

高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定绿原酸及其相关杂质

田晨煦¹, 徐小平¹, 廖丽云², 张洁¹, 刘静¹, 周莎¹

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 成都医学院, 四川 成都 610083)

摘要: 建立了高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)分离和鉴定绿原酸及其相关杂质的方法。采用 C18 色谱柱(5 μm Φ . 6 mm \times 150 mm), 乙腈-水(含 0.1% 甲酸)(体积比为 8:92)为流动相, 经 HPLC-MS/MS 和 HPLC-二极管阵列检测器在线检测, 对工业绿原酸中的奎尼酸、咖啡酸、绿原酸同分异构体等 8 个相关杂质的结构进行了鉴定。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 绿原酸; 相关杂质; 鉴别

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)04-0496-05 栏目类别: 研究论文

Separation and Identification of Chlorogenic Acid and Related Impurities by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

TIAN Chenxu¹, XU Xiaoping¹, LIAO Liyun², ZHANG Jie¹, LIU Jing¹, ZHOU Sha¹

(1. West China Pharmaceutical School of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

Abstract: A method using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was established for analysis and identification of chlorogenic acid along with its related impurities. A Gemini C18 HPLC column (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water (containing 0.1% formic acid) (8:92, v/v) as mobile phase. Eight related impurities of chlorogenic acid were identified and their structures were determined by using on-line HPLC-MS/MS and photodiode array detector (DAD). The method is quick, simple and can be used directly to identify the structure of unknown trace substances in the sample of chlorogenic acid.

Key words: high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (HPLC-MS/MS); chlorogenic acid; related impurities; identification

绿原酸(chlorogenic acid), 又名 3-O-咖啡酰奎宁酸(3-O-caffeoylquinic acid), 是广泛存在于植物中的一种多酚类化合物, 其中在忍冬类、杜仲、咖啡等植物中的含量较高。绿原酸具有较强的抗变态反应^[1]、调节体内血糖^[2]、清除氧自由基^[3]及抗癌抗 HIV^[4,5]等作用, 由于其疗效显著、毒副作用小而引起广泛研究^[6-8]。绿原酸源自于植物提取, 由于其结构不稳定, 因此极易在生产和贮运过程中引入相关杂质。为保证药物的安全有效和质量可控, 相关杂质的研究已成为目前新药质量研究的重要环节, 因此, 对绿原酸中相关杂质进行研究十分必要。由于相关杂质的含量小, 直接制备单体鉴定难度比较大, 故选择专属性强、灵敏度高的高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)联用技术对相关杂质

在线分离鉴定。

目前关于绿原酸的研究多为植物中有效成分的提取分离^[9,10]、含量测定^[11-14]以及药理作用等^[15,16], 共存物的研究也有少量报道^[17-20], 对于工业化生产的单体绿原酸(含量 \geq 99%)中相关杂质的研究尚未见报道。本文利用 HPLC-MS/MS 联用技术对单体绿原酸中的相关杂质进行了研究, 通过二极管阵列检测器(DAD)获得的紫外光谱(UV谱)和多级质谱鉴定了其中奎尼酸、咖啡酸、绿原酸同分异构体等 8 种主要杂质。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Hewlett-Packard HPLC system(美国惠普仪器

公司)配二极管阵列检测器;Finnigan LCQ^{DECA}质谱仪(英国菲立根仪器公司)。

绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所)、咖啡酸(caffeic acid)、喹宁酸(quinic acid)、乙腈购于Sigma Chemical(美国)。其他化学试剂皆为分析纯,实验用水为超纯水,临用前经0.45 μm微孔滤膜滤过。单体绿原酸样品(含量为99.85%)由四川九章生物化工科技发展有限公司提供。

1.2 溶液制备

供试液:称取绿原酸样品适量,用流动相溶解,配成1 g/L溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

酸性氧化供试液:取1 g/L绿原酸溶液1 mL,加30%过氧化氢溶液2 mL、0.01 mol/L盐酸溶液0.1 mL,于60℃水浴中加热4 h,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

碱性氧化供试液:取1 g/L绿原酸溶液1 mL,加30%过氧化氢溶液2 mL、0.01 mol/L氢氧化钠溶液0.1 mL,于60℃水浴中加热3 h,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

1.3 色谱条件

色谱柱:Gemini C18(5 μm,4.6 mm×150 mm);流动相:乙腈-水(含0.1%甲酸)(体积比为8:92);流速:1.0 mL/min;柱温:40℃;DAD扫描范围:190~800 nm。

1.4 质谱条件

电喷雾离子化源(ESI),70 eV,ESI喷口电压5 000 V,负离子检测模式;鞘气(N₂)流速:50流量单位;辅助气流速:10流量单位;毛细管温度:300℃;毛细管电压:15 V;扫描范围: m/z 50~600。

2 结果与讨论

2.1 LC-MS/MS和LC-DAD分析结果

取上述各供试液10 μL进样HPLC-MS/MS系统(该系统并联有DAD检测器),按照上述分析条件分离测定,分别采集分离组分的质谱图和紫外光谱图,记录相关数据。经测定,绿原酸及其相关杂质的HPLC-DAD图见图1。根据鉴定结果对各相关杂质按相对保留时间排序,结果见表1。

2.2 色谱组分的鉴定

经各组分DAD检出的紫外光谱初步分析,3、4、5和6号峰相应的紫外光谱均与绿原酸的紫外光谱一致,具有明显的光谱特征,表明这些物质具有类似的共轭结构。除1号色谱峰外,各色谱峰的紫外光谱中均存在242、280和324 nm的特征峰。因此,它们的主体结构应该与咖啡酸类似,主要的差异在于取代基不同。各色谱峰的负离子全扫描一级质

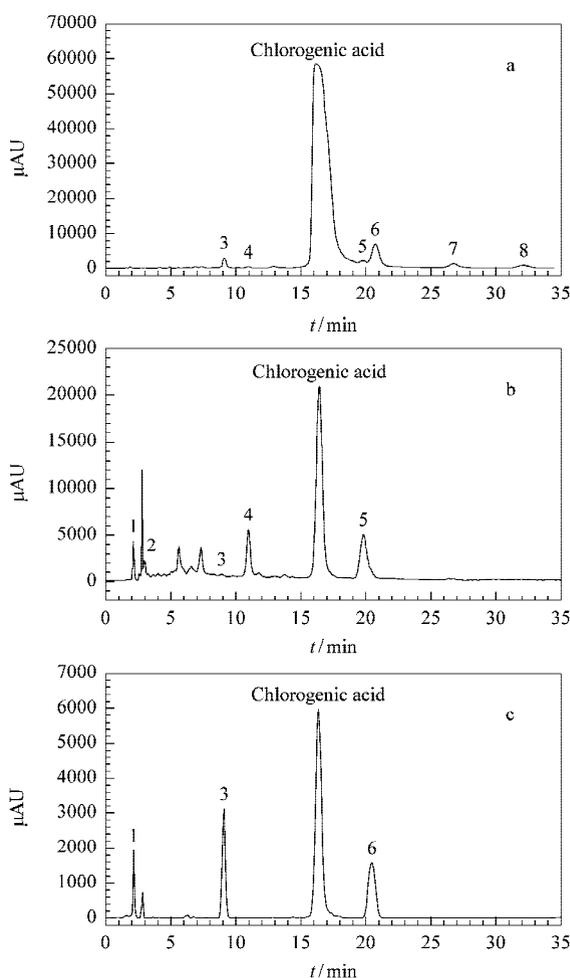


图1 绿原酸样品的HPLC-DAD图

Fig. 1 HPLC-DAD chromatograms of chlorogenic acid a. sample of chlorogenic acid; b. oxidized sample in acidic solution; c. oxidized sample in alkaline solution.

For peak identification, see Table 1.

表1 绿原酸样品中的相关杂质

Table 1 Related impurities in chlorogenic acid sample

Peak No. in Fig. 1	t_R /min	t_R'	$[M-H]^-$ (m/z)	Identification
1	2.12	0.13	191	quinic acid
2	2.93	0.18	387	7,8-hydroxide of chlorogenic acid
3	9.09	0.56	353	neochlorogenic acid
4	11.00	0.67	163	caffeic aldehyde
5	19.87	1.21	135	<i>p</i> -vinyl brezcatechin
6	20.72	1.28	179	caffeic acid
7	26.71	1.66	353	cryptochlorogenic acid
8	32.06	1.99	337	3-cumaroylquinic acid

t_R' : relative retention time to chlorogenic acid.

谱中的主要离子为 $[M-H]^-$,根据紫外图谱和 $[M-H]^-$ 的 m/z 的差异、色谱保留时间以及二级质谱的特征离子等信息,参考文献[17-20]进行化学成分的鉴别。

图1-a,b,c中的最大峰为绿原酸,其MS谱中 $[M-H]^-$ 的 m/z 为353,MS²谱中丰度较大的离子为 m/z 191,179,135,其裂解过程见图2。

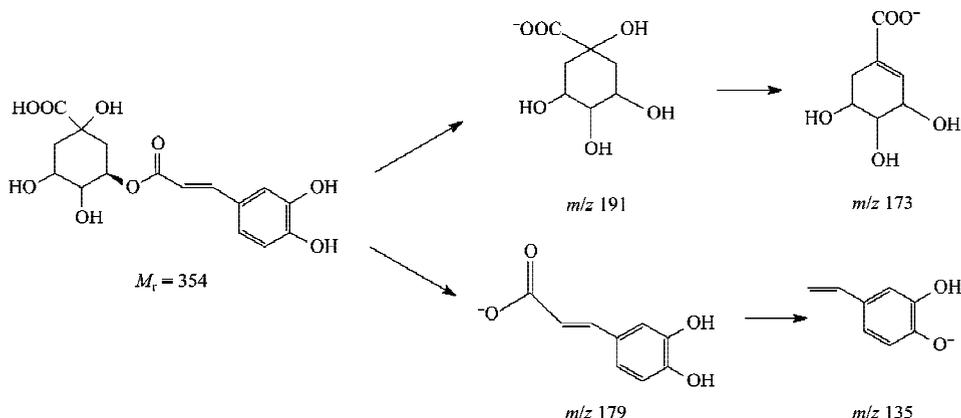


图 2 绿原酸的裂解过程

Fig. 2 Fragmentation pathways of chlorogenic acid

1 号峰($t_R' = 0.13$)的 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 191, 奎尼酸的相对分子质量为 192; 1 号峰的 UV 最大吸收波长为 234 nm, 与奎尼酸对照品的紫外图谱完全一致, 因此可确定 1 号峰为奎尼酸。其 MS 谱图见图 3。

2 号峰($t_R' = 0.18$)的 UV 最大吸收波长为 234 和 280 nm, 与绿原酸相比缺少了 324 nm 处的特征峰, 推测该物质的共轭结构比绿原酸短; 由于其 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 比绿原酸大 34, 推断其可能为绿原酸双键羟基化的产物; 2 号峰的 MS 谱中丰度较大的离子为 m/z 387 ($[M - H]^-$), 369, 335, 247, 191, 173, 151 和 137, 可能的裂解过程见图 4。

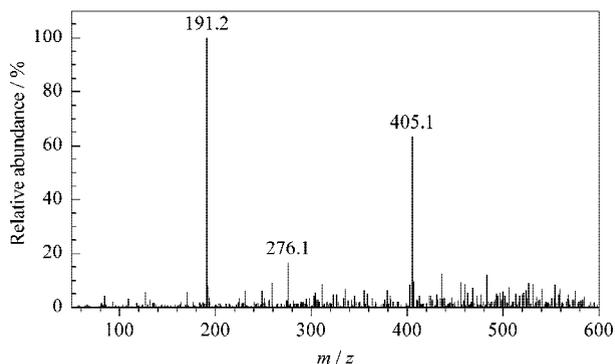


图 3 奎尼酸的 MS 图

Fig. 3 MS spectrum of quinic acid

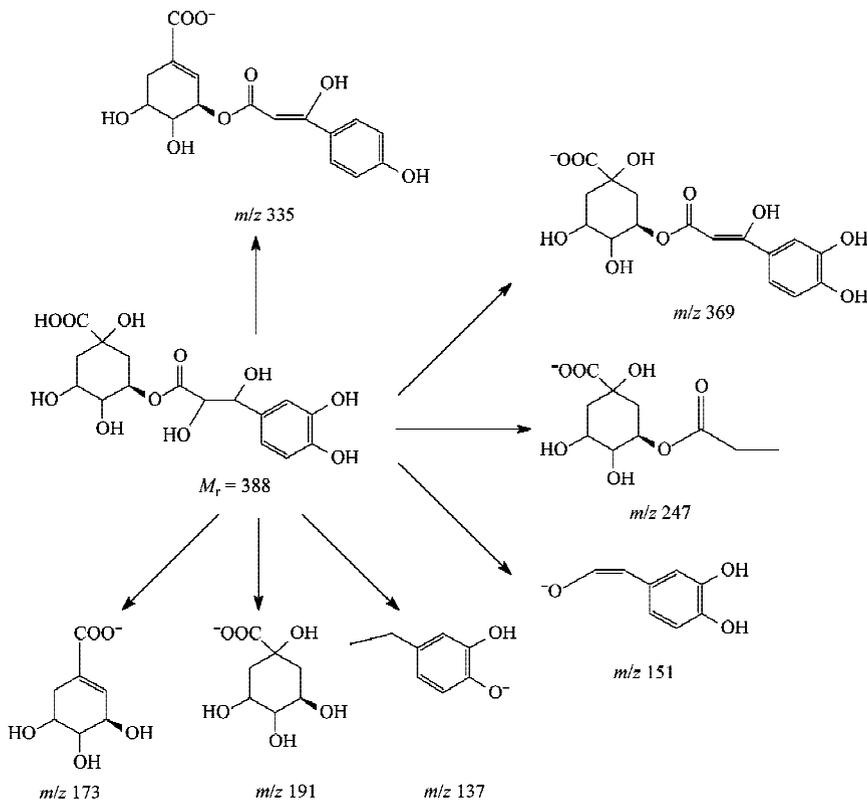


图 4 双键羟基化绿原酸的裂解过程

Fig. 4 Fragmentation pathways of the 7,8-hydroxide of chlorogenic acid

3 号峰($t_{R'} = 0.55$)的 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 353 $[M - H]^-$ 离子的 MS^2 谱中丰度较大的离子为 m/z 191, 179 和 135。UV 谱与 MS 谱均与绿原酸一致,最大吸收波长为 324 和 242 nm, 290 nm 左右有一肩峰。奎尼酸的 3-位与 5-位为对称位置,因此 3-位与 5-位异构体的 UV 谱应一致。推断该组分为奎尼酸 5-位结合咖啡酰,应为绿原酸的同分异构体新绿原酸,结构式见图 5,MS 裂解过程同图 2。

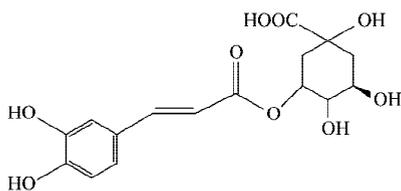


图 5 新绿原酸的结构式

Fig. 5 Structure of neochlorogenic acid

4 号峰($t_{R'} = 0.67$)的 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 163, UV 谱中最大吸收峰为 234, 278 和 310 nm, 与咖啡酸的 UV 谱略有差异, MS 谱的主要碎片有 m/z 137, 103, 推断为咖啡酸的还原产物咖啡醛。MS 裂解过程见图 6。

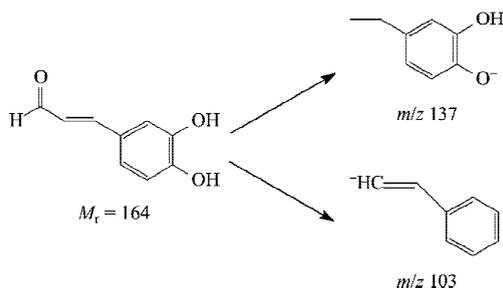


图 6 咖啡醛的裂解图

Fig. 6 Fragmentation pathways of caffeic aldehyde

5 号峰($t_{R'} = 1.21$)的 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 135, MS^2 谱与咖啡酸相同,相对分子质量比咖啡酸小 44。UV 最大吸收波长为 240 和 322 nm, 295 nm 处有肩峰,与咖啡酸类似。推测其为咖啡酸的脱羧产物对乙烯基邻苯二酚。MS 裂解过程见图 7。

6 号峰($t_{R'} = 1.28$)的 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 179, 一级和二级质谱均与咖啡酸相同, UV 最大吸收波长为 242 和 326 nm, 295 nm 处有肩峰,且与咖啡酸对照品的 HPLC 保留时间一致,故可确定其为咖啡酸。其 MS 裂解过程见图 8。

7 号峰($t_{R'} = 1.66$)的 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 353, 一级和二级质谱均与绿原酸一致,推测其为绿原酸的同分异构体, UV 谱与绿原酸有差异,最大吸收波长为 316 和 242 nm。结合 3 号峰的解析,推断为奎尼酸 4-位结合咖啡酰的异构体隐绿原酸,结构式见图 9, MS 裂解过程同图 2。

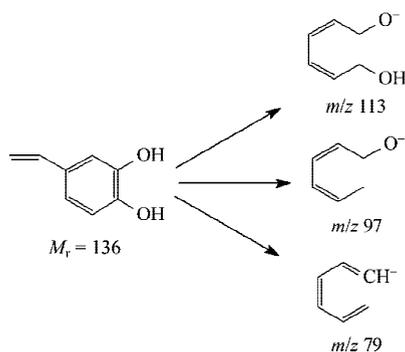


图 7 对乙烯基邻苯二酚的裂解过程

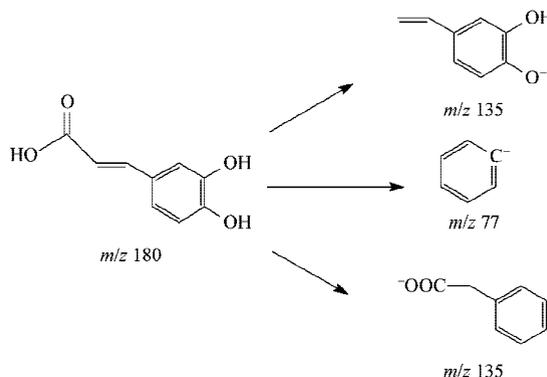
Fig. 7 Fragmentation pathways of *p*-vinyl benzocatechin

图 8 咖啡酸的裂解过程

Fig. 8 Fragmentation pathways of caffeic acid

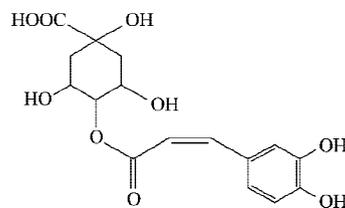


图 9 隐绿原酸的结构式

Fig. 9 Structure of cryptochlorogenic acid

8 号峰($t_{R'} = 1.99$)的 UV 最大吸收波长为 234 和 312 nm。 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 337, 比绿原酸小 16, 二级质谱中丰度较大的离子为 m/z 191 离子, 表明奎尼酸的结构完整, 在咖啡酰的苯环上一个酚羟基被还原, 为 3-香豆酰奎尼酸。其 MS 裂解过程见图 10。

2.3 讨论

(1) 由于单体绿原酸样品中相关杂质的含量较低, 实验通过光照、氧化、高温、强酸、强碱等手段使其产生更多的杂质, 色谱分离结果表明绿原酸主成分均能与降解产物完全分离, 降解产物大致相同, 不同反应条件所得杂质以某种降解产物为主, 因此, 选取降解产物较多的酸碱氧化的绿原酸溶液为代表进行鉴别。

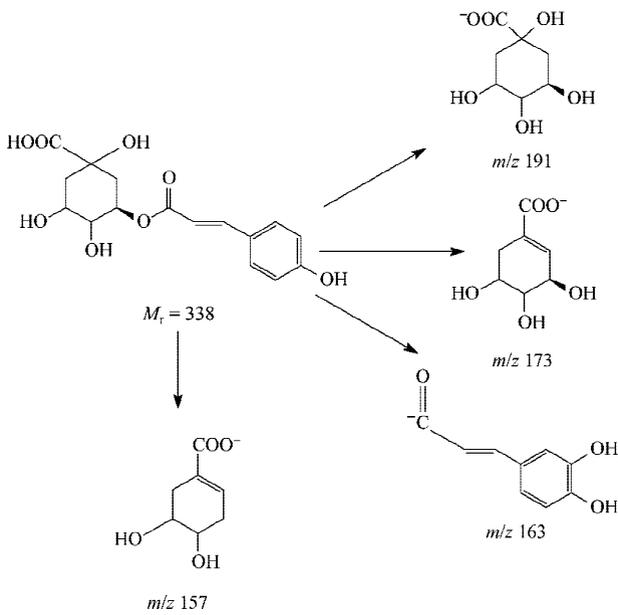


图 10 3-香豆酰奎尼酸的裂解过程

Fig. 10 Fragmentation pathways of 3-cumaroylquinic acid

(2)个别色谱峰由于含量较低,或受到绿原酸主成分的干扰,未获得一级质谱,尚须进一步研究。如图 1-a 中绿原酸主成分前后的许多组分和图 1-b 中保留时间为 5.62 min 和 7.33 min 的组分。

(3)检测中还得到 t_R 为 4.16 min ($t_R' = 0.28$) 的色谱峰(图 1-a)的 MS 谱,其 $[M - H]^-$ 离子的 m/z 为 371 $[M + Na - 2H]^-$ 离子的 m/z 为 393,推测为双键单羟基化绿原酸。但由于缺乏更多的信息和相关文献参考,无法确定羟基的准确位置。

(4)绿原酸的两个同分异构体的 MS 谱中均出现了 m/z 375 离子,推测是 $[M + Na - 2H]^-$ 离子,它的 MS^2 谱中有 m/z 201 离子,推测是咖啡酸的 $[M + Na - 2H]^-$ 离子,可能是因为该化合物为含有多个羟基的酚酸类化合物,其结构中的活泼 H 极易和 Na 发生交换,使 $[M + Na - 2H]^-$ 在 MS 谱中为最强峰;而绿原酸因其浓度高,交换的量所占比例小,故 $[M - H]^-$ 离子为 MS 谱中的最强峰。在正离子模式 MS 中出现了 m/z 377 ($[M + Na]^+$ 离子), MS^2 谱也同样出现了咖啡酸的 $[M + Na]^+$ (m/z 203) 离子,证实推断正确。

(5) MS^n 可以提供化合物的相对分子质量及取代基团的信息,但仅靠这些信息常会造成错误判断,结合 UV 谱对结构鉴定更为有利。如绿原酸与其两个异构体新绿原酸、隐绿原酸,MS 与 MS^2 完全一致,结合 UV 图谱分析更为有利。参考 Adzet 等^[20]对菜蓟(*Cynara scolymus* L.)的研究,新绿原酸的保留时间短于隐绿原酸,先出峰,因此证实本文中推断正确。

(6)新药中相关杂质的研究已成为目前新药开发质量研究的重点之一。由于供试品中相关杂质含量极微,仅仅采用 HPLC-MS 手段鉴定,信息量仍然少,建议有条件时,可同时合成一些初级鉴定出的组分,增加核磁共振和红外光谱等数据。

参考文献:

- [1] Hemmerle H, Burger H J, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler P W, Paulus E, Herling A W. *J Med Chem*, 1997, 40(2): 137
- [2] Schindler P W, Below P, Hemmerle H, Burger H J, Swamy K H S, Arion W J, Efendic S, Herling A W. *Drug Dev Res*, 1998, 44(1): 34
- [3] Ohnishi M, Morishita H, Iwahashi H, Toda S, Shirataki Y, Kimura M, Kido R. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 579
- [4] Sengupta A, Ghosh S, Das S. *Eur J Cancer Prev*, 2003, 12(3): 195
- [5] Pellati F, Benvenuti S, Magro L, Melegari M, Soragni F. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35(2): 289
- [6] Chang C Q, Chen J D, Wong H S. *Chinese Journal of Preventive Medicine (常翠青, 陈吉棣, 王香生. 中华预防医学杂志)*, 2001, 35(2): 79
- [7] Naemura A, Mitani T, Ijiri Y, Tamura Y, Yamashita T, Okimura M, Yamamoto J. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2005, 16(7): 501
- [8] Zhao H. *International Journal of Traditional Chinese Medicine (赵晖. 国外医学: 中医中药分册)*, 2000, 22(3): 151
- [9] Chen X J, Zhou C S. *Fine Chemicals (陈晓娟, 周春山. 精细化工)*, 2006, 23(3): 257
- [10] Ju Y L, Liu Y M. *Journal of Agricultural Science Yanbian University (鞠玉琳, 刘玉敏. 延边大学学报)*, 2006, 28(2): 133
- [11] Liu J H, Qiu A Y. *China Oils and Fats (刘军海, 裘爱泳. 中国油脂)*, 2005, 30(3): 54
- [12] Shi S L, Wang Z J, Shao A J, Huang L Q. *China Journal of Chinese Materia Medica (石少澜, 王祝举, 邵爱娟, 黄璐琦. 中国中药杂志)*, 2005, 30(9): 715
- [13] Wang J Y, Li L J, Zhang L Z. *Chinese Traditional and Herbal Drugs (王继彦, 李丽静, 张莲珠. 中草药)*, 2005, 36(8): 1166
- [14] Li J Z, Ma L, Cui T, Zhao R B, Qi X J. *Chinese Journal of Chromatography (李建中, 马良, 崔同, 赵仁邦, 齐小菊. 色谱)*, 2005, 23(1): 112
- [15] Deng L, Yuan H, Yu Z Y. *Chemistry & Bioengineering (邓良, 袁华, 喻宗沅. 化学与生物工程)*, 2005, 22(7): 4
- [16] Zhang A L, Ma Q, Gao J M, Zhang K J, Wang L. *Chinese Traditional and Herbal Drugs (张鞍灵, 马琼, 高锦明, 张康健, 王蓝. 中草药)*, 2001, 32(2): 173
- [17] Gao J M, Zhang A L, Zhao X M, Zhang K J. *Journal of Northwest Forestry University (高锦明, 张鞍灵, 赵晓明, 张康健. 西北林学院学报)*, 1999, 14(2): 73
- [18] Liu S M, Chen K S, Willibald Schliemann, Jürgen Schmitz, Dieter Strack. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (刘世名, 陈靠山, Willibald Schliemann, Jürgen Schmitz, Dieter Strack. 药物分析杂志)*, 2003, 23(2): 140
- [19] Zhang Z J, Li Q, Yu J, Wang Y Y, Wang X W, Xu X Y, Zhang H. *Chinese Traditional Patent Medicine (张尊建, 李茜, 余静, 王源园, 王兴旺, 徐向阳, 张惠. 中成药)*, 2004, 26(3): 175
- [20] Adzet T, Puigmacia M. *J Chromatogr*, 1985, 348: 447