

· 论著 ·

## 用 LC-MS/MS 法同时测定栀子中 3 种环烯醚萜苷类成分的含量

常瑞蕊<sup>1,2</sup>, 陈卫东<sup>1</sup>, 周婷婷<sup>2</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 233000; 2. 海军军医大学药学院药物分析教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 建立同时测定栀子中 3 种环烯醚萜苷类成分含量的方法。方法 采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法。色谱条件: Dikma Diamonsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub>柱(100 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 乙酸水(A)-0.1% 乙酸乙腈(B), 梯度洗脱; 流速为 0.4 ml/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μl。质谱条件: 电喷雾离子化电离源(ESI), 正/负离子检测, 雾化气流量 3 L/min, 干燥气流量 15 L/min, 脱溶剂管温度 240 °C, 加热块温度 400 °C, 碰撞气压力 230 kPa, 以多反应监测模式(MRM)配对离子方式进行定量, 山栀苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷选择的离子对质荷比分别为  $m/z$  391.10→149.30,  $m/z$  573.40→365.05,  $m/z$  447.30→225.15。结果 回归方程为: 山栀苷  $Y=243.810X-289.957, r=0.9999$ ; 京尼平龙胆双糖苷  $Y=137.125X+2092.76, r=0.9996$ ; 栀子苷  $Y=2030.32X+823213, r=0.9998$ ; 线性范围分别为 10.76~2152 ng/ml、516~4128 ng/ml、2000~20000 ng/ml。精密度、稳定性、重复性和加样回收率试验结果均符合要求。结论 此方法可快速、准确、灵敏地测定栀子中 3 种环烯醚萜苷类成分的含量, 为栀子的质量控制提供依据。

**[关键词]** 栀子; 山栀苷; 京尼平龙胆双糖苷; 栀子苷; 液相色谱-串联质谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0019-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.005

## A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous assay of three iridoids in *Gardenia jasminoides* Ellis

CHANG Ruirui<sup>1,2</sup>, CHEN Weidong<sup>1</sup>, ZHOU Tingting<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 233000, China. 2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a simple, rapid and sensitive method for the determination of major compounds from *Gardenia jasminoides* Ellis using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The analysis was performed on Dikma Diamonsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (100 mm×4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% acetic acid and 0.1% acetic acid-water as mobile phase at a rate of 0.4 ml/min. The column temperature was set at 40 °C and the injection volume was 2 μl. Quantification of these compounds was performed by LC-MS/MS with positive or negative ion mode electrospray ionization (ESI) in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Nebulizer gas, 3 L/h; drying gas, 15 L/h; desolvation line (DL) temperature, 240 °C; heat block temperature, 300 °C; CID, 230 kPa. The mass transition of the precursor/product ions was monitored at  $m/z$  391.10→149.30 for shanzhiside, 573.40→365.05 for genipin-1-gentiobioside, 447.30→225.15 for geniposide. **Results** The regress equation of shanzhiside, genipin-1-gentiobioside and geniposide were  $Y=243.810X-289.957, r=0.9999$ ;  $Y=137.125X+2092.76, r=0.9996$ ;  $Y=2030.32X+823213, r=0.9998$  in the range of 10.76-215.2 ng/ml; 516-4128 ng/ml; 2000-20000 ng/ml respectively. This validated method has good repeatability, precision, recovery and stability. The results meet the requirements by regulation. **Conclusion** This method shortened the analysis time and improved efficiency. It assayed the three iridoid glycosides in *Gardenia jasminoides* Ellis sensitively and precisely. This method can be used for the quality control of *Gardenia jasminoides* Ellis.

**[Key words]** *Gardenia jasminoides* Ellis; shanzhiside; genipin-1-gentiobioside; geniposide; LC-MS/MS

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81573584, 81773862)

**[作者简介]** 常瑞蕊, 硕士研究生, Tel: 15900996429, Email: gige224@163.com

**[通讯作者]** 陈卫东, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药代动力学、临床药学、药剂学、医院药学, Tel: (0551) 68129180, Email: wdchen@ahcm.edu.cn; 周婷婷, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药药效物质基础与体内代谢, Tel: (021) 81871262, Email: tingting\_zoo@163.com

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、凉血解毒以及消肿止痛的功效<sup>[1]</sup>, 临床上常用于糖尿病、抑郁症、高脂血症、炎症及绝经后综合征<sup>[2-4]</sup>。栀子中主要含有环烯醚萜苷类、有机酸酯、黄酮类以及二萜色素等成分<sup>[5]</sup>。其中, 环烯醚萜苷类化合物为主要成分, 该类成分具有利胆、保肝、抗炎、抗氧化、

抗肿瘤等多种药理活性<sup>[6]</sup>。

目前, 梔子的质量控制多采用高效液相色谱法<sup>[7]</sup>、超高效液相色谱法<sup>[8]</sup>或者高效薄层色谱法<sup>[9]</sup>等对梔子苷、京尼平龙胆双糖苷、山梔苷等环烯醚萜苷类成分进行定量分析, 但是上述方法均存在分析时间长、灵敏度和分辨率低等缺点。液质联用(LC-MS)是一种液相色谱与质谱串联的技术, 其将液相的高分离效能与质谱的强结构测定功能相结合<sup>[10]</sup>, 其中, 串联质谱(MS/MS)具有更高的灵敏度和更强的选择性。因此, 本研究采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法同时测定梔子中 3 种环烯醚萜苷类成分: 山梔苷、梔子苷、京尼平龙胆双糖苷的含量, 不仅能缩短分析时间、提高分析效率, 而且利用质谱的高分辨率和高灵敏度, 对梔子中含量较少的山梔苷进行准确定量, 为梔子质量控制提供更全面的依据。

## 1 仪器与试剂

Shinmadzu 8040 岛津液相色谱-串联质谱仪(日本岛津公司), 包括两台 LC-30A 色谱泵, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器和一台 8040 三重四级杆质谱仪; CR3i 高速冷冻离心机(美国赛默飞公司); XS205 精密天平(梅特勒-托利多国际有限公司)。

梔子药材(上海童涵春堂中药饮片有限公司, 产地: 江西)。对照标准品山梔苷(批号: 17090822, 上海同田生物技术股份有限公司), 京尼平龙胆双糖苷(批号: M0502AS, 大连美仑生物技术有限公司), 梔子苷(批号: G1910050, 上海安谱实验科技股份有限公司, 纯度 $\geq 98\%$ ); 色谱纯乙腈(美国 Honeywell 公司), 乙酸(美国 Tedia 公司); 超纯水通过 Milli-Q 系统在实验室自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Dikma Diamonsil<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 0.1% 乙酸水(A)-0.1% 乙酸乙腈(B)。梯度洗脱程序: 0~1 min, 22%~35% B; 1~4 min, 35% B; 4~5 min, 35%~22% B。流速 0.4 ml/min, 柱温 40 °C, 进样体积 2 μl, 分析时间 5 min。结果见图 1。

### 2.2 质谱条件

离子源为电喷雾电离源(ESI), 正/负离子检测, 扫描方式为多重反应监测模式(MRM)。正离子检测模式下, 京尼平龙胆双糖苷  $m/z$  573.40→365.05, 碰撞电压: -34 eV; 负离子检测模式下, 山

梔苷  $m/z$  391.10→149.30, 碰撞电压: 28 eV; 梔子苷  $m/z$  447.30→225.15, 碰撞电压: 14 eV。雾化气流量 3 L/min, 干燥气流量 15 L/min, 脱溶剂管温度 240 °C, 加热块温度 400 °C, 碰撞气压力 230 kPa。结果见图 2。

### 2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取山梔苷 5.38 mg、京尼平龙胆双糖苷 5.16 mg、梔子苷 2.50 mg, 用初始流动相定容至 5 ml 容量瓶中, 摇匀, 分别得到浓度为 1.08、1.03 和 0.50 mg/ml 的混合对照品溶液。

### 2.4 供试品溶液的制备

精密称取梔子药材粉末 0.5 g, 用 50% 乙腈定容至 10 ml 容量瓶中, 摇匀, 将粗提物以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 精密吸取续滤液 100 μl, 用 50% 乙腈定容至 100 ml 容量瓶中, 得梔子供试品溶液, 备用。

### 2.5 标准曲线的绘制

精密吸取“2.3”项下混和对照品溶液, 分别逐级稀释, 按照“2.1”、“2.2”项下条件, 进样 2 μl, 记录各对照品的浓度。以各对照品的质量浓度(X, ng/ml)为横坐标, 峰面积值(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 得标准曲线方程, 山梔苷:  $Y = 243.810X - 289.957$ ,  $r = 0.9999$ , 线性范围 10.76~215.2 ng/ml; 京尼平龙胆双糖苷:  $Y = 137.125X + 2092.76$ ,  $r = 0.9996$ , 线性范围 516~4128 ng/ml; 梔子苷:  $Y = 2030.32X + 823213$ ,  $r = 0.9998$ , 线性范围 2000~20000 ng/ml。以上结果表明, 山梔苷、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷在相应的浓度范围内线性关系良好。

### 2.6 精密度试验

精密吸取山梔苷、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷浓度分别为 53.8、2064、10000 ng/ml 的混合对照品溶液。按“2.1”、“2.2”项下条件, 于同一天重复进样 6 次, 记录峰面积。结果显示山梔苷、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷峰面积的 RSD 分别为 1.33%、0.93% 和 1.06%, 表明该方法精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取供试品溶液(编号: 20180627), 于室温下分别放置 0、2、4、6、8 h 后, 按“2.1”、“2.2”项下条件进样分析, 记录峰面积, 结果显示, 山梔苷、京尼平龙胆双糖苷、梔子苷峰面积的 RSD 分别为 1.74%、1.09% 和 0.59%, 表明供试品溶液在室温条件下稳定。

### 2.8 重复性试验

分别精密称取同一批药材粉末 0.5 g(编号: 20180627, 山梔苷、京尼平龙胆双糖苷和梔子苷的含量分别为 0.06%、3.76%、12.45%), 按“2.4”项下

处理后,按照“2.1”、“2.2”项下条件测定,记录峰面积,平行实验5次,结果显示,山栀苷、京尼平龙胆双糖苷、栀子苷峰面积的RSD依次为1.36%、1.44%、1.88%,表明该方法重复性良好。

### 2.9 加样回收率试验

精密称取6份已知含量的栀子药材粉末0.5g(编号:20180627),按“2.4”项下处理后,按各成分在原药材中的含量,分别精密加入相同含量和浓度的混合对照品溶液,按“2.1”、“2.2”项下条件进行分析,测定回收率。结果见表1。

### 2.10 样品含量测定

分别称取3批不同批次的栀子样品粉末,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”、“2.2”项下条件测定,每份溶液进样3次,计算山栀苷、京尼平龙胆双糖苷和栀子苷的含量。结果见表2。

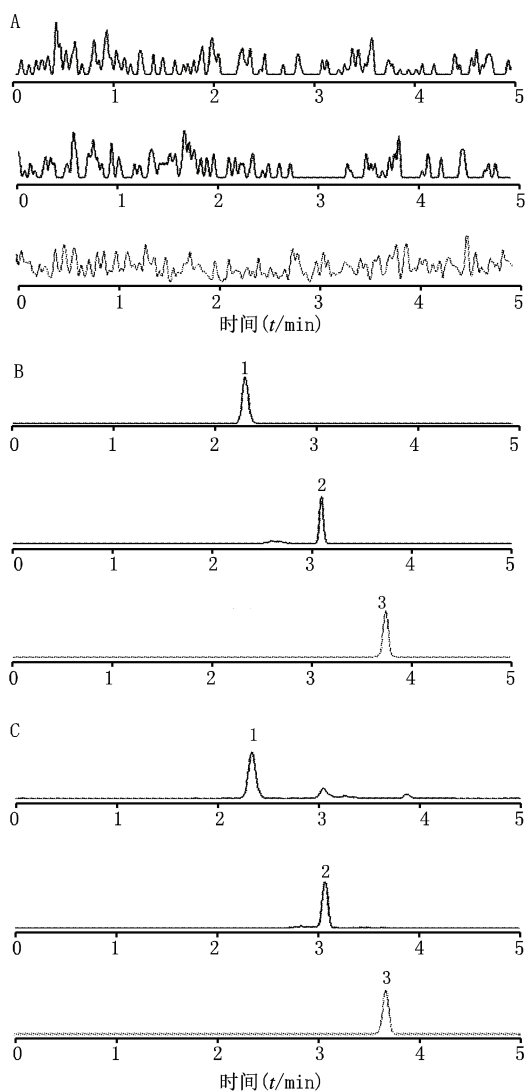


图1 3种待测物的MRM色谱图

A. 空白乙腈溶剂;B. 3种待测物混合对照品;C. 栀子粉末样品  
1. 山栀苷;2. 京尼平龙胆双糖苷;3. 栀子苷

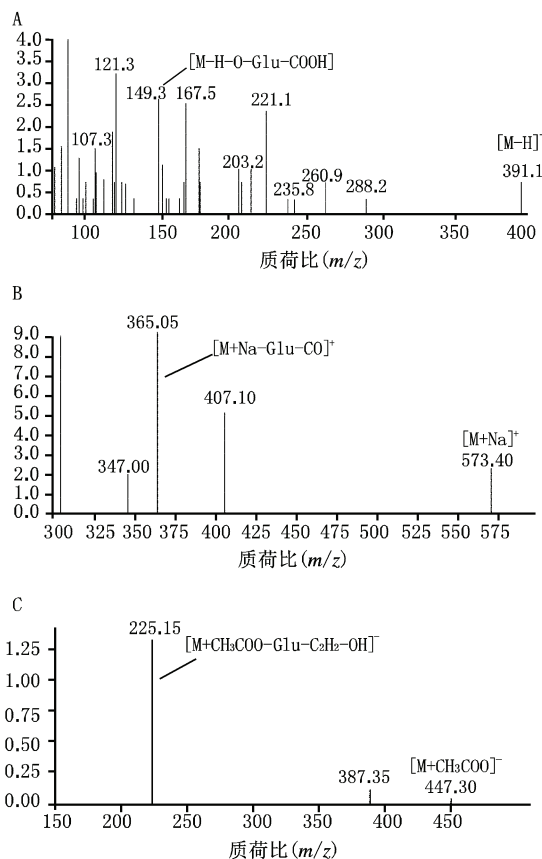


图2 3种待测物的产物离子质谱图

A. 山栀苷;B. 京尼平龙胆双糖苷;C. 栀子苷

表1 栀子提取物中3种环烯醚萜苷类成分加样回收率试验结果(n=6)

化合物	样品量 (m/g)	原有量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
山栀苷	0.500 9	0.36	0.40	0.78	103.73	1.77
	0.500 4	0.37	0.40	0.76		
	0.500 2	0.38	0.40	0.77		
	0.500 5	0.40	0.40	0.81		
	0.500 0	0.39	0.40	0.79		
	0.500 4	0.42	0.40	0.82		
京尼平龙胆双糖苷	0.500 9	20.86	20.00	42.18	102.02	1.40
	0.500 4	21.75	20.00	42.07		
	0.500 2	19.70	20.00	39.99		
	0.500 5	20.07	20.00	41.81		
栀子苷	0.5000	21.79	20.00	41.03		
	0.500 4	22.22	20.00	40.88		
	0.500 9	69.14	65.00	135.80	102.96	1.05
	0.500 4	65.85	65.00	134.52		
	0.500 2	66.79	65.00	134.73		
栀子苷	0.500 5	65.74	65.00	135.91		
	0.500 0	65.69	65.00	133.68		
	0.500 9	67.23	65.00	134.56		

表 2 不同批次栀子中 3 种环烯醚萜苷类成分的含量  
(mg/g,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

编号	山栀苷	京尼平龙胆双糖苷	栀子苷
20170910	0.566±0.050	35.566±0.770	139.468±1.567
20180329	0.748±0.039	41.867±3.041	144.139±1.972
20180627	0.643±0.015	37.638±0.643	124.536±0.687

### 3 讨论

#### 3.1 检测离子的选择

目前,在国内外关于环烯醚萜苷类成分的质谱检测条件的报道中,一级质谱多以负离子模式下的  $[M-H]^-$  为主<sup>[11-12]</sup>。由于不同仪器的响应和灵敏度不同,本实验采用负离子模式对山栀苷和栀子苷进行检测,采用正离子模式对京尼平龙胆双糖苷进行检测。对于一级质谱碎片离子的选择,山栀苷为  $[M-H]^-$ ,栀子苷为  $[M+CH_3COO]^-$ ,京尼平龙胆双糖苷为  $[M+Na]^+$ 。在二级质谱中,山栀苷的碎片离子选择  $[M-H-O-Glu-COOH]^-$ ,栀子苷的碎片离子选择  $[M+CH_3COO-Glu-C_2H_2-OH]^-$ ,京尼平龙胆双糖苷的碎片离子选择  $[M+Na-Glu-CO]^+$ 。先前报道表明环烯醚萜苷类成分在二级质谱中糖基易断裂<sup>[13-14]</sup>,本实验结果与报道相符。

#### 3.2 色谱条件的选择

本实验分别考察了乙腈和甲醇作为流动相中的有机相,发现乙腈作为有机相时,色谱分离效果更好,质谱响应强度更高,为了增强响应值、缩短分离时间,选择乙腈作为流动相中的有机相。同时本实验比较了流动相中添加 0.1%甲酸和 0.1%乙酸对离子化响应度和分离效果的影响,结果发现流动相中添加 0.1%乙酸的离子化响应度以及分离效果更好,故选择 0.1%乙酸水-0.1%乙酸乙腈作为流动相。

本实验对 LC-MS/MS 测定栀子中 3 种环烯醚萜苷类成分的方法进行了验证。结果表明,该方法具有较宽的线性范围,并且 3 种物质在此范围内具有良好的线性关系和相关系数( $r>0.999$ );与此同时,精密度、稳定性、重复性和回收率的 RSD 均  $< 2\%$ ,符合分析方法的要求。以上方法学考察数据显示,本实验建立的方法灵敏可靠,可用于测定栀子中 3 种环烯醚萜苷类成分的含量。

#### 【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.

- [2] LIU H, CHEN Y F, LI F, et al. *Fructus Gardenia* (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) phytochemistry, pharmacology of cardiovascular, and safety with the perspective of new drugs development[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(1): 94-110.
- [3] XING H, ZHANG K, ZHANG R, et al. Antidepressant-like effect of the water extract of the fixed combination of *Gardenia jasminoides*, *Citrus aurantium* and *Magnolia officinalis* in a rat model of chronic unpredictable mild stress[J]. *Phyto-medicine*, 2015, 22(13): 1178-1185.
- [4] WANG X, WANG G C, RONG J, et al. Identification of steroidogenic components derived from *Gardenia jasminoides* Ellis potentially useful for treating postmenopausal syndrome[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 390.
- [5] 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.
- [6] 郭建华, 田成旺, 刘晓, 等. 中药环烯醚萜类化合物研究进展[J]. *药物评价研究*, 2011, 34(4): 293-297.
- [7] 刘武占, 范建伟, 高艳红, 等. HPLC 同时测定栀子中 8 个环烯醚萜苷类成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(16): 2417-2421.
- [8] 关皎, 朱鹤云, 李菁, 等. UFLC 法同时测定栀子中 4 种活性成分的含量[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 2(28): 219-222.
- [9] CORAN S A, MULAS S, VASCONI A. Profiling of components and validated determination of iridoids in *Gardenia jasminoides* Ellis fruit by a high-performance-thin-layer-chromatography/mass spectrometry approach[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1325(2): 221-226.
- [10] 霍江燕, 梁生旺. 中药复方 LC-MS 技术研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(24): 60-62.
- [11] JIANG P, MA Y, GAO Y, et al. A comprehensive evaluation of the metabolism of genipin-1- $\beta$ -D-gentiobioside *in vitro* and *in vivo* by using HPLC-Q-TOF[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(27): 5490-5498.
- [12] 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.
- [13] 张建华, 许月明, 何玉琼, 等. 巴戟天环烯醚萜苷类成分含量测定和提取方法的研究[J]. *药 学 实 践 杂 志*, 2017, 35(4): 328-333.
- [14] WU H, LI X, YAN X, et al. An untargeted metabolomics-driven approach based on LC-TOF/MS and LC-MS/MS for the screening of xenobiotics and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 115: 315-322.

【收稿日期】 2018-10-17 【修回日期】 2018-11-23

【本文编辑】 李睿曼