(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106496292 A
(43)申请公布日 2017.03.15

(21)申请号 201510563412.0

(22)申请日 2015.09.08

(71)申请人 中国中医科学院中药研究所
地址 100700 北京市东城区东直门内南小街16号

(72)发明人 张村 王云 刘慧 申立峰 姚蓝 李玲云

(51)Int.Cl.
C07H 17/04(2006.01)
C07H 1/08(2006.01)
A61K 36/744(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种从栀子中同时制备6个环烯醚萜苷类成分的方法

(57)摘要

本发明提供了一种高效快速从栀子中同时制备6个环烯醚萜苷类成分的方法，该方法是将栀子果实醇提物，经大孔吸附树脂粗分、反相中压制备液相色谱富集流分和反相高压分离纯化等3步操作，即可得到6个纯度达95%以上的单体化合物。此方法可扩大实验室分离规模，提高纯化效率。本发明制备工艺简单、成本低、提取效率高，最重要的是样品无浪费，结晶纯度高。

CN 106496292 A

1. 一种从栀子中高效纯化 6 个环烯醚萜苷类成分的方法，按照以下步骤进行：将栀子药材碾碎成粗颗粒，以含水乙醇提取，合并提取液减压浓缩挥去乙醇得浸膏；浸膏以适量水分散溶解后，采用大孔吸附树脂分离，先以水洗脱后，再以不同比例的水 - 乙醇洗脱，收集洗脱液，浓缩，冷冻干燥，环烯醚萜苷类成分集中的洗脱部位为黄褐色粉末；将黄褐色粉末以适量水或稀甲醇溶液溶解，微孔滤膜（0.22μm）过滤，反相中压制备液相色谱初步分离，流动相为低浓度的甲醇 - 水系统梯度洗脱，检测波长 238nm，在线监测按图收集 3 个主要的色谱峰，浓缩，冷冻干燥；经 HPLC 分析，第一个色谱峰为混合物，灰白色粉末，第二、第三个色谱峰分别为含量大于 90% 的单体成分，经甲醇重结晶纯度达到 95% 以上，其外观为白色粉末；将富集到的第一个色谱峰（灰白色粉末）以适量水或稀甲醇溶液溶解，微孔滤膜（0.22μm）过滤，反相高压制备液相色谱再分离，流动相为低浓度的乙腈等度洗脱，检测波长 238nm，按照图谱收集 4 个色谱峰流分，浓缩，冷冻干燥，即可得到 4 个含量大于 95% 的环烯醚萜苷类成分，均为白色粉末。

2. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（1）中所用的提取溶剂为 40-60% 乙醇，加溶剂量为样品的 5-10 倍量，加热回流提取时间为 1-2 小时，提取次数为 2-3 次，浓缩至 1-2g 生药 /mL。

3. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（2）中所用的树脂为 D101，HPD-100，HP-20 或 AB-8。

4. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（2）中洗脱溶剂分别按照水、20-35% 乙醇、45-55% 乙醇、65-75% 乙醇、90-98% 乙醇依次洗脱，各梯度洗脱的体积为 6-10 倍柱体积。

5. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（2）中环烯醚萜苷类成分集中的洗脱部位为 20-35% 的乙醇洗脱部位。

6. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（3）中反相中压制备液相初步分离所用的制备柱填料为 C18，粒径 25-75μm，制备柱长 30-100cm，内径 2-4cm。

7. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（3）中低浓度的甲醇梯度洗脱方式为 10% 甲醇、20% 甲醇、30% 甲醇分别洗脱 30-35min、30-35min、80-120min，流速为 5-20mL/min，并在线监测收集色谱峰。

8. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（3）中得到 2 个高纯度成分（京尼平苷和京尼平龙胆二糖苷），经重结晶纯度可达到 95% 以上。

9. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（4）中反相制备液相再分离纯化所用的制备柱填料为 C18，粒径 5-10μm，制备柱长 25-30cm，内径 1.5-4cm。

10. 根据权利要求书 1 所述，其特征在于：步骤（4）中所用流动相为 5-10% 乙腈等度洗脱，流速为 2-10mL/min，按出峰个数及出峰时间收集得到 4 个含量达到 95% 以上高纯度成分（去乙酰车叶草甘酸甲酯、羟异栀子苷、龙船花苷、鸡屎藤次苷甲酯）。

一种从栀子中同时制备6个环烯醚萜苷类成分的方法

技术领域

[0001] 本发明属于中药领域，涉及一种从中药栀子中高效同时制备6种环烯醚萜苷类成分的分离纯化方法，主要分离纯化去乙酰车叶草苷酸甲酯、羟异栀子苷、龙船花苷、鸡屎藤次苷甲酯、京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷和京尼平苷等6个单体化合物。

背景技术

[0002] 栀子为茜草科植物栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)的干燥成熟果实，具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒，外用消肿止痛的功效。药理学研究表明，栀子具有解热镇静、保肝利胆等功效，临床上用于治疗急性黄疸性肝炎、止痛、扭挫伤、冠心病等。

[0003] 以京尼平苷为代表的环烯醚萜类成分为栀子的主要药效成分，包括鸡屎藤次苷甲酯、羟异栀子苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷等，具有保肝、抗炎等多方面的药理活性，《中国药典》收载了以栀子苷为对照品的定性定量分析方法。随着对栀子的深入研究，迫切需要开发一种从栀子中高效分离纯化多种环烯醚萜类成分的方法，从而为栀子的质量评价、药效物质研究、临床应用及栀子相关制剂的深入研发奠定基础。但该类成分结构类似，极性相近，水溶性大，稳定性差，分离纯化较为困难。

[0004] 目前，从栀子中提取纯化环烯醚萜苷类成分多有报道，传统分离方法多采用柱色谱法，以有毒有机溶剂洗脱分离，耗时长，成本高，纯度不够理想，易造成环境污染。中国专利(一种用栀子果实制备高纯度栀子苷的方法，CN1706859A)采用大孔吸附树脂、低浓度乙醇选择性洗脱，仅得到纯度为98.9%的栀子苷一个单体成分。中国专利(用栀子果实制备栀子苷、京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷的方法，CN1706858A)采用大孔树脂、高速逆流色谱和制备液相相结合的方法，仅分离得到了栀子苷、京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷2个高纯度成分，且大量使用乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂。中国专利(一种提取去乙酰车叶草苷酸甲酯和鸡屎藤次苷甲酯的方法，CN103242390A)通过大孔树脂除杂、硅胶柱洗脱除杂和中低压制备液相分离得到去乙酰车叶草苷酸甲酯和鸡屎藤次苷甲酯2个单体类成分，操作过程繁琐，且对环境有污染。中国专利(一种用栀子果实制备总环烯醚萜苷的方法，CN1706860A)采用大孔树脂、低浓度乙醇洗脱的方法，得到环烯醚萜总苷的纯度为85.7%，其中栀子苷的含量为55-65%，未得到纯度大于95%以上的单体化合物。中国专利(栀子环烯醚萜总提取物及其制备方法和用途，CN1517326A)通过乙醇渗漉、乙醇回流提取或水煎煮方法得到环烯醚萜总提取物，该提取工艺较为粗放，未得到如京尼平苷等单体化合物。中国专利(栀子果实中环烯醚萜苷和藏红花素的分离富集方法，CN101012248A)通过大孔树脂分离，30%乙醇梯度洗脱富集得到环烯醚萜苷类组分，得率为6.5%，其中栀子苷含量为65%，60%乙醇梯度洗脱得到藏红花素类组分，得率为4.5%，其中藏红花素Ⅰ的含量为13%，未得到高纯度的单体类成分。上述几种方法仅能得到一种或少数几种环烯醚萜苷类成分，操作繁琐，目前还未见从栀子中同步制备6种环烯醚萜苷类成分的方法。

[0005] 本发明以栀子果实醇提物为原料，通过大孔吸附树脂柱粗分离、反相中压液相色谱富集和反相高压液相色谱制备纯化等3步高效分离、纯化，在线检测收集相应流份，冷冻

干燥，即可同时得到 6 个纯度大于 95% 的环烯醚萜苷类成分。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术的不足，提供了一种工艺简单、分离量大、成本低、易规模化的快速制备多种高纯度栀子环烯醚萜苷类成分的方法，经 3 步分离纯化即可得到高纯度的鸡屎藤次苷甲酯、羟异栀子苷、龙船花苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平 -1- β -D- 龙胆双糖苷和京尼平苷等 6 个单体化合物，技术方法简单、新颖、高效。

[0007] 为实现上述目的，本发明采用以下技术方案来实施：

1. 栀子醇提物的制备：取栀子果实粗颗粒，以 40-60% 的乙醇回流提取，尽可能将栀子中的化学成分提取完全，过滤，合并滤液。减压回收乙醇至无醇味，得栀子醇提物浸膏。

[0008] 2. 大孔吸附树脂柱分离：取栀子醇提物浸膏以适量水分散溶解后，通过大孔吸附树脂柱分离，顺序以水、不同浓度的水 - 乙醇梯度洗脱，收集各洗脱部位，适当浓缩，经 HPLC 检测对比分析，将环烯醚萜苷类成分集中部位减压浓缩，冷冻干燥得到黄褐色粉末。

[0009] 3. 中压制备液相分离富集：取黄褐色粉末以适量稀甲醇溶解，以优化的色谱分离条件，通过 ODS 反相中压制备柱分离，在线检测，收集主要的色谱峰，减压回收溶剂，冷冻干燥。经 HPLC 分析，得到相应的流份富集部位和 2 个单体化合物。

[0010] 4. 高压制备液相分离制备：将中压制备液相富集得到的部位，以优化的色谱分离条件，通过反相高压液相制备色谱柱分离，在线检测，按峰顺次收集 4 个色谱峰，分别减压回收溶剂，冷冻干燥。以 HPLC 面积归一化法检测纯度，得到 4 个单体化合物。

[0011] 5. 化合物结构鉴定：以 NMR 检测以及对照品对照法，鉴定 6 个化合物的结构。

[0012] 本发明与现有从栀子中制备环烯醚萜苷类成分的方法相比，具有以下技术优势：

（1）本发明工艺流程简单，操作简便，针对性强，分离效率高。

[0013] 栀子醇提物通过大孔吸附树脂柱分离，结合反相中、高压制备液相分离等 3 步操作，即可从栀子中分离制备 6 个环烯醚萜苷类成分，工艺流程较简单。以大孔吸附树脂柱分离结合 HPLC 检测分析，一步锁定环烯醚萜苷类成分目标洗脱部位，且经水洗脱部位的除杂，减少了下一步对中压制备液相色谱柱的污染；反相中、高压制备液相色谱具有快速、高效、在线实时监测的优点，目标成分针对性强，制备的单体化合物纯度高；与常用的硅胶柱层析多次反复分离相比，减少了由于死吸附而引起的目标成分的大量损失，避免了大量有毒有机溶剂的使用，因而大大提高了分离效率。

[0014] （2）本发明采用的技术手段稳定可靠经济、重现性好，适宜于放大中试生产，具有较好的应用前景。

[0015] 大孔吸附树脂价廉、可再生使用，反相柱填料可反复使用，中、高压反相色谱易于扩大制备分离规模，适于规模化生产。

附图说明

[0016] 图 1 为栀子醇提物大孔吸附树脂不同溶剂洗脱部位的 HPLC 色谱图；

图 2 为 30% 乙醇洗脱部位的反相中压制备液相色谱图；

图 3 为 A 部位的反相高压制备液相色谱图；

图 4 为 6 个化合物的 HPLC 纯度分析；

图 5 为 6 个化合物的结构式；

图 6 为从栀子中同时制备 6 个环烯醚萜苷类成分的分离工艺流程图。

具体实施方式

[0017] 现结合实施例及附图对本发明技术方案进行详细说明，实施例仅限于说明本发明，但保护范围不被此限制。

[0018] 1. 栀子醇提物的制备：取栀子果实碾碎成粗颗粒，以 10 倍量 50% 的乙醇回流提取 3 次，每次 1.0h，过滤，合并滤液。减压回收乙醇至无醇味，得 1g/mL 的栀子醇提物浸膏。

[0019] 2. 大孔吸附树脂柱分离和检测环烯醚萜苷集中部位

（1）取栀子醇提物浸膏以适量水分散溶解后，通过 HPD-100 大孔吸附树脂柱分离，以 10 倍量柱体积的水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇梯度洗脱，收集各洗脱部位，减压浓缩，冷冻干燥得到不同洗脱部位的粉末。

[0020] （2）HPLC 检测对比分析

供试品的制备：取栀子药材及大孔吸附树脂柱不同洗脱部位粉末各适量，以甲醇溶解，过 0.22μm 微孔滤膜，备用。

[0021] HPLC 分析：岛津 LC20-AT 高效液相色谱仪（四元梯度泵、DAD 检测器、在线脱气机、自动进样器），色谱柱为 Agilent TC（2）C18 柱（4.6 mm×250 mm，5μm）；流动相为 0.2% 甲酸水（A）—乙腈（B）梯度洗脱：0~30min (94%→94% A)，30~40min (94%→83% A)，40~48min (83%→80% A)，48~55min (80%→78% A)，55~60min (78%→73% A)，60~75min (73%→68% A)，75~82min (68%→66% A)，82~85min (66%→64% A)，85~95min (64%→61% A)，95~100min (61%→50% A)，100~105min (50%→0% A)；检测波长 238nm；柱温 40℃；流速：1ml/min；各供试品进样 10μL。

[0022] 结果：环烯醚萜苷类成分的特征吸收为 238nm，根据不同洗脱部位出膏率及 HPLC 图谱对比分析来看，环烯醚萜苷类成分主要集中于 30% 乙醇洗脱部位，经冷冻干燥得到黄褐色粉末，故接下来主要针对该部位进一步分离纯化。具体结果见附图 1。

[0023] 3. 中压制备液相富集流份 A、分离 2 个单体化合物

（1）待分离样品溶液的制备：称取大孔树脂分离得到的 30% 乙醇部位（黄褐色粉末）10g，以 10% 甲醇溶解至 20mL，得到 0.5g/ml 的样品溶液，过 0.22μm 微孔滤膜后，备用。

[0024] （2）中压制备液相分离色谱条件：LC-3000 中高压制备液相一体机（二元梯度泵、紫外检测器、六通阀、定量环 10mL），制备柱长 31cm，内径 2.6cm，反相 C18 柱填料（Fuji-ODS，25-40μm，130g）；流动相为甲醇（A）-水（B）梯度洗脱：0~30.0 min (10%→10% A)，30.01~32.0 min (10%→20% A)，32~60.0 min (20%→20% A)，60.01~65.0 min (20%→30% A)，65.1~160.0 min (30%→30% A)；检测波长 238nm；流速：5.0ml/min；进样量 5.0mL。

[0025] （3）样品分离富集：将 5.0mL 样品溶液注入已平衡好的反相中压柱上，以上述色谱分离条件在线检测，按照出峰时间和次序依次收集检测到的色谱峰。根据中压制备液相色谱图，主要收集 A、B、C 等三个大的色谱峰，具体结果见附图 2。

[0026] （4）化合物纯度分析：HPLC 法，岛津 LC20-AT 高效液相色谱仪、色谱柱、检测波长、流速、柱温同 2.（2）项下；流动相为乙腈（A）-0.2% 甲酸水（B）梯度洗脱：0~22min A

(6% → 6%),22~32min A(6% → 17%),32~38min A(17% → 20%)。在该 HPLC 分析条件下,流份 A 为一混合物,有待于进一步分离。收集流份 B 和 C 分别减压浓缩至适量,经 HPLC 峰面积归一化法检测,纯度分别为 90.12% 和 93.25%;以甲醇重结晶分别得到白色粉末,2 个化合物的纯度提高至 97.12% 和 98.70%。具体结果见附图 4。

[0027] 4. 高压制备液相同步分离制备 4 个单体化合物

(1)A 流份样品溶液的制备:取浓缩后的 A 流份样品适量,以 10% 甲醇溶解制备成 0.5mg/ml 的样品溶液,过 0.22μm 微孔滤膜后,备用。

[0028] (2)高压制备液相分离色谱条件:LC-3000 中高压制备液相一体机,YMC 高压制备色谱柱 (250 mm×20 mm, 5μm);流动相为 6% 乙腈等度洗脱;检测波长 238nm;流速:5.0ml/min;进样量 1.0mL。

[0029] (3)样品分离制备:按照上述优化的色谱分离条件,依法进样,在线检测,按照出峰时间和次序依次收集,A 流份共收集到 A1、A2、A3、A4 等 4 个色谱峰,分别减压回收溶剂,冷冻干燥得到白色粉末。具体结果见附图 3。

[0030] (4)化合物纯度分析:HPLC 法,同 3.(4)项下色谱分析条件。以 HPLC 面积归一化法检测,结果 4 个单体化合物纯度分别为 97.89%, 98.12%, 95,45% 和 96.34%。具体结果见附图 4。

[0031] 5. 制备分离化合物的结构鉴定:经 NMR 测定并与文献报道的数据对比、以及与已知对照品比对,6 个化合物分别鉴定为乙酰车叶草苷酸甲酯(A1、化合物 1)、羟异栀子苷(A2、化合物 2)、龙船花苷(A3、化合物 3)、鸡屎藤次苷甲酯(A4、化合物 4)、京尼平 -1-β-D- 龙胆双糖苷(B、化合物 5)和京尼平苷(C、化合物 6)等 6 个化合物。化合物结构式具体结果见附图 5。

[0032] 6. 应当指出的是,具体实施方式只是本发明比较有代表性的例子,显然本发明的技术方案不限于上述实施例。本发明分离流程的具体结果见附图 6。

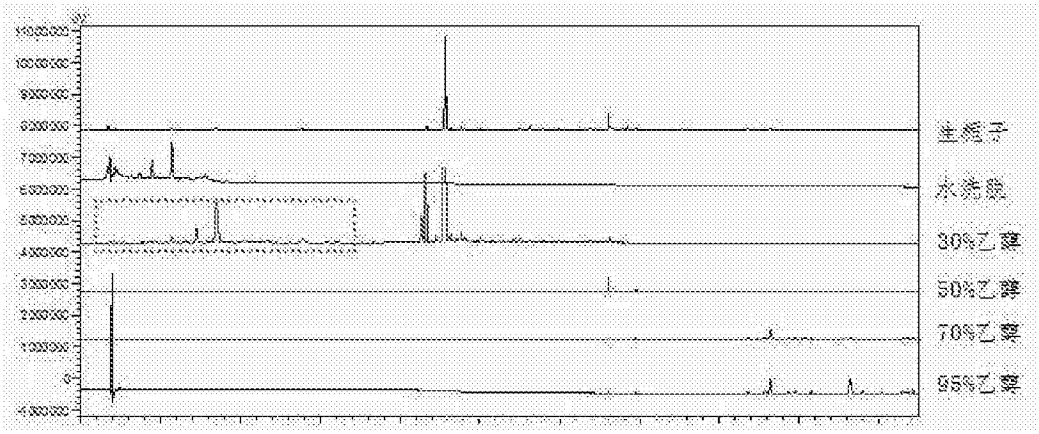


图 1

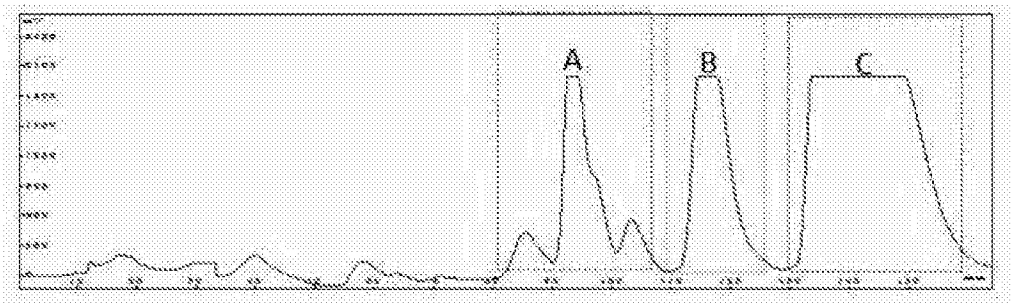


图 2

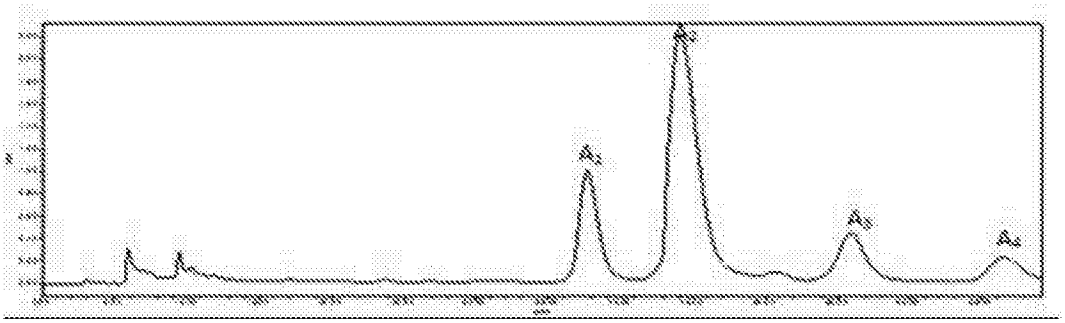


图 3

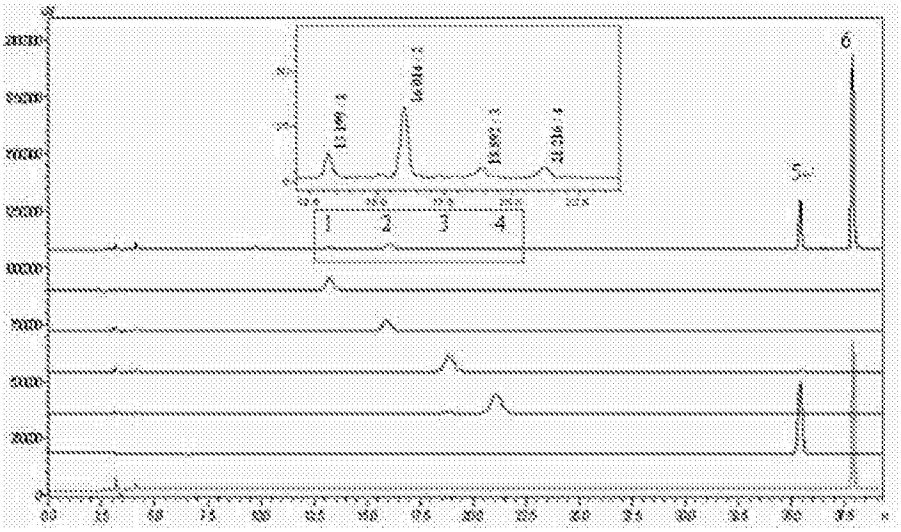

6
5
1
2
3
4

图 4

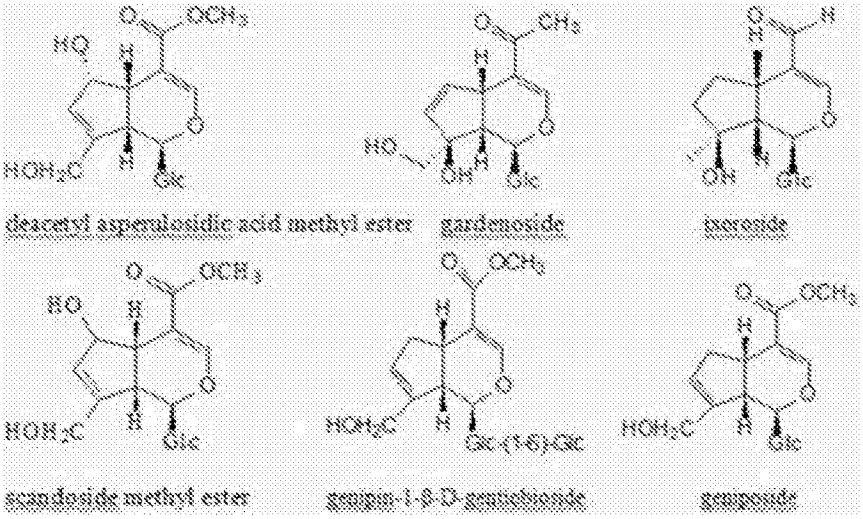

deacetyl asperulosidic acid methyl ester
gardenoside
isoreside
scandoside methyl ester
genipin-1-β-D-gentiobioside
genipin

图 5

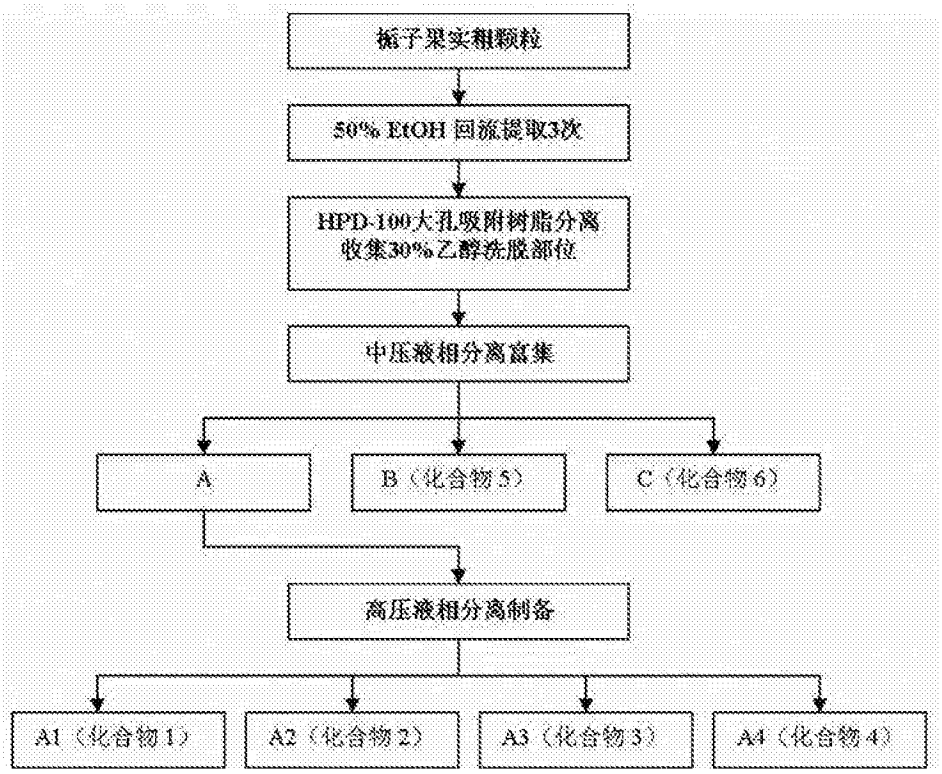

栀子果实粗颗粒
50% EtOH 回流提取3次
HPD-100大孔吸附树脂分离
收集30%乙醇洗脱部位
中压液相分离富集
A
B（化合物5）
C（化合物6）
高压液相分离制备
A1（化合物1）
A2（化合物2）
A3（化合物3）
A4（化合物4）

图 6