

栀子全时段融合指纹图谱的构建及特征峰的鉴定

王伟^{1,2}, 付娟^{1,2}, 万琴^{1,2}, 李家春^{1,2}, 黄文哲^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立栀子的指纹图谱并采用电喷雾离子源-四极杆-飞行时间质谱 (ESI-Q-TOF MS) 对其共有峰进行定性分析。方法 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 柱, 以乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱, 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 35 °C, 检测波长为 238、327、440 nm。使用 Matlab 7.1 软件编程, 对 3 波长下的 CSV 格式数据进行全时段融合。结果 各色谱峰分离度良好, 3 波长融合指纹图谱全面体现了栀子 238、327、440 nm 特征吸收波长的指纹信息, 标定 20 个共有峰, 并完成其中 16 个成分的鉴定。10 批不同批次的栀子指纹图谱与对照指纹图谱之间相似度较好, 相似度大于 0.90 以上。结论 实现了栀子融合指纹图谱的测定, 同时解析了图谱中的化学组成, 并制定了主成分与栀子苷相对峰面积的范围, 为全面控制药材质量提供了数据支撑。

关键词: 栀子; 全时段融合指纹图谱; 山栀苷; 京尼平苷酸; 去乙酰车叶草酸甲酯; 京尼平龙胆双糖苷; 栀子苷; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 异绿原酸 A; 西红花苷-I; 西红花苷-II

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2158-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.028

Study on all-time multi-wavelength fusion fingerprints of chemical components in *Gardeniae Fructus* and quantitative analysis of characteristic components

WANG Wei^{1,2}, FU Juan^{1,2}, WAN Qin^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish the multi-wavelength fusion HPLC fingerprints of *Gardeniae Fructus* and to make quantitative analysis of the common peaks by ESI-Q-TOF MS. **Methods** The Kromasil 100-5 C₁₈ column was used with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid in gradient elution; The flow rate was 1.0 mL/min; The column temperature was 35 °C; The detection wavelength was 238, 327, and 440 nm. Matlab7.1 was adopted for multi-wavelength fusion of the data in CSV format. **Results** Twenty chemical constituents were detected in fusion fingerprint, which included more information. Sixteen chemical constituents were compared with reference standards and identified by MS. The similarity of 10 batches of *Gardeniae Fructus* was over 0.90. **Conclusion** The systematic quantified fingerprint method based on the technique of multi-wavelength fusion fingerprint and identifying 16 constituents can be used for the fully quality control of *Gardeniae Fructus*.

Key words: *Gardeniae Fructus*; all-time multi-wavelength fusion fingerprint; shanzhiside; geniposidic acid; deacetylasperulosidic acid methyl ester; genipin-1-D-gentiobioside; geniposide; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; isochlorogenic acid A; crocin-I; crocin-II

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 性寒、味苦, 具泻火除烦、清热利湿、凉血解毒之功效^[1]。现代研究表明^[2], 栀子中含有环烯醚萜类、有机酸类、黄酮类和三萜类等多种化学成分。以栀子苷为代表的环烯醚萜类成分具有

抗炎、解热、利胆和保肝作用, 绿原酸等有机酸具有抗炎和保肝利胆作用, 西红花苷类成分具有去黄疸、利胆及明显的调血脂作用^[3]。栀子中各类成分的最大吸收波长有差别, 单一波长下的 HPLC 指纹图谱难以全面展现该药材真实的化学信息。

收稿日期: 2017-11-23

基金项目: 重大新药创制项目科技重大专项“现代中药创新集群与数字制药技术平台”(2013ZX09402203)

作者简介: 王伟 (1985—), 女, 硕士研究生, 从事中药分析与质量标准研究。Tel: 15105130045 E-mail: wangwei-0608@163.com

*通信作者 萧伟, 博士, 研究员, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: wzzh-nj@163.com

本研究对来源于道地产区的江西栀子所含的环烯醚萜类、有机酸酯类和西红花苷 3 大类成分同时进行监测,运用 Matlab 7.1 软件对 3 波长进行融合,并依据多批药材的 HPLC 指纹图谱结果建立了全时段融合指纹图谱,标定了 20 个共有峰,并鉴定出其中的 16 个化合物,为栀子药材物质基础研究提供了数据支撑。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);Agilent 1290 超高压液相色谱仪,DAD 紫外检测器;质谱检测器为 Agilent 6538Q-TOF-MS,电喷雾(ESI)离子源(美国安捷伦公司);Mettler AE240 电子分析天平、XP6 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);Centrifuge 5415D 高速离心机(湖南湘仪公司);Milli-Q Academic 纯水机(美国密理博公司);KQ-250DB 型超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 材料

对照品京尼平苷酸(批号 111828-201102,质量分数 96.0%)、去乙酰车叶草酸甲酯(批号 11786-200801)、绿原酸(批号 110753-201314,质量分数 96.6%)、栀子苷(批号 110749-201316,质量分数 97.5%)、西红花苷-I(批号 111588-201303,质量分数 92.6%)、西红花苷-II(批号 111589-201304,质量分数 92.4%),购于中国食品药品检定研究院;对照品山栀苷(批号 14092701,质量分数 >97.0%),购于成都普瑞法科技开发有限公司;新绿原酸(批号 MUST-13013001)、隐绿原酸(批号 MUST-13013002)、异绿原酸 A(批号 MUST-15042518)购于成都曼斯特生物科技有限公司,质量分数均大于 98.0%;对照品京尼平 1-β-D-龙胆二糖苷(批号 111320,质量分数 ≥98.0%),购于四川普菲德生物技术有限公司。10 批栀子药材购买于安徽亳州药材市场,编号分别为 S1~S10,产地为江西,经连云港康济大药房连锁有限公司吴舟执业药师鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。乙腈(色谱纯,美国天地公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm);柱温为 35 °C;流动相为乙腈(A)-0.1%磷

酸水(B),梯度洗脱,0~10 min, 5%~10% A; 10~20 min, 10% A; 20~24 min, 10%~18% A; 24~35 min, 18%~24% A; 35~40 min, 24%~35% A; 40~47 min, 35%; 47~50 min, 35%~80% A; 体积流量为 1.0 mL/min;检测波长为 238、327、440 nm;进样量为 10 μL。

2.2 质谱条件

ESI 离子源、负离子模式、毛细管电压 3 500 V、雾化气压力 310.3 kPa,干燥气体积流量 10 L/min,加热毛细管温度 350 °C,碎片电压 145 V,质量数扫描范围 m/z 100~2 000,碰撞能量为 20~25 eV。

2.3 对照品溶液的制备

取山栀苷、京尼平苷酸、去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、西红花苷-I、西红花苷-II 适量,精密称定,加 30%甲醇制成含山栀苷 17.31 μg/mL、京尼平苷酸 5.02 μg/mL、去乙酰车叶草酸甲酯 12.03 μg/mL、京尼平龙胆双糖苷 104.6 μg/mL、栀子苷 0.463 2 mg/mL、新绿原酸 3.036 μg/mL、绿原酸 16.12 μg/mL、隐绿原酸 4.089 μg/mL、异绿原酸 A 7.801 μg/mL、西红花苷-I 8.902 μg/mL、西红花苷-II 4.026 μg/mL 混合对照品溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 4 号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 30%甲醇 25 mL,超声处理 30 min,摇匀,滤过,即得。

2.5 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一供试品(S8)溶液连续进样 6 次,每次 10 μL,以栀子苷为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及主成分相对峰面积。结果 20 个共有峰相对保留时间的 RSD < 0.91%,7 个主成分相对峰面积的 RSD < 0.21%,6 次测定的色谱图相似度大于 0.99,说明仪器精密度良好,符合指纹图谱检测要求。

2.5.2 稳定性试验 取“2.3”项下混合对照品溶液,分别于 0、2、4、8、12、18、24 h 注入高效液相色谱仪,每次 10 μL。计算各个成分峰面积的为 RSD 值,结果 11 个成分峰面积 RSD < 0.95%。

取同一供试品(S8)溶液,分别于 0、2、4、8、12、18、24 h 注入高效液相色谱仪,每次 10 μL。以栀子苷为参照峰,计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及主成分相对峰面积。结果 20 个共有峰相对保留时间的 RSD < 0.89%,7 个主成分相对

峰面积的 $RSD < 0.33\%$ 。结果表明对照品溶液和供试品溶液在室温条件下放置 24 h 稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取同一药材 (S8), 按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定。以栀子苷为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及主成分相对峰面积。结果 20 个共有峰相对保留时间 $RSD < 0.37\%$, 7 个主成分相对峰面积 $RSD < 0.31\%$ 。结果表明该方法重复性良好。

2.6 指纹图谱的建立及相似度分析

取不同批次的栀子药材, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件测定, 分别得到 10 批样品的指纹图谱。

分别从 Chromeleon 工作站中导出 238、327、440 nm 的 CSV 格式数据文件, 使用 Matlab 7.1 软件编程, 对 CSV 格式数据进行全时段等基线 3 波长融合, 得到同时反映 3 个波长信息的色谱图和一组图谱数据, 并导入中药指纹图谱相似度评价体系 (2004A) 进行分析, 采用多点校正后进行自动匹配获得样品的共有模式 (对照指纹图谱)。共标定 20 个共有峰, 共有峰峰面积占总峰面积 90% 以上。结果见图 1。以此共有模式为标准, 对样品进行整体相似度评价。结果 10 批药材 (S1~S10) 的相似度分别为 0.966、0.949、0.927、0.978、0.956、0.967、0.928、0.919、0.982、0.978。说明不同批次的栀子

药材主要成分有较好的一致性, 稳定性较好。

2.7 色谱峰定性结果

按照“2.2”项质谱条件进行分析, 采用对照品比对, 结合 MS、MS/MS 数据和栀子已知化合物的相关文献报道^[4-13], 对指纹图谱中 20 个共有峰进行分析, 共鉴定了其中的 16 个成分, 结果见表 1。共有峰 18、19 及 20 对应的化学成分鉴定为西红花苷类物质, 但由于缺少更充分详尽的信息, 未能进行成分鉴定, 共有峰 14 未查阅到相关的文献报道, 有待深入研究。

3 讨论

3.1 指纹图谱融合技术的选择^[14-17]

栀子化学成分复杂, 紫外吸收差异较大, 单一波长下难以全面反映栀子中各类化学成分的全部信息, 采用融合技术对不同波长的色谱图进行融合, 可实现指纹图谱信息的最大化。通过 DAD 全波长扫描, 确定环烯醚萜类、有机酸酯类和西红花苷 3 类有效成分的检测波长分别为 238、327、440 nm, 并利用 Matlab 7.1 软件对 3 波长进行融合, 获得全面反映栀子中各类药效成分信息的指纹图谱。

3.2 色谱条件的选择

考虑到样品中含有有机酸类成分, 考察了乙腈-三氟乙酸水、乙腈-磷酸水、乙腈-甲酸水和甲醇-

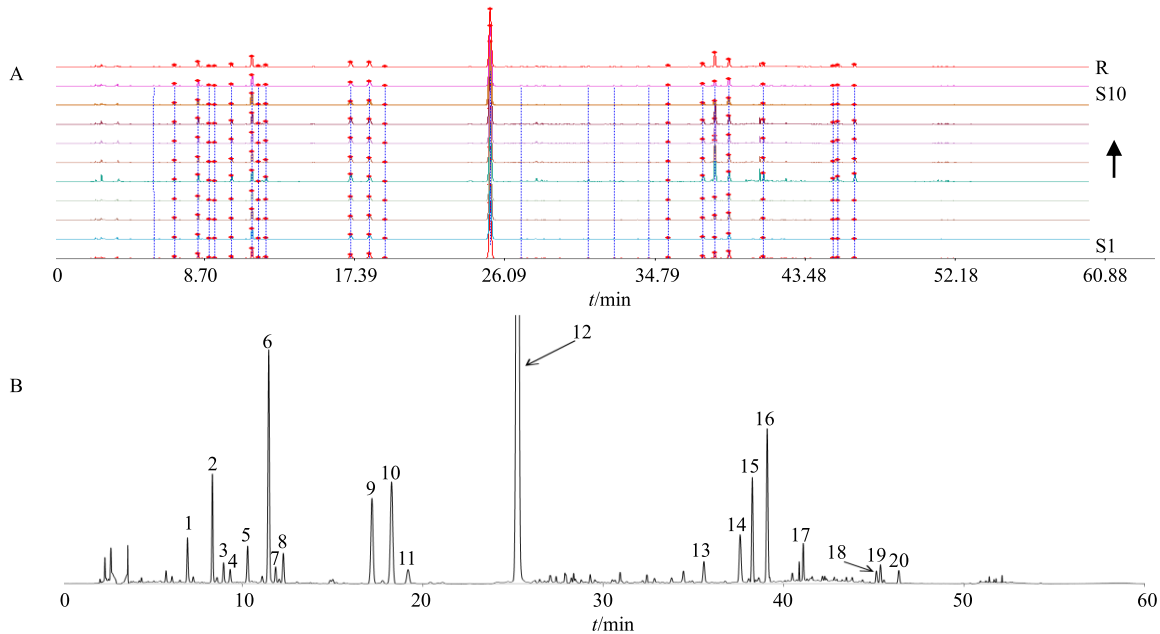


图 1 10 批栀子药材融合指纹图谱 (A) 和对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 Multi-wavelength fusion fingerprint of 10 batches of *Gardeniae Fructus* samples (A) and common (B) HPLC fingerprint

表 1 特征峰化学成分鉴定结果

Table 1 Identification results of chemical constituents of fingerprint

峰号	母离子	分子式	理论 m/z	误差 $\times(10^{-6})$	鉴定结果
1	373.114 9 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.114 0	2.39	栀子新苷
	409.090 6 [M+Cl] ⁻		409.090 7	0.21	
	449.131 6 [M+HCO ₂] ⁻		419.119 5	0.27	
2	391.125 2 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	391.124 6	1.59	山梔苷*
	427.101 3 [M+Cl] ⁻		427.101 3	0.08	
3	361.151 9 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₆ O ₉	361.150 4	4.21	龙船花苷
	397.127 7 [M+Cl] ⁻		397.127 1	1.46	
	407.157 6 [M+HCO ₂] ⁻		407.155 9	4.06	
4	373.115 6 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.114 0	4.24	京尼平苷酸*
	409.091 7 [M+Cl] ⁻		409.090 7	2.52	
5	403.124 2 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.124 6	0.96	去乙酰车叶草酸甲酯*
	439.101 5 [M+Cl] ⁻		439.101 3	0.59	
	449.130 4 [M+HCO ₂] ⁻		449.130 1	0.77	
6	403.125 1 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.124 6	1.40	羟异栀子苷*
	439.102 5 [M+Cl] ⁻		439.101 3	2.87	
	449.131 6 [M+HCO ₂] ⁻		449.130 1	1.40	
7	353.088 9 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	3.05	新绿原酸*
8	403.126 5 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.124 6	4.66	鸡屎藤次苷甲酯
	439.101 5 [M+Cl] ⁻		439.101 3	0.60	
	449.131 6 [M+HCO ₂] ⁻		449.130 1	0.27	
9	353.088 7 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	2.64	绿原酸*
	707.182 6 [2M-H] ⁻		707.181 9		
10	549.182 2 [M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	549.182 5	0.62	京尼平龙胆双糖苷*
	585.158 9 [M+Cl] ⁻		585.159 2	0.39	
	595.187 5 [M+HCO ₂] ⁻		595.188 0	0.75	
11	353.087 7 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	0.36	隐绿原酸*
12	387.130 2 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	387.129 7	1.42	栀子苷*
	423.106 3 [M+Cl] ⁻		423.406 3	0.14	
	433.135 6 [M+HCO ₂] ⁻		433.135 1	1.12	
13	515.120 7 [M-H] ⁻	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.119 5	2.32	异绿原酸 A*
14	695.220 7 [M-H] ⁻	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇	695.219 3	2.00	未知
	731.197 3 [M+Cl] ⁻		731.196 0	1.85	
	1 391.447 7 [2M-H] ⁻		1 391.447 7		
15	975.373 5 [M-H] ⁻	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	975.371 5	0.64	西红花苷-I*
	1 011.351 1 [M+Cl] ⁻		1 011.384 2	1.60	
16	659.161 9 [M-H] ⁻	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	659.161 8	0.17	3,5-二-O-咖啡酰基-4-O-(3-羟基-3-甲基戊二酰基)奎宁酸
17	813.317 9 [M-H] ⁻	C ₃₈ H ₅₄ O ₁₉	813.318 7	1.27	西红花苷-II*
	849.297 7 [M+Cl] ⁻		849.295 3	2.65	
	859.327 8 [M+HCO ₂] ⁻		859.324 1	3.91	

*-通过对照品鉴定的化合物

*-compounds identified by reference substance

磷酸水 4 个流动相系统。结果表明,乙腈-甲酸水系统的个别峰拖尾,乙腈-三氟乙酸水和乙腈-磷酸水系统分析效果没有差异,考虑到三氟乙酸具有一定的挥发性,易造成流动相体系的变化,最终采用了乙腈-磷酸水系统作为流动相。考察了 Luna C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 3 根不同品牌的色谱柱,在所选定的色谱条件下进行测定, Kromasil

C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离效果最佳。又比较了 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 不同粒度的色谱柱,显示没有显著的差异。最后选定 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱作为分析柱。比较柱温为 25、30、35、40 °C, 体积流量为 0.8、1.0、1.2 mL/min 所得图谱,结果柱温为 35 °C, 体积流量为 1.0 mL/min 时所得指纹图谱中各色谱峰分离较好。

3.3 提取方法的考察

研究中考察了提取溶剂(水, 10%、30%、50%、75%、100%甲醇和 50%、70%、100%乙醇)、提取方法(热回流、超声提取)、提取时间(20、30、40、60 min), 最终确定 30%甲醇, 超声提取 30 min 提取, 方法操作简便快捷, 有机溶剂用量少, 能够获取大量的化学成分信息。

3.4 内控标准的制定

在不同批次的栀子样品指纹图谱中, 山栀苷、羟异栀子苷、绿原酸、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、西红花苷 I 及共有峰 16 色谱峰响应值较高且稳定, 其含量高低能客观反映栀子药材内在质量, 基于通过控制原药材的质量稳定性以间接保证制剂质量的均一性原则, 规定山栀苷、羟异栀子苷、绿原酸、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷、西红花苷 I 及共有峰 16 与栀子苷的相对峰面积分别为 0.03~0.06、0.09~0.14、0.05~0.10、0.07~0.12、1.00、0.04~0.10、0.06~0.10。

本研究采用 HPLC 法建立了栀子药材主要药效成分融合指纹图谱, 可同时对 20 个共有峰进行定性分析, 为栀子药材及含有栀子药材的成方制剂质量标准建立和评价提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 杨全军, 范明松, 孙兆林, 等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展 [J]. 中国现代中药, 2010, 9(12): 7-12.
- [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] Zhou T T, Liu H, Wen J, *et al.* Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(17): 2520-2528.
- [5] Ren L L, Xue X Y, Zhang F F, *et al.* Studies of iridoid glycosides using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(18): 3039-3050.
- [6] Ding Y, Xiang L Y, Zhang T, *et al.* Chemical fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* fruit by high-performance liquid chromatography [J]. *J Food Drug Anal*, 2010, 18(3): 180-190.
- [7] He W H, Liu X, Xu H G, *et al.* On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in *Gardenia (Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts [J]. *Food Chem*, 2010, 123(2): 521-528.
- [8] Qi L W, Chen C Y, Li P. Structural characterization and identification of iridoid glyco-sides, saponins, phenolic acids and flavonoids in *Flos Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(19): 3227-3242.
- [9] 高凤阳, 高晓燕, 张加余, 等. HPLC-DAD-MS/MS 对栀子中色素成分的研究 [J]. 北京中医药大学报, 2012, 35(5): 343-348.
- [10] Liu H X, Gao L. Characterization and determination of genipin-1- β -gentiobioside in gardenia fruit by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection following electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Microchem J*, 2006, 38(43): 39-43.
- [11] Bergonzi M C, 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): 1199-1204.
- [12] 李木子, 王京辉, 蔡程科, 等. 栀子饮片质量分析研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1025-1032.
- [13] 朱 强, 王艳娟, 王振中, 等. HPLC-PDA-MS/MS 法研究热毒宁注射液生产过程中栀子化学成分的变化 [J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 429-438.
- [14] 刘 威, 李家春, 胡军华, 等. 桂枝水提液全时段双波长融合高效液相色谱指纹图谱研究及 6 个成分定量分析 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1043-1048.
- [15] 姚 东, 孟宪生, 王 帅, 等. 气滞胃痛颗粒全时段多波长融合指纹图谱研究及多成分定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1513-1517.
- [16] 孙国祥, 张静娴. 基于三波长融合谱的系统指纹定量法鉴定龙胆泻肝丸的真实质量 [J]. 色谱, 2009, 27(3): 318-322.
- [17] 崔 媛, 王小明, 杨 勇, 等. 薏苡仁油融合指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1698-1701.