

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

罗奇志^{1*}, 罗佳波², 王有志²

(南方医科大学 1. 分析测试中心, 2. 中医药学院, 广东 广州 510515)

摘要: 采用液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法分析双黄连粉针中的化学成分, 并对各化学成分的药味进行归属。采用 C18 柱, 以甲醇-0.25%醋酸水溶液梯度洗脱, 紫外光谱和电喷雾质谱同时在线检测, 负离子扫描模式扫描, 对每一组分峰进行质谱分析。通过质谱分析及文献对照, 从双黄连粉针图谱中共准确推断 43 个峰的相对分子质量, 推导出 20 个化合物, 并对各化合物进行了药味归属。

关键词: 双黄连粉针; 绿原酸; 黄芩苷; 连翘酯苷; 高效液相色谱-电喷雾串联质谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1391-06

Qualitative analysis of the main chemical constituents of Shuanghuanglian injection powder and their origin by HPLC-ESI/MS/MS spectrometry

LUO Qi-zhi^{1*}, LUO Jia-bo², WANG You-zhi²

(1. Analytical Center, 2. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: This paper is to report the analysis of the main chemical constituents of Shuanghuanglian injection powder and determination of their origin. The sample solution was analyzed by a Zorbax C18 column with a gradient mobile phase comprised of methanol and 0.25% acetic acid solution. Both UV and electrospray ionization mass spectrometry detector were used simultaneously, -Q1-scan detection mode was evaluated for the identification of the LC peaks. To analyze the mass spectrum of every LC peaks, 43 molecular mass from the ion chromatogram of Shuanghuanglian injection powder were identified and among them, structure of 20 compounds were elucidated, and the data were sorted to the three component herbs, separately.

Key words: Shuanghuanglian injection powder; chlorogenic acid; baicalin; forsythoside; HPLC-ESI-MS/MS

双黄连粉针剂是由金银花、连翘、黄芩精制而成的中药复方制剂, 是目前临床治疗呼吸道感染的首选药物之一, 具有清热解毒、清宣透散之功用, 对呼吸道感染、病毒性及细菌性肺炎治疗效果显著。现代药理研究表明, 双黄连具有抗甲、乙型流感病毒, 副流感病毒 (I ~ IV 型), 多种流感病毒变株 (B 型)、克萨奇病毒、合胞病毒、腺病毒的作用, 且对人体免疫系统具有正向调节作用^[1, 2]。近年来, 随着临床使

用的不断增加, 双黄连粉针不良反应的报道也不断增多^[3], 全面认识双黄连粉针中的化学成分对于该制剂的合理应用及开发具有重要意义, 为此, 采用高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱对双黄连粉针剂进行了初步的化学成分分析, 在此基础上, 再对色谱峰进行定性, 并分析其药味归属, 为阐明双黄连粉针的药效物质基础及其二次开发提供参考。

材料与方法

仪器与材料 Agilent G6410A QQQ LC/MS 液质联用仪 (美国 Agilent 公司), 配有 Agilent 1200 高分离

收稿日期: 2009-05-23.

*通讯作者 Tel: 86-20-62789061-849, Fax: 86-20-61648266,

E-mail: luoqizhi12@126.com

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。色谱柱: Kromasil C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 对照品咖啡酸 (批号 885-200001)、绿原酸 (批号 110753-200413)、黄芩苷 (批号 110715-200514)、连翘苷 (批号 821-9903) 均购自中国药品生物制品检定所; 奎尼酸对照品购自 Sigma 公司, 纯度>99%; 连翘酯苷对照品购自天津一方科技有限公司, 纯度>97%; 甲醇为 Merck 公司, 色谱纯; 其余试剂为分析纯。双黄连粉针剂为哈尔滨中药二厂 (批号 0702205); 金银花 (产地河南)、连翘 (产地河南)、黄芩 (产地河北) 药材, 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; 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

样品制备 精密称取市售双黄连粉针剂冻干粉约 0.1 g, 用甲醇溶解, 定容于 100 mL 量瓶, 取适量 0.45 μm 滤膜过滤, 得双黄连粉针供试液。

按中国药典 2005 版双黄连粉针制备工艺, 分别取金银花药材 7.5 g、连翘药材 15.0 g 和黄芩药材 7.5 g 制备各单个药材的提取物; 另取金银花药材 7.5 g 和连翘药材 15.0 g, 按双黄连粉针制备工艺两药材合煎, 制备金银花连翘合煎提取物; 另取金银花药材 7.5 g、连翘药材 15.0 g 和黄芩药材 7.5 g, 按双黄连粉针制备工艺 (金银花、连翘合煎, 黄芩单提), 制备自制双黄连粉针提取物^[4]。

咖啡酸、奎尼酸、绿原酸、黄芩苷、连翘苷和连翘酯苷对照品分别取适量, 用甲醇溶解, 0.45 μm 滤膜过滤, 备用。

色谱条件 色谱柱: Kromasil C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A (0.25%醋酸水溶液) — B (甲醇) 梯度洗脱: 0~10 min (B: 15% → 35%), 10~20 min (B: 35%), 20~60 min (B: 35% → 100%); 流速: 0.6 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL, 检测波长: 350 nm。

质谱条件 电喷雾电离源 (ESI 源), 碰撞能 100 V, 干燥气温度 350 °C, 干燥气流速: 11 L·min⁻¹, 雾化气压力 276 kPa, 毛细管电压 4 kV, 负离子扫描, 扫描范围 m/z 50~2 000。子离子扫描各化合物所用碰撞能量见表 1。

结果与讨论

1 高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析

将双黄连粉针供试液 (图 1A)、自制双黄连粉针

提取物 (图 1B)、金银花与连翘合煎提取物 (图 1C)、金银花提取物 (图 1D)、连翘提取物 (图 1E)、黄芩提取物 (图 1F) 分别进行全离子扫描及子离子扫描分析, 比较各样品全离子扫描图间的差异, 并根据二级质谱信息进行初步定性分析。

对比质谱与紫外检测到的谱图, 总离子流图 (TIC) 比紫外谱图可采集到更多色谱峰, 许多在 350 nm 处无紫外吸收或吸收较弱的组分在 TIC 图中有很好的响应信号, 说明采用质谱检测能提供更多化合物信号, 更全面地反应样品中化学成分的情况。

对自制双黄连粉针提取物及各样品中各色谱峰的质谱信号进行分析, 推断化合物, 通过对照品对照、谱图中碎片离子结构分析及文献^[5-13]查阅, 从自制双黄连粉针提取物中共检测出 43 个化合物的相对分子质量, 推导了其中 20 个化学成分, 结果见表 1。

10、15 和 16 号峰 $[M-H]^-$ 离子 m/z 均为 353, 二级质谱主要碎片离子 m/z 为 191、179、173、135, 但各碎片离子的丰度有所不同。绿原酸为咖啡酸与奎尼酸的缩酚酸, 相对分子质量为 354, $[M-H-咖啡酰基]^-$ 可得到 m/z 191 的碎片离子, m/z 173 为 $[191-H_2O]^-$, m/z 179 为咖啡酸根, m/z 135 为 $[179-COO]^-$, 由此推测 10、15 和 16 号峰为绿原酸的 3 个同分异构体。目前植物中发现的单咖啡酰奎尼酸有绿原酸 (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), 但根据文献^[14, 15]报道, 具有不同的二级质谱特征: 3-咖啡酰奎尼酸二级质谱有 m/z 191 的基峰, m/z 179 峰强度大于基峰强度的 50%; 5-咖啡酰奎尼酸二级质谱有 m/z 191 的基峰, m/z 179 峰强度小于基峰强度的 5%, 4-咖啡酰奎尼酸二级质谱有 m/z 173 的基峰, 同时有 m/z 179、191 峰, 经与对照品对照及二级谱特征, 确定 15 号峰为绿原酸, 10 号峰为 5-咖啡酰奎尼酸, 16 号峰为 4-咖啡酰奎尼酸。

28 和 33 号峰 $[M-H]^-$ 离子 m/z 均为 515, 二级质谱主要碎片离子 m/z 为 353、335、191、173、179 等, 异绿原酸相对分子质量为 516, 从分子结构上看, 比绿原酸多一个咖啡酰基, $[M-H-咖啡酰基]^-$ 可得到 m/z 353, $[M-H-咖啡酰基-H_2O]^-$ 可得到 m/z 335, 由此推测 28 和 33 号峰为异绿原酸的 2 个同分异构体, 但咖啡酰基的具体取代位置有待确定。

20 号峰 $[M-H]^-$ 离子 m/z 为 389, 二级质谱主要碎片离子 m/z 为 345、165 和 121 等, 番木鳖苷相对分子质量为 390, $[M-H-COO]^-$ 可得 m/z 345, m/z 165 为 $[M-H-Glc-COO-H_2O]^-$, 由此推测 20 号峰为番木鳖

苷。

24 和 27 号峰 $[M-H]^-$ 离子 m/z 均为 623, 二级质谱主要碎片离子 m/z 为 461 和 161。连翘酯苷 A 相对分子质量为 624, $[M-H-\text{咖啡酰基}]^-$ 可得到 m/z 461, m/z 161 为咖啡酰残基, 由此推测 24 和 27 号峰为连翘酯苷 A 的 2 个同分异构体, 目前已知连翘中相对分子质量为 624 的苯乙醇苷只有连翘酯苷 A 和阿克替苷 (acteoside), 两个化合物具有相同的母核和取代基, 但取代基位置不同。经对照品对照, 确定 27 号峰为连翘酯苷 A, 因此推测 24 号峰为阿克替苷。

17、18、21 和 22 号峰 $[M-H]^-$ 离子 m/z 均为 639,

其中 17 和 18 号峰经子离子扫描未得到其碎片离子, 21 和 22 号峰的主要碎片离子为 621、529、277 和 161 等, 连翘酯苷 C 相对分子质量为 640, 从分子结构上看, 比连翘酯苷 A 多一个羟基, $[M-H-H_2O]^-$ 可得到 m/z 621, m/z 529 为 $[M-H-C_6H_5O_2]^-$, m/z 161 为咖啡酰残基。由此推测 21 和 22 号峰为连翘酯苷 C 及其同分异构体 β -hydroxyforythiaside, 但取代基的具体位置需进一步确认。

12 号峰 $[M-H]^-$ 离子 m/z 为 461, 二级质谱主要碎片离子 m/z 为 315、205 和 163 等, 连翘酯苷 E 相对分子质量为 462, $[M-H-Rha]^-$ 可得 m/z 315, m/z 205 为

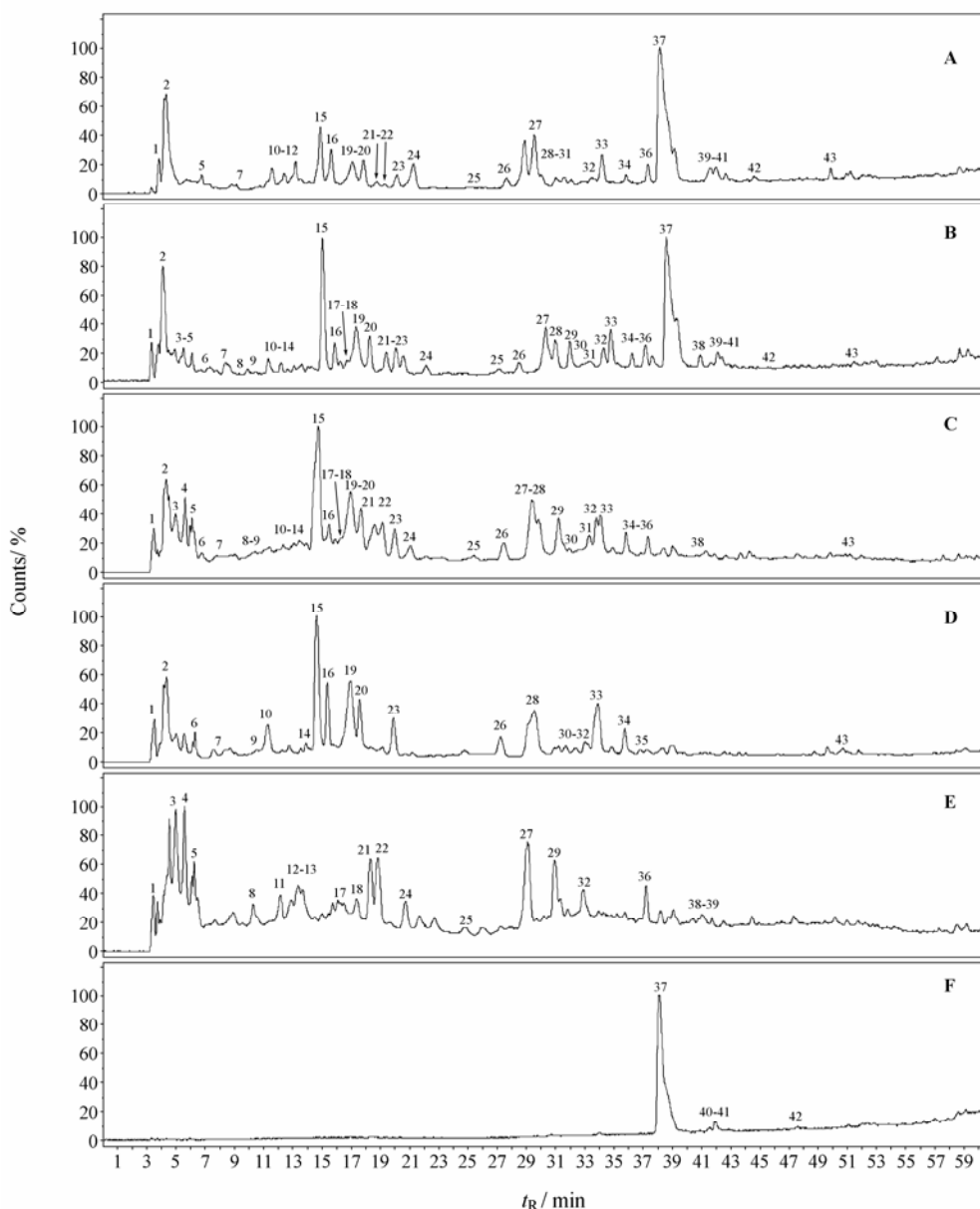


Figure 1 Total ion chromatogram of the samples. A: Extract of Shuanghuanglian injection powder; B: Extract of Shuanghuanglian; C: Extract of *Lonicera japonica* Thunb. and *Forsythia suspense* Thunb. simultaneously boiled; D: Extract of *Lonicera japonica* Thunb.; E: Extract of *Forsythia suspense* Thunb.; F: Extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi

Table 1 Analysis of the peaks of samples

Peak No	t_R/min	M_r	Compound	m/z		Collision energy/V
				MS	MS ²	
1	3.31	344, 202		343, 201		25
2	4.12	192	Quinic acid	191	109, 85, 127	20
3	4.94	250		249		20
4	5.52	236		235		20
5	6.06	174		173		20
6	7.27	372		371		20
7	8.53	174		173, 389		20
8	9.89	192		191	85, 109	20
9	10.46	390		389		25
10	11.35	354	5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	353	191, 173, 135	25
11	12.18	376		375	201, 179, 157, 135	25
12	12.89	462	Forsythiaside E	461	315, 205, 163, 135	25
13	13.25	488		487	233, 203, 161	25
14	14.19	374		373	285, 119, 97	25
15	15.03	354	3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	353	191, 179	25
16	15.88	354	4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	353	173, 179, 191, 135	25
17	16.20	640		639		25
18	16.72	640		639		25
19	17.33	374	Secologanic acid	373	193, 149, 97	25
20	18.26	390	Secologanoside	389	345, 165, 121, 95	25
21	19.42	640	Isomer of forsythiaside C	639	621, 529, 161, 277, 203	25
22	20.03	640	Isomer of forsythiaside C	639	621, 529, 161, 277, 203	25
23	20.55	418		417		25
24	22.09	624	Acteoside	623	461, 161	25
25	27.18	622	Isomer of suspensaside A	621	203, 179, 161, 151	25
26	28.44	404		403		25
27	30.36	624	Forsythiaside A	623	461, 161	25
28	30.97	516	Isomer of dicaffeoylquinic acid	515	353, 335, 173, 179, 135, 191	25
29	32.05	622	Suspensaside A	621	233, 203, 161, 151	25
30	32.79	448		447	285	25
31	33.31	594	Lonicerin	593	285	25
32	34.29	610	Rutin	609	301	25
33	34.81	516	Isomer of dicaffeoylquinic acid	515	353, 173, 179, 135	25
34	36.21	758	Centaurosides	757	525, 493, 595, 179, 149	28
35	37.14	714		713	677, 341	28
36	37.61	594		593	371, 356, 284	28
37	38.73	446	Baicalin	445	269 ⁺	25
38	40.91	940		939		28
39	41.58	522		521		28
40	42.07	430		429	253	25
41	42.39	460	Wogonoside	459 ⁺	283, 268	25
42	47.53	270		269		25
43	49.74	595		594	374, 471, 307, 191, 149	25

[315-C₆H₆O₂]⁻、 m/z 163 为鼠李糖基，由此推测 12 号峰为连翘酯苷 E。

37 号峰[M-H]⁻离子 m/z 为 445，二级质谱主要碎片离子 m/z 为 269。黄芩苷相对分子质量为 446， m/z 269 为[M-glu-H]⁻，故推测 37 号峰为黄芩苷，再经对

照品对照，证明推测准确。

41 号峰[M-H]⁻离子 m/z 为 459，二级质谱主要碎片离子 m/z 为 283、268、175 等，汉黄芩苷相对分子质量为 460， m/z 283 为[M-glu-H]⁻、 m/z 268 为[M-glu-CH₃-H]⁻，故推测 41 号峰为汉黄芩苷。

2 色谱峰的归属

双黄连粉针总离子流图中共检测到 43 个色谱峰, 其中 21 个峰来自金银花, 主要为绿原酸、异绿原酸及其同分异构体等化合物; 20 个峰来自连翘, 主要为连翘酯苷及其同分异构体等化合物, 其中 1 号和 32 号峰为金银花、连翘的共有峰; 4 个峰来自黄芩, 主要为黄芩苷等黄酮类化合物。从全方中未发现新的化合物峰, 但 35 号峰在全方中响应较明显, 而在金银花提取物及金银花、连翘合煎提取物中响应不明显。在金银花单煎、连翘单煎的谱图中, 有部分化合物峰在全方中无对应峰, 说明全方化学成分并不是单味药材的简单叠加。

对比金银花提取物、连翘提取物及金银花连翘合煎提取物的总离子流图, 未发现新的色谱峰, 说明金银花连翘合煎与金银花、连翘单煎相比, 未产生新的化合物, 但在 7~14 min 处, 金银花单煎、连翘单煎的谱图中, 7、8、10、11、12 和 13 号峰响应值都较高, 而合煎液的谱图中响应均较低; 连翘单煎谱图中, 在 21~24 min 处有几个响应较高的峰, 但在合煎的谱图中响应非常低; 对比合煎与全方的谱图, 无明显区别, 说明金银花、连翘合煎与两药材单煎相比, 虽无新化合物产生, 但化学成分的含量可能存在一定差异, 因而物质基础有一定的区别。

对比自制双黄连粉针提取物与市售双黄连粉针的总离子流图, 发现两者在化学成分上存在较大差异, 自制双黄连粉针提取物中的 3、4、6、8、9、13、14、17、18、31、35 和 38 号峰在市售双黄连粉针中无对应峰, 而市售双黄连粉针中也有部分峰在自制双黄连粉针提取物中无对应峰; 在自制双黄连粉针提取物中, 有 4 个相对分子质量为 640 的峰 (17、18、21 和 22 号峰)。在市售双黄连粉针中仅能找到 21 和 22 号峰, 而且与前者相比, 响应值非常低。29 号峰推测为 *Suspensaside A*, 在自制双黄连粉针提取物中响应较高, 而在市售双黄连粉针中响应较低。在市售双黄连粉针中, 有 3 个 $[M-H]^-$ 离子 m/z 为 623, 二级质谱为 461 和 161 的峰 (24、27 和 *a* 峰), 其中 *a* 峰在自制双黄连粉针中无对应峰, 推测其亦为连翘酯苷 *A* 的同分异构体, 但目前文献报道的相对分子质量为 624 的连翘酯苷只有两个, 从连翘酯苷 *A* 的分子结构上看, 咖啡酰基的取代位置不同, 易形成不同的异构体, 因此很可能在连翘药材中还有新的连翘酯苷的异构体未被发现, 需采用市售双黄连粉针的原药材来进一步分析鉴定。由此可见, 自制双黄连粉针与市

售双黄连粉针化学成分存在显著差异的主要原因, 可能是由于二者药材来源上的不同, 此外, 自制双黄连粉针比市售双黄连粉针少了一步冷冻干燥工艺, 可能也有一定的影响。

小结

通过以上各谱图间的对比分析及对各色谱峰的初步定性, 可以看出双黄连粉针是一个非常复杂的化合物组群, 其中许多化合物均以同系物或同分异构体的形式存在, 首次确定了双黄连粉针中绿原酸类化合物有 3 个单咖啡酰奎尼酸的同分异构体 (10、15 和 16 号峰) 和 2 个双咖啡酰奎尼酸的同分异构体 (28 和 33 号峰); 首次检测出双黄连粉针中同时存在着连翘酯苷 *A*、*C* 和 *E* 三类, 其中 $[M-H]^-$ 离子 m/z 为 623 的有 2 个 (24 和 27 号峰), 而市售双黄连粉针中有 3 个。连翘酯苷 *C* 及其同分异构体共 2 个 (21 和 22 号峰), 另 2 个 $[M-H]^-$ 离子 m/z 为 639 的化合物 (17 和 18 号峰) 是否为苯乙醇苷类化合物需进一步确认。在双黄连粉针、金银花提取物及金银花连翘合煎提取物中均存在一个响应值很高的 m/z 191 峰 (1 号峰), 经理论推断和对照品对照, 证实其为奎尼酸, 为首次报道双黄连粉针中存在奎尼酸, 并另文报道其不是来自于绿原酸的水解而是金银花中本身存在的化学成分^[16]。

中药理论认为中药中通常存在一类结构类似的化合物, 共同发挥药效作用, 从此实验结果可以确认中药中确实存在着这样的结构类似的化合物群。同时可以看到药材来源不同对全方化学成分的影响非常大, 因此从药材来源上进行严格控制, 并结合中药指纹图谱等技术, 是提高中成药质量的关键。

液相色谱电喷雾串联四极杆质谱联用技术由于不需要化合物对照品即能对各色谱峰进行初步定性, 因此与高效液相色谱法相比, 具有显著优势, 对双黄连粉针中存在的主要化学成分有了一个全面的认识, 而不再停留在几个已知且含量较高的组分上, 对于双黄连粉针的合理应用及开发具有重要意义。

References

- [1] Yi SH, Wang F, Wang LP, et al. Curative effect of Shuanghuanglian injection on antivirus *in vitro* [J]. J Bethune Univ Med Sci (白求恩医科大学学报), 2001, 27: 490-492.
- [2] Li F, Yi SH, Zhao CY, et al. Studies on antivirus effect of Shuanghuanglian injection [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药)

- 药), 2002, 33: 52–55.
- [3] Wu JR, Zhang B. Data mining study on adverse reaction induced by Shuanghuanglian injection [J]. Chin J Pharmacovigilance (中国药物警戒), 2008, 5: 139–143.
- [4] China Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Vol 1, 2005 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 505–506.
- [5] Zhou JJ, Xie GR, Yan XJ. Handbook of Chinese Medicine Chemical Composition of the Original Plant (中药原植物化学成分手册) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 4.
- [6] Li Q, Feng WS. Recent development of chemical components of studies Fructus Forsythiae [J]. J Henan Univ Chin Med (河南中医学院学报), 2005, 20: 78–80.
- [7] Zhang J, Ma BP, Zhao Y, et al. Qualitative analysis of the marker peaks of Shuanghuanglian powder in injection fingerprints and its synergy [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2005, 27: 1365–1369.
- [8] Lü BQ, Xing XF, Luo JB. Isolation of the chemical constituents from Shuanghuanglian injection and their structural identification [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2006, 26: 1471–1475.
- [9] Niu XS, Yan HX, Gao HY, et al. Studies on the antiviral activity and chemical constituents from Shuanghuanglian injection powder [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2006, 8: 16–19.
- [10] Bi YF, Tian Y, Pei SS, et al. Secoiridoid glycosides from Flos Lonicerae [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2008, 39: 18–21.
- [11] Gao HM, Mu HJ, Wang MZ, et al. Studies on the chemical constituents of Japanese Honeysuckle [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1995, 26: 568–569.
- [12] Tian CX, Xu XP, Liao LY, et al. Separation and identification of chlorogenic acid and related impurities by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2007, 25: 496–500.
- [13] Ren MT, Chen J, Song Y, et al. Identification and quantification of 32 bioactive compounds in *Lonicera* species by high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48: 1351–1360.
- [14] Clifford MN, Johnson KL, Knight S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 2900–2911.
- [15] Wang Z, Clifford MN. Comparison of the profiles of chlorogenic acids and their derivatives from three Chinese traditional herbs by LC-MSⁿ [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 185–190.
- [16] Luo QZ, Luo JB. Analysis of Shuanghuanglian injection powder by HPLC-ESI-mass/mass spectrometry [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2009, 31: 1402–1404.