

综述专论

栀子与西红花中西红花苷纯化、分析及构效关系研究进展*

朱安运¹, 夏媵¹, 李小波¹, 汪泽¹, 王文君¹, 张浩², 邓亮^{3**}, 陈阳^{1**}

(1. 遵义医学院珠海校区 珠海市中药基础及应用研究重点实验室, 珠海 519041; 2. 四川大学华西药学院生药学教研室, 成都 610041; 3. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500)

摘要: 西红花苷为自然界存在的唯一水溶性类胡萝卜素, 主要包括西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3、西红花苷-4 和顺式西红花苷-1。与其他广泛分布于多种植物的各类天然产物不同, 西红花苷仅来源于中药西红花和栀子, 在这 2 味中药中含量较高, 并具有广泛药理活性。因此, 为更深入研究西红花苷类成分药用价值, 对这类成分的分离纯化、分析测定及构效关系进行深入研究尤为重要。本文综合近 30 年来相关文献报道, 从西红花苷分离纯化、分析测定及构效关系 3 个方面进行概述并汇总相关文献, 为西红花苷深入研究及开发利用提供参考依据。

关键词: 西红花苷; 栀子; 西红花; 分离; 纯化; 分析测定; 构效关系

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)05-0735-13

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.05.01

Research progress of purification, determination and structure-activity relationship of crocins from gardenia and saffron*

ZHU An-yun¹, XIA Qiang¹, LI Xiao-bo¹, WANG Ze¹, WANG Wen-jun¹,
ZHANG Hao², DENG Liang^{3**}, CHEN Yang^{1**}

(1. Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai Key Laboratory of Fundamental and Applied Research in Traditional Chinese Medicine, Zhuhai 519041, China; 2. Department of Pharmacognosy, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. School of Pharmaceutical Science and Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: Crocins are the only water-soluble carotenoids in nature, and consist of crocin-1, crocin-2, crocin-3, crocin-4 and cis-crocin-1. Unlike other chemicals widely distributed in various natural herbal remedies, crocins are exclusively contained in traditional Chinese medicines including gardenia and saffron with high content. These

* 国家自然科学基金(21562051, 21162046); 贵州省科技厅基金(黔科合 J 字[2015]2157 号); 贵州省教育厅创新群体重大项目(黔教合 KY 字[2016]037)

** 通信作者 陈 阳 Tel:(0756)7637626; E-mail: chen yang197732@hotmail.com

邓 亮 Tel:(0871)65922809; E-mail: dengliangkmmc@163.com

第一作者 Tel: 15089184046; E-mail: zhuanyun19920501@hotmail.com

carotenoids have extensive pharmacological activities. Therefore, in order to further study the medicinal value of crocins, it is crucial to investigate the separation, purification, determination and structure-activity relationship of crocins. Current review summarizes the separation, purification, determination and structure-activity relationship of crocins based on the references of the past 30 years, and therefore facilitates further research and development of crocins.

Keywords: crocins; gardenia; saffron; separation; purification; determination; structure-activity relationship

西红花苷是西红花和栀子共有活性成分,由于最先于西红花中发现,故命名为西红花苷,主要包括西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3、西红花苷-4和顺式-西红花苷-1等^[1-2],这类天然产物苷元相同,均为西红花酸,两端连接不同数量葡萄糖而形成不同结构西红花苷,衍生成一系列极性不同的西红花苷衍生物(图1)。其中西红花苷-1是西红花苷中含量最高的化合物,约占70%~80%^[3-4]。国内外学者对西红花苷的药理活性进行了广泛的研究,结果显示这类成分具有抗氧化^[5],抗癌^[6-7],保护神经^[8],抗肝炎^[9]及防治心血管疾病^[10-11]等作用。栀子为茜草科植物栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)的干燥成熟果实,广泛用作传统中药和天然食用色素,传统中医认为其性寒味苦,无毒,主归心、肺、三焦经,具有泻火除烦、清热利尿和凉血解毒之功效^[12]。近30年来,国内外学者对栀子化学成分和药理活性方面进行了深入研究,结果显示,栀子中西红花苷含量较高^[3,13]。另一方面,西红花为鸢尾科植物西红花(*Crocus sativus* L.)的干燥柱头,具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神等功效^[14],并含大量西红花苷^[4]。前期研究显示,随着葡萄糖数量增加,极性增强,西红花苷稳定性降低,不同结构西红花苷分离纯化难度较高^[15]。本文主要对栀子与西红花药材中西红花苷单体的分离纯化进行概述,并对该类化合物分析检测及构效关系进行总结,以利于栀子和西红花药材中西红花苷类化合物分离纯化及分析工作的开展,并为2味药材质量研究及药理活性研究提供参考。

1 西红花苷分离纯化方法

自20世纪90年代,国内外学者主要采用硅胶柱层析^[16]、制备液相^[17]和高速逆流^[18-19]等色谱技术对中药栀子和西红花中西红花苷类分离纯化进行深入研究。

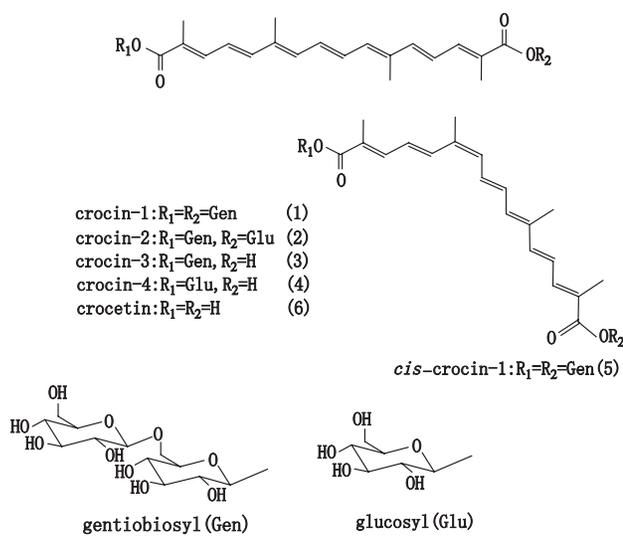


图1 西红花苷和西红花酸结构

Fig. 1 Structures of crocins and crocetin

1.1 柱层析法

1.1.1 硅胶柱层析法 (silica gel column chromatography, SGCC法) 常压SGCC法是天然产物分离纯化最常用的技术,所需设备简单,成本低,分离范围广,处理量大。其原理是依据化合物在硅胶上吸附能力的不同而获得分离。一般情况下,采用不同种类及浓度有机溶剂进行洗脱,极性小、吸附能力弱者先被洗脱,极性大、吸附能力强者后被洗脱,从而使混合物各成分得到纯化。Chen等^[13,15]采用SGCC法对栀子果实中西红花苷类进行分离:将栀子药材(40 kg)粉碎成粗粉,加入40%乙醇渗漉,乙醇部位浓缩,用乙酸乙酯萃取,醋酸乙酯部位浸膏采用硅胶柱层析,用二氯甲烷-甲醇(3%、5%、7%、10%)依次洗脱,甲醇-二氯甲烷(3%)部位结晶得到西红花酸(40 mg)。水相部位浸膏采用大孔吸附树脂HPD-100分离,乙醇(0、25%、60%)依次洗脱,乙醇(60%)部位采用硅胶柱层析,醋酸乙酯(5%、10%、15%、20%)-[甲醇-水(16:13)]依次洗脱,醋酸乙酯-[甲醇-水(16:13)](5%)部位采用制备型

ODS 柱纯化,得到西红花苷-3(3 g)。采用类似方法,在甲醇-水(16:13)-醋酸乙酯(10%、15%、20%)部位分别得到化合物西红花苷-2(1.5 g)、顺式-西红花苷-1(200 mg)和西红花苷-1(3 g)。该法仪器设备简单,成本低,分离效果好,制备量大,但需进行反复柱层析才能获得较高纯度单体,而且西红花苷极性大,SGCC 法为正相色谱法,故不可逆吸附高,回收率低。此外,该法对实验者操作技能要求稍高,实验重现性相对较低。

1.1.2 制备液相色谱法(preparative liquid chromatography, PLC 法) 自 20 世纪 60 年代发展至今,PLC 法作为 1 种快速高效分离技术,已被广泛用于有机化合物的制备和纯化,特别是在天然药物化学分离工作中越来越发挥着重要的作用^[20]。该技术原理是通过高负载、高分离度制备柱来实现高纯度化合物分离和纯化^[21]。分离过程具有样品不易变性,获得单体纯度高,回收率高及纯化周期短的特点,特别适合大极性化合物和难分离物质的纯化。目前,PLC 法不仅在实验室化合物分离纯化中广泛应用,在工业规模化生产中,该技术也成为分离纯化天然产物及化学合成产物的有效技术手段^[19]。Calsteren 等^[22]采用 RP-HPLC 法对西红花苷进行纯化:将西红花粉末用 50% 乙醇提取,浸膏采用 Sephadex LH-20(5 cm×45 cm)柱分离,然后采用 PLC 法进行纯化,收集得到西红花苷-1 和西红花苷-2 纯品。Choi 等^[23]采用半制备液相色谱法对西红花苷进行分离:10 g 干燥栀子果实依次用二氯甲烷、甲醇提取,甲醇部位浸膏浓缩,再溶于水过滤,滤液采用 C₁₈ 柱(25 mm×100 mm, 5 μm)分离,先用 50% 甲醇洗脱,然后采用 50% 甲醇至 100% 甲醇梯度洗脱,得到西红花苷-1(7 mg)。Zhang 等^[24]采用 PLC 法对西红花苷进行分离:将西红花(30 g)依次用石油醚、乙醚和 70% 甲醇提取,70% 甲醇部位浸膏浓缩,分别采用 C₁₈ 柱(600 mm×15 mm, 700 mm×8 mm)进行纯化,甲醇水梯度洗脱,得到西红花苷-1(1.2 g)、西红花苷-2(0.6 g)和西红花苷-3(0.24 g)。HPLC 分析结果显示,西红花苷-1、西红花苷-2 和西红花苷-3 的纯度分别为 99.04%、97.40%、96.70%。Koulakiotis 等^[25]采用半制备液相色谱法对西红花苷类进行分离:色谱柱为 RP-C₁₈ 柱(25 mm×10 mm, 5 μm),乙腈水梯度洗脱,分离得到西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3 的纯度均大于 98%。以上方法分离速度快,不可逆吸附低,重现性好,获得化合物纯度较高,最终可同时制备西红花

苷-1、西红花苷-2 和西红花苷-3,但该技术制备量相对较小,并且有机化学试剂消耗量大。

此外,大孔吸附树脂是一类不含交换基团,具有大孔网状结构和较大表面积的高分子吸附树脂,具有比表面积大和吸附容量大等优点^[26]。目前,该材料在天然药物化学成分分离纯化中应用广泛,而大孔吸附树脂技术与 PLC 法联用,可使分离纯化过程更加快速、高效。Feng 等^[16]采用大孔吸附树脂技术联合反相中压制备色谱同时分离栀子果实中的西红花苷-1 和栀子苷:将栀子果实(1.0 kg)用 40% 甲醇水提取,浸膏浓缩,采用 LX-60 大孔吸附树脂初步纯化后,西红花苷-1 和栀子苷的纯度分别达到 29.6% 和 83.4%,经反相中压色谱二次纯化,西红花苷-1 纯度达到 60.8%。与传统单一分离工艺相比,大孔吸附树脂与 PLC 法联用,使西红花苷分离工作更为高效,并且大孔吸附树脂再生容易,环境友好,成本低。

1.2 制备薄层色谱法(preparative thin layer chromatography, PTLC 法)

PTLC 法为薄层色谱在有机化合物分离制备中的 1 种有用手段,通常用于 10 mg 级有机化合物分离纯化。PTLC 法的色谱板厚度通常为 0.5~2 mm,因此比分析型薄层色谱法样品处理量显著提高,该法操作简便,设备简单,分离速度快,常用于硅胶柱层析分离效果不佳的化合物纯化工作中。Iborra 等^[27]采用 PTLC 法对西红花中西红花苷-1 进行分离:以甲醇-水-乙腈(7:2:1)为展开剂,固定相为氧化铝 150F₂₅₄,制备型薄层板厚度 1.5 mm,展开比移值(R_f)为 0.13,分离得到西红花苷-1(纯度 70%)。Pfister 等^[28]采用 PTLC 法对栀子西红花苷-1 进行分离:将栀子果实依次用乙醚,70% 乙醇分别提取,然后采用制备硅胶薄层板进行分离,以醋酸乙酯-异丙醇-水(56:34:10)为展开剂,展开后呈现 6 个薄层色谱带,比移值在 0.1~0.6 之间,将主色谱带洗脱浓缩,以吡啶-醋酸酐(2:1)为反应物,4-(二甲氨基)吡啶为催化剂,进行乙酰化反应,采用制备硅胶薄层板纯化,分别采用甲苯-醋酸乙酯(3:7)和正己烷-醋酸乙酯-甲醇(3:1:1)展开,分离得到全乙酰化西红花苷-1,比移值为 0.35。采用类似方法还可分离获得西红花酸、西红花苷-3 及顺式-西红花苷-1。以上方法步骤多,技术要求高,西红花苷制备量较小,但与 PLC 法相比,PTLC 法仪器要求低,装置简单,操作方便。

1.3 高速逆流色谱法 (high-speed counter current chromatography, HSCCC 法)

HSCCC 法是 1 种连续高效液-液分配色谱技术,其原理是利用不相溶两相在螺旋管中作高速行星式运动,使被分离化合物在两相间多次分配,从而实现短时间内对混合物高效分离^[29]。作为 1 种液液分配色谱,不需要任何固体载体或支撑物,相对于其他常用色谱技术来说,不会产生吸附剂所导致的吸附损耗,样品变性,样品峰拖尾及不易回收等问题^[30-31]。Liang 等^[17]采用 HSCCC 法分离纯化梔子中西红花苷-1:将干燥梔子用乙醇(80%)超声提取,水相部位浸膏依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取,醋酸乙酯-正丁醇-水(1:4:5)为流动相,分离获得西红花苷-1,纯度为 97.1%。Wang 等^[18]采用 HSCCC 法从梔子果实中分离纯化不同结构西红花苷:将梔子粉末用乙醇(60%)提取浓缩,采用 HPD-100 大孔吸附树脂柱层析,40%~60%乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩后,再进一步用制备型 HSCCC 法分离,溶剂系统为正己烷-醋酸乙酯-正丁醇-水(1:2:1:5),检测波长为 440 nm,得到西红花苷-1(246.2 mg)、西红花苷-2(34.2 mg)、西红花苷-3(24.4 mg)及西红花苷-4(24.7 mg);UPLC 法测定分离化合物单体纯度,测得纯度分别为 94.1%、96.3%、94.1% 及 98.9%。该法可一次性分离纯化出 4 种不同结构西红花苷,缩短了纯化时间,为西红花苷类化合物大量制备提供了工艺基础。总体上,HSCCC 法与传统柱层析法相比,仪器操作简单,对样品前处理要求低,梔子粗提取物即可进行制备分离。由于 HSCCC 法不需要固相载体,消除了西红花苷在固相载体上不可逆吸附及降解造成的损失,因此回收率高。此外,采用 HSCCC 法分离西红花苷,还具有分离效率高,化合物纯度高,费用低,制备量大等优点。同时,采用 HSCCC 法从梔子中可同时纯化出不同结构西红花苷单体。然而,该方法在西红花苷纯化应用实践中却存在有机溶剂消耗量大,且较难优化出合适溶剂体系的缺点。

1.4 其他方法

Lautenschlager 等^[32]报道,采用二氯甲烷对西红花(50 g)进行脱脂,然后采用 20%乙醇提取,浓缩,溶解于水,采用高速离心色谱法(FCPC)进行分离,用水-乙醇-醋酸乙酯-己烷(7:4:8:1)溶剂系统的上层作为流动相,下层为固定相,得到西红花苷-1(95 mg),纯度为 94%。此外,本课题组还通过酶的去糖基化制

备西红花酸,该法省时,省力,流程短,成本低。

综上所述,西红花苷分离纯化技术均为天然产物分离纯化的常用手段,研究者可依据具体实验条件和研究目的,选择采用合适技术进行西红花苷分离制备(表 1)。以上研究表明,SGCC 法所需仪器简单价廉,样品处理量较大,适合西红花苷-1 这 1 个单体的大量制备;而 PLC 法和 HSCCC 法由于理论塔板数高,分离度大,适合多个西红花苷的同时分离纯化。由于固定相装填密度均匀,PLC 法和 HSCCC 法重现性优于前 2 种技术,所以对实验人员技能要求相对较低;而硅胶柱层析和 PLC 法需要研究者有一定实践经验才能获得良好分离效率。以上方法均消耗大量有机化学试剂,故研究者在今后的西红花苷分离制备中,还需探索如何减少有毒化学试剂的使用,以减少研究工作对环境的污染。

2 西红花苷分析研究进展

西红花苷最大吸收波长为 440 nm 左右,采用分光光度法进行分析的灵敏度高。然而,由于梔子和西红花中各西红花苷衍生物数量多,因此近 30 年来,国内外学者采用不同色谱联用技术对梔子和西红花中包括西红花苷在内的多种有效成分进行分析检测。目前,梔子和西红花药材中西红花苷单体分析检测主要采用高效液相色谱法^[33]、液质联用技术^[34]和毛细管电泳法^[35]等。

2.1 高效液相色谱紫外可见分光光度法

2.1.1 常规分析 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC 法)是药物分析中常用的柱色谱分离分析技术,具有分离效率高,选择性好且分析速度快等优点。随着分析科学技术发展,HPLC 法已广泛用于梔子和西红花药材中西红花苷的分析测定。何常明等^[36]采用 HPLC-DAD 法对西红花中西红花苷进行检测:色谱柱为 C₁₈ 柱,乙腈水梯度洗脱,检测波长 440 nm。结果显示,西红花苷-1 质量浓度在 5.2~165 μg·mL⁻¹,西红花苷-2 质量浓度在 2.7~85 μg·mL⁻¹ 范围均呈良好线性关系,相关系数均大于 0.999,平均回收率分别为 102.5% 和 98.2%。付小敏等^[37]采用 HPLC-DAD 法测定梔子药材中西红花苷-1 含量:色谱柱为 C₁₈ 柱,乙腈-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱,检测波长 440 nm。结果显示,不同产地 18 批梔子药材中西红花苷-1 含量差异较大,西红花苷-1 含量为 0.2%~1.06%。以上研究由单一成分向多种成分检测方向发展,并且随着对西红花和梔子药材中各种化学成分研究的深入,可实现多种成分同时检测。

表 1 西红花苷不同分离纯化技术比较

Tab.1 Comparison of various separation and purification techniques of crocins

分离方法 (separation method)	原理 (principle)	优点 (advantage)	缺点 (disadvantage)
SGCC	依据化合物在硅胶上吸附能力不同而得到分离(separation according to adsorption capacities of different compounds on silica gel)	材料廉价,装置简单,制备量大(可从几十千克栀子中分别分离出几克或几百毫克不同结构西红花苷单体)[cheap stationary phase, simple device, and large amount of preparation(a few grams or hundreds of milligrams of different crocins could be prepared from dozens of kilograms of gardenia)]	不可逆吸附量大,分离步骤多,过程烦琐,对研究人员技巧要求高,重现性差(considerable amount of irreversible adsorption, repeated steps, therefore tedious in separation process and requiring high technical skill of researchers, poor reproducibility)
PTLC	利用各成分对同一吸附剂吸附能力不同,使不同化合物在展开剂中展开不同,使各组分得到分离(separation according to adsorption capacities of different compounds on stationary phase, various components could be separated by developing solvent)	装置简单,操作方便,分离周期短,分离步骤少(simple device, convenient operation, time-saving process and fewer separation steps)	分离效果有限,西红花苷-1制备量小,有一定技巧要求,重现性差(less efficiency of separation and small amount of crocin-1 preparation, requiring high technique skill of researchers and poor reproducibility)
PLC	利用高负载、高分离度制备柱在标准化色谱系统中来实现高纯度化合物分离(separation of high purity compounds in standard chromatographic systems using high loading and high resolution preparation column)	分离速度快,不可逆吸附低,不同极性化合物分离度高,样品前处理简单,可一次性分离得到西红花苷-1、西红花苷-2和西红花苷-3(fast separation process, low irreversible adsorption, high resolution of different polar compounds, simple sample pretreatment and simultaneous separation of crocin-1, crocin-2 and crocin-3 in one run)	各西红花苷单体制备量较小,有机化学试剂消耗大(small amounts of crocins preparation and large amounts of organic reagent required)
HSCCC	利用不相溶两相在螺旋管中做高速行星式运动,使被分离化合物在两相间多次分配,从而实现短时间内对混合物质高效分离(repeated separation of compounds in two-phase by immiscible two-phase by high-speed planetary movement in spiral tube, therefore a short time on efficient separation of various components)	不用固体载体,无化合物不可逆吸附、降解和失活,高效、快速,可同时获得高纯度西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3和西红花苷-4,回收率和重现性较高(free of solid carrier, therefore no irreversible adsorption, degradation and deactivation of target compounds; generally efficient and fast; simultaneous separation of crocin-1, crocin-2 and crocin-3 in one run; high recovery and reproducibility)	有机化学试剂消耗量大,不同结构西红花苷色谱条件优化耗时(large consumption of organic reagents and time-consuming in optimization of chromatographic conditions for crocins)

以上研究表明,由于各西红花苷化合物极性相差较大,在 HPLC 法分析中一般能获得良好分离及检测,能满足栀子和西红花中西红花苷化合物鉴定及含量测定。随着对西红花和栀子药材中各种化学成分的深入研究,研究者还开发出栀子中多成分同时检测技术。如徐燕等^[38]采用多波长 HPLC 法同时测定栀子中 3 类有效成分中 9 个成分(栀子苷、西红花酸、3 种西红花苷等)的含量;色谱柱为 C₁₈ 柱,检测器为二极管阵列检测器,0.3% 甲酸和

甲醇-乙腈(9:1)梯度洗脱;根据栀子中各成分的不同光谱特性,在 3 个紫外-可见检测波长下,同时测定其中 3 类成分;在检测波长 440 nm 测定西红花酸及 3 种西红花苷,结果显示:西红花苷-1 和西红花苷-2 质量浓度在 1.0~100 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好,西红花苷-3 质量浓度在 0.5~50 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好;西红花苷-1、西红花苷-2 及西红花苷-3 相关系数均大于 0.999,平均回收率分别为 99.2%、101.2% 及 98.8%。Li

等^[4]采用 HPLC-UV 法对西红花中 5 个成分进行定量分析: 色谱柱为反相 C₁₈ 柱, 甲醇-1% 醋酸梯度洗脱, 检测波长分别为 200~600 nm 或 420 nm, 结果显示, 西红花苷-1, 西红花苷-2, 西红花苷-3、西红花苷-4 及西红花酸线性范围良好, 相关系数均大于 0.999, 日内和日间 RSD 均小于 11%。Chen 等^[3]采用 HPLC-UV 法同时检测栀子中栀子苷、西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3 及顺式-西红花苷-1: 色谱柱为 C₁₈ 柱, 乙腈-水梯度洗脱, 检测波长分别为 238 nm 和 440 nm; 由于结果稳定, 重现性好, 此法适用于栀子药材内西红花苷含量测定。以上方法可实现药材中包括西红花苷在内的多个成分同时分析测定, 效率显著提高, 分离度、准确度和精密度均符合要求。

2.1.2 体内分析 西红花苷药理功效广泛, 近 15 年来, 也有部分文献报道西红花苷在体内吸收、分布、代谢及排泄机制。杜鹏等^[39]将西红花苷-1 灌胃给予大鼠, 采用 HPLC-UV 法测定西红花苷-1 含量, 结果在血液和尿中未检测出西红花苷-1, 但检测出西红花酸, 并推测西红花苷是水解成西红花酸后被吸收入血。唐琳等^[40]采用 HPLC 法检测家兔血浆中西红花苷-1: 家兔静脉注射西红花苷-1 后, 血浆中能检测到西红花苷-1, 其血药浓度-时间曲线符合二室模型, 结果显示西红花苷-1 质量浓度在 0.86~27.54 mg·L⁻¹ 范围线性良好。Asai 等^[41]采用西红花总苷灌胃给予小鼠, 采用 HPLC 法对西红花苷代谢物进行检测: 反相 C₁₈ 柱, 0.1% 醋酸铵溶液和 0.1% 醋酸铵醇溶液梯度洗脱, 结果显示西红花苷在小鼠肠道内被水解成西红花酸吸收入血, 在体内又被转化成西红花酸葡萄糖醛酸代谢物, 并推测这种体内代谢物可能是西红花酸和西红花苷在体内发挥疗效的活性分子形式。Xi 等^[42]采用大鼠口服西红花苷, HPLC 法对西红花苷代谢物进行检测: 流动相为甲醇-水-醋酸(55:44.5:0.5), 结果在血浆中未检测出西红花苷, 而检测出低浓度西红花酸, 同时西红花苷大量出现在排泄物和肠道中。此外, 西红花苷通过不同肠段时浓度减少, 且在结肠时减少量较大, 故而推测肠道为西红花苷水解的 1 个部位。此外, 张颖等^[43]采用大鼠口服西红花苷-1 后, HPLC 法检测血浆中西红花苷-1 含量: 结果与 Asai 等在小鼠中获得的结果相似, 西红花苷-1 口服给药后以代谢物西红花酸的

形式快速吸收入血。朱俊博等^[44]将西红花苷-1 以肌肉注射给大鼠后, 采用 HPLC 法测定大鼠血浆中西红花苷-1 含量: 以乙腈-甲醇-0.5% 冰醋酸溶液(15:20:50)为流动相等度洗脱, 结果显示, 西红花苷-1 肌肉注射后血浆吸收快, 分布广泛。Umigai 等^[45]研究健康成年人口服西红花酸的药代动力学, 结果显示, 西红花酸比其他类胡萝卜素吸收更快。Zhang 等^[46]研究大鼠口服西红花苷和西红花酸, 采用 UPLC-MS/MS 对血浆中两者含量进行测定, 发现西红花苷在胃肠道内很快水解成西红花酸。

体内代谢物分析测定研究结果(表 2)表明, 西红花苷在肠道内被水解成西红花酸吸收入血, 在体内可能被转化成西红花酸葡萄糖醛酸代谢物。由于西红花酸及其二相代谢产物极性有较大差异, 并且各结构西红花苷均代谢为西红花酸 1 个化合物, 化合物种类减少, 故而 HPLC 法足以满足此类分析任务。但需注意, 由于体内样本中西红花酸含量较低, 如何在样品前处理中保留并富集目标化合物, 是该领域研究人员必须面对的技术难点。

2.2 液质联用分析

随着质谱技术的发展, 液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术越来越成熟。LC-MS 以液相色谱为分离系统, MS 法为检测系统, LC 法与 MS 法技术互为补充, 将 LS 法对复杂样品的高效分离能力与 MS 对有机化合物定性鉴定的优势结合起来, 样品检测时不需要进行烦琐和复杂的前处理, 高效快速, 灵敏度高, 尤其对于含量较少且无法获得足够样品量进行核磁共振鉴定的情况, 采用 LC-MS 联用技术即可实现混合物各成分的同时分离与鉴定。Carmona 等^[47]采用高效液相色谱-电喷雾离子化质谱联用(HPLC-ESI-MS)法对西红花中 15 种西红花苷进行鉴定分析: MS 条件为干燥气温度 350 °C, 毛细管电压 2.5 kV, 毛细管温度 195 °C。Ding 等^[48]通过 HPLC-ESI-MS 法建立了不同产地栀子化学指纹图谱并对有效成分进行分析: MS 条件为干燥气温度 350 °C, 干燥气流速 8.0 L·min⁻¹, 雾化气压 206.9 kPa, 扫描范围 50~1 000; 结果 m/z 975 [M-H]⁻ 离子和 m/z 999 [M+Na]⁺ 离子为西红花苷-1 分子离子峰, m/z 813 [M-H]⁻ 离子和 m/z 837 [M+Na]⁺ 离子为西红花苷-2 分子离子峰。Wu 等^[49-50]采用

表 2 西红花苷体内分析
Tab. 2 *In vivo* determination of crocins

药物 (drug)	给药方式 (method of administration)	分析方法 (analytical method)	流动相 (mobile phase)	结果 (result)	参考文献 (reference)
西红花苷-1 (crocins-1)	大鼠灌胃 (gavage in rats)	HPLC	甲醇-水-冰醋酸 (methanol-water-glacial acetic acid) (55:44.5:0.5)	血液和尿中未检测出西红花苷-1,但检测出西红花酸 (crocetin instead of crocins-1 was detected in blood and urine)	[39]
西红花苷-1 (crocins-1)	家兔静脉注射 (intravenous injection in rabbits)	HPLC	甲醇-乙腈-1%醋酸 (methanol-acetonitrile-1% acetic acid) (15:10:50)	血浆中能检测到西红花苷-1,其血药浓度药-时曲线符合二室模型 (crocins-1 can be detected in plasma, and the drug-time curve possesses property of two-compartment model)	[40]
西红花总苷 (crocins)	小鼠灌胃 (gavage in mice)	HPLC	0.1% 醋酸铵溶液-0.1% 醋酸铵醇溶液 (梯度洗脱) [0.1% ammonium acetate-methanol containing 0.1% ammonium acetate (gradient elution)]	西红花苷在肠道内被水解成西红花酸吸收入血,在体内又被转化成西红花酸葡萄糖醛酸代谢物 (crocins was hydrolyzed to crocetin which was absorbed into blood through intestine, and then converted into crocetin glucuronic acid metabolite <i>in vivo</i>)	[41]
西红花总苷 (crocins)	大鼠灌胃 (gavage on rats)	HPLC	甲醇-水-冰醋酸 (methanol-water-glacial acetic acid) (55:44.5:0.5)	血浆中未检测出西红花苷,检测出低浓度西红花酸,同时西红花苷大量出现在排泄物和肠道中 (no crocins were detected in plasma, whereas crocetin with low concentration was detected, and crocins were present in excrement and intestine)	[42]
西红花苷-1 (crocins-1)	大鼠灌胃 (gavage in rats)	HPLC	甲醇-0.5% 醋酸 (methanol-0.5% acetic acid) (48:52)	血浆以及葡萄糖醛酸酶水解后未检出西红花苷-1成分,但是在血浆中检测到较高浓度的西红花酸,葡萄糖醛酸酶水解后的血浆中西红花酸含量未见明显增加 (no crocins-1 was detected in both original and β -glucuronidase treated plasma. However, large amount of crocetin, the aglycon form of crocins-1, was detected in the original plasma. The concentration of crocetin did not increase significantly after hydrolyzation by β -glucuronidase)	[43]
西红花苷-1 (crocins-1)	大鼠肌肉注射 (intramuscular injection in rats)	HPLC	乙腈-甲醇-0.5% 醋酸 (acetonitrile-methanol-0.5% acetic acid) (15:20:50)	西红花苷-1多被机体器官、组织所摄取,其血药浓度药-时曲线符合单室模型 (crocins-1 was mainly absorbed by organs and tissues, and drug-time curve of plasma possesses property of single-compartment model)	[44]
西红花酸 (crocetin)	成人口服 (oral in adult)	HPLC	0.1% 三氟醋酸溶液-[甲醇-0.1% 三氟醋酸溶液(9:1)], 梯度洗脱 [0.1% trifluoroacetic acid solution-[methanol-0.1% trifluoroacetic acid solution (9:1)], gradient elution]	西红花酸比其他类胡萝卜素在胃肠道吸收更快 (crocetin was absorbed faster than other carotenoids in gastrointestinal tract)	[45]
西红花总苷 (crocins)	大鼠灌胃 (gavage in rats)	UPLC- MS/MS	0.1% 甲酸溶液-乙腈 (梯度洗脱) [0.1% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution)]	西红花苷在胃肠道水解成西红花酸 (crocins was hydrolyzed to crocetin in gastrointestinal tract)	[46]

HPLC-DAD-ESI-MS法对栀子中8种有效成分进行分析:MS条件为电喷雾离子源负离子模式,毛细管电压3.5 kV,离子源温度135 ℃,锥孔电压110 V,碎片电压110 V;结果显示 m/z 975 [M-H]⁻离子和 m/z 859 [M+HCOO]⁻离子分别为西红花苷-1和西红花苷-2分子离子峰。Bergonzi和Cai等^[51-52]采用类似方法对栀子中西红花苷类化合物进行鉴定:结果 m/z 975 [M-H]⁻离子为西红花苷-1分子离子峰。此外,Verma等^[53]采用LC-MS-MS法对西红花中西红花苷-1和西红花苷-2等有效成分进行分析:结果显示, m/z 975 → 651和 m/z 813 → 652分别为西红花苷-1和西红花苷-2碎片离子峰。

另一方面,Masi等^[54]采用质子转移反应-飞行时间-质谱(PTR-TOF-MS)联用技术和HPLC法对意大利和伊朗两地西红花中西红花苷类单体进行含量测定。MS条件:质子转移反应以H₃O⁺为反应物,漂移电压600 V,温度110 ℃,压力0.225 kPa;通过PTR-TOF-MS发出的信号强度以及HPLC分析;结果显示,意大利西红花中西红花苷(尤其反式-西红花苷-3和西红花苷-4)含量较高。该法具有较大的质量分析范围,能提供较高质量分辨率和高质量精度数据,前体离子选择性好。以上方法灵敏度高,重现性和选择性好,可应用到栀子和西红花药材中西红花苷类成分鉴定。

2.3 毛细管电泳法

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是20世纪80年代以来新兴的一种分析技术,具有高效、快速、简便,样品用量少及分析对象广等优点,被用于天然产物的分析检测^[55-56]。CE以弹性石英毛细管为分离通道,高压直流电场为驱动力,根据组分的淌度和分配系数的差异进行分离^[57]。Zougagh等^[35]采用非水毛细管电泳法(nonaqueous capillary electrophoresis, NACE)对西红花苷类进行质量控制:用石英毛细管(75 μm,有效长度40 cm)作为分离通道,背景电解质溶液为50 mmol·L⁻¹硼酸甲醇溶液-硼砂和甲醇(1:3),运行电压16 kV,运行温度20 ℃,检测波长435 nm,压力进样3.5 kPa,8 s,对西红花中4种西红花苷单体进行

检测;结果显示,西红花苷类化合物出峰时间比用HPLC稍早,此法具有快速灵敏,易操作,分辨率高等优点,对西红花中西红花苷化合物分析效率优于HPLC,但分离能力稍弱,重现性差,对样品前处理要求较高。表3为以上各类代表性西红花苷分析方法总结。

3 西红花苷构效关系研究

母核相同的同类药物,取代基的变化会导致药理活性显著改变。西红花苷母核均为西红花酸,各西红花苷差异仅为母核(苷元)两端连接葡萄糖基数量不同。研究显示,西红花苷结构中糖数量多少可引起西红花苷药理活性显著变化。Sugiura等^[58]研究西红花苷在阻止由乙醇引起的大脑海马区域LTP抑制作用的效果:结果显示西红花苷-1抑制活性强于西红花苷-2。Abe等^[59]对西红花苷拮抗由乙醇引起大鼠的海马神经元NMDA(N-甲基-D-天冬氨酸)受体介导抑制作用进行研究:结果显示,西红花苷-1比西红花酸二葡萄糖酯更能显著阻断NMDA的抑制反应。Escribano等^[60]对西红花苷肿瘤细胞生长的抑制作用进行研究:结果显示,西红花苷-1对肿瘤细胞生长有抑制作用,而西红花酸不显示对肿瘤细胞生长的任何抑制作用。Papandreou等^[61]对西红花苷对β-淀粉样聚合的抑制活性进行研究:将反式-西红花苷-4(西红花酸两端分别连接2个葡萄糖基)和二甲基西红花酸(西红花酸两端分别连接1个甲基)对抑制β-淀粉样原纤维的生成进行比较,研究发现反式-西红花苷-4在相对更低的浓度下就能抑制β-淀粉样原纤维生成。此外,也有相反的研究报告,Xuan等^[62]就西红花苷对眼睛血流增加和视网膜功能恢复进行研究:结果显示,西红花苷-1和西红花苷-2对眼睛血流增加及视网膜功能恢复低于西红花苷-3、西红花苷-4和西红花酸,西红花苷葡萄糖可能会影响药物与受体的结合,影响药效功能的发挥。以上研究显示,随着西红花苷上葡萄糖基数量增加,西红花苷的活性也逐渐增强,显示西红花苷较为明显的结构-功效关系。西红花苷构效关系研究结果见表4。

表 3 代表性西红花苷分析方法

Tab. 3 Representative methods for analysis of crocins

方法 (method)	分析对象 (analysis object)	分析条件 (analysis condition)	结果 (result)	参考文献 (reference)
HPLC-UV	西红花中西红花苷-1, 西红花苷-2, 西红花苷-3 和 西红花苷-4 (crocin-1, crocin-2, crocin-3 and crocin-4 in saffron)	Nova-Pak 反相 C ₁₈ 柱 (4 μm, 150 mm × 3.9 mm) 和 HP C ₁₈ 柱 (5 μm, 20 mm × 4 mm); 流动相为甲醇-1% 醋酸梯度洗脱; 检测波长 200-600 nm 或 420 nm; 流速 1.0 mL·min ⁻¹ [Nova-Pak reverse phase C ₁₈ column (4 μm, 150 mm × 3.9 mm) and HP C ₁₈ column (5 μm, 20 mm × 4 mm); mobile phase was methanol-1% acetic acid with gradient elution; wavelength at 200-600 nm or 420 nm; flow rate with 1.0 mL·min ⁻¹]	西红花苷-1, 西红花苷-2, 西红花苷-3 及西红花苷-4 线性范围内良好, 相关系数均大于 0.999, 日内和日间的 RSD 均小于 11% (in determination of crocin-1, crocin-2, crocin-3 and crocin-4, good linear range, more than 0.999 of correlation coefficients, and less than 11% of RSD of intra and inter day was observed)	[4]
HPLC-DAD	西红花中西红花苷-1 和 西红花苷-2 (crocin-1 and crocin-2 in saffron)	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈水梯度洗脱; 检测波长 440 nm; 流速 1.0 mL·min ⁻¹ [Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase was acetonitrile and water with gradient elution; detection wavelength at 440 nm; flow rate with 1.0 mL·min ⁻¹]	西红花苷-1 在 5.2-165 μg·mL ⁻¹ , 西红花苷-2 在 2.7-85 μg·mL ⁻¹ 范围均呈良好线性关系, 相关系数分别为 0.999 9 和 0.999 8, 平均回收率分别为 102.5% 和 98.2% [calibration curve were 5.2-165 μg·mL ⁻¹ (r=0.999 9) and 2.7-85 μg·mL ⁻¹ (r=0.999 8) for crocin-1 and crocin-2, respectively; average recoveries of crocin-1 and crocin-2 were 102.5% 98.2%, respectively]	[36]
HPLC-ESI-MS	梔子中西红花苷-1 和 西红花苷-2 (crocin-1 and crocin-2 in gardenia)	Agilent ZORBAX SB-C ₁₈ 柱 (1.8 μm, 2.1 mm × 50 mm); 流动相为 1% 甲酸-乙腈梯度洗脱; 毛细管电压 3.5 kV; 离子源温度 135 °C; 锥孔电压 110 V; 碎片电压 110 V; 电喷雾离子源负离子模式 [Agilent ZORBAX SB-C ₁₈ column (1.8 μm, 2.1 mm × 50 mm); mobile phase was 1% formate-acetonitrile with gradient elution; capillary voltage at 3.5 kV; ion source temperature at 135 °C; tapered voltage at 110 V; debris voltage 110 V; electrospray ion source negative ion mode]	<i>m/z</i> 975 [M-H] ⁻ 离子和 <i>m/z</i> 859 [M+HCOO] ⁻ 离子分别为西红花苷-1 和 西红花苷-2 分子离子峰 (<i>m/z</i> 975 [M-H] ⁻ ion and <i>m/z</i> 859 [M+HCOO] ⁻ ion were molecular ion peaks of crocin-1 and crocin-2, respectively)	[49-50]
PTR-TOF-MS、 HPLC	西红花中顺式-西红花苷-1, 顺式-西红花苷-4, 反式-西红花苷-2, 反式-西红花苷-3, 反式-西红花苷-4 和 反式-西红花苷-5 (cis-crocin-1, cis-crocin-4, trans-crocin-2, trans-crocin-3, trans-crocin-4 and trans-crocin-5 in saffron)	Luna C ₁₈ 柱 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相为水 (甲酸调整 pH 至 3.2)-乙腈梯度洗脱; 流速 0.8 mL·min ⁻¹ ; 质子转移反应以 H ₃ O ⁺ 为反应物; 漂移电压 600 V; 温度 110 °C; 压力 0.225 kPa [Luna C ₁₈ column (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); mobile phase was water (adjusted to pH 3.2 with formic acid)-acetonitrile with gradient elution; flow rate at 0.8 mL·min ⁻¹ ; proton transfer reaction by H ₃ O ⁺ as the reactant; drift voltage at 600 V; temperature at 110 °C; pressure at 0.225 kPa]	分别采用 PTR-TOF-MS 和 HPLC 对比分析, 意大利西红花中西红花苷 (尤其反式-西红花苷-3 和 西红花苷-4) 含量较高 [determinations of saffron with PTR-TOF-MS and HPLC indicated saffron from Italy possesses high content of crocins (particularly trans-crocin-3 and crocin-4)]	[54]

表 3(续)

方法 (method)	分析对象 (analysis object)	分析条件 (analysis condition)	结果 (result)	参考文献 (reference)
NACE	西红花中西红花苷-1, 西红花苷-2, 西红花苷-3 和 西红花苷-4 (crocin-1, crocin-2, crocin-3 and crocin-4 in saffron)	石英毛细管 (75 μm , 有效长度 40 cm) 为分离通道, 背景电解质溶液为 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸甲醇溶液-硼砂和甲醇 (1:3); 运行电压 16 kV; 运行温度 20 $^{\circ}\text{C}$; 压力进样 3.5 kPa, 8 s (quartz capillary (75 μm , effective length 40 cm) as the separation channel; background electrolyte solution is 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ boric acid methanol solution: borax-methanol (1:3); operating voltage at 16 kV; operating temperature at 20 $^{\circ}\text{C}$; pressure injection at 3.5 kPa, 8 s)	西红花苷单体线性范围内良好, 相关系数均大于 0.99, 且在相近条件下, 西红花苷类化合物出峰时间比用 HPLC 稍早 (the correlation coefficients of crocins are greater than 0.99 with good linear range, and under the same conditions, the crocin compounds peaked earlier than that of HPLC)	[35]

表 4 西红花苷构效关系

Tab. 4 The structure-activity relationship of crocins

成分 (components)	模型 (models)	结果 (results)	参考文献 (references)
西红花苷-1 和 西红花苷-2 (crocin-1 and crocin-2)	抑制乙醇诱导海马突触损伤 (inhibition of ethanol-induced hippocampal synaptic injury)	西红花苷-1 对乙醇引起大脑海马区域 LTP 及海马神经元 NMDA 的抑制活性强于西红花苷-2 (inhibitory activities of crocin-1 on ethanol-induced LTP and hippocampal neurons suppression in hippocampus of brain were stronger than those of crocin-2)	[58-59]
西红花苷-1 和 西红花酸 (crocin-1 and crocetin)	肿瘤细胞抑制活性 (inhibitory activity of tumor cell)	西红花苷-1 对肿瘤细胞生长有抑制作用, 而西红花酸没有 (crocin-1 inhibited tumor cell growth, whereas crocetin did not)	[60]
反式-西红花苷-4 和 西红花苷-2 (trans-crocin-4 and crocin-2)	β -淀粉样聚合抑制活性 (inhibitory activity of β -amyloid polymerization)	反式-西红花苷-4 对 β -淀粉样聚合的抑制作用强于西红花苷-2 (inhibitory effect of trans-crocin-4 on β -amyloid polymerization was stronger than that of crocin-2)	[61]
西红花苷-1, 西红花苷-2, 西红花苷-3, 西红花苷-4 和 西红花酸 (crocin-1, crocin-2, crocin-3, crocin-4 and crocetin)	促进眼部血液循环及视网膜恢复功能 (eye blood circulation enhancing activity and recovery of retinal function)	西红花苷-1 和 西红花苷-2 促进眼部血液循环及视网膜恢复功能低于西红花苷-3、西红花苷-4 和 西红花酸 (less enhancing activities of crocin-1 and crocin-2 on eye blood circulation and retinal recovery were observed when compared with crocin-3, crocin-4 and crocetin)	[62]

4 小结与展望

本文概述近 30 年来栀子和西红花中西红花苷分离纯化、分析测定及构效关系研究进展。国内外学者采用各种色谱技术对栀子和西红花中西红花苷类化合物进行分离纯化, 文献显示, 采用 SGCC 法能获得较大量西红花苷纯品, 但此类技术回收率

稍低, 需反复进行柱层析。随着分离技术的进步, 一次能同时分离出数个不同结构化合物的 PLC 法及 HSCCC 法在西红花分离纯化中的优势逐渐显示出来。目前, HPLC 法仍广泛应用于栀子和西红花中西红花苷类成分的分析检测, 结果显示, 该法在西红花苷分析检测方面选择性好, 灵敏度高且分析

速度快,而 LC-MS 法则可实现栀子和西红花中西红花苷类化学成分简便快速的结构鉴定,该法对于快速、准确地从复杂样品中测定低含量西红花苷具有重要意义。不同结构西红花苷构效关系的研究结果显示,随着母核两端连接糖数量增加,活性也逐渐增强,显示这类化合物活性的发挥与结构中糖数量存在相关性。综上,尽管目前各国学者对西红花苷分离纯化、分析测定及构效关系进行了广泛的研究,但如何利用现代化学和生物学出现的前沿技术,对西红花苷进行更深入的研究,将是今后研究的方向。

参考文献

- [1] PHAM TQ, CORMIER F, FARNWORTH E, *et al.* Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48 (5): 1455
- [2] 刘怡,陈磊,张留记. 不同产地栀子皮和栀子仁中有效成分的含量比较 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23 (1): 81
LIU Y, CHEN L, ZHANG LJ. Study on effective constituent contents in different positions of *Gardenia jasminoides* from different producing places [J]. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol*, 2012, 23 (1): 81
- [3] CHEN Y, ZHANG H, LI YX, *et al.* Crocin and geniposide profiles and radical scavenging activity of gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) from different cultivars and at the various stages of maturation [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81 (4): 269
- [4] LI N, LIN G, KWAN YW, *et al.* Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 849 (2): 349
- [5] OCHIAI T, OHNO S, SOEDA S, *et al.* Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its stronger antioxidant effects than those of alpha-tocopherol [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 362 (1): 61
- [6] ABDULLAEV FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002, 227 (1): 20
- [7] AUNG HH, WANG CZ, NI M, *et al.* Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells [J]. *Exp Oncol*, 2007, 29 (3): 175
- [8] MEHRI S, ABNOUS K, MOUSAVI SH, *et al.* Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32 (2): 227
- [9] HOSSEINZADEH H, YOUNESI HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice [J]. *BMC Pharmacol*, 2002, 2 (1): 1
- [10] SHEN XC, QIAN ZY. Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats [J]. *Pharmazie*, 2006, 61 (4): 348
- [11] HE SY, QIAN ZY, TANG FT, *et al.* Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms [J]. *Life Sci*, 2005, 77 (8): 907
- [12] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 248
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 248
- [13] CHEN Y, ZHANG H, TIAN X, *et al.* Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* Ellis and *Crocus sativus* L. : a relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents [J]. *Food Chem*, 2008, 109 (3): 484
- [14] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 129
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 129
- [15] CHEN Y, CAI L, ZHAO C, *et al.* Spectroscopic, stability and radical-scavenging properties of a novel pigment from gardenia [J]. *Food Chem*, 2008, 109 (2): 269
- [16] CHOI SJ, KIM MJ, HEO HJ, *et al.* Ameliorating effect of *Gardenia jasminoides* extract on amyloid beta peptide-induced neuronal cell deficit [J]. *Mol Cells*, 2007, 24 (1): 113
- [17] FENG JY, HE XH, ZHOU S, *et al.* Preparative separation of crocins and geniposide simultaneously from gardenia fruits using macroporous resin and reversed-phase chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37 (3): 314
- [18] LIANG ZK, YANG M, XU ZS, *et al.* Isolation and purification of geniposide, crocin-1, and geniposidic acid from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography [J]. *Sep Sci Technol*, 2014, 49 (9): 1427
- [19] WANG YR, CHEN Y, DENG L, *et al.* Systematic separation and purification of iridoid glycosides and crocetin derivatives from *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2015, 1283 (1): 202
- [20] 陈莺谊,李行诺,张翠萍,等. 高效制备液相色谱在天然产物分离中的应用 [J]. *药学进展*, 2010, 34 (8): 337
CHEN YY, LI XN, ZHANG CP, *et al.* Application of high performance preparative chromatography to the separation of natural products [J]. *Prog Pharm Sci*, 2010, 34 (8): 337
- [21] KATTI A, GUIOCHON G. Optimization of sample size and sample volume in preparative liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1989, 61 (9): 982
- [22] CALSTEREN MV, BISSONNETTE M, CORMIER F, *et al.* Spectroscopic characterization of crocetin derivatives from *Crocus sativus* and *Gardenia jasminoides* [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45 (4): 1055
- [23] CHOI HJ, PARK YS, KIM MG, *et al.* Isolation and characterization of the major colorant in gardenia fruit [J]. *Dyes Pigments*, 2001, 49 (1): 15

- [24] ZHANG H, ZENG YH, YAN F, *et al.* Semi-preparative isolation of crocins from saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Chromatographia*, 2004, 59 (11-12): 691
- [25] KOULAKIOTIS NS, GIKAS E, IATROU G, *et al.* Quantitation of crocins and picrocrocin in saffron by HPLC: application to quality control and phytochemical differentiation from other *Crocus* taxa [J]. *Planta Med*, 2015, 81 (7): 606
- [26] 王一敏,任晓蕾. 大孔树脂的应用研究 [J]. *中医药信息*, 2008, 25(4): 2
WANG YM, REN XL. Application study of macroporous resin [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2008, 25 (4): 2
- [27] IBORRA JL, CASTELLAR MR, CANOVAS M, *et al.* TLC preparative purification of picrocrocin, HTCC and crocin from saffron [J]. *J Food Sci*, 1992, 57 (3): 714
- [28] PFISTER S, MEYER P, STECK A, *et al.* Isolation and structure elucidation of carotenoid-glycosyl esters in gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and saffron (*Crocus sativus* Linne) [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44 (9): 2612
- [29] ITO Y. Recent advances in counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1991, 538 (1): 3
- [30] LI L, LIU CM, LIU ZQ, *et al.* Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from plant extract of plantago asiatica by high performance centrifugal partition chromatography [J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 19 (11): 1349
- [31] JUBERT C, BAILEY G. Isolation of chlorophylls a and b from spinach by counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1140 (1): 95
- [32] LAUTENSCHLAGER M, LECHTENBERG M, SENDKER J, *et al.* Effective isolation protocol for secondary metabolites from saffron: semi-preparative scale preparation of crocin-1 and trans-crocetin [J]. *Fitoterapia*, 2014, 92: 290
- [33] HE ML, CHENG XW, CHEN JK, *et al.* Simultaneous determination of five major biologically active ingredients in different parts of *Gardenia jasminoides* fruits by HPLC with diode-array detection [J]. *Chromatographia*, 2006, 64 (11-12): 713
- [34] LECH KJ, WITOWSKA-JAROSZ J, JAROSZ M. Saffron yellow: characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection [J]. *J Mass Spectrom*, 2009, 44 (12): 1661
- [35] ZOUGAGH M, SIMONET BM, RIOS A, *et al.* Use of non-aqueous capillary electrophoresis for the quality control of commercial saffron samples [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1085 (2): 293
- [36] 何常明,谢晓梅,何美莲,等. 西红花中西红花苷-1和西红花苷-2含量测定方法的建立 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(9): 1270
HE CM, XIE XM, HE ML, *et al.* Establishment of determination method for crocin-I and crocin- II in *Crocus sativus* L. [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2006, 26 (9): 1270
- [37] 付小梅,彭水梅,刘倩,等. HPLC法同时测定栀子类药材中10个主要有效成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34 (4): 615
FU XM, PENG SM, LIU Q, *et al.* Quantitative analysis of ten compounds in fruits of *Gardenia* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34 (4): 615
- [38] 徐燕,曹进,王义明,等. 多波长高效液相色谱法同时测定栀子中的三类成分 [J]. *药学学报*, 2003, 38 (7): 3091
XU Y, CAO J, WANG YM, *et al.* Simultaneous determination of 3 kinds of components in *Gardenia* by high-performance liquid chromatography under different UV-vis wavelength [J]. *Acta Pharm Sin*, 2003, 38 (7): 3091
- [39] 杜鹏,钱之玉. 西红花苷-1大鼠吸收及排泄的研究 [J]. *中国新药杂志*, 2004, 13 (9): 801
DU P, QIAN ZY. Studies on the absorption and excretion of crocin-1 in rats [J]. *Chin J New Drugs*, 2004, 13 (9): 801
- [40] 唐琳,颜钊,徐莺. RP-HPLC法测定家兔血浆中西红花苷-1浓度及其药代动力学研究 [J]. *药学学报*, 2004, 39 (10): 854
TANG L, YAN F, XU Y, *et al.* Determination of crocin-1 in rabbit plasma and the pharmacokinetics by RP-HPLC [J]. *Acta Pharm Sin*, 2004, 39 (10): 854
- [41] ASAI A, NAKANO T, NAGAO A, *et al.* Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53 (18): 7302
- [42] XI L, QIAN ZY, DU P, *et al.* Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14 (9): 633
- [43] 张颖,刘建勋,林力,等. 大鼠口服西红花苷-1后吸收入血成分及药动学 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47 (2): 136
ZHANG Y, LIU JX, LIN L, *et al.* Pharmacokinetics of crocin-1 after oral administration in rats [J]. *Chin Pharm J*, 2012, 47 (2): 136
- [44] 朱俊博,史彦斌,李向阳. 西红花苷-1经大鼠肌肉注射的体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2014, 36 (9): 1983
ZHU JB, SHI YB, LI XY. Pharmacokinetics of crocin-1 administered by intramuscular injection in rats [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2014, 36 (9): 1983
- [45] UMIGAI N, MURAKAMI K, ULIT MV, *et al.* The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18 (7): 575
- [46] ZHANG Y, FEI F, ZHEN L, *et al.* Sensitive analysis and simultaneous assessment of pharmacokinetic properties of crocin and crocetin after oral administration in rats [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1044-1045: 1
- [47] CARMONA M, ZALACAIN A, NOVELLA JL, *et al.* Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS [J]. *J Agric*

- Food Chem, 2006, 54(3): 973
- [48] DING Y, XIANG LY, ZHANG T, *et al.* Chemical fingerprint analysis of *gardenia jasminoides* fruit by high-performance liquid chromatography [J]. *J Food Drug Anal*, 2010, 18(3): 180
- [49] WU XY, ZHOU Y, YIN F, *et al.* Quality control and producing areas differentiation of *Gardeniae Fructus* for eight bioactive constituents by HPLC-DAD-ESI-MS [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(4): 551
- [50] YIN FZ, WU XY, LI L, *et al.* Quality control of *Gardeniae Fructus* by HPLC-PDA fingerprint coupled with chemometric methods [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(10): 1685
- [51] CAI SX, ZHANG R, GUO Y, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of gardenia fruit oil with bioactive components and their identification and quantification by HPLC-DAD/ESI-MS (2) [J]. *Food Funct*, 2015, 6(7): 2194
- [52] BERGONZI MC, RIGHESCHI C, ISACCHI B, *et al.* Identification and quantification of constituents of *Gardenia jasminoides* Ellis (Zhizi) by HPLC-DAD-ESI-MS [J]. *Food Chem*, 2012, 134(2): 1199
- [53] VERMA RS, MIDDHA D. Analysis of saffron (*Crocus sativus* L. stigma) components by LC-MS-MS [J]. *Chromatographia*, 2010, 71(1): 117
- [54] MASI E, TAITI C, HEIMLER D, *et al.* PTR-TOF-MS and HPLC analysis in the characterization of saffron (*Crocus sativus* L.) from Italy and Iran [J]. *Food Chem*, 2016, 192: 75
- [55] CHEN XJ, ZHAO J, WANG YT, *et al.* CE and CEC analysis of phytochemicals in herbal medicines [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(1): 168
- [56] 关瑾, 刘芷含, 丁爽, 等. 色谱法在质子泵抑制剂药物对映体分离分析中的应用进展 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(7): 1143
- GUAN J, LIU ZH, DING S, *et al.* Application advances of chromatography in separation and determination of PPIs enantiomers [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(7): 1143
- [57] 罗国安, 王义明. 毛细管电泳的原理及应用 [J]. *色谱*, 1995, 13(6): 437
- LUO GA, WANG YM. Principles and applications of capillary electrophoresis [J]. *Chin J Chromatogr*, 1995, 13(6): 437
- [58] SUGIURA M, SHOYAMA Y, SAITO H, *et al.* Crocin (crocin di-gentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo* [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271(2): 703
- [59] ABE K, SUGIURA M, SHOYAMA Y, *et al.* Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons [J]. *Brain Res*, 1998, 787(1): 132
- [60] ESCRIBANO J, ALONSO GL, FERNANDEZ JA, *et al.* Crocin, safranal and picocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro* [J]. *Cancer Lett*, 1996, 100(1-2): 23
- [61] PAPANDEOU MA, KANAKIS CD, POLISSIOU MG, *et al.* Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(23): 8762
- [62] XUAN B, ZHOU YH, LI N, *et al.* Effects of crocin analogs on ocular blood flow and retinal function [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 1999, 15(2): 143

(本文于 2017 年 2 月 15 日收到)