·中药化学·

HPLC-DAD-MS/MS 对栀子中色素成分的研究*

高凤阳　高晓燕　张加余　张倩　乔延江　卢建秋#
(北京中医药大学科研实验中心　北京 100029)

摘要:目的　鉴定栀子中藏红花素类色素成分。**方法**　色谱条件:Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);0.15% 甲酸水-甲醇梯度洗脱,流速 0.6 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 440 nm。质谱条件:电喷雾离子源(ESI);负离子模式检测;扫描范围 m/z 100~1 400。结合化学成分的紫外-可见吸收光谱特征,与多级质谱(MS/MS)裂解特征分析,对其结构进行确证。**结果**　采用高效液相色谱-二级管阵列检测器(HPLC-DAD)鉴别了栀子中的 31 个藏红花素类色素成分,并根据 MS/MS 裂解规律推断了其中的 23 个化学成分。**结论**　HPLC-DAD-MS/MS 可用于快速筛选和鉴定栀子中的藏红花素类色素成分。

关键词:栀子;藏红花素类色素;HPLC-DAD-MS/MS;成分鉴定
中图分类号:R284.1

Pigment study in fruits of *Gardenia jasminoide* by HPLC-DAD-MS/MS*

GAO Feng-yang, GAO Xiao-yan, ZHANG Jia-yu, ZHANG qian, QIAO Yan-jiang, LU Jian-qiu#
(Center of Research and Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing　100029))

Abstract: Objective　To determine the crocins in the fruits of *Gardenia jasminoides*. **Methods**　The chromatographic condition was as follows: HPLC procedure was performed on the chromatographic column of Dikma Diamonsil C_{18}(4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 30 ℃, and the mobile phase was 0.15% formic acid solution-methanol in gradient elution. The flow velocity was 0.6 mL/min and the detection wavelength was 440 nm. The mass spectrometry condition was as follows: source of electrospray ionization (ESI), detection of negative ion mode and scan rang being $m/z = 100 - 1400$. The structure of crocins was determined combining the analysis on characteristics of ultraviolet-visible absorption spectra and MS/MS dissociation. **Results**　There were 31 crocins identified from the fruits of *Gardenia jasminoides* by using HPLC-DAD-MS/MS, and 23 chemical constituents deduced according to the laws of MS/MS dissociation. **Conclusion**　HPLC-DAD-MS/MS can be used for rapid screening and identifying crocins from the fruits of *Gardenia jasminoides*.

Key words: fruits of *Gardenia jasminoides*; crocins; HPLC-DAD-MS/MS; constituent identification

栀子来源于茜草科植物栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)的干燥成熟果实,味苦性寒,归心、肺、三焦经[1],具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒的功效[2]。现代研究表明,栀子中二萜类藏红花素是珍稀中药西红花及栀子中共有的水溶性类胡萝卜素类活性成分,具有很高的研究价值。

液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)是将高效液相色谱优秀的分离能力与质谱高灵敏度和高专属性的检测有机地结合在一起,成为天然产物领域中最强有力的化学筛选手段之一[3-7]。Carmonam 等[8-12]采用 LC-ES-MS 从栀子果实和西红花中鉴定了 15 种藏红花素类化合物。通过建立快速鉴定栀子中的藏红花素类色素成分的高效液相色谱-二级管阵列检测器-多级质谱(HPLC-DAD-MS/MS),为

高凤阳,女,在读硕士生
通信作者:卢建秋,男,博士,教授,硕士生导师,主要研究方向:中药质量安全性评价,Email: lujq@vip.sina.com
* 国家"重大新药创制"科技重大专项项目(No. 2010ZX09502-002)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

藏红花素类色素成分的鉴定提供借鉴和参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1100 LC-MSD TRAP XCT plus 系统，包括在线真空脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、电喷雾(ESI)接口，HP Chemstation Rev A 0.803 色谱工作站等。

1.2 药品与试剂

栀子药材取自亚宝北中大(北京)制药有限公司，经北京中医药大学杨瑶珺副研究员鉴定。西红花苷-Ⅰ(批号 111588-200501)和西红花苷-Ⅱ(批号 111589-201103)，均购自中国食品药品检定研究院。

甲醇、乙腈为色谱纯(德国默克公司)，甲酸(美国 ROE 公司 HPLC 级试剂)，高纯水来自 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

称取栀子药材粉末(40 目)10 g，加 70% 甲醇 100 mL，加热回流 2 h，冷却后称定，用 70% 甲醇补足减失重量，摇匀，静置后取上清液过滤，即得。

2.2 对照品溶液的制备

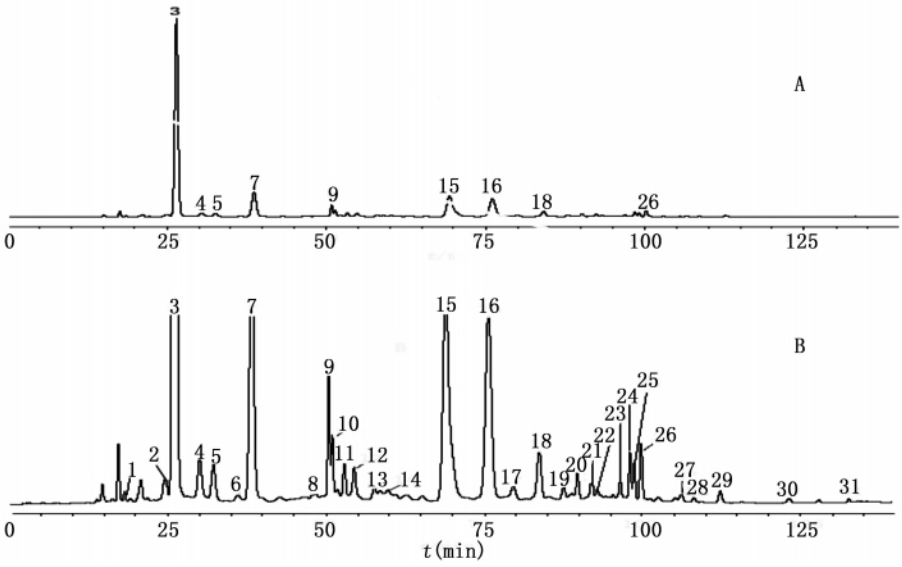
取西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ对照品适量，精密称定，加 70% 甲醇制成每 1 mL 含 0.126 mg 和 0.034 mg 的溶液，即得。

2.3 高效液相色谱条件

Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)。流动相：A 为 0.15% 甲酸溶液，B 为甲醇。梯度洗脱：0～10 min，40%～50% B；10～40 min，50%～53% B；40～43 min，53%～60% B；43～70 min，60% B；70～85 min，60%～70% B；85～90 min，70%～75% B；90～115 min，75%～78% B；115～125 min，78%～85% B；125～130 min，85%～100% B。流速 0.6 mL/min，柱温 30 ℃。二极管阵列检测器记录 190～700 nm 紫外-可见光谱，检测波长设定为 440 nm。所得色谱图见图 1，对照品紫外-可见光谱图见图 2。

2.4 串联质谱实验条件

负离子模式检测；雾化气和干燥气均为氮气(纯度 > 99.99%)，碰撞气为氦气(纯度 > 99.99%)；干燥气流速 12 L/min；雾化室压力 40 psi；雾化温度 350 ℃；毛细管电压 3 500 eV；扫描范围 m/z 100～1 400；流动相采用检测器后分流进入检测器为 0.15 mL/min；18～135 min 质谱检测。所得质谱图见图 3。



A 满刻度色谱图；B 局部放大色谱图；3 西红花苷-Ⅰ；7 西红花苷-Ⅱ。

A full scale chromatogram; B partial enlarged chromatogram; 3 crocin-Ⅰ; 7 crocin-Ⅱ.

图 1 栀子供试品溶液中藏红花素类色素成分 HPLC 图(440 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms of crocins in *Gardenia jasminoides* test samples (440 nm)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

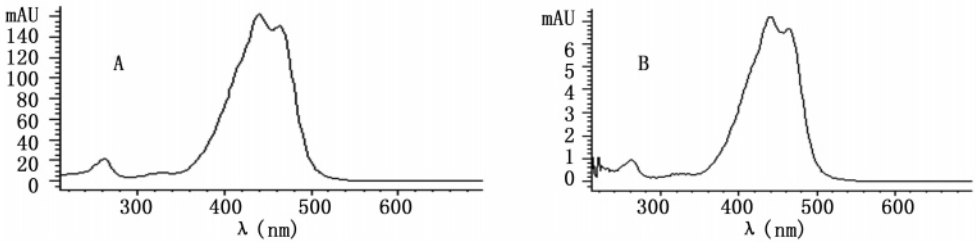
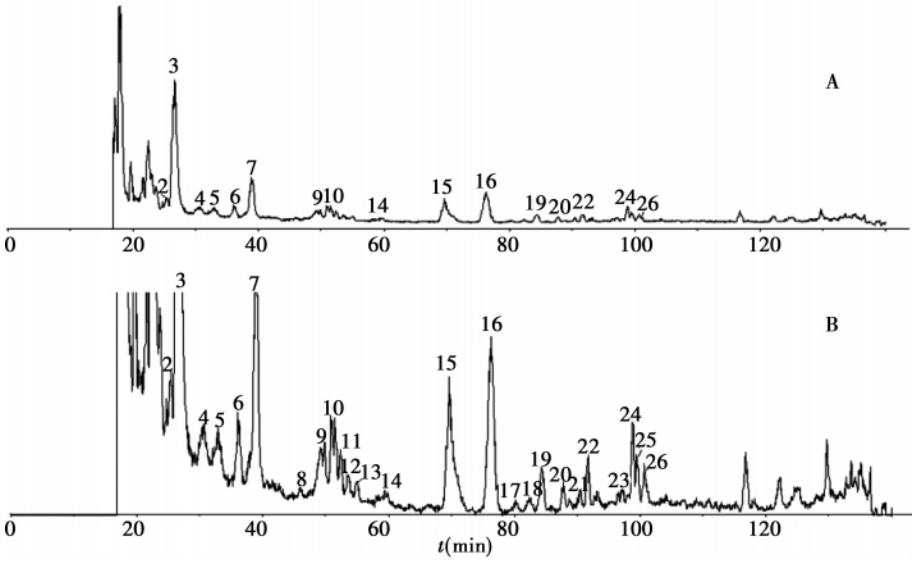


图 2　西红花苷-Ⅰ(A)和西红花苷-Ⅱ(B)对照品紫外-可见光谱图

Fig. 2　UV-visible spectro of crocin-Ⅰ(A) and crocin-Ⅱ(B)



A 满刻度色谱图; B 局部放大色谱图; 3 西红花苷-Ⅰ; 7 西红花苷-Ⅱ。

A full scale chromatogram; B partially enlarged chromatogram; 3 crocin-Ⅰ; 7 crocin-Ⅱ.

图 3　栀子供试品溶液总离子流图

Fig. 3　Total ion chromatograms of crocins in fruits of *Gardenia jasminoides*

3　结果

3.1　实验条件的优化

供试品溶液的制备方法比较了冷浸法、回流法和超声提取法,结果证明采用回流提取法提取效率更高。同时比较了 0.2% 甲酸 - 甲醇: 乙腈(3:1)、0.1% 甲酸 - 甲醇、0.1% 甲酸 - 乙腈、0.15% 甲酸 - 甲醇不同梯度条件下的色谱图以及 Zarbax-SB C_{18} 和 Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱的分离效果,并对柱温和进样量进行考察,最终确定了"2.3"项下所述的色谱条件。

3.2　栀子中藏红花素类成分的紫外 - 可见光谱分析

藏红花素类化合物的基本结构为单双交替的长链共轭 π 电子体系,长链上连有 4 个甲基,其末端连接不同的取代基,具有很明显的光谱特征。如图 2 中西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ的紫外 - 可见光谱吸收值所示,化合物在 400 ~ 500 nm 均有 2 个吸收峰。检测的 31 个化合物的最大吸收波长以 440 nm 为中心,在 2 ~ 22 nm 内有偏移,与西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ最大吸收值基本一致,曲线相似,说明具有类似的共轭结构。各化合物最大吸收波长不同程度的偏移是由于末端取代基存在差异,产生相应的红移或蓝移效应[13-14];同时,峰 8、9、12、13、15、18、19、21、23、24、25、27、31 在 330 nm 左右均有较明显吸收峰,根据类胡萝卜素类异构化紫外 - 可见吸收光谱特点,判断这 13 个化合物为顺式结构,其余化合物为反式结构。结果见表 1。其中化合物 3、7 分别为对照品西红花苷-Ⅰ、西红花苷-Ⅱ。

3.3　栀子中藏红花类色素成分的 MS/MS 分析

根据对照品和文献[8-12]中藏红花素类化合物的质谱裂解碎片,可以发现藏红花素类色素成分的很明显的裂解特征,主要是糖苷键的断裂与中性丢失 CO_2 分子: 化合物首先脱去两端糖基得到碎片

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 栀子中藏红花类色素成分的HPLC-DAD-MS/MS数据表

Table 1 Characterization of crocins from fruits of *Gardenia jasminoides* by HPLC-DAD-MS/MS

峰号 Peak No.	保留时间 Retention time (min)	分子离子峰 Molecular ion peak [M-H]⁻	多级质谱数据 MS/MS spectrum data	紫外-可见 λ_{max} UV-Vis λ_{max} (nm)
1	18.6	—	—	418
2	24.9	651	583, 327, 283, 239	430
3	26.4	975	651, 327, 283	440
4	30.4	975	651, 489, 327, 283	438
5	32.6	945	651, 621, 327, 283	440
6	36.5	651	327, 283, 239	430
7	38.7	813	651, 489, 327, 283, 239	440
8	48.7	652	651, 529, 327, 283, 239	330, 430
9	50.7	–	–	328, 440
10	51.3	489	327, 283, 239	438
11	53.2	651	327, 283, 239	438
12	54.8	975	651, 327, 283	328, 438
13	58.0	1020	857, 529, 489, 327	332, 438
14	60.2	1008	683, 639, 489, 327	436
15	69.4	975	651, 327, 283	325, 434
16	76.0	652	583, 489, 327, 283, 239	434
17	79.9	651	489, 283, 239	434
18	84.0	813	651, 489, 327	325, 432
19	88.0	651	514, 327, 283, 239	328, 434
20	90.1	489	327, 283, 239	434
21	92.4	489	327, 283, 239	324, 434
22	93.3	–	–	430
23	97.0	651	514, 327, 239	324, 432
24	98.5	651	327, 283, 239	320, 426
25	99.2	651	327, 283, 239	320, 426
26	100.3	—	—	434
27	106.5	489	327, 283, 239	320, 426
28	108.5	—	—	432
29	112.7	—	—	428
30	123.7	—	—	448
31	133.0	—	—	328, 426

注：峰号3，7为对照品。

Note: Peak 3 and peak 7 are reference.

离子m/z 327，依次脱去两分子CO_2，分别产生m/z 283和m/z 239的碎片离子。表1中列出了栀子中藏红花素类成分的质谱离子碎片信息，其中23个化合物符合该裂解规律，说明它们属于藏红花素类化合物。同时，互为同分异构体的藏红花素类化合物顺式结构比反式结构在色谱柱上的保留时间长，可以对顺反异构体进行初步推断。

化合物3、4、12、15的准分子离子峰为m/z 975 [M-H]⁻，推断其互为同分异构体，其中化合物12、15为顺式结构；碎片离子峰m/z 651 [M-H-gen]⁻，二级质谱有基峰m/z 327 [M-H-2gen]⁻、m/z 283 [M-H-2gen-CO_2]⁻和强峰m/z 651 [M-H-gen]⁻。西红花苷-Ⅰ的多级质谱裂解途径见图4。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

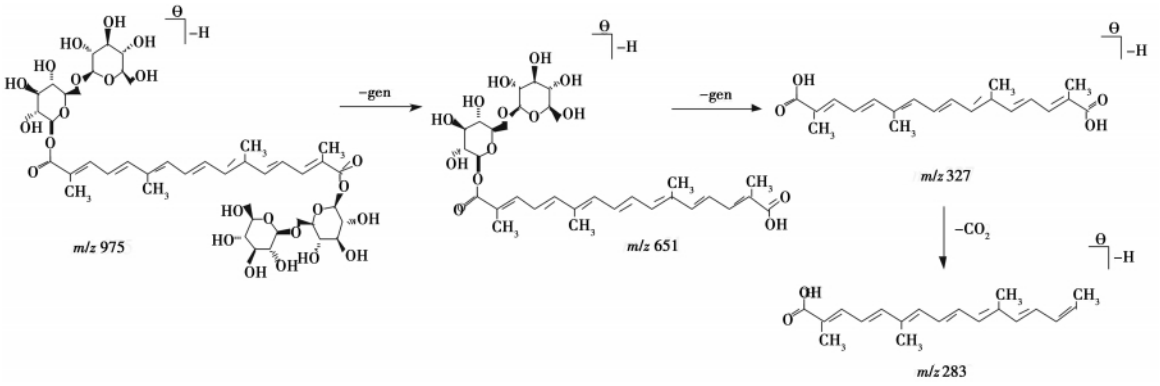


图 4　西红花苷-Ⅰ(化合物 3)的多级质谱裂解途径

Fig. 4　MS/MS fragmentation pathways of crocin-Ⅰ (compound 3)

化合物 7、18 的准分子离子峰为 m/z 813 [M-H]⁻，互为顺反异构。它们的 MS 谱中均有较弱的 m/z 651 [M-H-glc]⁻，二级质谱 m/z 651 [M-H-glc]⁻，m/z 489 [M-H-gen]⁻，m/z 327 [M-H-glc-gen]⁻。西红花苷-Ⅱ的多级质谱裂解途径见图 5。

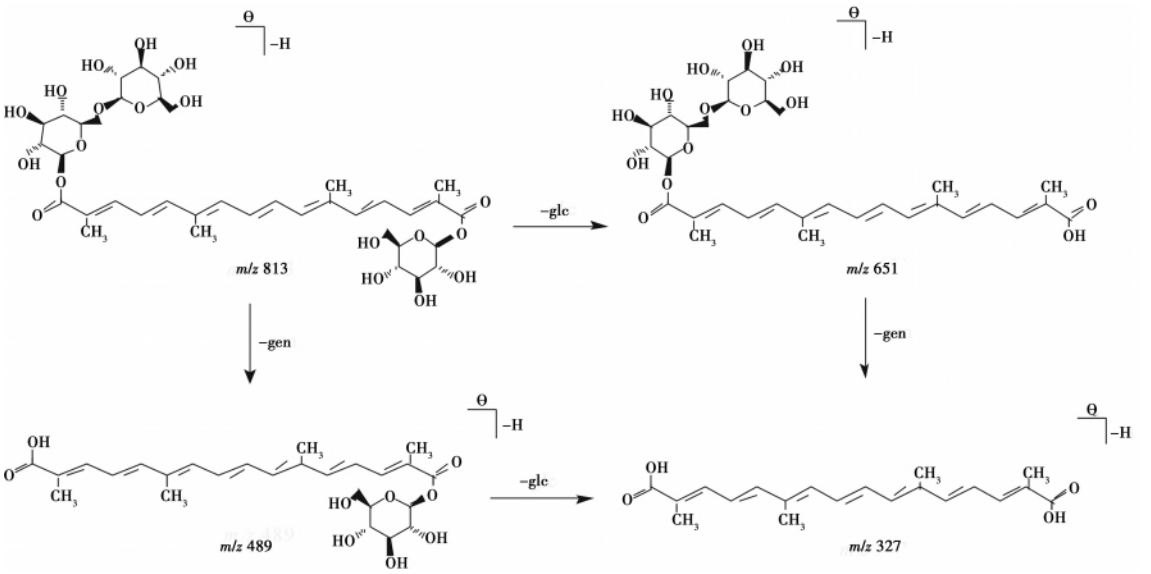


图 5　西红花苷-Ⅱ(化合物 7)的多级质谱裂解途径

Fig. 5　MS/MS fragmentation pathways of crocin-Ⅱ (compound 7)

化合物 2、6、11、17、19、23、24、25 的一级质谱均为 m/z 651 [M-H]⁻，推断这些化合物互为同分异构体，其中化合物 19、23、24、25 为顺式结构二级质谱中性丢失两分子的葡萄糖残基 m/z 327 [M-H-2glc]⁻或一分子龙胆二糖 m/z 327 [M-H-gen]⁻，在 m/z 327 基础上丢失一分子 CO_2 为 m/z 283，进一步裂解丢失一分子 CO_2，产生 m/z 239 的碎片离子。

化合物 10、20、21、27 的一级质谱均产生 m/z 489 [M-H]⁻，并有较弱的 m/z 327 [M-H-glc]⁻，二级质谱 m/z 327 [M-H-glc]⁻，m/z 283 [M-H-glc-CO_2]⁻，m/z 239 [M-H-glc-2CO_2]⁻。推断其互为同分异构体，其中化合物 21、27 为顺式结构。

分子量为 653 的化合物 8 和 16 互为顺反异构，因其分子量为奇数，推测其分子中含氮原子，目前未见该类化合物的相关报道，应为新化合物；化合物 5、13、14 有明显的藏红花素类化合物质谱裂解特征，但与上述裂解规律存在差异，尚难以推测其取代基类型和位置。化合物 1、9、22、26、28、29、30、31 只有光谱信息，缺乏更多质谱裂解碎片离子信息，难以推测其结构。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4 讨论

利用西红花苷-Ⅰ和西红花苷-Ⅱ两个藏红花素类色素成分的对照品，根据这两种化合物结构的紫外-可见光谱特征及质谱裂解规律，推断出栀子中同系列藏红花素类成分，建立鉴定栀子中藏红花素类色素成分的HPLC-DAD-MS/MS方法。该方法具有快速、经济、准确的优点，为研究结构类似、但缺乏相应对照品的同系列复杂化合物提供了研究思路和方法，对中药复杂体系的物质基础研究具有重要意义。

参考文献:

[1] 杜守颖，赵帅眉，陆洋. 中药栀子提取物质量标准研究[J]. 北京中医药大学学报，2009，32(11)：768-775.

[2] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 2010版. 一部. 北京：中国医药科技出版社，2010：231-232.

[3] MAN S L，GAO W Y，ZHANG Y J，et al. Qualitative and quantitative determination of major saponins in Paris and Trillium by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS[J]. J Chromatogr B，2010，878：2493-2948.

[4] ZHANG J Y，LI N，CHE Y Y，et al. Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of Murraya paniculata by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal，2011，56：950-961.

[5] TIAN Q G，LI D，PATIL B S. Identification and determination of flavonoids in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench，polygonaceae) by high-performance liquid chromatography with electrospary ionization mass spectrometry and photodiode array ultraviolet detection[J]. Phytochem Anal，2002，13：251-256.

[6] ROBARDS K. Strategies for the Determination of Bioactive Phenols in Plants，Fruit and Vegetables[J]. J Chromatogr A，2003，1000：657-691.

[7] LIU P，SUN JH，XU M，et al. Characterization of diterpenoids in the bark of Pseudolarix kaempferi by HPLC-ESI/MS^n[J]. Acta Pharmacol Sin，2011，46：213-220.

[8] KATARZYAN L，JANINA W，MACEJ J. Saffron yellow：characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection[J]. Mass Spectrom，2009，44：1661-1667.

[9] MANUEL C，AMAYA Z，ANA M，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，2006，54：973-979.

[10] THANH Q，FRANCUOIS C，EDWARD F，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. Agr ic. Food Chem，2000，48：1455-1461.

[11] RANJIT S，DEEPAK M. Analysis of Saffron (Crocus sativus L. Stigma) Components by LC-MS-MS[J]. Chromatographia，2010，7：117-123.

[12] MANUEL C，ANA M，FEDERICO F，et al. Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS：Comparative study of samples from different geographical origins[J]. Food Chemistry，2007(100)：445-450.

[13] 杨万政，曹秀君，李金淑，等. 紫外分光光度法测定沙棘油中总类胡萝卜素方法改进[J]. 中央民族大学学报：自然科学版，2009，18(3)：5-8.

[14] 王海滨. 类胡萝卜素的紫外可见光谱特性及其应用[J]. 武汉工业学院学报，2004，23(4)：10-13.

(收稿日期：2011-12-30)

《北京中医药大学学报》开通网上全文阅读

为了更好地服务作者、读者，提高工作效率，《北京中医药大学学报》编辑部自2011年1月1日起开通网上采编系统(http://xb.bucm.edu.cn)，请广大作者和读者登陆本刊网址，随时通过此系统投稿、查稿、修改稿件或浏览最新目录等，首次登陆需先行注册。2010—2011年杂志及现刊内容已在网上全文刊出，可在线全文阅读。

本刊不再接收电子邮件与纸版投稿，请作者、读者相互转告。如有特殊情况请与本刊编辑部联系。

电话：010-64287405。

《北京中医药大学学报》编辑部

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net