

# 10批不同产地六棱菊中咖啡酸的工艺优化与含量测定<sup>△</sup>

魏江存<sup>1\*</sup>, 陈勇<sup>1#</sup>, 谢臻<sup>1</sup>, 李耀华<sup>1</sup>, 唐春丽<sup>2</sup>, 阙祖亮<sup>1</sup>, 庾延和<sup>1</sup>, 张昕<sup>1</sup>, 庞丹清<sup>1</sup>(1.广西中医药大学药学院, 南宁 530020; 2.广西中医药大学第一附属医院药学部, 南宁 530022)

中图分类号 R914.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4792-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.10

**摘要** 目的:优化六棱菊中咖啡酸提取工艺,并建立其含量测定方法。方法:以回流提取法提取六棱菊中咖啡酸。以提取含量为考察指标,设计正交试验,考察乙醇体积分数、料液比及提取时间对咖啡酸提取的影响,优化提取工艺条件。采用高效液相色谱法,以咖啡酸为对照品,在320 nm波长下测定10批不同产地六棱菊药材中的咖啡酸含量。结果:优化的提取工艺条件为乙醇体积分数为10%、料液比为1:40、提取时间为3 h。以此条件对咖啡酸进行工艺验证试验,六棱菊中咖啡酸平均含量为0.521 1 mg/g (RSD=1.18%, n=3)。10批不同产地六棱菊药材中咖啡酸含量在0.375 2~0.776 6 mg/g之间,含量差异较大。结论:六棱菊药材中咖啡酸含量与产地和采收季节等有关。本试验优选工艺提取咖啡酸重复性较好;建立的咖啡酸含量测定方法稳定、可行。

**关键词** 六棱菊;含量测定;咖啡酸;高效液相色谱法

## Technology Optimization and Content Determination of Caffeic Acid in 10 Batches of *Laggera alata* from Different Areas

WEI Jiangcun<sup>1</sup>, CHEN Yong<sup>1</sup>, XIE Zhen<sup>1</sup>, LI Yaohua<sup>1</sup>, TANG Chunli<sup>2</sup>, QUE Zuliang<sup>1</sup>, YU Yanhe<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, PANG Danqing<sup>1</sup>(1.College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China)

- [11] 王亚平,陈蓉,林守清,等.生殖衰老过程中子宫的变化[J].协和医学杂志,2016,7(6):401-408.
- [12] Chakraborty TR, Gore AC. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function[J]. *Exp Biol Med*: Maywood, 2004, 229(10):977-987.
- [13] 马晓萍,徐颖,丁婕,等.戊酸雌二醇对去卵巢大鼠子宫、阴道、乳腺雌激素受体表达的影响[J].中国药科大学学报,2014,45(3):341-345.
- [14] Kaunitz AM, Manson JE. Management of menopausal symptoms[J]. *Obstet Gynecol*, 2015, 126(4):859-876.
- [15] 孙晓,寇俊萍,李丁娟,等.当归芍药散对卵巢摘除小鼠行为学变化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):44-46.
- [16] Wintermantel TM, Elzer J, Herbison AE, et al. Genetic dissection of estrogen receptor signaling in vivo[J]. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 2006(1):25-44.
- [17] Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse[J]. *Lab Anim Res*, 2012, 28(2):71-76.
- [18] Dupont S, Krust A, Gansmuller A, et al. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes[J]. *Development*, 2000, 127(19):4277-4291.
- [19] Fan X, Gabbi C, Kim HJ, et al. Gonadotropin-positive pituitary tumors accompanied by ovarian tumors in aging female ER $\beta$ -/- mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(14):6453-6458.
- [20] 朱迪娜,王磊,王思彤,等.植物雌激素的研究进展[J].中草药,2012,43(7):1422-1429.
- [21] 王运来,胡鹿尧,方庆,等.基于生物网络的当归芍药散、桂枝茯苓丸治疗原发性痛经作用机制研究[J].中药材,2015,38(11):2348-2352.
- [22] 郝庆秀,王继峰,牛建昭,等.熟地等4味中药的植物雌激素作用的实验研究[J].中国中药杂志,2009,34(5):620-624.
- [23] 刘克菊,王文君,金慰芳,等.更年期对卵巢切除大鼠骨与子宫组织雌激素受体亚型的调节[J].复旦学报(医学版),2005,32(4):439-442,506.

(收稿日期:2017-06-21 修回日期:2017-09-28)

(编辑:林静)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of caffeic acid in *Laggera alata*, and establish a method for its content determination. METHODS: The caffeic acid in *L. alata* was extracted by reflux extraction. Using extraction content as investigation index, orthogonal test was used to investigate the effects of ethanol volume fraction, material-liquid ratio and extraction time on caffeic acid, and the extraction technology conditions were optimized. HPLC was adopted to determine the content of caffeic acid in 10 batches of *L. alata* from different areas, using caffeic acid as reference substance, at wavelength of 320 nm. RESULTS: The optimized extraction technology conditions were as follows as ethanol volume fraction of 10%, material-liquid ratio of 1:40 and extraction time of 3 h. Under the condition, verification test for caffeic acid was carried out, and the average content of caffeic acid in *L. alata* was 0.521 1 mg/g (RSD=1.18%, n=3). The content of caffeic acid in 10 batches of *L. alata* from different areas ranged in 0.375 2-0.776 6 mg/g, and the content showed great differences. CONCLUSIONS: The content of caffeic acid in *L. alata* is related to area and harvest season. The caffeic acid extraction by optimized technology shows good reproducibility; and the established method for content determination is stable and feasible.

**KEYWORDS** *Laggera alata*; Content determination; Caffeic acid; HPLC

六棱菊 [*Laggera alata* (D. Don) Sch. Bip. ex Oliv] 系菊科六棱菊属植物, 全草入药, 性苦、辛, 微温, 有祛风、除湿、解毒之功效, 在民间作为抗菌消炎、清热解毒的良药, 主要分布于我国东部、东南部至西南部, 北至安徽和湖北<sup>[1]</sup>。因六棱菊新鲜的枝叶揉搓后散发特殊的臭味, 民间称之为“臭灵丹”<sup>[2]</sup>, 以“臭灵丹”为主的许多复方制剂在临床上应用也取得较好的疗效<sup>[3-5]</sup>。目前, 六棱菊多应用于急性扁桃体炎<sup>[6]</sup>、感冒<sup>[7]</sup>、病毒感染<sup>[8]</sup>等的治疗。

六棱菊主要含倍半萜类、黄酮类、酚酸类等化学成分<sup>[2, 9-12]</sup>, 具有治疗急慢性炎症、抗肿瘤、抗病毒和抗微生物活性等功效<sup>[2]</sup>。其中, 咖啡酸属于酚酸类化合物, 在金银花、野菊花和蒲公英等植物中广泛分布。咖啡酸具有多种药理作用<sup>[13]</sup>, 主要包括保护心血管、调节免疫、降脂、降糖、利胆止血等。以咖啡酸作为指标性成分进行含量测定, 可以为六棱菊药材的质量标准奠定基础, 然而国内外未见对其进行含量测定的相关报道。本试验不仅建立了六棱菊中咖啡酸的含量测定方法, 还同时测定了广西壮族自治区内 10 批不同产地六棱菊中咖啡酸的含量, 并比较不同产地药材中咖啡酸含量差异, 为六棱菊药材的质量评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2695 高效液相色谱仪, 包括 2489 紫外检测器、四元泵、真空脱气泵、自动进样器、柱温箱和 Empower3 工作站 (美国 Waters 公司); Simplicity 纯水系统 (密理博中国有限公司); Practum 224-1CN 分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); DHG-9203A 电热恒温鼓风干燥箱、HWS-26 电热恒温水浴锅 (上海齐欣科学仪器有限公司); TGL-16G 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 0.45 μm 微孔滤膜 (天津市津腾实验设备有限公司)。

### 1.2 试剂与药材

咖啡酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 1110885-200102, 纯度: >98.0%); 乙腈为色谱纯, 甲醇和磷酸为分析纯, 试验用水为纯水。所有六棱菊药材样

品均经广西中医药大学药学院田辉教授鉴定为菊科六棱菊属植物六棱菊 [*Laggera alata* (D. Don) Sch. Bip. ex Oliv] 的全草。六棱菊样品信息见表 1。

表 1 广西壮族自治区内 10 批不同产地的六棱菊样品信息

Tab 1 Sample information of 10 batches of *L. alata* from different areas in Guangxi Zhuang Autonomous Region

药材编号	药材来源	采集或采购时间	采集或采购部位	干燥方式
1	南宁市武鸣县*	2015年11月	全草	晒干
2	防城港市上思县*	2015年9月	全草	晒干
3	南宁市邕宁区*	2015年10月	全草	晒干
4	百色市田阳县	2014年7月	全草	晒干
5	南宁市上林县*	2015年10月	全草	晒干
6	百色市隆林县	2016年4月	全草	晒干
7	桂林市平乐县	2015年4月	全草	晒干
8	百色市靖西县	2014年9月	全草	晒干
9	桂林市荔浦县	2015年9月	全草	晒干
10	南宁市宾阳县	2014年12月	全草	晒干

注: 有“\*”标志为自采样品, 其余均从药材市场购买

Note: “\*” signs for self-sampling, and the rest are purchased from the herbal market

## 2 方法与结果

### 2.1 六棱菊中咖啡酸提取工艺优化

2.1.1 单因素考察 (1) 提取方法考察。从六棱菊中提取咖啡酸的方法主要有回流提取法、超声提取法、浸渍法、渗漉法、煎煮法等<sup>[14]</sup>。以咖啡酸提取时间 1 h、料液比 1:40、提取溶剂 45% 乙醇为提取条件, 分别采用回流提取法、超声提取法和溶剂浸渍法提取六棱菊中的咖啡酸。结果, 回流提取法对咖啡酸提取率较高, 故采用回流提取法。(2) 乙醇体积分数考察。固定咖啡酸提取时间为 3 h、料液比为 1:40, 采用回流提取法, 以乙醇体积分数为 10%、25%、45%、65%、95% 提取六棱菊中咖啡酸并计算得率。结果, 25% 乙醇回流提取率较高, 但与 10% 乙醇提取效果差别不大。从减少乙醇溶剂方面考虑, 选用 10% 乙醇为提取体积分数。(3) 料液比考察。固定咖啡酸提取时间为 3 h、乙醇体积分数为 10%, 采用回流提取法, 以料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 提

取六棱菊中咖啡酸并计算得率。结果,料液比为1:40时咖啡酸得率较高,故选用料液比为1:40。(4)提取时间考察。固定料液比为1:40、乙醇体积分数为10%,采用回流提取法,以提取时间为1.0、2.0、2.5、3.0、3.5 h提取六棱菊中咖啡酸并计算得率。结果,提取时间为2.5 h时咖啡酸得率较高,故选用提取时间为2.5 h。

2.1.2 正交试验设计 根据文献[15]和参考2015年版《中国药典》(一部),以乙醇体积分数(A,% )、料液比(B,g/mL)、提取时间(C,h)为考察因素,以咖啡酸含量作为评价指标,按3因素3水平选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。各因素水平及试验结果见表2、表3,方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A(乙醇体积分数),%	B(料液比),g/mL	C(提取时间),h
1	10	1:20	1
2	45	1:30	2
3	95	1:40	3

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Orthogonal test design and results

试验号	因素				咖啡酸含量,mg/g
	A	B	C	D(误差)	
1	1	1	1	1	0.434 6
2	1	2	2	2	0.336 9
3	1	3	3	3	0.524 0
4	2	1	2	3	0.340 3
5	2	2	3	1	0.412 2
6	2	3	1	2	0.416 7
7	3	1	3	2	0.266 7
8	3	2	1	3	0.265 7
9	3	3	2	1	0.235 1
$K_1$	0.432	0.347	0.372	0.361	
$K_2$	0.390	0.338	0.304	0.340	
$K_3$	0.256	0.392	0.401	0.377	
R	0.176	0.054	0.097	0.037	

表4 方差分析结果

Tab 4 Result of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.051	2	0.026	25.500	<0.05
B	0.005	2	0.003	2.500	>0.05
C	0.015	2	0.008	7.500	>0.05
D(误差)	0.000	2	0.000	1.000	

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00, F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note:  $F_{0.01}(2,2)=99.00, F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表3可知,各提取因素对六棱菊提取工艺的影响顺序为A>C>B,即乙醇体积分数对六棱菊的提取工艺影响最大,其次是提取时间,最后是料液比。由表4可知,乙醇体积分数对六棱菊提取具有显著影响,而料液比和提取时间无显著影响,所以对六棱菊中咖啡酸成分提取效果有显著影响的因素是乙醇体积分数。因此,本试验最理想的提取方案是A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即乙醇体积分数为10%、料液比为1:40、提取时间为3 h时,提取效果最佳。

2.1.3 工艺验证试验 以优选出的咖啡酸提取条件进行六棱菊中咖啡酸提取的验证试验。分别称取3份六棱菊药材粉末,分别为0.500 6、0.500 1、0.500 9 g,按“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液,平行进行3次测定。计算六棱菊中咖啡酸含量分别为0.521 4、0.514 8、0.527 1 mg/g,平均含量为0.521 1 mg/g, RSD=1.18% (n=3)。验证试验表明,优化后的咖啡酸提取条件较好,工艺可行。

## 2.2 高效液相色谱法测定六棱菊中咖啡酸的含量

按文献[15-16]和参考2015年版《中国药典》(四部)方法测定含量。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸(22:78, V/V);流速为1.0 mL/min;检测波长为320 nm;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。按照上述条件测定,各组分分离度良好,见图1。

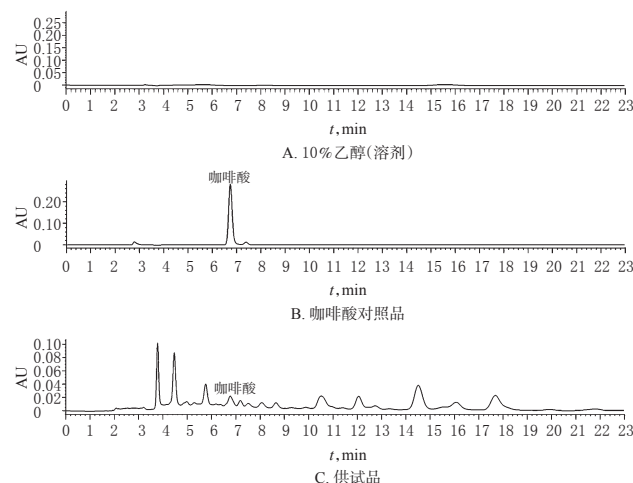


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取咖啡酸对照品16.2 mg,置于20 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得咖啡酸对照品贮备液,质量浓度为0.81 mg/mL。精密量取上述咖啡酸对照品贮备液2 mL,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,即得咖啡酸对照品溶液,质量浓度为64.8 μg/mL。精密量取上述对照品溶液2 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶液稀释至刻度,即得咖啡酸对照品溶液,质量浓度为12.96 μg/mL,此咖啡酸浓度用于做线性方程。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取六棱菊药材粉末0.5 g,使用10%乙醇提取,回流,以离心半径0.65 cm、13 000 r/min离心10 min,取上清液,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 方法学考察 按相关方法进行检测。结果显示,所用色谱条件分离效果良好,提取溶剂对咖啡酸测定无干扰,咖啡酸出峰时间为6.8 min。以咖啡酸进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方

程为  $y=4 \times 10^6 x - 22\ 912$  ( $r=0.999\ 1$ ), 检测限为  $10.60\ \mu\text{g/mL}$ , 咖啡酸进样量的线性范围为  $0.025\ 92 \sim 0.259\ 2\ \mu\text{g}$ ; 精密度试验中,  $\text{RSD}=2.25\%$  ( $n=6$ ); 稳定性试验中, 样品溶液室温放置  $24\ \text{h}$  的峰面积  $\text{RSD}=1.77\%$  ( $n=6$ ); 重复性试验中, 六棱菊中咖啡酸平均含量为  $0.455\ 2\ \text{mg/g}$ ,  $\text{RSD}=2.86\%$  ( $n=6$ ); 加样回收试验中, 低、中、高加样量 ( $0.182\ 1, 0.227\ 6, 0.273\ 1\ \text{mg}$ ) 的六棱菊中咖啡酸的平均回收率分别为  $98.33\%$ 、 $97.18\%$ 、 $100.07\%$ ,  $\text{RSD}$  分别为  $1.85\%$ 、 $2.07\%$ 、 $1.31\%$  ( $n=3$ ), 均符合相关要求。

2.2.5 样品含量测定 分别称取 10 批不同产地的六棱菊药材粉末(过 2 号筛)  $0.5\ \text{g}$ , 精密称定, 按“2.2.3”项下的方法制备成供试品溶液, 按“2.2.1”项下条件测定, 采用外标一点法计算咖啡酸的含量, 结果见表 5。

表 5 广西壮族自治区内 10 批不同产地的六棱菊样品中咖啡酸含量测定结果

Tab 5 Content determination results of caffeic acid in 10 batches of *L. alata* from different areas in Guangxi Zhuang Autonomous Region

药材编号	药材来源	咖啡酸含量, mg/g
1	南宁市武鸣县*	0.399 3
2	防城港市上思县*	0.447 8
3	南宁市邕宁区*	0.463 7
4	百色市田阳县	0.712 8
5	南宁市上林县*	0.559 5
6	百色市隆林县	0.550 1
7	桂林市平乐县	0.375 2
8	百色市靖西县	0.776 6
9	桂林市荔浦县	0.651 8
10	南宁市宾阳县	0.575 4

注: 有“\*”标志为自采样品, 其余均从药材市场购买

Note: “\*” signs for self-sampling, and the rest are purchased from the herbal market

由表 5 可知, 广西壮族自治区内 10 批不同产地的六棱菊药材中均含有咖啡酸, 且咖啡酸含量差异较大, 其含量范围为  $0.375\ 2 \sim 0.776\ 6\ \text{mg/g}$ ; 其中百色市靖西县的六棱菊药材所含咖啡酸含量最高, 明显高于其他产地样品, 其次是百色市田阳县、桂林市荔浦县样品, 而桂林市平乐县样品咖啡酸含量最低。六棱菊中的咖啡酸含量差异较大, 可能是受六棱菊植物生长期与生长环境的共同作用, 影响其生长和咖啡酸成分的积累。若仅以咖啡酸成分作为六棱菊药材质量评价的依据, 六棱菊的最佳产地是百色市靖西县。

### 3 讨论

#### 3.1 流动相的选择

本试验过程中考察了甲醇- $0.05\%$  磷酸、甲醇- $0.1\%$  磷酸、甲醇- $0.2\%$  磷酸、甲醇- $0.3\%$  甲酸、乙腈- $0.05\%$  磷酸、乙腈- $0.1\%$  磷酸、乙腈- $0.2\%$  磷酸、乙腈- $0.3\%$  甲酸、甲醇-水、乙腈-水等系统对样品成分分离效果的影响, 结果, 乙腈- $0.1\%$  磷酸溶液作为流动相时, 分离度较好, 故流动相最终确定为乙腈- $0.1\%$  磷酸溶液。

#### 3.2 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器, 在  $200 \sim 400\ \text{nm}$  波长下对供试品和对照品溶液进行全波长扫描, 结果咖啡酸在  $291, 320\ \text{nm}$  波长下有最大吸收。考虑到  $291\ \text{nm}$  作为检测波长时, 溶剂峰大, 基线漂移; 而用  $320\ \text{nm}$  时, 溶剂峰小, 基线平稳, 咖啡酸响应值较大。故最终采用  $320\ \text{nm}$  作为本试验的检测波长。

#### 3.3 提取方法的选择

本试验过程中还考察了提取溶剂(甲醇、乙醇)、不同体积分数的乙醇( $10\%$ 、 $45\%$ 、 $95\%$ )、提取方法(超声和加热回流)和提取时间( $1, 2, 3\ \text{h}$ )对样品提取结果的影响。结果,  $10\%$  乙醇溶液加热回流  $3\ \text{h}$  提取效果好。

综上, 本试验优选工艺提取咖啡酸含量重复性较好; 建立的咖啡酸含量测定方法稳定、可行。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 75 卷. 北京: 科学出版社, 1979: 48-50.
- [2] 周长新, 吴迪瑶, 李湘萍, 等. 六棱菊属植物研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1133-1140.
- [3] 魏江存, 陈勇, 魏中璇, 等. 六棱菊生药学与质量分析研究进展[J]. 广州化工, 2017, 45(2): 1-2.
- [4] 何红, 蔡瑞锦, 庞永成. 臭灵丹口服液治疗急性呼吸道感染高热 95 例[J]. 云南中医中药杂志, 2000, 21(6): 38-39.
- [5] 朱红涛, 和立, 薛凤玉, 等. 臭灵丹合剂治疗急性支气管炎 30 例临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(17): 118, 121.
- [6] 周家璇. 灵丹草颗粒剂治疗 50 例急性乳蛾的临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 2002, 23(1): 14-15.
- [7] 郑秀琴, 李洁, 陈昆昌, 等. 臭灵丹合剂治疗感冒临床疗效观察[J]. 中国民族民间医药, 2000, 9(6): 343-345.
- [8] 李洪兵. 臭灵丹与桑菊饮加减治疗顽固性带状疱疹皮损临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2000, 9(1): 30.
- [9] 武艳琪, 李娜, 王明伟. 我国六棱菊属植物化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 181-184.
- [10] 徐昭君. 六棱菊化学成分及植物化学分类学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [11] Van Puyvelde L, Bosselaers J, Stevens C, et al. Phytotoxins from the leaves of *Laggera Decurrens*[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(5): 2116-2119.
- [12] 占丽琴, 耿华伟, 李墨娇, 等. 六棱菊的化学成分[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2014, 35(3): 325-329.
- [13] 苏美英, 周婷婷, 周茂金. 咖啡酸在大鼠体内的药理学研究[J]. 中国药房, 2008, 19(16): 1220-1222.
- [14] 夏委. 中药有效成分提取方法研究进展[J]. 中国药业, 2016, 25(9): 94-96.
- [15] 魏江存, 陈勇, 谢臻, 等. 瑶药扁担藤薄层鉴别和原儿茶酸提取工艺及含量测定研究[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(14): 30-34.
- [16] 魏江存, 陈勇, 阙祖亮, 等. 优化槐米中芦丁提取工艺的实验研究[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2017, 38(2): 91-95, 101.

(收稿日期: 2017-01-24 修回日期: 2017-09-29)

(编辑: 余庆华)