

★交流★

引种紫锥菊中菊苣酸的定性定量分析\*

李晶<sup>1</sup> 聂斌<sup>2</sup> 武力<sup>2\*\*</sup> 曾振灵<sup>1</sup> 吴鸿<sup>3</sup> 陈建新<sup>1\*\*</sup>

(1. 华南农业大学 兽医学院 广州 510642; 2. 华南农业大学 实验兽药厂 广州 510642; 3. 华南农业大学 药用植物研究中心 广州 510642)

摘要 目的: 建立薄层色谱法(TLC)和高效液相色谱法(HPLC)对紫锥菊不同部位中的菊苣酸进行分析,为紫锥菊质量标准的建立提供依据。方法: TLC鉴别紫锥菊根、茎、叶、花中的菊苣酸; HPLC测定以上各部位中菊苣酸的含量,色谱柱为XTerra C<sub>18</sub>柱(150 mm×4.6 mm 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(23:77),流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>,紫外检测波长为326 nm。结果: TLC中菊苣酸的斑点清晰可辨,Rf值为0.72; HPLC测得菊苣酸的进样浓度在0.5~100 μg·mL<sup>-1</sup>范围内与峰面积呈良好的线性关系(r=0.9999),方法的平均回收率(n=3)为95.3%(RSD=3.6%)。紫锥菊根、茎、叶、花中的菊苣酸含量分别为12.1 0.68 5.60 2.47 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 该检测方法简便可行,可用于紫锥菊中菊苣酸的质量控制。

关键词: 紫锥菊(紫花松果菊); 根; 茎; 叶; 花; 菊苣酸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1804-04

Determination of cichoric acid in introducing plant of *Echinacea purpurea*\*

LI Jing<sup>1</sup> NIE Bin<sup>2</sup> WU Li<sup>2\*\*</sup> ZENG Zhen-ling<sup>1</sup>, WU Hong<sup>3</sup> CHEN Jian-xin<sup>1\*\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Experimental Veterinary Drugs Company, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Research Center for Medicinal Plants, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Objective: To establish TLC and HPLC methods to analyze cichoric acid in different parts of *Echinacea purpurea*. Methods: TLC was adopted to rapidly identify the cichoric acid of different parts of *Echinacea purpurea*, including root, stem, leaf and flower, and HPLC was adopted to determine the content of cichoric acid in different parts of the plant. The column of XTerra C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm 5 μm) was adopted, with mixture of acetonitrile-0.1% phosphoric acid(23:77) as mobile phase at flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the UV detector was set at 326 nm. Results: The cichoric acid dot of TLC was clear and the Rf value was 7.2. For HPLC determination, a good linear relationship in the range of 0.5-100 μg·mL<sup>-1</sup>(r=0.9999) and ideal average recovery(95.3%, RSD=3.6%, n=3) were obtained. The content of the cichoric acid in root, stem, leaf and flower of *Echinacea purpurea* was 12.1 0.68 5.60 2.47 mg·g<sup>-1</sup> respectively. Conclusion: The method is simple, and can be used to control quality of cichoric acid in *Echinacea purpurea*.

Key words: *Echinacea purpurea*; root; stem; leaf; flower; cichoric acid; TLC; HPLC

紫锥菊是菊科(Asteraceae)紫锥菊属(即松果菊属)(*Echinacea*)植物,自然分布于美洲地区,该属有8个种及数个变种,作为药用品种已开发利用的有3

种,即紫锥菊(又名紫花松果菊)*Echinacea purpurea*、狭叶紫锥菊*Echinacea angustifolia*和淡白紫锥菊*Echinacea pallia*,其中药用价值较大的是紫锥菊<sup>[1]</sup>。

\* 广东省教育部产学研合作专项资金项目(2008B090500250)  
\*\* 通讯作者 武力 Tel: (020) 85284886; E-mail: wuliee@yahoo.com.cn  
陈建新 Tel: (020) 85280665; E-mail: jxchen@scau.edu.cn

由于其在增强机体免疫力和抗炎方面效果显著, 而使其受到广泛关注<sup>[2]</sup>。其所含的成分复杂, 主要有效成分有多糖类、咖啡酸类、烷酰胺类和多炔类等化合物<sup>[1]</sup>。咖啡酸衍生物中的菊苣酸是紫锥菊中重要免疫活性成分, 在体内外具有细胞吞噬促进作用和抗病毒活性, 所以菊苣酸的含量情况通常成为紫锥菊相关研究的重要指标<sup>[3-4]</sup>。近年来, 北京、上海、南京等地先后成功引种紫锥菊<sup>[5]</sup>。从2002年起华南农业大学将紫锥菊从美国引种到广州获得成功, 并对其发育规律和施肥的影响进行了系统研究<sup>[6]</sup>。本文旨在建立紫锥菊中活性成分菊苣酸的定性定量分析方法, 并对广州地区引种栽培的紫锥菊不同部位中菊苣酸的含量进行测定, 为引种紫锥菊质量标准的建立及其开发利用提供科学依据。

### 1 仪器和试剂

日本岛津 LC-10AVP 型高效液相色谱仪(紫外检测器), KQ2200B 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), 薄层层析硅胶 H 板(烟台市化学工业研究所)。

菊苣酸对照品购自美国 Sigma 公司, 供测定的紫锥菊原种购自美国, 供试种子为自产种, 于2009年3月10日播种, 2009年7月22日盛花期收获整棵植株, 自然阴干, 分成根、茎、叶、花4个部位, 置于60℃烘箱烘干, 分别称重, 粉碎, 过20目筛备用<sup>[5]</sup>。种植基地为广州市华南农业大学教学科研基地, 该基地供试土壤 pH 为 7.55<sup>[6]</sup>。

乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法和结果

#### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品储备液** 精密称定菊苣酸对照品 5 mg, 以甲醇-0.5%磷酸水溶液(4:1)制备 1 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液, 即得。

**2.1.2 供试品溶液** 称取紫锥菊各部位药粉约 0.4 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入甲醇-0.5%磷酸水溶液(4:1)近 25 mL, 密塞, 超声处理 60 min, 放置至室温, 转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇-0.5%磷酸水溶液(4:1)定容, 摇匀, 滤过, 即得各部位提取液。取提取液 10 mL, 氮气流吹干浓缩至 1 mL, 即得供薄层色谱分析用供试品溶液; 提取液经 0.22 μm 的滤膜过滤, 即得供含量测定用供试品溶液。

**2.2 菊苣酸的 TLC 鉴别** 分别吸取菊苣酸的对照

品溶液及紫锥菊根、茎、叶和花的供试品溶液各 3 μL, 分别点于同一硅胶 H 薄层板上, 待点样干燥后, 以石油醚-乙酸乙酯-甲酸(3:6:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干<sup>[7]</sup>, 置于密封碘瓶中熏蒸染色, 观察样品中与对照品相同高度的斑点, 计算其比移值 R<sub>f</sub> 为 0.72。见图 1。

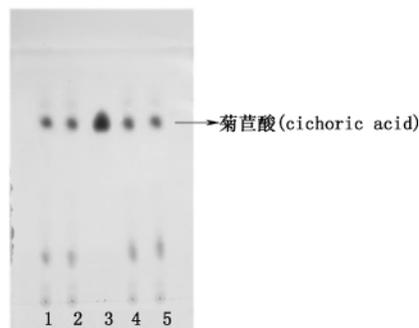


图1 菊苣酸对照品(3)及紫锥菊根(1)、茎(2)、叶(4)和花(5)提取液的 TLC 图(碘熏染色)

Fig 1 TLC of cichoric acid(3), the extract of root(1), stem(2), leaf(4) and flower(5) of *Echinacea purpurea*

### 2.3 菊苣酸的 HPLC 测定

**2.3.1 色谱条件及系统适用性** 色谱柱: XTerra C<sub>18</sub>柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸水溶液(23:77); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 326 nm; 进样量: 20 μL。菊苣酸的出峰时间(*t<sub>R</sub>*)为(4.75±0.13) min, 药材中其他组分峰对菊苣酸无干扰, 理论塔板数为 489, 菊苣酸色谱峰能达到基线分离, 峰对称性好, 基线平稳。色谱图见图 2。

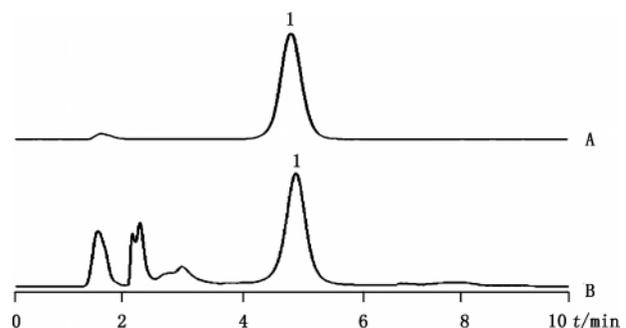


图2 菊苣酸对照品(A)、紫锥菊根提取液(B)的 HPLC 图  
Fig 2 HPLC of cichoric acid (A) and extract of root of *Echinacea purpurea* (B)

1. 菊苣酸(cichoric acid)

**2.3.2 线性关系考察** 精密量取“2.1.1”项下的对照品储备液 2.5, 12.5, 125, 250, 375, 500 μL, 分别用甲醇-0.5%磷酸水溶液(4:1)定容至 5 mL,

摇匀,即得浓度分别为 0.5, 2.5, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列对照品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件,分别进样 20  $\mu\text{L}$ ,测定菊苣酸峰面积,以峰面积( $X$ )为横坐标,进样浓度( $Y$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为:

$$Y = 1.233 \times 10^{-6} X + 0.08855 \quad r = 0.9999$$

表明菊苣酸进样浓度在 0.5 ~ 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性良好。

**2.3.3 精密度试验** 精密吸取 75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,连续进样 5 次,测定菊苣酸的峰面积, RSD( $n=5$ ) 为 1.1%,表明该方法精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 精密吸取紫锥菊供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定,测得菊苣酸峰面积的 RSD 为 1.5%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.3.5 重复性试验** 精密称取紫锥菊茎粉 5 份,各

约 0.4 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 20  $\mu\text{L}$  在上述色谱条件下测定菊苣酸的含量。结果含量平均值为 0.68  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD( $n=5$ ) 为 1.4%。

**2.3.6 加样回收率试验** 根据“2.3.5”项下的测定结果(紫锥菊茎粉中菊苣酸的含量为 0.68  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 精密称取紫锥菊茎粉适量共 3 份,分别精密加入 1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的菊苣酸对照品储备液 270  $\mu\text{L}$ ,摇匀,按“2.1.2”项下方法制备供试溶液,精密吸取 20  $\mu\text{L}$  进样测定菊苣酸的量,计算其平均回收率( $n=3$ ) 为 95.3%, RSD 为 3.6%。

**2.3.7 样品含量测定** 按照“2.1.2”项下方法分别制备紫锥菊根、茎、叶、花 4 个部位的供试品溶液各 3 份,精密吸取 20  $\mu\text{L}$ ,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定紫锥菊不同部位中菊苣酸的含量,测定结果见表 1。

表 1 紫锥菊不同部位菊苣酸的含量测定结果( $n=3$ )

Tab 1 The content of cichoric acid of different parts of *Echinacea purpurea*

植株部位 (different parts)	菊苣酸的含量 (content of cichoric acid) / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	不同部位在整株中的重量百分比 (the proportion of different parts in whole plant) / %	不同部位菊苣酸所占百分比 (the proportion of cichoric acid in whole plant) / %
花( flower)	2.47	26.8	22.0
叶( leaf)	5.60	24.1	44.7
茎( stem)	0.68	43.2	9.70
根( root)	12.1	5.90	23.6
全草( whole plant)	3.27	100	100

### 3 讨论

**3.1 样品提取方法的研究** 考察了超声提取法、加热回流提取法 2 种方法对菊苣酸含量检测的影响,结果表明超声提取方法的提取率较高,而且操作相对比较方便;提取溶液考察了 95% 乙醇、甲醇以及不同比例的甲醇和 0.5% 磷酸水溶液(1:1; 2:1; 3:1; 4:1; 5:1) 结果显示甲醇-0.5% 磷酸水溶液(4:1) 提取率较高,故选择甲醇-0.5% 磷酸水溶液(4:1) 为提取溶剂;溶剂体积倍量考察中,提取物为 0.4 g 溶剂量约为 25 mL 时,可以提取完全;超声时间考察了 20, 40, 60, 80, 100 min,结果表明超声 60 min 即可提取完全,所以超声时间设定为 60 min;将超声提取的温度分别设定为 30  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$ 、70  $^{\circ}\text{C}$ ,测定结果表明超声温度在 70  $^{\circ}\text{C}$  以内时对菊苣酸的提取基本没有影响。

**3.2 检测波长的选择** 对菊苣酸对照品溶液,在

200 ~ 400 nm 波长范围内扫描,记录吸收光谱,结果表明菊苣酸在 326 nm 波长处有最大吸收,故选择 326 nm 为检测波长。

**3.3 流动相的选择** 采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液<sup>[8]</sup> 这一体系作为流动相,并对其不同比例(15:85; 23:77; 30:70) 的分离效果进行了比较,结果乙腈-0.1% 磷酸水溶液的比例为 23:77 时菊苣酸分离较好,保留时间适宜,峰形较好,故流动相选为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(23:77)。

**3.4 紫锥菊不同植株部位菊苣酸的含量** 菊苣酸是紫锥菊的主要活性成分,其含量是评价紫锥菊药用价值的重要指标。本文分别分析了盛花期紫锥菊不同部位菊苣酸的含量,结果表明根部菊苣酸含量较高(12.1  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ),与 Callan<sup>[9]</sup> 报道的北美洲产紫锥菊根部菊苣酸含量(12  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相当;叶和花中菊苣酸的含量分别占整株植物的 44.7% 和

23.6%; 茎中菊苣酸含量最低(0.68 mg · g<sup>-1</sup>), 占整株植物的9.70%。菊苣酸含量分析结果提示, 紫锥菊中根、叶和花具有较好的药用价值。工业提取紫锥菊时, 为提高菊苣酸含量和提取效率, 可考虑去除茎部。

参考文献

- 1 YAO Xing-dong(姚兴东), NIE Yuan-mei(聂圆梅). HPLC analysis of phenolic compounds in *Echinacea* species(紫锥花种属中酚类化合物的HPLC分析). *J Anal Sci*(分析科学学报) 2006 22(2): 199
- 2 Vimalanathan S, Kang L, Amiguet VT *et al.* *Echinacea purpurea* aerial parts contain multiple antiviral compounds. *Pharm Biol*, 2005, 43(9): 740
- 3 WANG Hong(王弘), LIU Wen-zhi(刘文芝). Determination of cichoric acid in *Echinacea purpurea*(松果菊中有效成分菊苣酸含量测定). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2002 27(6): 418
- 4 WU Qi-lin(吴启林). Study on the extraction and purification process of cichoric acid in *Echinacea purpurea*(紫锥菊中菊苣酸提取纯化工艺研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2004, 35(9): 995
- 5 DOU De-ming(窦德明), CUI Shu-yu(崔树玉). Assaying of cichoric acid in introducing plant of *Echinacea purpurea*(引种紫锥菊有效成分菊苣酸含量研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2001 32(11): 987
- 6 CHEN Rong(陈荣), WU Hong(吴鸿). Effect of nitrogen, phosphorus and potassium on yield and quality of *Echinacea purpurea*(氮磷钾配施对紫锥菊产量和质量的影响). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2006 38(6): 917
- 7 Tang Tie-xin, Wu Hong. An image analysis system for thin-layer chromatography quantification and its validation. *J Chromatogr Sci*, 2008 46(6): 560
- 8 XU Du(徐度), TANG Yu-wei(唐宇伟), ZHU Wei(朱伟). Determination of 2 caffeic acid derivatives in *Echinacea* extracts by RP-HPLC(RP-HPLC测定紫锥菊提取物中2种咖啡酸衍生物的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药) 2006 28(10): 1493
- 9 Callan NW, Yokelson T, Wall-MacLane S *et al.* Seasonal trends and plant density effects on cichoric acid in *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *J Herbs Spices Med Plants* 2005 11(3): 35

(本文于2010年10月13日收到)

中国科协 2011 年工作要点(一)

2011 年是中国共产党成立 90 周年,也是“十二五”开局之年,科协工作的总体要求是:高举中国特色社会主义伟大旗帜,以邓小平理论和“三个代表”重要思想为指导,深入贯彻落实科学发展观,按照党的十七大、十七届三中、四中、五中全会精神和胡锦涛总书记 12·15 讲话要求,团结带领广大科技工作者,以召开中国科协八大为契机,围绕科学发展主题和加快转变经济发展方式主线,立足服务、促进和谐,深入基层、务求实效,为增强自主创新能力、提高全民科学素质、完成“十二五”规划、全面建成小康社会作出新的更大贡献。

一、认真学习、深入贯彻党的十七届五中全会和中央经济工作会议精神,团结带领广大科技工作者努力为加快转变经济发展方式服务

1. 组织开展高水平的学术交流活动,着力提升自主创新能力; 2. 着眼于把创新要素引入企业,推动建立企业为主体、市场为导向、产学研相结合的技术创新体系; 3. 切实加大“科普惠农兴村计划”实施力度; 4. 努力为党和政府科学决策发挥好国家级科技思想库作用; 5. 精心组织开展对外科技交流合作活动。

二、充分发挥科普工作主要社会力量的作用,努力为提高全民科学素质、建设人力资源强国服务

6. 修改完善并实施好全民科学素质行动计划纲要实施方案; 7. 进一步扩大全国科普日的品牌示范作用; 8. 切实加强重点人群科学素质工作; 9. 着力提高科普资源共建共享水平。

三、充分发挥团结动员科技工作者的独特作用,努力为建设创新型科技人才队伍服务

10. 进一步加大人才工作力度; 11. 大力引进举荐高层次人才; 12. 继续办好“12·15”会员日等重要活动,广泛宣传优秀科技工作者; 13. 深入开展继续教育和专门培训活动; 14. 推动和谐学术生态建设。