

# 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的制备及其对HeLa 细胞的抗增殖活性研究

施琦渊<sup>1</sup>, 吴家琪<sup>1</sup>, 於佳露<sup>1</sup>, 张心怡<sup>1</sup>, 李钦<sup>2</sup>, 褚建波<sup>1</sup>, 施菁<sup>1\*</sup> (1.杭州医学院, 杭州 310053; 2.浙江省医学科学院药物研究所, 杭州 310013)

**摘要:** 目的 制备高纯度 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸, 并评价其对宫颈癌 HeLa 细胞的抗增殖活性。方法 采用柱色谱提取法和中压液相色谱法从奇蒿花中分离、纯化得到高纯度的 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸。采用 MTT 法评价该化合物对宫颈癌 HeLa 细胞的体外抗增殖活性。结果 柱色谱提取的提取率和中压液相色谱法的回收率分别为 99.0%, 61.2%, 总回收率为 54.0%。随着 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸浓度升高, HeLa 细胞存活率下降, 细胞形态损伤增加, 受试药物的  $IC_{50}$  值为  $26.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 本研究提供了一种简单、高效、节能的 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸制备方法。3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对 HeLa 细胞具有一定的体外抗增殖活性。

**关键词:** 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸; 奇蒿; 柱色谱提取法; 中压液相色谱法; 抗增殖活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)14-1738-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.14.003

引用本文: 施琦渊, 吴家琪, 於佳露, 等. 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的制备及其对 HeLa 细胞的抗增殖活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1738-1742.

## Preparation of 3,5-*O*-dicaffeoyl Quinic Acid and Its Antiproliferative Activity on HeLa Cells

SHI Qiyuan<sup>1</sup>, WU Jiaqi<sup>1</sup>, YU Jialu<sup>1</sup>, ZHANG Xinyi<sup>1</sup>, LI Qin<sup>2</sup>, CHU Jianbo<sup>1</sup>, SHI Jing<sup>1\*</sup> (1. Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; 2. Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the preparing technology of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid with high purity and its antiproliferative activity on HeLa cells. **METHODS** 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid was prepared by column chromatographic extraction methods coupled with medium pressure liquid chromatography from flower of *Artemisia anomala*. The antiproliferative activity of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid on HeLa cell was evaluated by MTT method. **RESULTS** The extraction and purification recovery yield were 99.0% and 61.2%, respectively. The total recovery yield of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid reached 54.0%. With the increase of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid concentration, the HeLa cells viability decreased and the cell morphological damage increased. The  $IC_{50}$  value of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid on HeLa cells was  $26.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . **CONCLUSION** A simple, efficient, energy-saving 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid preparation method is developed. The compound displays good antiproliferative activity on HeLa cells *in vitro*.

**KEYWORDS:** 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid; *Artemisia anomala*; column chromatographic extraction method; medium pressure liquid chromatography; antiproliferative activity

奇蒿(*Artemisia anomala* S. Moore)为菊科多年生草本植物,常用作止痛药、抗生素和伤口愈合剂<sup>[1-2]</sup>,在其加工、运输过程中,花容易脱落,常被丢弃。本课题组对奇蒿花进行了初步化学成分研究,首次从中分离、纯化得到一种含量较高的化合物(>1%),经结构鉴定为 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸。出于废物利用和增加附加值的考虑,本研究报道了一种制备 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的新方法,即以奇蒿花为原料,采用柱色谱提取法,以中压液相色谱法为分离方法,并以所得化合物为药理活

性研究用的试药,研究其对宫颈癌 HeLa 细胞的抗增殖活性,以期奇蒿的综合开发利用提供参考。

### 1 仪器与材料

1260 高效液相色谱仪、四元泵、DAD 检测器(美国 Agilent 公司);中压制备液相色谱仪、二元泵(瑞士 BUCHI 公司);New classic MF 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 公司);BioRad 680 酶标仪(美国伯乐公司);DMI3000B 荧光倒置显微镜(Leica 公司)。

奇蒿采于浙江省杭州市瓶窑镇奇鹤村;对照

基金项目:浙江省医药卫生项目(2017KY311);“十三五”浙江省中医药(中西医结合)重点学科建设计划项目(2017-XK-A43)

作者简介:施琦渊,男,博士,讲师 Tel: (0571)87692881 E-mail: shiqiyuan@hmc.edu.cn \*通信作者:施菁,女,硕士,教授 Tel: (0571)87692894 E-mail: 2002035004@hmc.edu.cn

品 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: A0026; 纯度>98%); 人宫颈癌 HeLa 细胞株(中科院上海细胞库); 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲酸、醋酸均为色谱纯, 来自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DEME 高糖培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); MTT、DMSO 均来自碧云天生物技术; 水(重蒸水); 乙醇、磷酸等均为分析纯, 来自天津永大化学试剂有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸定量测定方法

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 40 °C; 检测波长为 328 nm; 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>; 流动相为乙腈-5%醋酸溶液(14:86)。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品约 10 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解, 定量, 摇匀, 即得对照品储备液。取对照品储备液适量, 稀释即得对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取样品溶液, 加 2%醋酸溶液稀释, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 即得供试品溶液。

**2.1.4 测定** 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪测定, 典型样品的色谱图见图 1。

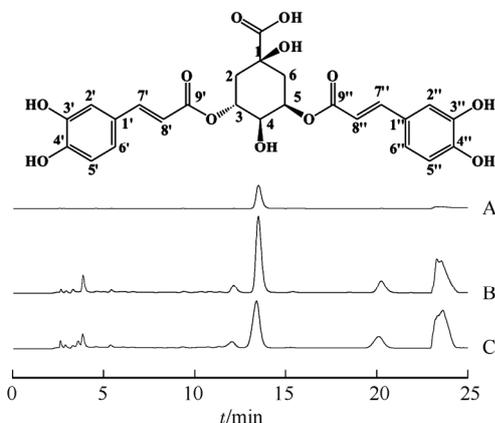


图 1 典型样品的色谱图

A-对照品溶液; B-对照品+供试品溶液; C-供试品溶液。

Fig. 1 Typical chromatograms of test sample

A-standard solution; B-standard and sample solution; C-sample solution.

## 2.2 提取

**2.2.1 乙醇浓度的选择** 取奇蒿花粉约 10 g, 精密称定, 分别加入 100 mL 的 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%乙醇溶液, 浸泡提取 1 h, 过滤, 取续滤液, 液相分析, 结果见图 2。结果表明, 随

着乙醇浓度的增加, 3,5-*O*-咖啡酰基奎宁酸的得率先升后降, 乙醇浓度为 60%时, 得率最高, 因此选择 60%乙醇溶液作为后续试验的提取溶剂。

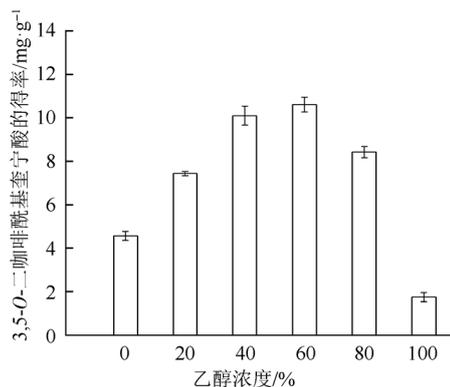


图 2 乙醇浓度对 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸提取的影响 (n=3)

Fig. 2 Effects of ethanol concentration on the extraction of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid(n=3)

**2.2.2 浸泡溶剂用量的选择** 取奇蒿花粉约 10 g, 精密称定, 加入 100 mL 的 60%乙醇溶液, 采用纱布滤过的方法, 在 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h 测定未被药材吸收的溶剂体积。实验结果表明, 奇蒿花粉最多可吸收 3.8 倍量的 60%乙醇溶液, 为了便于操作, 选择浸泡溶剂用量为 4 倍量。

**2.2.3 浸泡时间的选择** 取奇蒿花粉约 10 g, 精密称定, 加入 40 mL 的 60%乙醇溶液, 分别在 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 取样分析。实验结果表明, 3,5-*O*-咖啡酰基奎宁酸的得率先快速增加, 后趋于平稳, 在 4 h 左右达到平衡, 见图 3。因此浸泡时间选择 4 h。

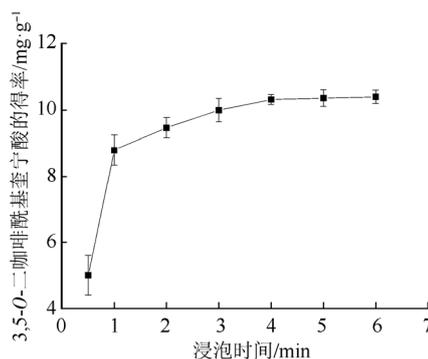


图 3 浸泡时间对 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸提取的影响 (n=3)

Fig. 3 Effects of macerating time on the extraction of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid(n=3)

**2.2.4 单根和串联柱色谱提取** 基于上述单因素实验结果, 取奇蒿花粉约 10 g, 精密称定, 置于盛有 40 mL 的 60%乙醇溶液的玻璃柱中(直径

1.8 cm, 径高比 10/1), 自由沉降, 室温(20 °C)浸泡 4 h, 60%乙醇溶液洗脱, 流速为 4 BV·h<sup>-1</sup>。洗脱液分段收集并分析, 每份 40 mL。实验结果表明, 32 倍量 60%乙醇溶液可将奇蒿花粉中的 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸提净(图 4)。为减少提取溶剂用量, 将柱色谱串联, 单根柱色谱提取所得洗脱液, 仅保留前 3 份作为终产物, 第 4 份作为下一个提取单元的浸泡溶剂, 第 5, 6, 7, 8 份作为下一个提取单元的洗脱溶剂。

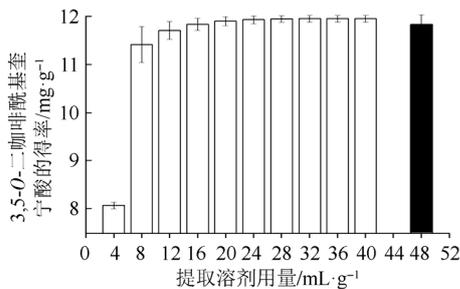


图 4 单根(白柱)和串联柱色谱法(黑柱, 12 倍量 60%乙醇)从奇蒿花中提取 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量( $n=3$ )

Fig. 4 Extraction of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid from *Artemisia anomala* flower by non-cyclic single CCE with 60% ethanol(white bars) and by the cyclic CCE with 12-fold volume of 60% ethanol(black bar)( $n=3$ )

另取奇蒿花约 10 g, 精密称定, 加 10 倍量 60%乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 即得回流提取液, 作为柱色谱提取法研究的对照。

实验结果表明, 串联柱色谱提取方法的提取率可达 99.0%(12 倍量 60%乙醇), 比传统热回流提取方法高 17.6%(提取 2 次, 每次 10 倍量 60%乙醇), 仅比单根柱色谱提取方法低 1%(32 倍量 60%乙醇), 结果见表 1。

表 1 不同提取方法的 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸得率和提取率( $n=3$ )

Tab. 1 Extracting efficiency of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid by different extraction methods( $n=3$ )

提取方法	3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸得率/mg·g <sup>-1</sup>	提取率/%
传统回流提取法	9.72±0.09	81.4±0.9
单根柱色谱提取法	11.95±0.06	100.0±0.6
串联柱色谱提取法	11.83±0.12	99.0±1.1

### 2.3 浓缩

取串联柱色谱提取法所得洗脱液, 60 °C减压浓缩至生药浓度分别为 0.1, 0.2, 0.25, 0.33, 0.5 g·mL<sup>-1</sup>。浓缩液经 5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 30 min, 取上清液, 加 2%醋酸溶液稀释, 液相分析。实验

结果表明, 随着浓缩程度的不断增加, 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的回收率不断降低, 当浓缩液的浓度为生药 0.33 g·mL<sup>-1</sup>时, 回收率仅为 76.6%。而浓缩程度过低, 则后续纯化过程中上样体积过大, 谱带展宽, 影响中压液相色谱分离效果。综合考虑, 选择生药浓度为 0.25 g·mL<sup>-1</sup>作为浓缩终点(回收率为 89.1%)。结果见图 5。

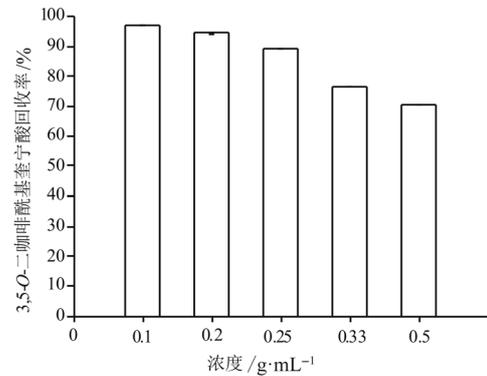


图 5 浓缩对于 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸回收率的影响( $n=3$ )

Fig. 5 Effects of concentration process on the recovery of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid( $n=3$ )

### 2.4 纯化

通过对流动相组成、上样量、流速等条件的优化, 优选得到以下最佳中压液相色谱分离条件: 取生药浓度为 0.25 g·mL<sup>-1</sup>的浓缩液 20 mL, 经 13 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 后, 取上清液, 置于装有反相硅胶(50 μm)的玻璃柱上(15 mm×250 mm, I.D.), 室温条件下(20 °C), 以乙醇-5%醋酸溶液(5:95)为流动相, 等度洗脱, 流速为 20 mL·min<sup>-1</sup>, 收集洗脱液(每份 50 mL), 液相分析, 中压液相色谱分离结果见图 6。根据测定结果, 合并组分, 减压浓缩至干, 即得目标产物。在该实验条件下, 1 次中压液相色谱分离可制备得到 32.3 mg 高纯度 3,5-*O*-咖啡酰基奎宁酸(峰面积归一化法测定纯度>98%), 纯化过程的回收率为 61.2%。

### 2.5 结构鉴定

ESI-TOFMS 谱图显示[M-H]<sup>-</sup>( $m/z$  515.119 4)和[M+H]<sup>+</sup>( $m/z$  517.134 5)信号。

<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz): δ 2.16~2.35(4H, m, H-2, -6), 4.00(1H, dd,  $J=3.0, 7.5$  Hz, H-4), 5.41(1H, m, H-5), 5.45(1H, m, H-3), 6.29 和 6.38(1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8', -8''), 6.80 和 6.81(1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5', -5''), 6.98 和 6.99(1H, dd,  $J=2.0, 8.0$  Hz, H-6', -6''), 6.99

和 7.00 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2', -2''), 7.60 和 7.64(1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-7', -7'')。

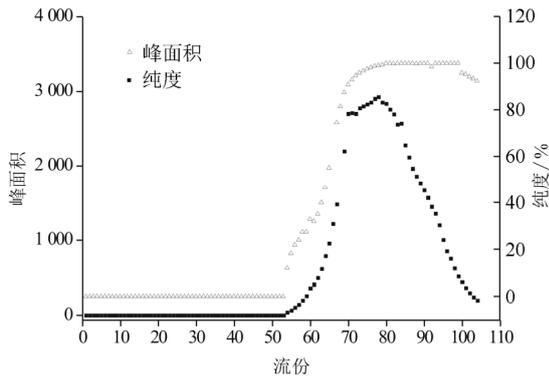


图 6 最佳中压液相色谱条件下分离所得流份的峰面积和纯度  
Fig. 6 Peak areas and purity of medium pressure liquid chromatography elutes under optimized conditions

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz):  $\delta$  34.69(C-2), 36.44(C-6), 69.35(C-4), 70.73(C-3), 71.27(C-5), 73.45(C-1), 113.72 和 113.78(C-8', -8''), 114.20 (C-2', -2''), 115.11(C-5', -5''), 121.64 和 121.71 (C-6', -6''), 126.42 和 126.54(C-1', -1''), 145.38 (C-3', -3''), 145.71 和 145.92(C-7', C-7''), 148.11 和 148.21(C-4', -4''), 167.07 和 167.55(C-9', -9''), 173.98(C-7)。

上述质谱、 $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  数据与文献 [3]报道基本一致。

## 2.6 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对 HeLa 细胞的抗增殖活性

体外肿瘤细胞增殖抑制试验(MTT法)<sup>[4]</sup>: 取对数生长期人宫颈癌 HeLa 细胞, 0.25%胰蛋白酶消化后, 调整细胞悬液浓度为  $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中。次日给药(每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 分别设空白对照组、细胞对照组以及不同浓度药物组, 于 37  $^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h 后, 采用倒置显微镜观察, 拍照记录各组细胞形态。每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 以 PBS 培养液溶解), 继续培养 4 h。以移液枪小心吸去上清, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 室温置于摇床 10 min, 酶标仪于 490 nm 处测定 OD 值, 计算细胞存活率[细胞存活率(%)=( $OD_{\text{药物组}} - OD_{\text{空白对照组}} / (OD_{\text{细胞对照组}} - OD_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ )]和受试药物的半数抑制浓度  $IC_{50}$ 。

细胞形态结果见图 7, 48 h 时, 暴露于  $15.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  药物的细胞, 形态发生明显改变, 细胞轮廓变圆, 贴壁不紧密, 细胞数量减少, 浓度越高, 细胞损伤越严重。

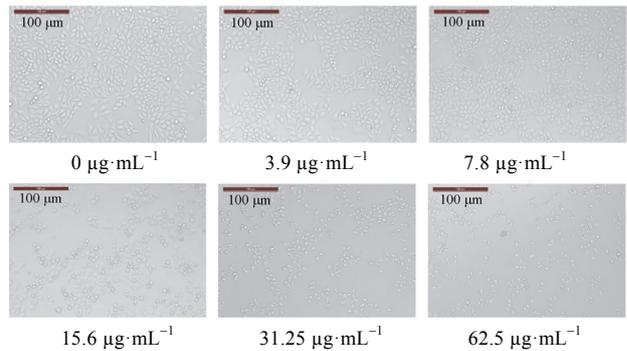


图 7 不同浓度 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对人宫颈癌 HeLa 细胞形态的影响

Fig. 7 Effect of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid with different concentration on the morphology of HeLa cells

细胞存活率见图 8, 随 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸浓度升高, 细胞存活率下降, 当浓度达到  $15.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 与正常对照组比较, 细胞存活率有显著差异( $P < 0.05$ ),  $IC_{50}$  值为  $26.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 95% 置信区间为  $22.17 \sim 31.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。研究结果表明, 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对 HeLa 细胞具有一定的体外抗增殖活性。

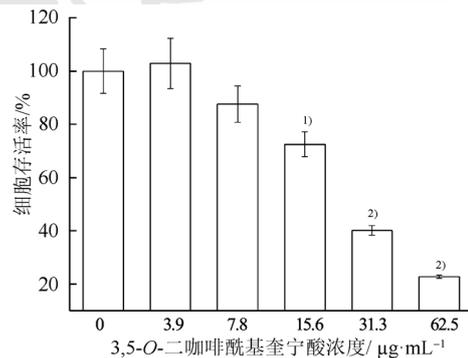


图 8 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对人宫颈癌 HeLa 细胞存活率的影响( $n=3$ )

与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 8 Effect of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid on the morphology of HeLa cells( $n=3$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

## 3 讨论

3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的制备方法有化学合成和植化分离等方法。Raheem 等<sup>[5]</sup>报道了一种 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的合成方法, 合成涉及羟基的保护和脱保护, 九步反应, 得率约为 20.5%。也有学者报道从植物中分离 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸, 但多数是从植物化学成分的角度研究, 得率较低, 不适合工业化生产。本研究以奇蒿加工过程中产生的废弃物奇蒿花为原料, 研究 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的制备工艺, 总回收率高

(54.0%)，操作步骤少，适合大规模生产，为高纯度 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸提供了一种新方法。

本研究采用柱色谱提取和中压液相色谱法作为提取和纯化方法，设备简单、操作简便、生产效率更高。应用柱色谱从植物中提取天然产物，已被证明比传统的萃取方法更有效，溶剂用量更少，能耗更低，特别适合于热不稳定天然活性成分的提取<sup>[6-7]</sup>。本课题组前期研究发现 3,5-*O*-咖啡酰基奎宁酸的热稳定性较差<sup>[8]</sup>，本研究结果也表明，加热回流提取法得率低于柱色谱提取法，而基于罐组逆流提取原理的串联柱色谱提取法，比单根柱色谱提取法，溶剂用量更少，提取效率更高。中压液相色谱法常用于天然活性成分的分离纯化<sup>[9-12]</sup>，兼顾柱效和系统压力，对仪器设备要求较低，可在较低压力下完成对组分的分离，易于扩大生产。本研究通过对流动相组成、上样量、流速等条件的优化，在中压设备允许的压力范围内，在较短的时间内(5 h 内)，实现了目标成分和杂质的部分分离，得到了高纯度的 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸。串联柱色谱提取结合中压法是从植物材料中大量制备热敏性成分的有效方法。

在抗肿瘤活性方面，文献报道 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸能抑制癌蛋白 E<sub>6</sub> 和 E<sub>6</sub>AP，同时抑制 SiHa 和 CaSKi 细胞(宫颈癌细胞)的增殖<sup>[13]</sup>，本研究对 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对 HeLa 细胞的抗增殖活性进行了研究，为 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸及奇蒿进一步开发利用提供了参考。

## REFERENCES

- [1] NI F Y, SONG Y L, LIU L, et al. Preparation technology of isochlorogenic acids A, B, and C [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2015, 46(3): 369-373.
- [2] XU R L, SHI Y P. Chemical constituents from Artemisiae Anomala Herba [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2014, 45(11): 1521-1525.

- [3] ZHU X F, ZHANG H X, LO R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities [J]. J Agric Food Chem, 2006, 52(24): 7272-7278.
- [4] SHI Z T, BAO H Y, FENG S. Antitumor activity and structure-activity relationship of seven lanostane-type triterpenes from *Fomitopsis pinicola* and *F. officinalis* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(5): 915-922.
- [5] RAHEEM K S, BOTTING N P, WILLIAMSON G, et al. Total synthesis of 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid and its derivatives [J]. Tetrahedron Letters, 2011, 52 (52): 7175-7177.
- [6] WU Y J, SHI Q Y, LEI H L, et al. Simple and efficient preparation of 3,6'-disinapoylsucrose from *Polygalae Radix* [J]. Sep Purif Technol, 2014, 125(43): 7-13.
- [7] SHI Q Y, GENG S, CHENG J L, et al. An efficient procedure for preparing main acylated pentasaccharides from *Polygalae Radix* using integrated extraction-adsorption method followed by semi-preparative high performance liquid chromatography [J]. Sep Purif Technol, 2015(153): 84-90.
- [8] WU J, YU Y N, ZHANG X Y, et al. Study on the stability and antioxidant activity of 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(10): 1397-1400.
- [9] WEI Z F, LUO M, ZHAO C J, et al. An efficient preparative procedure for main flavone aglycones from *Equisetum palustre* L. using macroporous resin followed by gel resin flash chromatography [J]. Sep Purif Technol, 2013(118): 680-689.
- [10] MA F Y, LUO M, ZHAO C J, et al. Simple and efficient preparation of biochanin A and genistein from *Dalbergia odorifera* T. Chen leaves using macroporous resin followed by flash chromatography [J]. Sep Purif Technol, 2013(120): 310-318.
- [11] ZONG X F, ZHANG H R, LI B, et al. Preparative separation of hydroxyl safflowers yellow A and anhydrosafflor yellow B in plant extract of *Carthamus tinctorius* L. by reverse-phase medium-pressure liquid chromatography [J]. J Liq Chromatogr R T, 2013, 36(14): 1947-1958.
- [12] PATSAVAS M C, BYRNE R H, LIU X W. Purification of meta-cresol purple and cresol red by flash chromatography: Procedures for ensuring accurate spectrophotometric seawater pH measurements [J]. Mar Chem, 2013, 150(2): 19-24.
- [13] BAEK T W, LEE K A, AHN M J, et al. Effects of 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid from *Artemisia scoparia* Waldstein et Kitamura on the function of HPV 16 oncoproteins [J]. Korean J Pharmacognosy, 2004, 35(4): 368-374.

收稿日期: 2018-11-19

(本文责编: 蔡珊珊)