第 37 卷第 23 期
2012 年 12 月

中国中药杂志
China Journal of Chinese Materia Medica

Vol. 37, Issue 23
December, 2012

HPLC-DAD-ESI-MS/MS 研究金银花水提工艺中绿原酸类成分的变化规律

张倩[1,2]，张加余[2]，隋丞琳[2]，史新元[2]，乔延江[2]，卢建秋[1*]

(1. 北京中医药大学 科研实验中心，北京 100029; 2. 北京中医药大学 中药学院，北京 100102)

[摘要] 目的: 分析金银花水提液中的绿原酸类成分及水提过程中绿原酸类成分的变化规律。方法: Agilent Zorbax SB-C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)，检测波长 327 nm，柱温 30 ℃，流动相 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B)，梯度洗脱，流速 0.5 mL·min^{-1}，质谱采用负离子多级检测模式，对抽取的 22 个金银花水提液样本进行分析。结果: 从水提液中准确鉴定了咖啡酸和 6 种绿原酸类成分。在提取过程中，绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎宁酸含量达到最高值后会逐渐趋于平衡或缓慢降低，其他成分的含量一直呈上升趋势，但是变化率逐渐减小。结论: 该研究为改进含金银花中药制剂的生产工艺提供了依据。

[关键词] 金银花; 水提工艺; 绿原酸类成分; HPLC-DAD-ESI-MS/MS; 变化规律

金银花是忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花，化学成分包括黄酮类、环烯醚萜苷类、有机酸类等[1]。其中有机酸类成分一直被视为金银花清热解毒的物质基础，主要组成为绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸 A)等绿原酸类成分[2]。它们的结构中存在酯键、不饱和双键和多元酚，在提取过程中，往往会通过水解和分子内酯基迁移而发生异构化[3]。为了考察该类成分在水提过程中的变化规律，并为改进含金银花中药制剂的生产工艺提供依据，本研究采用 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 对浸泡、加热回流、沸腾煎煮 3 个阶段抽取的 22 个金银花水提液样本进行了分析，准确鉴定了咖啡酸和 6 种绿原酸类成分，并研究了含量较高的 6 种成分的变化规律。

1 材料

Agilent 1100 LC/MSD XCT plus 系统: 包括在线脱气机、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、电喷雾(ESI)接口、1100 色谱工作站(美国 Agilent 公司); 夹套式 100 L 多功能提取罐(天津市隆业中药设备有限公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Millipore Synergy UV 型超纯水机(美国 Millipore 公司); R200D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); 甲酸、乙腈为色谱纯，水为超纯水。

绿原酸(批号 110753-200413)，咖啡酸(批号 110885-200102)购于中国食品药品检定研究院; 新绿原酸、隐绿原酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸(纯度均大于 99.0%)购于成都普瑞科技有限公司; 金银花药材来自亚宝北中大(北京)制药有限公司，经北京中医药大学卢建秋研究员鉴定为忍冬科植物忍冬 *L. japonica* 的干燥花蕾。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取绿原酸、咖啡酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、新绿原酸、隐绿原酸对照品适量，精密称定，加甲醇制成适宜浓度的对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液适量，加甲醇制成适当浓度的混合对照品溶液，于 4 ℃冰箱中储存。

2.1.2 供试品溶液的制备 金银花药材 7 kg，一煎加水 12 倍，提取前浸泡 30 min，加热回流提取，沸腾后煎煮 30 min; 二煎加水 10 倍，加热回流提取，沸腾后煎煮 30 min。采用强制外循环旁路取样方式，浸泡及加热过程每 6 min 取样一次; 沸腾后煎煮过程每 10 min 取样一次，2 次提取过程共抽取样本 22 个，每个样本约 10 mL。每次取样前 30 s，通过强制

[稿件编号] 20120524005
[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项(2010ZX09502-002); 北京中医药大学自主选题项目(2011-JYBZZ-XS104)
[通信作者] * 卢建秋，研究员，Tel: (010) 64286203，E-mail: lujq@vip.sina.com
[作者简介] 张倩，硕士研究生，Tel: 15201391374，E-mail: dazhangqian@126.com

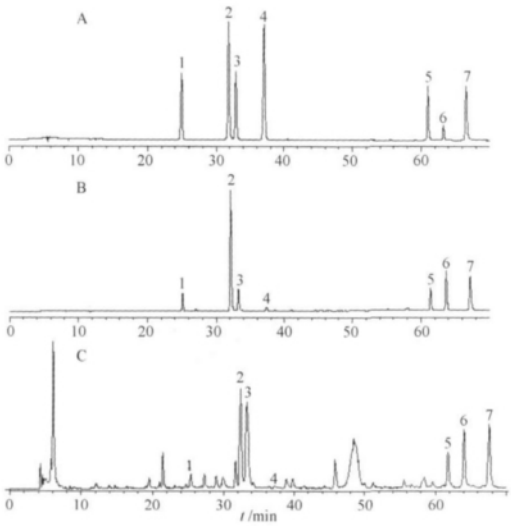
© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

外循环系统更新旁路内药液，保证所抽取样本与罐内药液状态保持一致。

编号方法：一煎浸泡、加热回流、沸腾煎煮 3 个阶段编号分别为 Q + N，T + N，H + N（N = 1，2，3…）；二煎加热回流、沸腾煎煮 2 个阶段的编号分别为：2T + N，2H + N（N = 1，2，3…）。

2.2 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；柱温 30 ℃；检测波长 327 nm；流动相 0.1% 甲酸溶液（A）-乙腈（B），洗脱梯度：0 ~ 15 min，0% ~ 10% B；15 ~ 22 min，10% ~ 12% B；22 ~ 45 min，12% ~ 18% B；45 ~ 55 min，18% ~ 23% B。流速 0.5 mL · min^{-1}；进样量 10 μL。金银花水提液的 HPLC-DAD 图见图 1。



1. 新绿原酸；2. 绿原酸；3. 隐绿原酸；4. 咖啡酸；5. 3，4-二咖啡酰奎宁酸；6. 3，5-二咖啡酰奎宁酸；7. 4，5-二咖啡酰奎宁酸。

图 1 对照品（A）、金银花水提液（B）的 HPLC 图和金银花水提液（C）TIC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Lonicera japonica* standards (A), water-extraction (B) and total ion chromatogram in negative mode (C)

2.3 质谱条件

质谱检测采用 ESI 源，负离子模式；雾化气和干燥气均为氮气（纯度 > 99.99%），碰撞气氦气（纯度 > 99.99%）；干燥气流速 11 L · min^{-1}；雾化室压 3 625 Pa；干燥气温度 350 ℃，毛细管电压 4 000 eV，4 级碎片扫描，m/z 100 ~ 800；金银花水提液的总离子流图见图 1。

2.4 系统适用性试验

按上述色谱条件，金银花水提液中 7 个成分分离良好，分离度均在 3.0 以上，拖尾因子均在 0.95 ~ 1.05，理论塔板数均大于 11 000。

2.5 金银花水提液中绿原酸类成分的 LC-MS^n 分析

通过对各化合物准分子离子峰和负离子多级碎片的分析，结合文献 [4-6] 和对照品比对，准确鉴定了色谱峰 1 ~ 7，结果见表 1。隐绿原酸的 MS^2 基峰为 m/z 173，新绿原酸、绿原酸的 MS^2 基峰为 m/z 191；新绿原酸和绿原酸在 m/z 179 处峰强度明显不同，分别占基峰的 49%，3%；3，5-二咖啡酰奎宁酸的二级碎片主要有 m/z 353，191，179，而 3，4-二咖啡酰奎宁酸和 4，5-二咖啡酰奎宁酸还存在 m/z 173 的二级碎片；但是 3，4-二咖啡酰奎宁酸和 4，5-二咖啡酰奎宁酸具有相似的碎片信息，无法区分，只能通过对照品比对进行准确鉴别，见图 2。此类成分具有相似的裂解碎片，以 4，5-二咖啡酰奎宁酸为例阐释裂解途径，结果见图 3。

2.6 供试品溶液的 HPLC 测定

本课题组在前期研究工作中针对绿原酸类成分建立了一定的线性范围，同时进行了精密度的考察，为使待测样本的峰面积落在线性范围以内，将采集的 22 个样本用水稀释至合适浓度进样，按上述色谱、质谱条件分析，最后再折算成原液峰面积进行比较。结果见图 4。

文献 [7] 报道，金银花提取时间越长、提取温度越高，绿原酸的溶出率越高。但从图 2 可以看出，一煎过程中，随着浸泡时间的增加，6 种成分的含量都有所增加，其中以绿原酸含量变化最大；加热回流阶段，各成分含量明显增加，以绿原酸、3，5-二咖啡酰奎宁酸、4，5-二咖啡酰奎宁酸变化最为明显；沸腾后煎煮阶段，含量较高的绿原酸和 3，5-二咖啡酰奎宁酸含量不再增加，并有缓慢的下降趋势，其他成分仍然呈上升趋势。二煎过程中各成分的含量明显比一煎低，其中绿原酸和 3，5-二咖啡酰奎宁酸在沸腾前即达到平衡，其他成分的含量还有所增加。

3 讨论

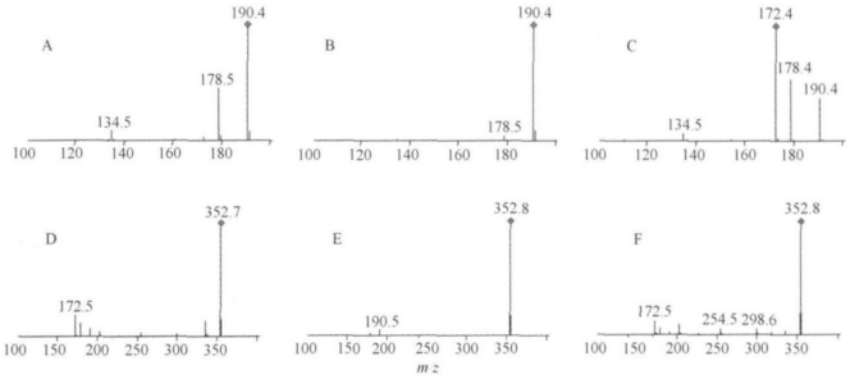
本课题组的早期研究工作通过解析质谱碎片初步确定了金银花中 6 种绿原酸类成分[8]，但由于缺少对照品，无法进行验证，本实验进行了补充。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　金银花水提液中绿原酸类成分 LC-MS^n 分析

Table 1　LC-MS^n analysis of chlorogenic acids in *Lonicera japonica* water-extraction

No.	t_R/min	$[M-H]^-$	质谱碎片(相对强度)	化合物
1	25.3	353	MS^2 [353]: 191(100), 179(49), 135(6), 173(2); MS^3 [191]: 127(100), 173(77), 111(38)	新绿原酸
2	32.3	353	MS^2 [353]: 191(100), 179(3); MS^3 [191]: 127(100), 173(97), 111(40), 109(24)	绿原酸
3	33.3	353	MS^2 [353]: 173(100), 179(45), 191(30), 135(5); MS^3 [173]: 111(100), 155(67), 109(17), 137(10), 127(8); MS^3 [191]: 127(100), 111(11)	隐绿原酸
4	37.6	179	MS^2 [179]: 135(100)	咖啡酸
5	61.6	515	MS^2 [515]: 353(100), 173(20), 179(13), 191(7); MS^3 [353]: 173(100), 179(61), 191(40), 135(8); MS^4 [173]: 111(100), 155(40), 109(11), 137(8)	3,4-二咖啡酰奎宁酸
6	63.9	515	MS^2 [515]: 353(100), 191(5), 179(2); MS^3 [353]: 191(100), 179(49), 135(7), 173(4); MS^4 [191]: 127(100), 173(91)	3,5-二咖啡酰奎宁酸
7	67.4	515	MS^2 [515]: 353(100), 173(11), 179(6), 191(2); MS^3 [353]: 173(100), 179(53), 191(21), 135(6); MS^4 [173]: 111(100), 155(51), 109(16), 137(11)	4,5-二咖啡酰奎宁酸



A. 新绿原酸; B. 绿原酸; C. 隐绿原酸; D. 3,4-二咖啡酸奎宁酸; E. 3,5-二咖啡酰奎宁酸; F. 4,5-二咖啡酰奎宁酸。

图 2　6 种绿原酸类成分的 MS^2 质谱图

Fig. 2　MS^2 spectra of six chlorogenic acids

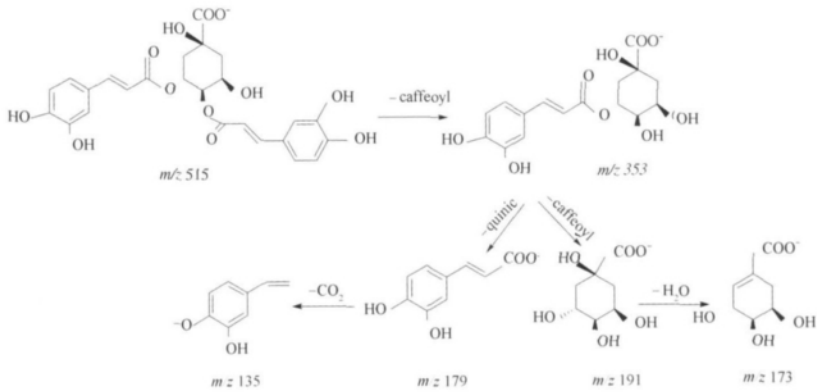
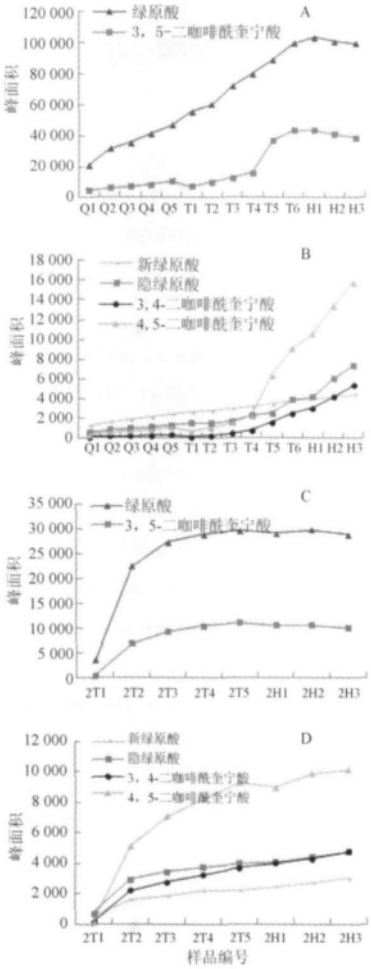


图 3　4,5-二咖啡酰奎宁酸的裂解途径

Fig. 3　Fragmentation pathways of 4,5-dicaffeoylquinic acid

咖啡酸含量较低,不将其纳入研究范围; 金银花中的有机酸以绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎宁酸为主,

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A，B. 一煎；C，D. 二煎。

图 4　金银花水提过程中绿原酸类成分变化

Fig. 4　Transformation of chlorogenic acids in *Lonicera japonica* during the process of extraction

若将 6 种绿原酸类成分在同一折线图中描绘，则不能清晰呈现其他 4 种成分的变化趋势，故将它们分为 2 组观察变化规律。

绿原酸类成分结构母核相同，在受热等外在条件下可以通过分子内酯基迁移发生异构化[9]。随着提取的进行，3 个双咖啡酰奎宁酸类成分之间的比例发生较大变化，3，5-二咖啡酰奎宁酸所占比例逐渐下降，其他 2 种所占比例逐渐升高，推测其原因可能是提取过程到达一定阶段后，3，5 二咖啡酰奎宁酸会异构化为另外 2 种成分，与文献[10]结论一致。

水提醇沉法是含金银花的中药制剂的常用提取方法，本实验主要是针对水提阶段绿原酸类成分的变化规律进行研究，涉及的参数主要是温度和时间，但在整个水提醇沉工艺过程中，影响该类成分含量的因素还有很多，如乙醇用量、醇沉浓度、搅拌速度等[11]，尚待进一步研究。

[参考文献]

[1] 王燕，王智民，林丽美，等. 金银花及其同属植物化学成分研究进展[J]. 中国中药杂志，2008，33(8)：968.

[2] 陈有根，王志斌，戴俊东. 3 种经典工艺生产的金银花提取物中绿原酸类成分含量比较[J]. 中成药，2007，29(3)：362.

[3] 刘意，曾桂先，宋凤兰，等. 绿原酸稳定性研究[J]. 辽宁化工，2009，38(4)：226.

[4] 李小芩，孙晓红，蔡爽，等. 采用 UPLC-ESI-MS/MS 以及主成分聚类分析研究不同品种金银花的化学成分及其差异[J]. 药学学报，2009，44(8)：895.

[5] 田晨煦，徐小平，廖丽云，等. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定绿原酸及其相关杂质[J]. 色谱，2007，25(4)：496.

[6] 张丽媛，李遇伯，李利新，等. RRLC-Q-TOF/MS 分析金银花的化学成分[J]. 中南药学，2012，10(3)：204.

[7] 阎东海. 提取三要素在金银花提取过程中对氯原酸提出率及稳定性的相关性研究[J]. 中国中药杂志，1994，19(9)：545.

[8] 刘永刚，卢建秋，高晓燕，等. 高效液相色谱-电喷雾电离质谱法分析不同时期金银花中酸性成分及含量[J]. 中国药房，2006，17(22)：1756.

[9] 罗奇志，王有至，罗佳波. 绿原酸水解产物的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析[J]. 药物分析杂志，2011，31(7)：1345.

[10] Ma Yuan-chun, Wang Xiao-qian, Hou Fei-fei, et al. Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis and studies on the stability of Shuang-Huang-Lian preparations[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54: 265.

[11] 陈俊. 金银花提取物的物质基础和制备工艺研究[D]. 杭州：浙江大学，2010.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

中国中药杂志
China Journal of Chinese Materia Medica

Regularity of changes in chlorogenic acids in *Lonicera japonica* extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS

ZHANG Qian[1,2], ZHAGN Jia-yu[2], SUI Cheng-lin[2], SHI Xin-yuan[2], QIAO Yan-jiang[2], LU Jian-qiu[1*]

(1. *Center of Scientific Experiment*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029, *China*;
2. *School of Chinese Pharmacy*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100102, *China*)

[Abstract] **Objective:** To analyze chlorogenic acids contained in *Lonicera japonica* water extracts, and to investigate the regularity of changes in chlorogenic acids during the water extraction process. **Method:** Agilent Zorbax SB-C_{18} analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was eluted with 0.1% formic acid (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL · min^{-1}. The detection wavelength was 327 nm and the column temperature was 30 ℃. Negative MS^n mode was adopted in mass spectrum for ananlyzing the 22 samples of *L. japonica* water extracts. **Result:** Caffeic acid and six organic acids were accurately identified from the water extracts. During the extraction, the contents of chlorogenic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid became stable or gradually decreased after reaching the highest value. The contents of other components had long been increasing, but with a decreasing rate of change. **Conclusion:** This study provides basis for improving the production process of traditional Chinese medicine preparations containing *L. japonica*.

[Key words] *Lonicera japonica*; water extraction process; chlorogenic acids; HPLC-DAD-ESI-MS/MS; regularity of change

doi: 10.4268/cjcmm20122312

[责任编辑 马超一]

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net