

# 绿原酸水解产物的高效液相色谱—电喷雾串联质谱分析

罗奇志<sup>1\*</sup>, 王有志<sup>2</sup>, 罗佳波<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学肿瘤研究所, 广州; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

**摘要** 目的: 分析双黄连方药制备过程中影响绿原酸水解的因素及可能的水解产物。方法: 采用高效液相色谱—电喷雾串联质谱法分析绿原酸在不同 pH 值条件及不同水解时间的水解产物。结果: 绿原酸在 pH6.85 的水溶液中较稳定, 在酸性条件下比碱性条件下稳定。结论: 绿原酸的水解模式主要有分子间酯键断裂、咖啡酰基迁移、水合反应等。

**关键词:** 绿原酸; 水解; 液相色谱; 质谱; 双黄连; 中药; 金银花

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)07-1345-05

## HPLC – ESS/MS analysis of chlorogenic acid and its hydrolysate

LUO Qi – zhi<sup>\*</sup>, WANG You – zhi<sup>2</sup>, LUO Jia – bo<sup>2</sup>

(1. Cancer Research Institute, 2. Key New Drug Research Laboratory, College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract Objective:** To investigate the main factors that induce the chlorogenic acid hydrolyse and the related hydrolysate during the preparation of Shuang – huang – lian decoction. **Methods:** HPLC – ESI – MS<sup>n</sup> were used to identify the hydrolysate of chlorogenic acid in different conditions. **Results:** chlorogenic acid was stable in the water with pH value 6.85, it was more stable in the acidic water than in the basic water. **Conclusion:** the hydrolyse of chlorogenic acid was supposed as cleavage of the ester bond, cleavage of the ester bond with a rearrangement of the caffeoyl residue or the addition of a molecule of water.

**Key words:** chlorogenic acid; hydrolyse; HPLC; MS; Shuang – Huang – Lian; traditional Chinese drug; Flos Lonicerae

绿原酸是金银花中的有效成分,具有多种药理活性,因此常作为含金银花的中药成方制剂的质控指标<sup>[1-2]</sup>。2005 版中国药典双黄连制剂中,绿原酸为主要质控指标之一,但有文献报道绿原酸不稳定,在烘烤和  $\gamma$  射线辐射的条件下,对咖啡提取物中绿原酸的含量进行考察,发现烘烤将导致绿原酸含量降低而  $\gamma$  射线辐射则对其含量没有影响<sup>[3-4]</sup>;亦有研究报道,绿原酸受酸、碱、温度等的影响较大,易发生水解<sup>[5-10]</sup>,但对其水解模式,水解产物尚缺乏深入研究。前期我们在研究双黄连方药的化学成分时也发现,双黄连方药中同时含有 3 个绿原酸的同分异构体<sup>[11]</sup>,双黄连的制剂工艺对绿原酸及其同分异构体的稳定性有何影响?绿原酸的同分异构体之间是否可以相互转化?值得进一步探讨。因此,本研究对双黄连制备过程中影响绿原酸稳定性的各类因

素予以考察,并采用高效液相色谱—电喷雾串联质谱技术鉴定其水解产物,为双黄连制剂的深入研究提供参考。

### 1 仪器与试剂

Agilent G6410A QQQ LC/MS 液质联用仪(美国 Agilent 公司),配有 Agilent 1200 高分离度快速液相色谱系统,ESI(电喷雾电离源)离子源,MassHunter 数据工作站。ZSB-724 恒温水浴锅(上海智成分析仪器制造有限公司);pHS-3C 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

对照品:咖啡酸(批号 885-200001)、绿原酸(批号 110753-200413),均购自中国药品生物制品检定所;奎尼酸标准品(购自 Sigma 公司,纯度 > 99%);甲醇(Merck 公司,色谱纯)。其余试剂为分析纯。

\* 通讯作者 Tel: 13711357975; E-mail: luozhizhi@fimmu.com

金银花药材(产地河南,批号 070901)、连翘药材(产地河南,批号 070820)经本校中药鉴定教研室刘传明副教授鉴定,金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾;连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa*(Thunb.) Vahl 的干燥果实。

## 2 实验方法

### 2.1 各药材煎液制备及 pH 值测定

按《中国药典》2005 版双黄连粉针制备工艺条件<sup>[12]</sup>,制备各药材煎液并测定 pH 值。

2.1.1 取金银花药材 7.50 g,加 10 倍量水温浸 30 min,置电热套中回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并两次滤液,pH 计测定该滤液 pH 值为 5.00。

2.1.2 取金银花药材 7.50 g,连翘药材 15.04 g,加 10 倍量水温浸 30 min,置电热套中回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并两次滤液,pH 计测定该滤液 pH 值为 4.18。

### 2.2 绿原酸水解试验

重蒸水 4 份,其中 3 份分别用乙酸或氨水调 pH 为 4.18、5.00、9.18,另一份用 pH 计测定 pH 值为 6.85。

精密称取绿原酸对照品 13.6250 mg,置 25 mL 量瓶中,用无水乙醇溶解并定容至刻度,制成浓度为  $0.5450 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的绿原酸母液,分别取该母液 1 mL,置于 10 mL 的具塞小瓶中,分别加入 pH 值为 4.18、5.00、9.18、6.85 的水溶液至 5 mL,100℃ 水浴锅中水解,水解 1.5 h 后,从各小瓶中取出 1 mL,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,得各 pH 条件下水解 1.5 h 样品。余液继续水解 1.5 h 后,从各小瓶中再各取出 1 mL,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,得各 pH 条件下水解 3 h 样品。

### 2.3 高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇/0.1% 醋酸水溶液(33/67, V/V); 流速 0.4 mL · min<sup>-1</sup>, 327 nm 检测 柱温: 室温。

2.3.2 质谱条件 电喷雾电离源,碰撞能 100 V,干燥气温度 350℃,干燥气流速: 11 L · min<sup>-1</sup>,雾化气压力 27.60 kPa,负离子扫描,扫描范围  $m/z$  50 ~ 1000。

## 3 实验结果

3.1 按“2.3”项下条件,将绿原酸不同 pH 条件,不同时间点的水解样品、绿原酸标准品依次上样分析,谱图如图 1 所示,各峰的推导见表 1。

3.2 由图 1 可见,绿原酸标准品(A 图)含有一定

的杂质,1 号峰为主峰, $[M - H]^{-}$   $m/z$  为 353,有  $m/z$  191 的碎片离子,即为绿原酸峰;2 号峰为杂质峰, $[M - H]^{-}$   $m/z$  亦为 353,也有  $m/z$  191 的碎片离子,推测为绿原酸的同分异构体。绿原酸在 pH 4.18,100℃ 水浴条件下水解 1.5 h 时(B 图),1、2 号峰依然存在,但在 5 ~ 6 min 处出现少量的水解产物峰 3, $[M - H]^{-}$   $m/z$  为 181;水解 3 h(C 图)时 5 ~ 6 min 处出现水解产物峰 3、4, $[M - H]^{-}$   $m/z$  分别为 181(推测其为[绿原酸-奎尼酸+H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>)、371(推测其为[绿原酸+H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>)。同时,1 号峰旁出现一个肩峰 5,其  $[M - H]^{-}$   $m/z$  亦为 353,并与绿原酸有相同的碎片离子,推测其为绿原酸的同分异构体。绿原酸在 pH 5.00,100℃ 水浴条件下水解 1.5 h 时(D 图),在 1 号峰旁亦出现肩峰 5,其它与绿原酸标准品基本相同;水解 3 h 时(E 图),1 号峰旁的肩峰 5 明显变大,并且在主峰前出现 3 个较小的水解峰 6、4、7,其中 6 号峰  $[M - H]^{-}$   $m/z$  为 191,经奎尼酸标准品对照为奎尼酸峰,推测其由绿原酸脱咖啡酰基得来;4 号峰  $[M - H]^{-}$   $m/z$  为 371,推测其为[绿原酸+H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>;7 号峰  $[M - H]^{-}$   $m/z$  为 353,推测其为绿原酸的另一个同分异构体。绿原酸在 pH = 6.85 的蒸馏水中,100℃ 水浴条件下水解 1.5 h 时(F 图),与绿原酸标准品基本相同;水解 3 h 时(G 图),在主峰前出现水解峰 4。绿原酸在 pH = 9.18,100℃ 水浴条件下水解 1.5 h 时(H 图),1 号峰峰高明显降低,2 号峰消失,同时产生了 5 个水解峰 6、8、7、5、9,对水解峰的质谱进行解析,其中 6 号峰  $[M - H]^{-}$   $m/z$  为 191,经奎尼酸标准品对照为奎尼酸峰,推测其由绿原酸脱咖啡酰基得来;7、5 号峰  $[M - H]^{-}$   $m/z$  均为 353,并都有相同的碎片离子  $m/z$  191,推测其为绿原酸的同分异构体;8 号峰  $[M - H]^{-}$   $m/z$  为 352,有  $m/z$  191 的子离子,推测其为绿原酸在碱性条件下,失去羧基的 H<sup>+</sup> 后,再失去咖啡酰基苯环对位上羟基的 H<sup>+</sup> 而来,此时苯氧基负离子的负电荷可以分散到酰基上去,形成稳定的共轭结构;9 号峰显示  $m/z$  165,121,推测其为[咖啡酰基+2H]<sup>-</sup>,及[咖啡酰基+2H-COO]<sup>-</sup>。水解 3 h 时(I 图),11.6 min 处的绿原酸主峰全部消失,水解产物主要为 6 号峰奎尼酸和 9 号峰,推测其为[咖啡酰基+2H]<sup>-</sup>,及[咖啡酰基+2H-COO]<sup>-</sup>。各色谱峰化学成分分析见表 1。

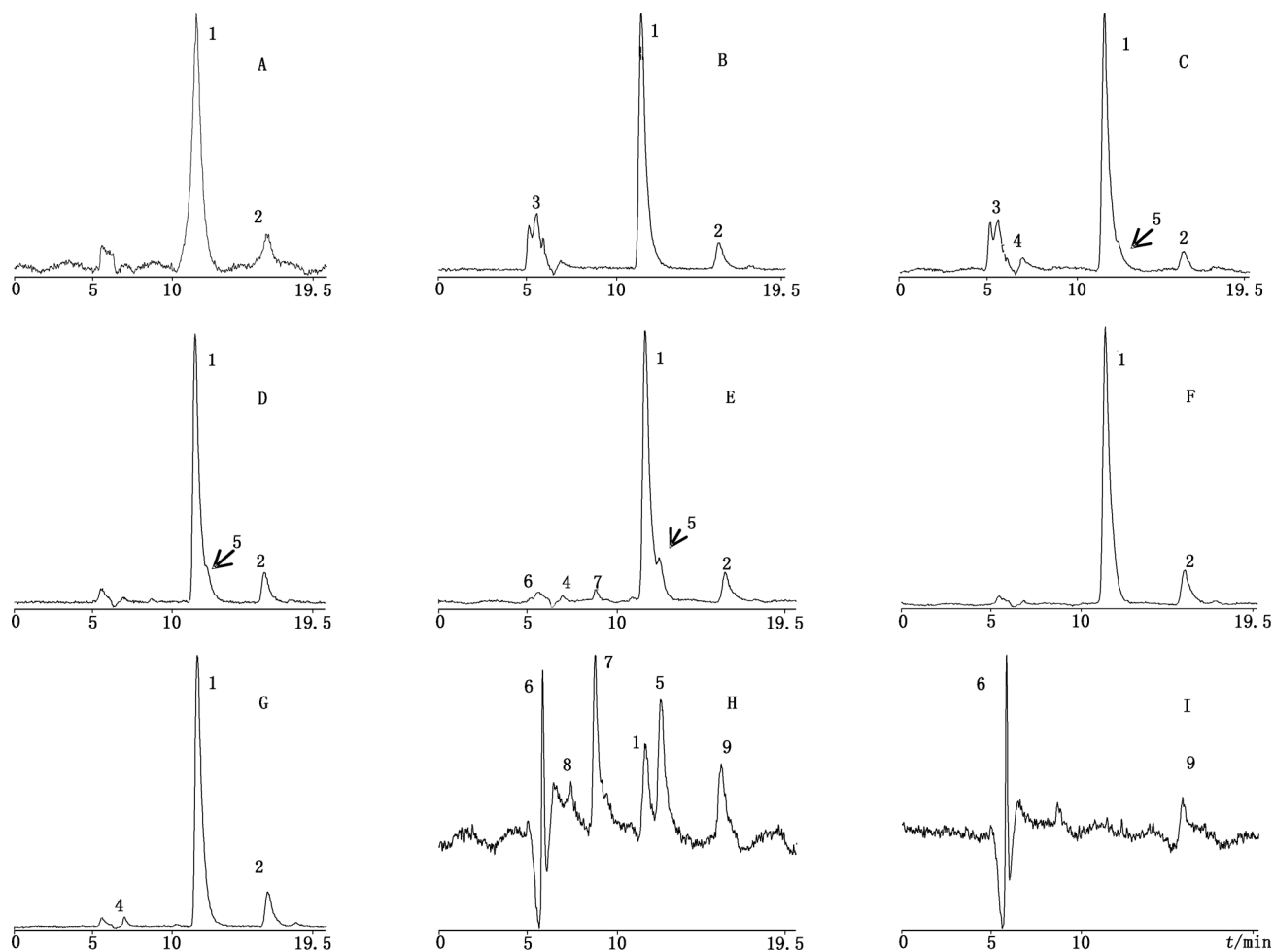


图1 绿原酸标准品及不同条件下水解样品的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of chlorogenic acid and its hydrolysate in different conditions

A 绿原酸标准品 (chlorogenic acid standard) ; B 绿原酸在 100℃ pH4.18 条件下水解 1.5 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ pH4.18 for 1.5 h) ; C 绿原酸在 100℃ pH4.18 条件下水解 3 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ pH4.18 for 3 h) ; D 绿原酸在 100℃ pH5.00 条件下水解 1.5 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ pH5.00 for 1.5 h) ; E 绿原酸在 100℃ pH5.00 条件下水解 3 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ , pH5.00 for 3 h) ; F 绿原酸在 100℃ pH6.85 条件下水解 1.5 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ pH6.85 for 1.5 h) ; G 绿原酸在 100℃ , pH6.85 条件下水解 3 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ pH6.85 for 3 h) ; H 绿原酸在 100℃ pH9.18 条件下水解 1.5 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ pH9.18 for 1.5 h) ; I 绿原酸在 100℃ pH9.18 条件下水解 3 h ( chlorogenic acid hydrolysed at 100℃ pH9.18 for 3 h)

表1 各色谱峰化学成分分析

Tab 1 Analysis of the peaks of samples

峰号 ( peak No. )	保留时间 ( retention time ) /min	分子量 ( Mr )	化合物 ( compound )	质荷比 $m/z$ ( neg )
				$[M - H]^-$
1	11.61	354	绿原酸 ( chlorogenic acid )	353
2	16.13	354	绿原酸异构体 I ( isomer I of chlorogenic acid )	353
3	5.65	182	[绿原酸 - 奎尼酸 + H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ( [ chlorogenic acid - quinic acid + H <sub>2</sub> O ] <sup>-</sup> )	181

续表 1

峰号 (peak No.)	保留时间 (retention time) /min	分子量 (Mr)	化合物 (compound)	质荷比 $m/z$ (neg)
				$[M - H]^-$
4	6.95	372	[绿原酸 + H <sub>2</sub> O - H] <sup>-</sup> [chlorogenic acid + H <sub>2</sub> O - H] <sup>-</sup>	371
5	12.39	354	绿原酸异构体 II isomer II of chlorogenic acid	353
6	6.16	192	奎尼酸 quinic acid	191
7	8.76	354	绿原酸异构体 III isomer III of chlorogenic acid	353
8	7.40	353	[绿原酸 - 2H] <sup>-</sup> [chlorogenic acid - 2H] <sup>-</sup>	352
9	15.68	166, 122	[咖啡酰基 + 2H] <sup>-</sup> , [咖啡酰基 + 2H - COO] <sup>-</sup> [caffeoyl + 2H] <sup>-</sup> , [caffeoyl + 2H - COO] <sup>-</sup>	165, 121

#### 4 讨论

绿原酸是由咖啡酰与奎尼酸(1-羟基六氢吡喃-2,3,4,5-四羧酸)生成的缩酚酸,分子式: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>,分子量: 354.30,其结构式见图2。是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物。根据咖啡酰在奎尼酸上的结合部位和数目不同,从理论上讲,单咖啡酰奎尼酸和二咖啡酰奎尼酸所组成的绿原酸异构体共有10种,分别为:1-咖啡酰奎尼酸、3-咖啡酰奎尼酸、4-咖啡酰奎尼酸、5-咖啡酰奎尼酸、1,3-二咖啡酰奎尼酸、1,5-二咖啡酰奎尼酸、1,6-二咖啡酰奎尼酸、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸。但到目前为止,从植物中发现的绿原酸异构体有如下:绿原酸(3-咖啡酰奎尼酸)、隐绿原酸(4-咖啡酰奎尼酸)、新绿原酸(5-咖啡酰奎尼酸)、异绿原酸A(4,5-二咖啡酰奎尼酸)、异绿原酸B(3,4-二咖啡酰奎尼酸)、异绿原酸C(3,5-二咖啡酰奎尼酸)、莱菔素(1,3-二咖啡酰奎尼酸)<sup>[13]</sup>。

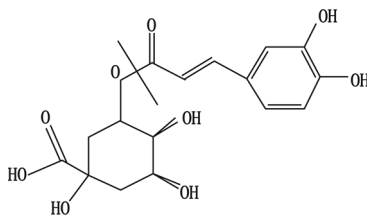


图2 绿原酸结构式

Fig 2 structure of chlorogenic acid

绿原酸被认为是双黄连制剂中抗菌、抗病毒的主要有效成分,被作为定量的指标。从绿原酸的分子结构式看,有酯键、不饱和双键及多元酚三个不稳定部分。在从植物提取过程中,可通过水解和分子内酯基迁移而发生异构化,若从酯键处断裂,可产生  $m/z$ 191(奎尼酸峰)和  $m/z$ 163(咖啡酰基峰)的水解产物;咖啡酰基断裂后在奎尼酸上的取代位置发生重排,可产生绿原酸的同分异构体。

我们通过模拟双黄连制剂制备过程中绿原酸可能存在的环境,对绿原酸的稳定性进行了考察。双黄连制剂制备时,先将金银花与连翘用温水浸泡,此时药液 pH 值约在 6.85 左右,从实验结果可见,绿原酸在此条件下较稳定,即使在 100℃ 下水浴 3h 也只产生一个小的水解峰。随着药材中成分的不断煎出,药液 pH 逐渐变为 4.18 左右,在此条件下绿原酸在水解 1.5 h 时,可能部分从酯键处断裂,出现少量的 [绿原酸 - 191 + H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> 水解产物;水解 3 h 时,水解产物进一步增多,出现 [绿原酸 + H<sub>2</sub>O - H]<sup>-</sup> 峰,同时发生分子内酯基迁移,出现绿原酸的同分异构体。因此,提取绿原酸时不宜长时间加热,否则会引起更多的水解。此外,我们模拟了金银花单煎情况下绿原酸的水解, pH = 5.00 时,绿原酸稳定性较 pH 4.18 时稍差,在水解 1.5 h 时即有绿原酸的同分异构体出现。在 pH 9.18 时,绿原酸不稳定,发生剧烈水解,1.5 h 时,由于分子内酯基迁移,产生了 2 个绿原酸同分异构体;同时酯键断裂,产生奎尼酸和

[咖啡酰基 + 2H]<sup>-</sup> 及 [咖啡酰基 + 2H - COO]<sup>-</sup> 3 h 时,水解产物主要为奎尼酸、[咖啡酰基 + 2H]<sup>-</sup> 及 [咖啡酰基 + 2H - COO]<sup>-</sup>。

由此推测在一定的条件下,绿原酸可通过分子内酯键迁移形成其异构体、分子内酯键断裂形成小分子的水解产物,也可形成水合离子等。在偏酸性条件、中性条件时,绿原酸较稳定,在碱性条件下极不稳定,金银花连翘合煎比金银花单煎有利于绿原酸的稳定;双黄连制剂工艺中,将金银花连翘合煎提取物与黄芩提取物混合,最终调溶液 pH 为 7,有利于绿原酸的稳定。

参考文献

- 1 ZHANG Dan(张丹), LI Zhang-wan(李章万), JIANG Yan(姜焱). Determination of chlorogenic acid in Flos Lonicerae, Herba Artemisia Scopariae and ten Chinese patent medicines by HPLC (HPLC 测定金银花、茵陈及其 10 种中成药中绿原酸的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 1996, 16(2): 83
- 2 ZHANG Xia(张霞), CUI Hai-yan(崔海燕), JIA Xiao-yan(贾晓艳), et al. Separation and purification of chlorogenic acid from Flos Lonicerae by high-speed counter current chromatography(高速逆流色谱法分离纯化金银花中的绿原酸). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2010, 30(1): 106
- 3 Abraham S K, Sarma L, Kesavan P C. Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and a  $\alpha$ -carotene against  $\gamma$ -radiation induced *in vitro* chromosomal damage. *Mutation Res* 1993, 303: 109
- 4 Variyar PS, Ahmad R, Bhat R. Flavoring components of raw monsooned arabica coffee and their changes during radiation processing. *J Agric Food Chem* 2003, 31: 51(27): 7945
- 5 CHEN Gang(陈钢), HOU Shi-xiang(侯世祥), HU Ping(胡平), et al. Studies on stability of chlorogenic acid in extract of flos lonicerae. (金银花提取物中绿原酸的稳定性研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2003, 28(3): 223
- 6 LU Jian-qiu(卢建秋), LIU Yong-gang(刘永刚), HAN Jing(韩静), et al. LC/MS<sup>n</sup> 测定绿原酸的水解动力学及鉴定水解产物. *Chin Tradit Pat Med* (中成药) 2006, 28(8): 1225
- 7 JIANG Bin(江滨), WANG Feng-yun(王风云), ZENG Yuan-er(曾元儿), et al. 绵茵陈药材提取液中绿原酸稳定性影响因素考察. *Chin Tradit Pat Med* (中成药) 2007, 29(3): 359
- 8 Mendel Friedman, Hella S Jürgens. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000, 48(6): 2101
- 9 WANG Zheng(王征), Clifford MN. Comparison of the profiles of chlorogenic acids and their derivatives from three Chinese traditional herbs by LC-MS<sup>n</sup>. (LC-MS<sup>n</sup> 比较分析三种传统中草药中绿原酸及其衍生物组分). *Acta Pharm Sin* (药学学报) 2008, 43(2): 185
- 10 TIAN Chen-xu(田晨煦), XU Xiao-ping(徐小平), LIAO Li-yun(廖丽云), et al. Separation and identification of chlorogenic acid and related impurities by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定绿原酸及其相关杂质). *Chin J Chromatogr* (色谱) 2007, 25(4): 496
- 11 LUO Qi-zhi(罗奇志), LUO Jia-bo(罗佳波), WANG You-zhi(王有志). Qualitative analysis the main chemical constituents of shuanghuanglian injection powder and their origin by high performance liquid chromatography(HPLC)-electrospray ionization(ESI)-mass/mass spectrometry(高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱定性分析双黄连粉针中化学成分及其药味归属). *Acta Pharm Sin* (药学学报) 2009, 44(12): 1391
- 12 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 505
- 13 Report on the safety of Traditional Chinese Medicine injections containing chlorogenic acid. (含绿原酸中药注射剂的安全问题研究总结报告). Center for Drug Evaluation, State Food and Drug Administration(国家食品药品监督管理局药品审评中心) 2006. 1107

(本文于 2010 年 9 月 3 日收到)