

栀子中2个成分的分离鉴定及不同采收期 栀子样品的比较分析

于晓蕾, 李艳芳*, 苏瑞强, 赵志全

(鲁南制药集团股份有限公司, 中药制药共性技术国家重点实验室,
山东省中药制药新技术重点实验室, 山东 临沂 276006)

[摘要] 目的: 分离制备栀子药材中化学成分, 建立栀子中该成分 HPLC 含量测定法。方法: 色谱条件采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液(18:82)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 327 nm, 柱温 40 °C。结果: 从栀子药材中分离鉴定出 6"-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷(1), 3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸(2) 2 个成分; 这 2 个成分在 0.118 8~1.188, 0.122 8~1.228 μg 线性关系良好; 平均回收率分别为 99.23%, 100.4%, RSD 分别为 2.4%, 2.3%; 栀子不同采收期对 2 种成分含量影响较大。结论: 本试验结果能较好地反映栀子不同采收期成分的变化, 可为栀子药材质量标准的完善提供参考。

[关键词] 栀子; 6"-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷; 3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0040-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020040

Isolation, Identification of Two Constituents in Gardeniae Fructus and Their Quantitative Analysis in Different Harvesting Time YU Xiao-lei, LI Yan-fang*, SU Rui-qiang, ZHAO Zhi-quan (*Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd., State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shandong Provincial Key Laboratory of New Manufacture Technology of TCM, Linyi 276006, China*)

[Abstract] **Objective:** To prepare chemical constituents and establish an HPLC method for determining these constituents in Gardeniae Fructus. **Method:** The chromatographic separations were obtained on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid aqueous solution (18:82) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 327 nm, and the column temperature was 40 °C. **Result:** 6"-p-coumaroyl genipin gentiobioside (1) and 3,5-di-O-caffeoyl-4-O-(3-hydroxy-3-methyl) glutaroyl quinic acid (2) were isolated from Gardeniae Fructus. These two constituents showed good linear relationship in range of 0.118 8-1.188 μg and 0.122 8-1.228 μg, respectively. The average recoveries were 99.23% (RSD 2.4%) and 100.4% (RSD 2.3%). Harvesting time has significant effect on the contents of the two constituents. **Conclusion:** The tests reflect the variation of the constituents in different harvesting time and the methods established are suitable for the quality improvement of Gardeniae Fructus.

[Key words] Gardeniae Fructus; 6"-p-coumaroyl genipin gentiobioside; 3,5-di-O-caffeoyl-4-O-(3-hydroxy-3-methyl) glutaroyl quinic acid

栀子具泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效^[1]。栀子中化学成分复杂,包括环烯醚萜苷类、萜类、有机酸类、黄酮类、多糖类等成分^[2]。以栀子

苷为代表的环烯醚萜类为其主要活性成分,具有解热、抗炎、保肝、利胆、镇痛、镇静、抗菌等作用^[3],本课题组前期对该类成分进行了一系列研究^[4-5]。而

[收稿日期] 20140331(007)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2012CB724001)

[第一作者] 于晓蕾, 在职硕士, 工程师, 从事新药研究与开发, Tel:0539-8336639, E-mail:douxibo@sina.com

[通讯作者] * 李艳芳, 硕士, 工程师, 从事中药新药研发与质量控制研究, Tel:15953943021, E-mail:liyanfang1981@163.com

以绿原酸为代表的有机酸类作为栀子中另一大类成分,亦具有广泛的药理活性^[6],但对栀子中该类化合物的测定研究报告较少^[7]。本研究从栀子药材中分离鉴定了6"-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷(**1**),3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸(**2**)2个成分;通过建立上述2种成分的HPLC测定法,比较该2种成分在不同采收期内的含量变化,为进一步完善栀子质量控制提供理论依据。

1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司),Dr Flash II型中低压制制备色谱仪(上海利穗化工科技有限公司),Varian型高压制备色谱仪(美国Varian公司),LGJ-10D型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司)。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

栀子样品共9批,分别于2012年8月~12月采收于江西樟树,经鲁南制药集团高级工程师李守信鉴定,均为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥果实。

2 提取与分离

称取栀子药材1 kg,适当粉碎,加70%乙醇回流提取2次,合并提取液,回收乙醇,浓缩至适量,加入约8倍量95%乙醇搅拌醇沉,放置24 h,滤过,滤液回收乙醇至无醇味,将所得浓缩液加入适量水溶解,过滤后调pH至7~8,加至AB-8型大孔吸附树脂柱,以水、95%乙醇洗脱,回收溶剂,分别得到Fr.1,Fr.2。

将Fr.2部分以适量水溶散,加至AB-8型大孔吸附树脂柱,以水、20%乙醇洗脱,水液弃去,20%乙醇洗脱液回收溶剂后,依次经常压酸性氧化铝柱色谱、硅胶柱色谱、中低压制制备液相色谱、高压制备液相色谱纯化并冷冻干燥得化合物**1**(300 mg)。

将Fr.1部分调pH至4~5,加至AB-8型大孔吸附树脂柱,以水、95%乙醇洗脱,水液弃去,醇液回收乙醇,加入适量水溶散,用乙酸乙酯萃取。取乙酸乙酯部位,依次经聚酰胺柱色谱、中低压制制备液相色谱、高压制备液相色谱纯化并冷冻干燥得化合物**2**(200 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1** 白色无定形粉末。ESI-MS m/z 719.4 [M + Na]⁺。¹H-NMR(600 MHz, D₂O) δ : 4.66(1H, d, J = 8.4 Hz, H-1), 7.10(1H, H-3), 2.43(1H, m, H-5), 2.37(1H, m, H-6_A), 1.50(1H, m, H-

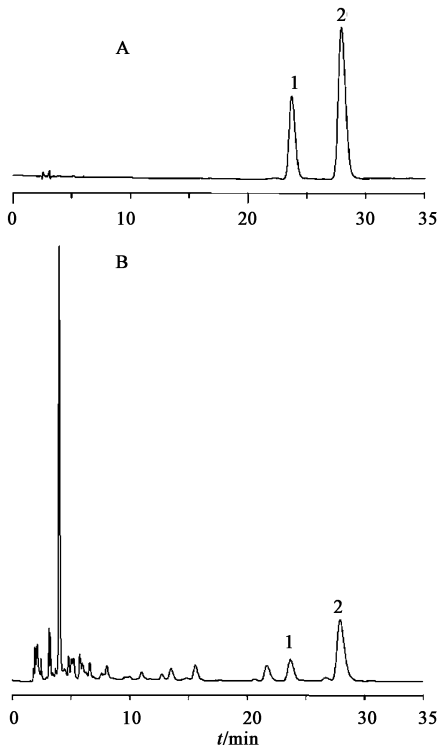
6_B), 5.46(1H, H-7), 2.78(1H, dd, J = 8.4, 7.8 Hz, H-9), 4.03(2H, d, J = 13.8 Hz, H-10_A, H-10_B), 3.41(3H, s, COOCH₃), 5.94(1H, d, J = 15.6 Hz, H-2'), 7.25(1H, d, J = 15.6 Hz, H-3'), 7.10(2H, d, J = 7.8 Hz, H-5', H-9'), 6.61(2H, d, J = 7.8 Hz, H-6', H-8'), 4.66(1H, d, J = 8.4 Hz, Glc-H_{1'}), 3.97(1H, dd, J = 24.0, 14.4 Hz, Glc-H_{6'A}), 3.91(1H, dd, J = 24.0, 10.8 Hz, Glc-H_{6'B}), 4.55(1H, d, J = 8.4 Hz, Glc-H_{1''}), 3.49(1H, m, Glc-H_{5'}), 3.70(1H, m, Glc-H_{5''}), 4.31(1H, dd, J = 15.6, 8.4 Hz, Glc-H_{6''A}), 4.27(1H, dd, J = 15.6, 7.8 Hz, Glc-H_{6''B}), 3.15~3.36(6H, m, Glc-H_{2',2'',3',3'',4',4''})。 ¹³C-NMR(600 MHz, D₂O) 给出30个碳信号 δ : 97.3(C-1), 152.3(C-3), 110.9(C-4), 34.4(C-5), 38.0(C-6), 129.0(C-7), 141.5(C-8), 45.0(C-9), 68.5(C-10), 169.1(C-11), 51.6(C-12), 168.6(C-1'), 113.5(C-2'), 145.9(C-3'), 125.8(C-4'), 130.4(C-5', 9'), 115.8(C-6', 8'), 158.5(C-7'), 98.6(Glc-1'), 74.8(Glc-2'), 72.9(Glc-3'), 69.8(Glc-4'), 75.5(Glc-5'), 63.7(Glc-6'), 102.8(Glc-1''), 73.4(Glc-2''), 72.6(Glc-3''), 68.9(Glc-4''), 75.5(Glc-5''), 59.8(Glc-6'')。以上数据与文献[3]对照一致,由此可确定该化合物为6"-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷。

化合物**2** 灰白色无定形粉末。ESI-MS m/z 659.2 [M - H]⁻。 ¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 7.63(1H, d, J = 15.6 Hz, CA-olefin), 7.57(1H, d, J = 15.6 Hz, CA-olefin), 7.07(1H, d, J = 1.8 Hz, CA-H₂), 7.06(1H, d, J = 1.8 Hz, CA-H₂), 6.98(1H, dd, J = 1.8, 4.8 Hz, CA-H₆), 6.97(1H, dd, J = 1.8, 4.8 Hz, CA-H₆), 6.79(1H, d, J = 3.6 Hz, CA-H₅), 6.78(1H, d, J = 4.2 Hz, CA-H₅), 6.32(1H, d, J = 15.6 Hz, CA-olefin), 6.24(1H, d, J = 15.6 Hz, CA-olefin), 5.64(1H, m, QA-H₃), 5.64(1H, m, QA-H₃), 5.56(1H, m, QA-H₅), 5.29(1H, dd, J = 3.6 Hz, QA-H₄), 4.92(4H, CA-OH), 2.73(2H, m, GA-H₂), 2.69(2H, m, GA-H₄), 2.62(2H, m, GA-OH, QA-OH), 2.44(1H, dd, J = 4.2, 14.4 Hz, QA-H₆, axial), 2.35(1H, brd, QA-H₂, equatorial), 2.27(1H, brd, QA-H₆, equatorial), 2.17(1H, dd, J = 6.6, 14.4 Hz, QA-H₆, axial), 1.35(3H, s, GA-CH₃)。 ¹³C-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 175.6(QA-COO), 173.4(GA-COO), 170.1(GA-COO), 167.0(CA-COO), 166.5(CA-COO), 148.3(CA), 148.2(CA), 146.3(CA), 146.1

(CA), * 145.3 (CA), 126.4 (CA), 126.3 (CA), 121.8 (CA), 121.7 (CA), * 115.1 (CA), 113.8 (CA), 113.8 (CA), 113.6 (CA), 113.2 (CA), 73.1 (QA-C-1), 69.2 (QA-C-4), 68.3 (GA-C-3), * 67.6 (QA-C-3, QA-C-5), 45.1 (GA-C-4), 44.3 (GA-C-2), * 35.0 (QA-C-2, QA-C-6), 26.3 (GA-CH₃)。CA, QA, GA 分别代表咖啡酸, 奎宁酸, (3-羟基-3-甲基)戊二酸(*代表两个磁等同C)。以上数据与文献[4]对照一致, 由此可确定该化合物为3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸。

4 含量测定

4.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(18:82), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 327 nm, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。上述色谱条件下, 6"-对香豆酰基-京尼平龙胆双糖苷(1), 3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸(2) 2 个成分分离度良好, 见图 1。



1. 6"-对香豆酰基-京尼平龙胆双糖苷; 2. 3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸; A. 混合对照品; B. 样品

图1 梔子样品的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Gardeniae Fructus

4.2 对照品溶液的制备 精密称取 1, 2 2 个对照品(经 HPLC 面积归一化法测定纯度均大于 98%) 适量, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并

定容至刻度, 摇匀, 即得各对照品贮备液。依次精密吸取各贮备液适量于同一 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 0.118 8, 0.122 8 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 于 4 °C 冰箱中冷藏, 备用。

4.3 供试品溶液的制备 取梔子粉末(过 4 号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 用 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

4.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 分别注入高效液相色谱仪, 按色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得成分 1 的回归方程 $Y = 1.716 \times 10^3 X + 0.257$ ($r = 0.9998$); 成分 2 的回归方程 $Y = 2.661 \times 10^3 X - 6.652$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 成分 1 在 0.118 8 ~ 1.188 μg, 成分 2 在 0.122 8 ~ 1.228 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

4.5 精密度试验 精密吸取 4.2 项下混合对照品溶液 5 μL, 按 4.1 项下色谱条件于 1 d 和 3 d 内连续进样, 测定成分 1 和 2 的峰面积, 结果 2 个成分峰面积的日内精密度 RSD 分别为 0.2%, 0.2%, 日间精密度 RSD 分别为 0.3%, 0.3%。

4.6 重复性试验 取同一批梔子药材粉末 6 份, 按 4.3 项下方法制备供试品溶液, 以 4.1 项下的色谱条件进样测定, 结果成分 1 和 2 的平均质量分数分别为 3.54, 2.80 mg·g⁻¹, RSD 依次为 1.4%, 1.7%, 表明该方法重复性良好。

4.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 4.1 项下色谱条件进样测定, 结果成分 1 和 2 峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.8 加样回收率试验 取已知含量样品粉末 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 按各成分在原药材中的含量, 分别精密加入适量对照品储备液, 按 4.3 项下方法制备供试品溶液, 测定, 计算加样回收率, 成分 1 和 2 的平均回收率为 99.23%, 100.4%, RSD 分别为 2.4%, 2.3%, 结果见表 1。

4.9 不同采收期梔子含量测定 取 9 批梔子不同采收期样品, 按 4.3 项下方法制备供试品溶液, 测定, 以外标法计算, 结果见表 2。

5 讨论

本研究借助液相色谱峰跟踪技术, 从中药梔子

表 1 栀子中 2 个成分加样回收率测定

Table 1 Results of recovery test of two compchents in Gardeniae Fructus

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.258 2	0.914	0.950	1.876	101.2	99.23	2.4
	0.251 4	0.890	0.950	1.812	97.01		
	0.252 7	0.895	0.950	1.832	98.68		
	0.249 6	0.884	0.950	1.808	97.26		
	0.254 3	0.900	0.950	1.835	98.34		
	0.248 9	0.881	0.950	1.859	102.9		
	2	0.258 2	0.723	0.737	1.459	99.91	100.4
0.251 4		0.704	0.737	1.424	97.73		
0.252 7		0.708	0.737	1.463	102.5		
0.249 6		0.699	0.737	1.427	98.85		
0.254 3		0.712	0.737	1.478	103.9		
0.248 9		0.697	0.737	1.432	99.73		

注:成分 1 为 6"-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷,成分 2 为 3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸。

中分离并鉴定出 6"-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷(1),3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸(2)2 个成分。结合前期研究^[5]和 2 个成分的分离鉴定,可为进一步完善栀子药材质量标准提供相应对照品。

在流动相的选择中,由于成分 2 为有机酸类,故选择酸性流动相系统,抑制其分子解离,使其峰形稳定,分离度良好。在检测波长的选择中,成分 2 最大吸收波长为 327 nm,成分 1 的最大吸收波长为 313 nm,但在 327 nm 处亦有较大吸收,故选择 327 nm 为检测波长。

本文建立了栀子中 1,2 两个成分的 HPLC 含量测定法,并对不同采收期的栀子药材进行分析测定。结果发现不同采收时间的栀子药材 2 个成分的含量有明显变化,其中 8 月中旬采收的栀子成分 1 未检测到含量,随采收时间推移,成分 1 含量迅速增高,并趋于稳定;栀子成分 2 含量则缓慢降低。以上数据可从一定程度上反映出栀子药材中 2 个成分

表 2 不同采收期栀子中 2 个成分的含量(n=3)

Table 2 Determination results of 2 constituents in Gardeniae Fructus of different harvesting time(n=3)

采收时间	成分 1	成分 2
8 月中旬	0.00	3.59
8 月中旬	0.00	2.73
8 月中旬	0.00	4.24
10 月中旬	1.87	3.18
10 月中旬	3.44	3.12
10 月中旬	3.57	3.21
11 月中旬	4.64	2.07
11 月中旬	3.19	2.84
11 月中旬	3.54	2.80

的含量随采收时间的变化趋势,为进一步完善栀子质量控制提供理论参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:231-232.

[2] 苗明三,李振国. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:708.

[3] 孟祥乐,李红伟,李颜,等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):959-967.

[4] 刘武占,范建伟,高艳红,等. HPLC 同时测定栀子中 8 个环烯醚萜苷类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(16):2417-2421.

[5] 李艳芳,范建伟,刘武占,等. 一测多评法测定栀子中 4 个环烯醚萜苷类成分的含量[J]. 中药材,2014,37(5):822-825.

[6] 庞瑞. 金银花有效成分的药理学研究进展[J]. 陕西中医学院学报,2011,34(5):77-79.

[7] 邬晓鸥,鲁静. 高效液相色谱法测定栀子中绿原酸的含量[J]. 中国中药杂志,1996,21(10):620-621.

[8] Yu Y, Xie Z L, Gao H, et al. Bioactive iridoid glucosides from the fruit of *Gardenia jasminoides* [J]. J Nat Prod, 2009, 72(8):1459-1464.

[9] Nishizama M, Izuhara R, Kaneko K, et al. 5-Lipoxygenase inhibitors isolated from *Gardeniae Fructus* [J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36(1):87-95.

[责任编辑 顾雪竹]