, 等. 超声提取技术在茶叶提取分离中的研究[J]. 口腔护理用品工业, 2014, 24(4): 27 - 30.
- [11] 杜纪权, 徐宏, 曹庸, 等. 迷迭香提取物的抗氧化特性及应用中存在的问题[J]. 食品工业科技, 2011, 32(7): 467 - 469, 473.

(2014 - 10 - 13 收稿)