

· 药剂与炮制 ·

LCMS-IT-TOF 分析栀子炒焦前后化学成分的变化

雷磊^{1,2,3}, 王玉^{2,3,4}, 霍志鹏^{2,3}, 宋兆辉^{2,3}, 刘丽芳^{1*}, 何毅^{2,3*}

1. 中国药科大学 中药学院, 南京 210009;
2. 天士力控股集团有限公司 天士力研究院 现代中药开发中心, 天津 300410;
3. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家级重点实验室, 天津 300410;
4. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072)

[摘要] 目的:分析焦栀子的化学成分,考察栀子炮制前后的化学成分变化情况,明确焦栀子的药效物质基础。方法:采用液相色谱-离子阱-飞行时间质谱技术(LCMS-IT-TOF),色谱条件为 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相 0.005% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~5 min, 10%~15% B; 5~8 min, 15% B; 8~18 min, 15%~95% B; 18~20 min, 95% B; 20~22 min, 95%~10% B; 22~25 min, 10% B),柱温 30 ℃,流速 0.4 mL·min⁻¹,进样量 2 μL;质谱分析使用电喷雾离子源(ESI),分别在正、负离子模式下扫描,扫描范围均为 *m/z* 100~1 000。通过对照品比对、质谱数据分析、文献参考等对各离子峰进行鉴定,并比较炮制前后部分离子峰的峰面积,研究炮制后化学成分的变化情况。结果:共鉴定出了 38 个化合物,炮制后未产生新的化合物。炮制一定时间后,主要化合物的变化情况为栀子苷、京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷、山栀子苷、绿原酸、西红花苷峰面积降低,京尼平苷酸、藏红花酸峰面积增高。结论:该方法能够快速准确地鉴别焦栀子中的化学成分,栀子炮制后环烯醚萜类和西红花苷类成分含量发生了显著变化,这可能与焦栀子的止血活性和心脑血管保护作用有关。

[关键词] 焦栀子; 栀子; 炒焦; 西红花苷类; 环烯醚萜类; 藏红花酸; 三萜类

[中图分类号] R22;R28;R943.1;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0088-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190751

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181215.1110.002.html>

[网络出版时间] 2018-12-19 16:44

Variations of Chemical Constituents in Gardeniae Fructus Before and After Stir-frying by LCMS-IT-TOF

LEI Lei^{1,2,3}, WANG Yu^{2,3,4}, HUO Zhi-peng^{2,3}, SONG Zhao-hui^{2,3},
LIU Li-fang^{1*}, HE Yi^{2,3*}

1. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2. Research Center of Modern Chinese Medicine of Tasly Academy, Tasly Holding Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China;
3. State Key Laboratory of Critical Technology of Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China;
4. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

[Abstract] **Objective:** To rapidly analyze chemical compositions in raw products and stir-fried products of Gardeniae Fructus, and determine the pharmacodynamic material basis of Gardeniae Fructus Praeparatus.

[收稿日期] 20181025(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301005)

[第一作者] 雷磊,在读硕士,从事现代中药分析研究,E-mail:looklei@outlook.com

[通信作者] *刘丽芳,博士,教授,从事生药活性成分与质量评价研究,Tel:025-86185136,E-mail:liulifang69@126.com;

*何毅,博士,从事中药新药开发与研究工作,Tel:022-86343860,E-mail:heyi@tasly.com

Method: Liquid chromatography-ion trap-time-of-flight-mass spectrometry (LCMS-IT-TOF) was performed on ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), mobile phase was 0.005% formic acid aqueous solution (A) -acetonitrile (B) for gradient elution (0-5 min, 10% -15% B; 5-8 min, 15% B; 8-18 min, 15% -95% B; 18-20 min, 95% B; 20-22 min, 95% -10% B; 22-25 min, 10% B), the column temperature was 30 °C and the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, volume of sample injection was 2 μL; electrospray ionization (ESI) was applied for mass spectrometric analysis under positive and negative ion mode, the scanning ranges were *m/z* 100-1 000. The ion peaks were identified by comparison of control substances, mass spectrometry data analysis and literature references. The peak areas of some ion peaks before and after processing were compared, the changes of chemical compositions in Gardeniae Fructus after processing were investigated. **Result:** Based on the mass spectral data information and references, a total of 38 compounds were identified, no new compounds were produced after processing. The ion peak areas of main compounds were investigated during the stir-frying processing, the contents of geniposide, genipin-1-β-D-gentiobioside, shanzhiside, chlorogenic acid and crocin in Gardeniae Fructus Praeparatus were decreased; the contents of geniposidic acid and crocetin were increased. **Conclusion:** The method can rapidly and accurately identify the chemical constituents in Gardeniae Fructus Praeparatus. The changes of iridoids and crocins in Gardeniae Fructus during the stir-frying process may be related to hemostatic activity and protection of cardiovascular and cerebrovascular.

[**Key words**] Gardeniae Fructus Praeparatus; Gardeniae Fructus; stir-frying; crocins; iridoids; crocetin; triterpenes

栀子性寒,味苦,归心、肺、三焦经,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒的功效,用于治疗热病心烦、黄疸尿赤、血淋涩痛、目赤肿痛和火毒疮疡等^[1]。栀子主要含有环烯醚萜类、有机酸类、黄酮类等化合物,具有显著的镇痛抗炎、抗氧化、保肝利胆等作用^[2]。传统中医诊治过程中也常选用其炮制品,包括焦栀子、栀子炭等形式,具有凉血止血疗效,用于治疗血热吐血、衄血、尿血、崩漏^[1]。

2015 年版《中国药典》中焦栀子和栀子的鉴别、检查、性味与归经、用法与用量项基本相同;性状方面,焦栀子形状同栀子或为不规则的碎块,表面焦褐色或焦黑色、内部棕色或棕褐色;两者含量测定方法相同,但焦栀子对于栀子苷含量要求较低;功能与主治方面,栀子具有清热凉血、外用止痛等功效,而焦栀子更偏重于凉血止血的效果^[1]。有研究采用 HPLC 考察炮制对栀子化学成分的影响,但主要集中于栀子炒焦过程中栀子苷、京尼平龙胆二糖苷、京尼平苷酸、西红花苷、藏红花酸等成分含量变化情况^[3-4],对于焦栀子、栀子的整体化学成分和炮制过程中成分之间发生的转化情况研究较少。焦栀子与栀子在化学成分组成上的差异可能是二者功效不同的原因,对焦栀子的整体化学成分组成进行研究,有助于阐明炮制对其疗效的影响。

本实验采用 LCMS-IT-TOF 对焦栀子中的化学成分进行分析,鉴定出了 38 种化学成分,总结了主要的

裂解规律,可为焦栀子的物质基础、质量控制研究提供参考;采用半定量分析法对栀子中主要成分的变化情况进行研究,以探索炮制对栀子药效成分的影响。

1 材料

Prominence LCMS-IT-TOF 型超快速高效液相色谱离子阱飞行时间质谱联用仪(包括 LC-20AD 型二元泵,SLI-20AC 型自动进样器,CTO-20A 型柱温箱,SPD-M20A 型二极管阵列检测器,日本岛津公司),XS205DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),ST16R 型冷冻离心机(美国赛默飞世尔公司),Milli-Q 型超纯水系统(美国密理博公司),A11 basic 型分析研磨机(德国 IKA 公司)。

栀子饮片由天士力现代中药资源有限公司提供,批号 20161150,经中国药科大学刘丽芳教授鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实;栀子苷对照品(武汉远成共创科技有限公司,批号 20180330,纯度 > 95%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相 0.005% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 10% ~ 15% B; 5 ~ 8 min, 15% B; 8 ~ 18 min, 15% ~ 95% B; 18 ~ 20 min, 95% B; 20 ~ 22 min, 95% ~ 10% B; 22 ~

25 min, 10% B), 柱温 30 °C, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式喷雾电压 4.5 kV, 负离子模式喷雾电压 -3.5 kV。一级、二级离子扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 000, 采用三氟乙酸钠溶液作为校正标准液, 偏差 < 2 ppm。雾化气采用氮气, 流速 1.5 mL·min⁻¹。诱导碰撞解离(CID)能量 50%, 曲型脱溶剂管(CDL)温度 200 °C, 离子累计时间 10 ms, 检测电压 1.6 kV,

2.3 样品的制备

2.3.1 焦栀子制备^[1] 称取适量栀子生品, 共 3 份, 分别置预热的电炒锅中炒制 30, 45, 60 min, 中火(1.5 kW, 200 °C)炒至表面颜色变为焦褐色或焦黑

色, 得到 3 份不同炒制时间的焦栀子。

2.3.2 对照品溶液 取栀子苷对照品适量, 精密称定, 用甲醇使溶解, 制成 0.2 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.3.3 样品溶液 分别称取栀子生品和焦栀子(30 min), 焦栀子(45 min) 和焦栀子(60 min) 粉末(过四号筛) 1.0 g, 置于锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 20 min, 放冷, 称定质量, 用甲醇补足失重, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

3 结果

栀子生品和焦栀子(30 min) 总离子流图见图 1~2, 通过对照品比对、保留时间、质谱裂解规律、文献信息共鉴定了 38 个化合物^[5-13], 见表 1~2, 结果显示栀子炒焦后未发现新的化合物。

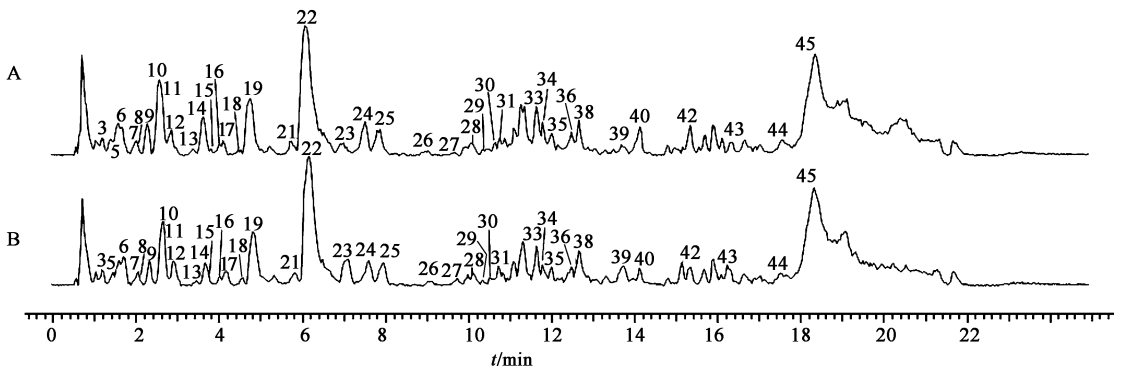


图1 栀子生品(A)和焦栀子(30 min,B)在正离子模式下的总离子流

Fig.1 Total ion current diagrams of raw products(A) and stir-fried products(30 min,B) of Gardeniae Fructus under positive ion mode

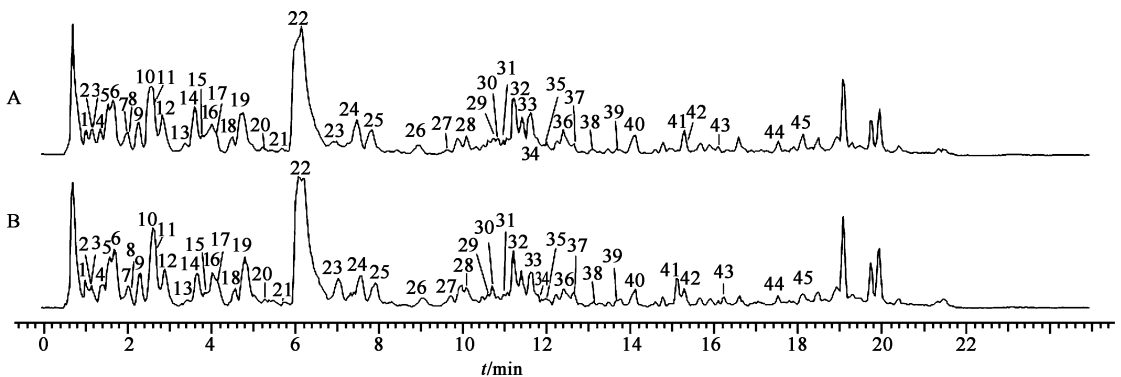


图2 栀子生品(A)和焦栀子(30 min,B)在负离子模式下的总离子流

Fig.2 Total ion current diagrams of raw products(A) and stir-fried products(30 min,B) of Gardeniae Fructus under negative ion mode

3.1 焦栀子化学成分的质谱解析

3.1.1 环烯醚萜苷类化合物的解析示例 栀子中含有大量环烯醚萜类成分, 在一、二级质谱图中有较好的响应。峰 22 的全扫描一级质谱图中, 可见明显的 *m/z* 433.133 8 [M + COOH]⁻ 和 *m/z* 411.128 1 [M + Na]⁺ 离子峰, 确定其相对分子质量为 388 Da, 二级扫描中正离子模式下可见失去葡萄糖残基和 1

个分子 H₂O 的碎片 *m/z* 209, 负离子模式可见失去葡萄糖残基的碎片 *m/z* 225, 符合栀子苷的裂解规律^[14-15], 见图 3, 并通过与对照品比对确定其为栀子苷。峰 19 的一级质谱图中, *m/z* 573.178 3 [M + Na]⁺, *m/z* 595.185 6 [M + COOH]⁻ 和 *m/z* 549.176 2 [M - H]⁻, 推测相对分子质量 550 Da。峰 19 的二级扫描中负离子模式下可见脱去糖苷、

表 1 焦栀子 LCMS-IT-TOF 负离子模式下的化学成分分析

Table 1 LCMS-IT-TOF analysis of chemical compositions in *Gardeniae Fructus Praeparatus* under negative ion mode

峰号	t_R /min	化合物	分子式	m/z [M - H] ⁻ 或 m/z [M + COOH] ⁻			MS ²	类别
				理论值	检测值	偏差 /ppm		
1	1.09	未知	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₄	433.061 8	433.066 2	10.16	335,191	-
2	1.20	水晶兰苷 ^[7]	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389.108 3	389.107 1	-3.08	209,191	环烯醚萜苷
3	1.20	未知	C ₂₇ H ₂₂ O	407.164 7	407.162 4	-5.65	361,181	-
4	1.34	gardoside ^[5,7,9-11]	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.113 4	373.112 4	-2.68	193,149	环烯醚萜苷
5	1.42	caryoptosidic acid ^[5,7]	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	391.124 0	391.123 8	-0.51	229, 211, 193, 185, 167, 149	环烯醚萜苷
6	1.64	山栀子苷 ^[5,7,9-11]	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	391.124 0	391.123 8	-0.51	229, 211, 193, 185, 167, 149	环烯醚萜苷
7	1.93	京尼平苷酸 ^[5,7,9-11]	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.113 4	373.110 9	-6.70	211,167,149	环烯醚萜苷
8	2.04	8-epiapodantheroside ^[6-7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	387.129 1	387.129 6	1.29	343,223,205,181	环烯醚萜苷
9	2.30	鸡矢藤次苷甲酯 ^[7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.124 0	403.127 4	8.43	241	环烯醚萜苷
10	2.50	羟异栀子苷 ^[5,7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.124 0	403.127 9	9.67	241	环烯醚萜苷
11	2.63	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	345.154 9	345.153 7	-3.48	179,161,143	单萜苷
12	2.85	去乙酰车叶草苷酸甲酯 ^[7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.124 0	403.126 5	6.20	-	环烯醚萜苷
13	3.42	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	345.154 9	345.153 7	-3.48	153	单萜苷
14	3.65	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	391.160 4	391.161 6	3.07	-	单萜苷
15	3.84	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	391.160 4	391.161 6	3.07	-	单萜苷
16	4.00	绿原酸 ^[9]	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 2	353.085 9	-3.68	191,179,173	有机酸
17	4.13	未知	C ₁₆ H ₂₈ O ₈	393.176 0	393.176 7	1.78	347,185	-
18	4.54	未知	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₀	425.165 9	425.164 6	-3.06	379,247	-
19	4.80	京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷 ^[5,7,9-11]	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	595.187 4	595.185 6	-3.02	517,387,323,225,207	环烯醚萜苷
20	5.31	栀子花酸 B ^[5,7,9]	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485.326 7	485.325 1	-3.30	531	四环三萜
21	5.79	jasminoside I	C ₂₂ H ₃₆ O ₁₂	537.218 3	537.213 2	-9.49	341	单萜苷
22	6.12	栀子苷 ^[5,7,9-11]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	433.134 6	433.133 8	-1.85	387,225	环烯醚萜苷
23	7.02	芥子酸-酰基-β-D-葡萄糖苷 ^[7]	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	431.118 9	431.118 2	-1.62	-	有机酸
24	7.53	epijasminoside A ^[5]	C ₁₆ H ₂₆ O ₇	375.165 5	375.166 9	3.73	-	单萜苷
25	7.86	jasminoside O/T ^[7]	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₁	507.207 7	507.207 2	-0.99	-	单萜苷
26	9.05	zataroside B ^[5]	C ₁₆ H ₂₄ O ₇	373.149 8	373.148 4	-3.75	-	酚类
27	9.70	2-methyl-L-erythritol-4-O-(6-O-trans-sinapoyl)-β-D-glucopyranoside ^[5]	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₃	503.176 4	503.173 4	-5.96	-	环烯醚萜苷
28	10.12	2-methyl-L-erythritol-1-O-(6-O-trans-sinapoyl)-β-D-glucopyranoside ^[5]	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₃	503.176 4	503.179 3	5.76	-	环烯醚萜苷
29	10.71	芦丁 ^[5]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 5	609.141 6	-6.40	301,271,255	黄酮
30	10.78	10-O-乙酰京尼平苷 ^[5,7]	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁	475.145 1	475.142 0	-6.52	-	环烯醚萜苷
31	10.89	金丝桃苷/异槲皮苷 ^[5]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 6	463.089 3	3.67	301,271,255	黄酮
32	11.29	6'-O-p-coumaroylgeniposide ^[5]	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	533.165 9	533.163 7	-4.13	-	环烯醚萜苷
33	11.50	3,4-dicaffeoyl-5-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl) quinic acid ^[5,7]	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	659.161 2	659.159 3	-2.88	-	有机酸
34	11.70	5-O-caffeoyl-4-O-sinapoylquinic acid ^[5,7]	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	559.145 1	559.142 9	-3.93	397	有机酸

续表 1

峰号	t_R /min	化合物	分子式	m/z [M - H] ⁻ 或 m/z [M + COOH] ⁻			MS ²	类别
				理论值	检测值	偏差 /ppm		
35	11.83	6'- <i>O</i> -sinapoylgeniposide ^[7]	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	593.187 0	593.183 1	-6.57	-	环烯醚萜苷
36	12.43	6'- <i>O</i> - <i>trans</i> -sinapoyl jasminoside A ^[7]	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	535.217 9	535.216 6	-2.43	323	单萜苷
37	12.50	西红花苷 ^[5,7]	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	975.370 9	975.376 6	5.84	651,489,327	西红花苷类
38	12.71	<i>cis</i> -crocin-3/ <i>trans</i> -crocin-3 ^[5,7]	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	651.265 2	651.266 5	2.00	489,327	西红花苷类
39	13.71	<i>cis</i> -crocin-3/ <i>trans</i> -crocin-3 ^[5,7]	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	651.265 2	651.266 5	2.00	489,327	西红花苷类
40	14.15	未知	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503.337 2	503.335 7	-2.98	-	-
41	15.07	藏红花酸 ^[5,7]	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	327.159 6	327.160 5	2.87	283,239	西红花苷类
42	15.36	erubigenin ^[5,7]	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.342 3	487.340 7	-3.28	-	五环三萜
43	16.13	未知	C ₂₇ H ₄₆ O ₉	559.311 8	559.312 1	0.54	-	-
44	17.60	未知	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295.227 3	295.227 1	-0.68	-	-
45	18.18	2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid ^[7]	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.347 4	471.345 9	-3.18	-	五环三萜

表 2 焦栀子 LCMS-IT-TOF 正离子模式下的化学成分分析

Table 2 LCMS-IT-TOF analysis of chemical compositions in Gardeniae Fructus Praeparatus under positive ion mode

峰号	t_R /min	化合物	分子式	m/z [M + H] ⁺ 或 m/z [M + Na] ⁺			MS ²	类别
				理论值	检测值	偏差 /ppm		
3	1.20	未知	C ₂₇ H ₂₂ O	385.156 8	385.153 5	-8.57	-	-
5	1.42	caryoptosidic acid ^[5-7]	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	415.121 6	415.118 8	-6.75	-	环烯醚萜苷
6	1.64	山栀子苷 ^[5-7,9-11]	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	415.121 6	415.118 8	-6.75	177,149	环烯醚萜苷
7	1.93	京尼平苷酸 ^[5-7,9-11]	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	397.111 0	397.114 1	7.81	-	环烯醚萜苷
8	2.04	8-epiapodantheroside ^[6-7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	411.126 7	411.130 0	8.03	-	环烯醚萜苷
9	2.30	鸡矢藤次苷甲酯 ^[7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	427.121 6	427.119 4	-5.15	-	环烯醚萜苷
10	2.50	羟异栀子苷 ^[5-7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	427.121 6	427.125 7	9.60	-	环烯醚萜苷
11	2.63	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	369.152 5	369.150 9	-4.33	-	单萜苷
12	2.85	去乙酰车叶草苷甲酸酯 ^[7]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	427.121 6	427.124 9	7.73	-	环烯醚萜苷
13	3.42	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	369.152 5	369.150 9	-4.33	-	单萜苷
14	3.65	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	369.152 5	369.150 9	-4.33	-	单萜苷
15	3.84	jasminoside B/D ^[7]	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	369.152 5	369.150 9	-4.33	-	单萜苷
16	4.00	绿原酸 ^[9]	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.102 9	355.106 0	8.73	163	有机酸
17	4.13	未知	C ₁₆ H ₂₈ O ₈	371.168 1	371.166 5	-4.31	203,391	-
18	4.54	未知	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₀	403.158 0	403.157 5	-1.24	-	-
19	4.80	京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷 ^[5-7,9-11]	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	573.179 5	573.178 3	-2.09	411,365,227,209	环烯醚萜苷
21	5.79	jasminoside I	C ₂₂ H ₃₆ O ₁₂	515.210 4	515.20 8	-4.66	377	-
22	6.12	栀子苷 ^[5-7,9-11]	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	411.126 7	411.128 1	3.41	209	环烯醚萜苷
23	7.02	芥子酸-酰基-β-D-葡萄糖苷 ^[7]	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	409.111 0	409.109 3	-4.16	-	有机酸
24	7.53	epijasminoside A ^[5]	C ₁₆ H ₂₆ O ₇	353.157 6	353.158 9	3.68	-	单萜苷
25	7.86	jasminoside O/T ^[7]	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₁	485.199 8	485.197 0	-5.77	-	单萜苷
26	9.05	zataroside B ^[5]	C ₁₆ H ₂₄ O ₇	329.160 0	329.161 4	4.25	167	酚类

续表 2

峰号	t_R /min	化合物	分子式	$m/z [M + H]^+$ 或 $m/z [M + Na]^+$			MS ²	类别
				理论值	检测值	偏差 /ppm		
27	9.70	2-methyl-L-erythritol-4-O-(6-O-trans-sinapoyl)- β -D-glucopyranoside ^[5]	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₃	527.174 0	527.173 1	-1.71	-	环烯醚萜苷
28	10.12	2-methyl-L-erythritol-1-O-(6-O-trans-sinapoyl)- β -D-glucopyranoside ^[5]	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₃	527.174 0	527.173 1	-1.71	-	环烯醚萜苷
29	10.71	芦丁 ^[5]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.161 2	611.161 7	0.82	303	黄酮
30	10.78	10-O-乙酰京尼平苷 ^[5,7]	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁	453.137 2	453.133 4	-8.39	-	环烯醚萜苷
31	10.89	金丝桃苷/异槲皮苷 ^[5]	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.103 3	465.105 9	5.59	-	黄酮
33	11.50	3,4-dicaffeoyl-5-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl) quinic acid ^[5,7]	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	683.158 8	683.165 0	9.08	-	有机酸
34	11.70	5-O-caffeoyl-4-O-sinapoylquinic acid ^[5,7]	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	561.160 8	561.164 2	6.06	-	有机酸
35	11.83	6'-O-sinapoylgeniposide ^[7]	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	617.184 6	617.182 8	-2.92	-	环烯醚萜苷
36	12.43	6'-O-trans-sinapoyl jasminoside A ^[7]	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	537.233 5	537.237 9	8.19	-	单萜苷
38	12.71	cis-crocin-3/trans-crocin-3 ^[5,7]	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	675.262 8	675.262 5	-0.44	-	西红花苷类
39	13.71	cis-crocin-3/trans-crocin-3 ^[5,7]	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	675.262 8	675.262 5	-0.44	-	西红花苷类
40	14.15	未知	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	527.334 8	527.334 9	0.19	487,469,451	-
42	15.36	erubigenin ^[5,7]	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	489.358 0	489.355 5	-5.11	511	五环三萜
43	16.13	未知	C ₂₇ H ₄₆ O ₉	537.303 9	537.304 3	0.74	-	-
44	17.60	未知	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	297.242 9	297.241 8	-3.70	-	-
45	18.18	2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid ^[7]	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	495.345 0	495.341 0	-8.08	455	五环三萜

丢 1 个分子 H₂O 和 CH₃OH 产生的碎片 m/z 517, 387, 323, 225, 207, 从而推测其具有和栀子苷相同的母核, 并且带有双糖苷取代, 故将其鉴定为京尼平-1- β -D-龙胆双糖苷。

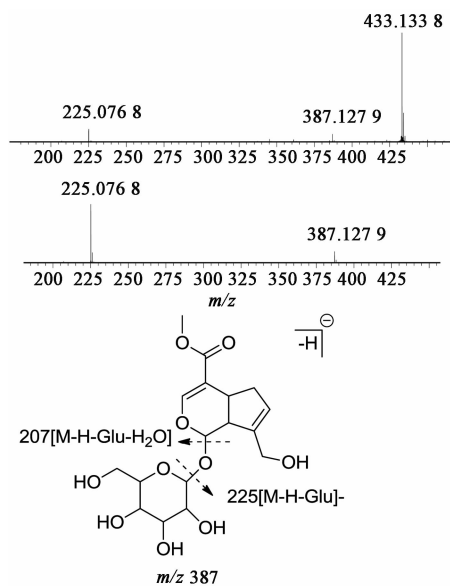


图 3 栀子苷在负离子模式下一、二级质谱及裂解规律
Fig. 3 Mass spectra and possible fragment pathways of geniposide

峰 m/z 391.123 8 $[M - H]^-$ 和 m/z 415.118 8 $[M + Na]^+$, 确定其相对分子质量为 392 Da, 根据精确相对分子质量推断元素组成并检索数据库, 初步推测 2 个化合物分别为 caryoptosidic acid 和山栀子苷。以 m/z 391 作为前体离子进行二级扫描, 负离子模式下可见脱去糖苷后中性丢失 H₂O 和 CO₂ 产生碎片 m/z 229, 211, 193, 185, 167, 149, 从而推断其裂解规律, 见图 4。根据文献[6-7]报道, 并结合保留时间、极性参数, 峰 5 鉴定为 caryoptosidic acid, 峰 6 为山栀子苷。

3.1.2 有机酸类化合物的解析示例 峰 16 全扫描模式一级质谱图可见明显的离子峰 m/z 353.085 9 $[M - H]^-$ 和 m/z 355.106 0 $[M + H]^+$, 确定其相对分子质量为 354 Da, 根据精确相对分子质量推断元素组成并通过检索数据库, 推测其可能是绿原酸或其同分异构体。二级质谱扫描结果显示 m/z 353.085 9 中性丢失 H₂O, CO₂ 等产生碎片 m/z 191, 179, 173, 进一步验证峰 16 是绿原酸类成分。文献报道了绿原酸的二级质谱裂解规律, m/z 191 碎片响应最强, m/z 179 和 m/z 135 强度都较弱^[16-17]; 本实验发现二级质谱中可观察到响应较强的离子碎片 m/z 191 和响应较弱的碎片 m/z 179, m/z 135 碎片

峰 5 和峰 6 全扫描一级质谱图可见明显的离子

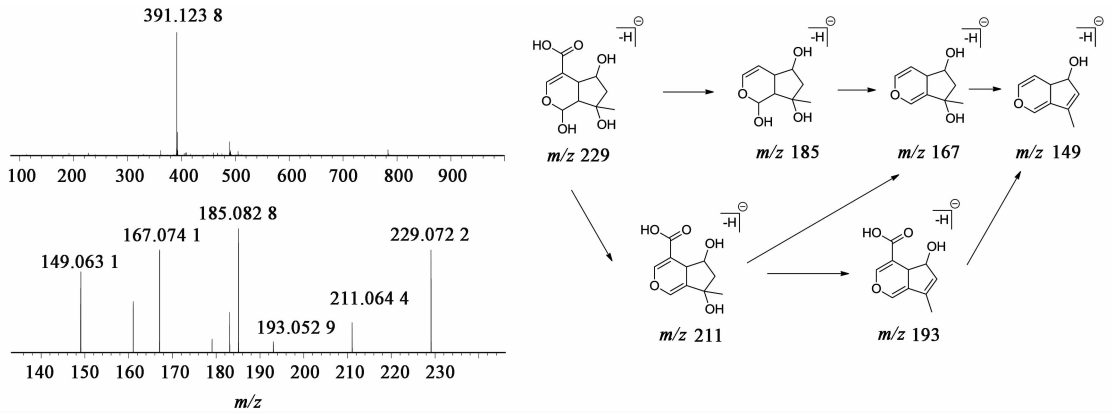


图 4 caryoptosidic acid 和山栀子苷在负离子模式下的一、二级质谱及裂解规律

Fig. 4 Mass spectra and possible fragment pathways of caryoptosidic acid and shanzhiside

几乎观察不到,与报道的现象相似,推测峰 16 可能为绿原酸,裂解规律见图 5。

3.1.3 西红花苷类化合物的解析示例 峰 37 全扫描一级质谱图可见明显的离子峰 m/z 975.376 6

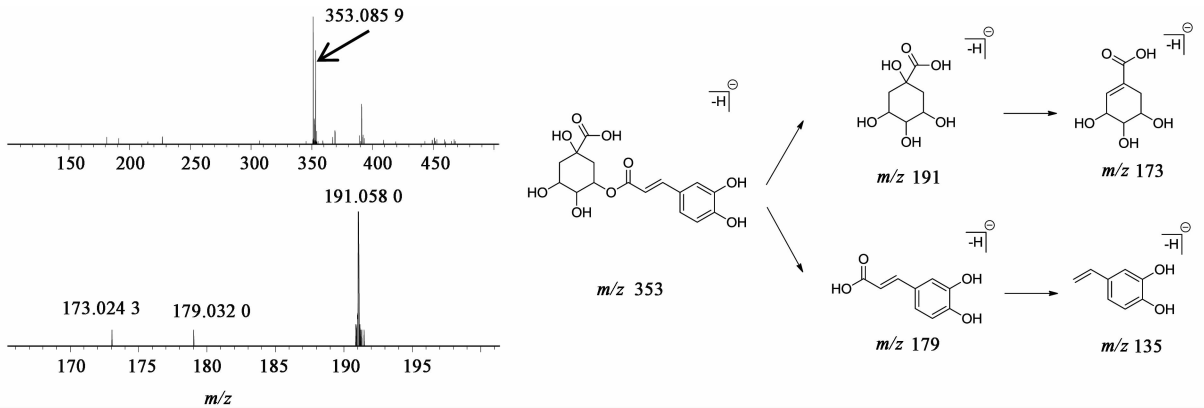


图 5 绿原酸在负离子模式下的一、二级质谱及裂解规律

Fig. 5 Mass spectra and possible fragment pathways of chlorogenic acid

$[M - H]^-$, 通过精确相对分子质量比对和数据库检索,推测该化合物应为西红花苷。质谱碎片可见脱去龙胆二糖产生的 m/z 651, 327, 进一步验证该化合物是西红花苷。峰 38 和峰 39 的一级质谱可见明显的分子离子峰 m/z 651.266 5 $[M - H]^-$ 和 m/z

675.262 5 $[M + Na]^+$, 两者为同分异构体,与西红花苷的分子离子正好相差 1 个分子龙胆二糖残基的相对分子质量 (324 Da), 推测可能为 *cis*-crocin-3/*trans*-crocin-3。根据二级质谱产生的碎片,推测西红花苷类化合物的裂解规律见图 6。

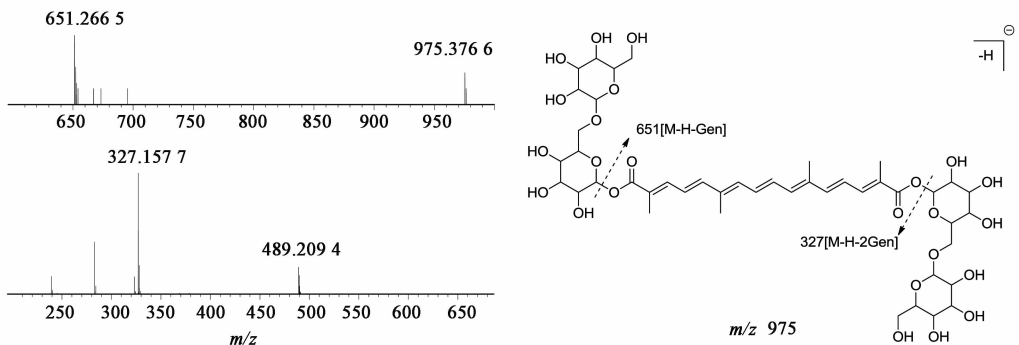
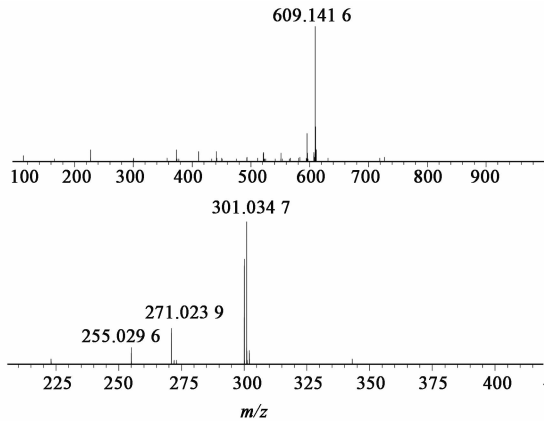


图 6 西红花苷在负离子模式下的一、二级质谱及裂解规律

Fig. 6 Mass spectra and possible fragment pathways of crocin

3.1.4 黄酮类化合物的解析示例 峰 29 的全扫描一级质谱图中可见明显的离子峰 m/z 611.161 7 $[M + H]^+$ 和 m/z 609.141 6 $[M - H]^-$, 推断该化合物的相对分子质量为 610 Da。其负离子模式下的二级扫描碎片主要有 m/z 301, 271, 255, 分子离子峰通过碰撞解离丢失芸香糖产生碎片 m/z 301, 继而丢失碳环羰基形成碎片 m/z 271, 表明该化合物可能为黄酮类, 其黄酮苷元为槲皮素, m/z 255 为槲皮素碎片丢失 A 环上 1 个分子 H_2O 后, 进一步丢失碳



环羰基形成的碎片, 见图 7, 结合文献 [18-21] 鉴定为芦丁。峰 31 的全扫描一级质谱图中可见明显的离子峰 m/z 465.105 9 $[M + H]^+$ 和 m/z 463.089 3 $[M - H]^-$, 该化合物的相对分子质量为 464 Da。负离子模式下响应较好, 分子离子峰裂解产生碎片 m/z 301, 271, 255, 与芦丁的二级碎片信息相似, 具有和芦丁相同的母核, 分子离子峰脱去葡萄糖残基产生碎片 m/z 301, 结合文献信息鉴定为金丝桃苷或异槲皮苷^[5]。

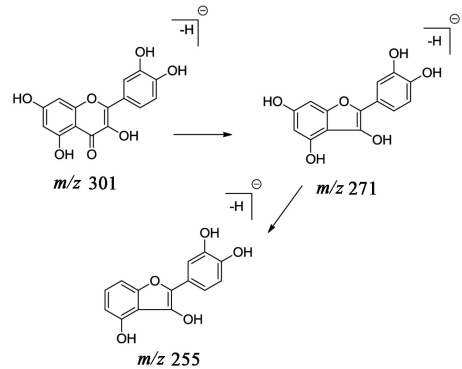


图 7 芦丁在负离子模式下一、二级质谱及裂解规律

Fig. 7 Mass spectra and possible fragment pathways of rutin

3.1.5 三萜类化合物的解析示例 通过对比对空白溶剂, 查阅文献共鉴定了 3 个三萜类化合物, 正、负离子模式下的响应均较好。峰 20 的全扫描一级质谱图中, 可见明显的离子峰 m/z 531.138 6 $[M + HCOO]^-$ 和 m/z 485.325 1 $[M - H]^-$, 通过精确相对分子质量推断其元素组成为 $C_{30}H_{46}O_5$, 符合羊毛脂甾烷型的 C_{30} 基本骨架, 结合文献鉴定为羊毛脂甾烷型四环三萜栀子花酸 B^[5,7,9]。峰 42 在一级质谱图中可见离子峰 m/z 489.355 5 $[M + H]^+$, m/z 511.358 0 $[M + Na]^+$ 和 m/z 487.340 7 $[M - H]^-$, 峰 45 可见 m/z 495.341 0 $[M + Na]^+$ 和 m/z 471.345 9 $[M - H]^-$, 推断这 2 个化合物分别为五环三萜 erubigenin 和 2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid^[5,7], 见图 8。

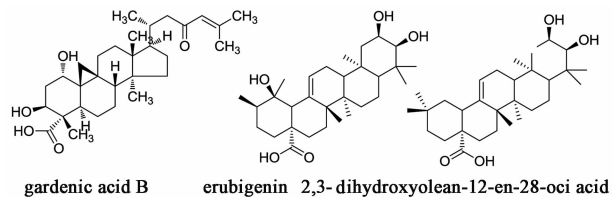


图 8 栀子花酸 B, erubigenin 和 2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid 的结构式

Fig. 8 Structural formulas of gardenic acid B, erubigenin and 2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid

3.2 栀子炒焦前后主要成分峰面积的变化 在质谱中对应色谱峰的保留时间、准分子离子峰和二级质谱碎片信息均基本相同的情况下, 每个离子峰的峰面积变化可以反映相应化合物含量的变化情况^[22-23]。可通过各炮制品相对于栀子生品的峰面积比值来分析栀子炮制前后化学成分的变化情况。选择焦栀子中具有代表性的几种活性成分进行分析^[3], 包括栀子苷、京尼平-1- β -D-龙胆双糖苷、山栀

子苷、绿原酸、京尼平苷酸、西红花苷、藏红花酸。栀子炮制品在负离子模式下主要化学成分的含量变化见表 3。

栀子苷具有镇痛、抗炎、保肝利胆、抗氧化、降糖等药理作用^[24], 但其热稳定性较差, 经炮制后栀子苷含量降低^[3,25]。邵坚等^[3]研究发现栀子苷、京尼平-1- β -D-龙胆双糖苷、去乙酰车叶草酸甲酯的含量降低, 而京尼平苷酸的含量却升高, 推测炮制可能使糖苷键发生断裂, 多种环烯醚萜苷类成分转化成京尼平苷酸。本研究通过比较离子峰面积研究了 4 种环烯醚萜成分在栀子炒制之后的含量变化情况, 结果发现炒制一定时间后栀子苷、京尼平-1- β -D-龙胆双糖苷、山栀子苷 3 个成分含量降低, 而京尼平苷酸

表 3 梔子炮制品中主要活性成分在负离子模式下与生品中的峰面积比值

Table 3 Peak area ratios of main active components in Gardeniae Fructus Praeparatus and Gardeniae Fructus under negative ion mode

化合物	焦梔子	焦梔子	焦梔子
	(30 min)- 生品	(45 min)- 生品	(60 min)- 生品
梔子苷	96.6	95.2	87.6
京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷	77.4	74.2	63.2
山梔子苷	103.2	91.4	86.3
绿原酸	74.8	56.4	45.5
京尼平苷酸	85.6	111.7	146.2
西红花苷	99.6	63.4	38.1
藏红花酸	79.9	135.0	180.8

含量显著增加,与文献报道的情况一致。另有研究发现环烯醚萜苷具有抗凝血活性,能够明显减少胶原诱导的血小板聚集,而焦梔子常作为止血药物使用,环烯醚萜苷类成分的减少可能导致炮制后其止血作用增强的原因^[3,26]。

陈雁等^[4]研究显示梔子炮制品中西红花苷的含量较生品明显降低,而藏红花酸的含量增加。而本研究结果显示 30 min 炮制品中的藏红花酸含量有所降低,45 min 和 60 min 炮制品中含量则增加,这可能是由于藏红花酸受热会发生分解,而西红花苷受热脱去糖苷又能生成藏红花酸^[4],西红花苷含量相对于藏红花酸较高,因此炮制达到一定程度后,藏红花酸含量整体呈增加趋势。王亭^[27]总结了藏红花酸对心血管系统的保护作用,能够改善心肌缺血和心肌梗死。SHENG 等^[28]和 Lee 等^[29]通过实验研究发现西红花苷和藏红花酸均能够抑制血清甘油三酯和低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平,这 2 种化合物有着显著的降血脂活性,两者通过对胰脂酶的抑制,能够减少脂肪和胆固醇的吸收,且藏红花酸对于胰脂酶的抑制作用更强。TANG 等^[30]通过给高胆固醇模型的家兔灌胃藏红花酸,发现其能够显著恢复家兔主动脉内皮的依赖性舒张,具有抗动脉粥样硬化的作用;Nam 等^[31]则通过体外试验发现藏红花酸能有效抑制肿瘤坏死因子(TNF)-α 诱导的核转录因子(NF)-κB 活性和血管细胞黏附因子(VCAM)-1 的 mRNA 以及蛋白的表达,从而起到抗动脉粥样硬化的作用。已有研究指出藏红花酸的药效活性相较于西红花苷更强,炒制后焦梔子中藏红花酸含量的增高对于心脑血管系统可能具有更好的

保护作用。

环烯醚萜苷类是梔子中主要的化合物类别,该类成分热稳定性较差,炒制过程中发生分解,可能导致原有相应药效的减弱,而藏红花酸含量的增加又可能会产生新的药效。2015 年版《中国药典》对于梔子和焦梔子的功能主治的描述完全不同,也和其相应成分改变相关,由于环烯醚萜苷类成分的减少,焦梔子的止血活性增强,对于其他方面功能的变化情况以及是否产生新的药效,还需通过后续实验研究证实。

4 讨论

本研究采用 LCMS-IT-TOF 技术对梔子和焦梔子的化学成分进行鉴别,共鉴定了梔子所含有 38 种化学成分,炒焦后未发现明显的新化合物,为了探究炒制过程对梔子化学成分的影响,采用半定量法测定了梔子苷、京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷、山梔子苷、绿原酸、京尼平苷酸、西红花苷、藏红花酸 7 种成分随炒制时间增长的变化情况。由于热不稳定成分发生改变,成分之间相互转化,导致多种成分之间的含量变化较大,从而药性强弱改变,或产生某些新的药效^[32-33]。焦梔子中环烯醚萜苷类成分的减少,导致梔子原有药效活性的减弱,但却增强了凉血止血的活性;西红花苷类成分向藏红花酸转化,增强了心血管保护作用,预示新的药效产生。

该方法能够快速准确地鉴定药材中的多种化学成分,相较于单独测定焦梔子中某几种化学成分的含量,对焦梔子整体的化学成分群有了进一步的认识;虽然本研究未在焦梔子中发现新的化合物,但是仍存在部分离子峰没有确定归属,还可通过分离纯化等手段,对于含量较低的成分进行富集,进一步明确焦梔子的药效物质基础。但炮制过程并不是单一成分发生改变,而是化学成分群整体发生改变,因此在研究焦梔子及其生品药效活性差异时,需要考虑中药整体性的特点,还可采用网络药理学等手段,更全面地探讨焦梔子的药效变化情况。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:248-249.
[2] 王恩力,董方,姚景春. 梔子苷药理学和毒理学研究进展[J]. 中国药房,2015,26(19):2730-2733.
[3] 邵坚,罗光明,朱继孝,等. 梔子炮制前后 7 种成分的比较研究[J]. 中草药,2015,46(11):1629-1633.
[4] 陈雁,杨中林,张雷红,等. HPLC-ELSD 法测定梔子不同炮制品中梔子苷、藏红花素和藏红花酸的含量

- [J]. 中药材, 2011, 34(5): 687-690.
- [5] CHEN Q C, ZHANG W Y, YOUN U, et al. Iridoid glycosides from *Gardeniae Fructus* for treatment of ankle sprain[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(6): 779-784.
- [6] HAN Y, WEN J, ZHOU T, et al. Chemical fingerprinting of *Gardenia jasminoides* Ellis by HPLC-DAD-ESI-MS combined with chemometrics methods[J]. *Food Chem*, 2015, 188: 648-657.
- [7] WANG L, LIU S, ZHANG X, et al. A strategy for identification and structural characterization of compounds from *Gardenia jasminoides* by integrating macroporous resin column chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion-mobility spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1452: 47-57.
- [8] YANG L, PENG K, ZHAO S, et al. 2-Methyl-L-erythritol glycosides from *Gardenia jasminoides* [J]. *Fitoterapia*, 2013, 89: 126-130.
- [9] 汪航, 冯芳, 王学全. 梔子大黄汤化学成分的 HPLC-PDA-ESI-MS/MS 分析[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(3): 232-237.
- [10] 乐文, 冯芳, 王娅. 梔子甘草豉汤的 LC-PDA-MS/MS 分析及抗抑郁作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(4): 342-347.
- [11] 王晓燕, 张丽, 王添琦, 等. 梔子化学成分的 UHPLC-Q-TOFMS 分析[J]. 中药材, 2013, 36(3): 407-410.
- [12] 李玲云, 王云, 刘梦娇, 等. 梔子金花丸化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定与分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 1-11.
- [13] 刘青, 曹瑞军, 赵欣, 等. 梔子水提物的 HPLC-ESI-MSⁿ 分析[J]. 中成药, 2007, 29(11): 1651-1654.
- [14] 李存满, 骆亚薇, 田宝勇. 环烯醚萜类化合物的质谱裂解规律研究进展[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2015, 39(6): 522-526.
- [15] 李存满, 梁鑫淼, 薛兴亚. 电喷雾离子源正离子模式下环烯醚萜苷的质谱裂解行为[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(3): 567-572.
- [16] 张阿琴, 李迩娜, 张仓, 等. LC-MS 分析消癌平注射液中有有机酸类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 88-90.
- [17] 于金英, 王云红, 刘国强, 等. LC-ESI-MS/MS 鉴定荜茇中芥子油苷及有机酸类成分[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(1): 67-72.
- [18] 于澎, 张虹. HPLC-ESI-MS 法同时测定虎杖提取物中的 17 种成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(12): 963-968.
- [19] 田丰, 陈婷, 王晔尘, 等. HPLC-ESI-TOF-MS 法快速分离与鉴别益母草药材中的多种化学成分[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(4): 86-89.
- [20] 陈向阳, 张乐, 吴莹, 等. LCMS-IT-TOF 法快速分析薄荷黄酮部位的主要化学成分[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 546-550.
- [21] 张忠立, 左月明, 杨雅琴, 等. 梔子中的黄酮类化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 79-81.
- [22] 潘凌云, 徐敏, 王亿, 等. UPLC-ESI-MS/MS 法分析藤黄炮制前后化学成分的变化[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1098-1103.
- [23] 颜晓静, 郑博文, 张毅达, 等. UPLC-Q-TOF/MS 分析孟河医派特色猪心血丹参炮制前后化学成分的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 109-116.
- [24] 王恩力, 董方, 姚景春. 梔子苷药理学和毒理学研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(19): 2730-2733.
- [25] 吴婷, 鄢连和, 朱美晓. 梔子的炮制沿革及炮制品现代研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(6): 1011-1014.
- [26] WANG P, WANG Q, LUO C, et al. Iridoid glycosides extracted from *Zhizi* (*Fructus Gardeniae*) decrease collagen-induced platelet aggregation and reduce carotid artery thrombosis in an *in vivo* rat model[J]. *J Tradit Chin Med (Engl Ed)*, 2013, 33(4): 531-534.
- [27] 王亭. 中药梔子有效成分及药理作用的研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1782-1784.
- [28] SHENG L, QIAN Z, ZHENG S, et al. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: crocin inhibits pancreatic lipase [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 543 (1/3): 116-122.
- [29] Lee I A, Lee J H, Baek N I, et al. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(11): 2106-2110.
- [30] TANG F T, QIAN Z Y, LIU P Q, et al. Crocetin improves endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta in hypercholesterolemic rabbit by increasing eNOS activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(5): 558-565.
- [31] Nam K N, Choi Y S, Jung H J, et al. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(4): 493-499.
- [32] 黄滔, 穆淑珍, 郝小江. 梔子化学成分研究[J]. 中药材, 2012, 35(12): 1950-1952.
- [33] 马丽. 浅论焦梔子的药理作用及用其治疗血证的效果[J]. 当代医药论丛, 2016, 14(9): 21-22.

[责任编辑 刘德文]