

# UFLC-LCMS-IT-TOF对 双黄连注射液的检测

No.LCMS-IT-TOF-012

**摘要：** 本文使用UFLC快速液相缩短分析时间，使用LCMS-IT-TOF离子阱飞行时间串联质谱对双黄连注射液进行全面的定性分析，通过精确分子量信息鉴定出了20种主要组分，通过多级碎片对它们进行了结构确认，并分析了各组分可能的裂解途径和结构。

**关键词：** LCMS-IT-TOF 双黄连口服液

双黄连注射液是由金银花（双花）、黄芩和连翘三味中药材经提取纯化而制成的中药注射剂，临床上主要用于外感风热引起的发热、咳嗽、咽痛，适用于病毒及细菌感染的上呼吸道感染、肺炎、扁桃体炎、咽炎等，在临床上应用较为广泛，疗效确切。

由于双黄连注射液中的化学成分来自于三味不同的药材，复杂多样，因此要全面地对其化学成分进行研究，难度很大。LCMS-IT-TOF具有离子阱和飞行时间质谱的双重优点，可以得到多级的高质量数准确性和高分辨率的信息，MS或MS<sup>n</sup>可以提供大量关于化合物的结构信息及其准确的质量数，诸如分子量、分子式、碎片离子等，通过对这些信息的综合分析，可以推断该化合物的裂解方式，进而推断其可能的化学结构，从而全面分析组分中的化学组成。原注射液标准中，化学成分方面仅对制剂中的绿原酸、黄芩苷和连翘苷进行了控制，而未对其他成分进行研究，临床应用的安全性存在隐患。因此，全面地研究注射剂中主要的化学成分具有重要意义。

本文采用快速液相缩短分析时间，使用LCMS-IT-TOF对双黄连注射液进行定性分析，鉴定出其中20种主要成分的分子结构式。

## ■ 实验部分

### 1、仪器设备

岛津超快速液相色谱仪(UFLC)和离子阱飞行时间串联质谱仪(LCMS-IT-TOF)。具体配置为：输液泵LC-20AD×2，在线脱气机DGU-20A3，自动进样器SIL-20A8，柱温箱CTO-20AC，控制器CBM-20A，离子阱飞行时间串联质谱仪LCMS-IT-TOF，工作站LCMSsolution V3.50。

### 2、试剂与样品

试剂：乙腈，HPLC级；纯水，Milli-Q超纯水仪制备得到；甲酸，LCMS级；所有试剂和样品需用0.45 μm以下滤膜过滤。

样品：双黄连口服液超纯水稀释10倍后过滤

### 3、试验条件

#### 色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS，2.0 mm I.D. × 75 mm L.，2.2 μm；

流动相：A相含0.1%甲酸的水溶液，B相含0.1%甲酸的乙腈；

流速：0.2 mL/min；柱温：40℃；

检测波长：350nm；进样量：5 μL；

梯度洗脱程序：见下表

表1 梯度洗脱程序

时间(min)	0	5	10	30	33	33.01
B% (v)	5	14	14	50	50	5
A% (v)	95	86	86	50	50	95

## 质谱条件

离子源：ESI，负离子扫描；扫描范围： $MS^1m/z100-1000$ ， $MS^2m/z50-1000$ ， $MS^3m/z50-500$ ； $MS^4m/z50-500$ 加热模块温度：250℃；CDL温度：250℃；雾化气流速：1.5L/min；干燥气流速：10L/min；离子源电压：-3.5 kV；检测器电压：1.70kV；质量数校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。

## 结果与讨论

### 1、色谱分析结果

双黄连注射液成分复杂，不易分离。即使考虑到使用质谱做检测器可以适当降低分离度，在常规液相中，仍然需要110分钟的分离时间。为了提高效率，本次试验使用岛津的快速液相UFLC-XR作为分离工具，将分离时间缩短为35分钟，节省了2/3的时间，并保留了相同的分离度。

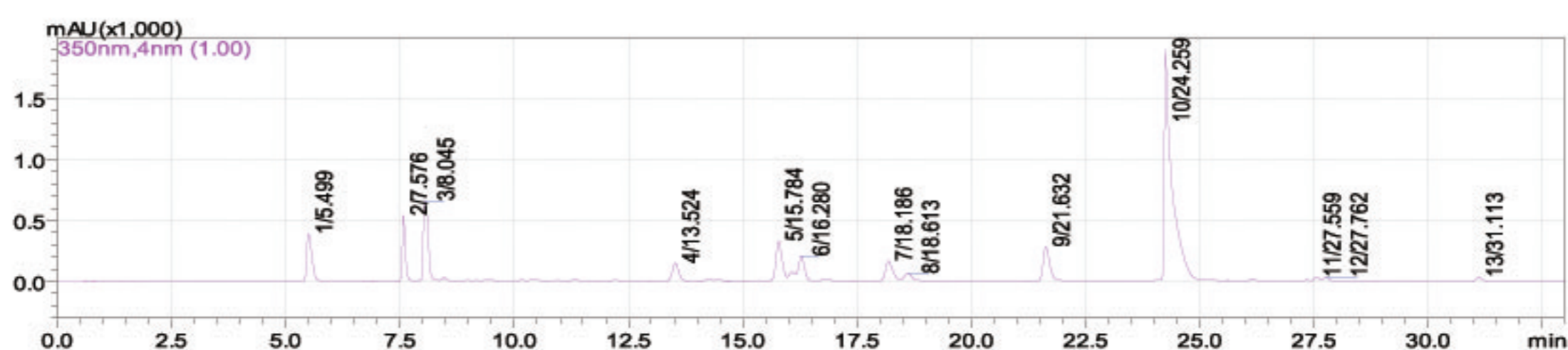


图1 双黄连注射液350nm下的色谱图

350nm检测下，共检测出13种主成分，考虑到双黄连注射液原料之一金银花中含有的有机酸成分在350nm下没有吸收和有些组分未分开的可能，所以实际成分多于13种。

### 2、质谱分析结果

根据文献中已知双黄连注射液的可能成分及部分标准品的分析确认，确定出其中20种有效成分，这20种有效成分的质量色谱图见图2，主要情况见表2：

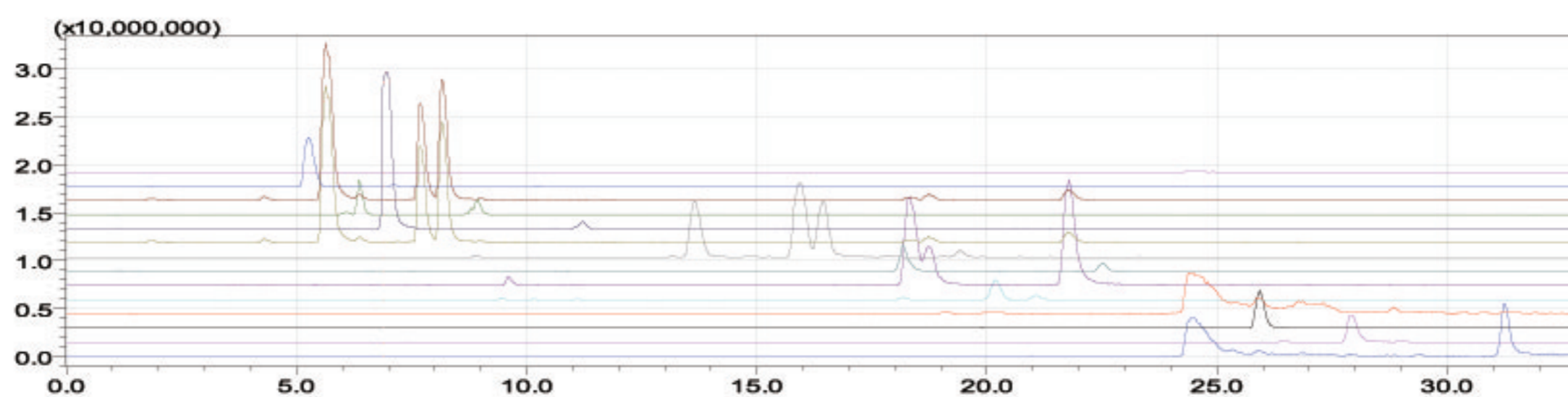


图2 双黄连注射液质量色谱图

表2 检测到的20种离子列表

ID	组分名称	保留时间 (min)	分子式	[M-H]-	多级碎片
				与真实值偏差	
1	表马钱子酸	5.54	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	375.1294 0.8ppm	MS <sup>2</sup> : 213.0876; MS <sup>3</sup> : 169.0900; MS <sup>4</sup> : 151.0623
2	新绿原酸	5.86	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0886 2.27ppm	MS <sup>2</sup> : 191.0576, MS <sup>3</sup> : 93.0384
3	去甲基连翘脂苷 E	6.35	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	447. 1496 2.60ppm	MS <sup>2</sup> : 315.1104, MS <sup>3</sup> : 135.0489
4*	连翘脂苷 E	6.89	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	461.1673 1.73ppm	MS <sup>2</sup> : 315.1104, MS <sup>3</sup> : 135.0489
5	绿原酸	7.69	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0887 0.28ppm	MS <sup>2</sup> : 191.0577, MS <sup>3</sup> : 127.0416
6	隐绿原酸	8.17	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0887 2.10ppm	MS <sup>2</sup> : 173.0477, MS <sup>3</sup> : 93.0376
7	连翘酯苷 A 同分异构体	13.59	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	623.2009 4.49ppm	MS <sup>2</sup> : 461.1688, MS <sup>3</sup> : 315.1080
8	连翘酯苷 A 同分异构体	15.91	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	623.2009 4.49ppm	MS <sup>2</sup> : 461.1688, MS <sup>3</sup> : 315.1080
9*	连翘酯苷 A	16.43	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	623.2009 4.49ppm	MS <sup>2</sup> : 461.1688, MS <sup>3</sup> : 315.1080
10	松脂素-4'-O型β-D-葡萄糖苷	18.14	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	519.1900 5.10ppm	MS <sup>2</sup> : 357.1353, MS <sup>3</sup> : 151.0437 MS <sup>4</sup> : 136.0189
11	异绿原酸 B	18.26	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1198 0.50ppm	MS <sup>2</sup> : 353.0904, MS <sup>3</sup> : 191.0579
12	异绿原酸 C	18.76	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1198 0.50ppm	MS <sup>2</sup> : 353.0904, MS <sup>3</sup> : 191.0579
13	异绿原酸 A	21.82	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515.1198 0.50ppm	MS <sup>2</sup> : 353.0904, MS <sup>3</sup> : 191.0579
14	表松脂素-4"-O型β-D-葡萄糖苷	20.18	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>13</sub>	565.1928a 0.19ppm	MS <sup>2</sup> : 357.1360, MS <sup>3</sup> : 151.0437
15	黄芩苷	24. 49	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	445. 0789 2.98ppm	MS <sup>2</sup> : 269.0467, MS <sup>3</sup> : 251.0374 MS <sup>4</sup> : 223.0415
16*	连翘苷	25. 97	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	579. 2087a 0. 69	MS <sup>2</sup> : 371.1499 MS <sup>3</sup> : 356.1255 MS <sup>4</sup> : 135.0516
17	去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷	26.78	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	445. 0789 2.98ppm	MS <sup>2</sup> : 269.0467, MS <sup>3</sup> : 251.0374 MS <sup>4</sup> : 223.0415
18	黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷	27.28	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	445. 0789 2.98ppm	MS <sup>2</sup> : 427.0711, MS <sup>3</sup> : 269.0462 MS <sup>4</sup> : 251.0357
19	汉黄芩苷	27.99	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	459. 0942 1. 96ppm	MS <sup>2</sup> : 283.0627, MS <sup>3</sup> : 268.0397 MS <sup>4</sup> :239.0360
20*	黄芩素	31.32	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269.0455 0.74ppm	MS <sup>2</sup> : 223.0401, MS <sup>3</sup> : 195.0473

\*表示有对照品

a 表示该离子为[M+HCOO]<sup>-</sup>

这20种有效成分的类型可分为：有机酸类化合物、木质素类化合物、苯乙醇苷类，黄酮类化合物。

### 1) 有机酸类化合物

有机酸类化合物是金银花的抗菌有效成分，主要分为咖啡酰奎宁酸类和其它有机酸，常以此类物质的含量高低来评价金银花的质量优劣。

本次检测在样品中共检测出六种奎宁酸类衍生物（2、5、6、11、12、13号组分）和一种其它酸类（1号组分）。

2、5、6号组分对应的保留时间分别为5.86min，7.69min，8.17min，在负离子模式下，它们均可产生相同的 $[M-H]^-$ 离子（ $m/z=353.088$ ），11、12、13号组分对应的保留时间分别为18.3min、18.8min和21.8min，均产生了相同的 $[M-H]^-$ 离子（ $m/z=515.119$ ）以及 $[M-H-glc]^-$ 离子（ $m/z=353.090$ ），由此可以确定，前者为单咖啡酰奎宁酸类，后者为二咖啡酰奎宁酸类。

参考文献，通过比较ESI-MS<sup>2</sup>的碎片离子的异同，可以确定单咖啡酰奎宁酸类上乙酰化的位置，一般说来，当乙酰化在3-和5-位时，都会产生[奎宁酸-H]<sup>-</sup>离子（ $m/z=191.057$ ）的基峰离子，但取代位置在3-位时，[咖啡酰-H]<sup>-</sup>（ $m/z=179.037$ ）丰度较5-位高，而当乙酰化在4-位时，[奎宁酸-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>离子（ $m/z=173.047$ ）是ESI-MS<sup>2</sup>的基峰离子，由此可以判断，2、5、6号组分分别为新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸。

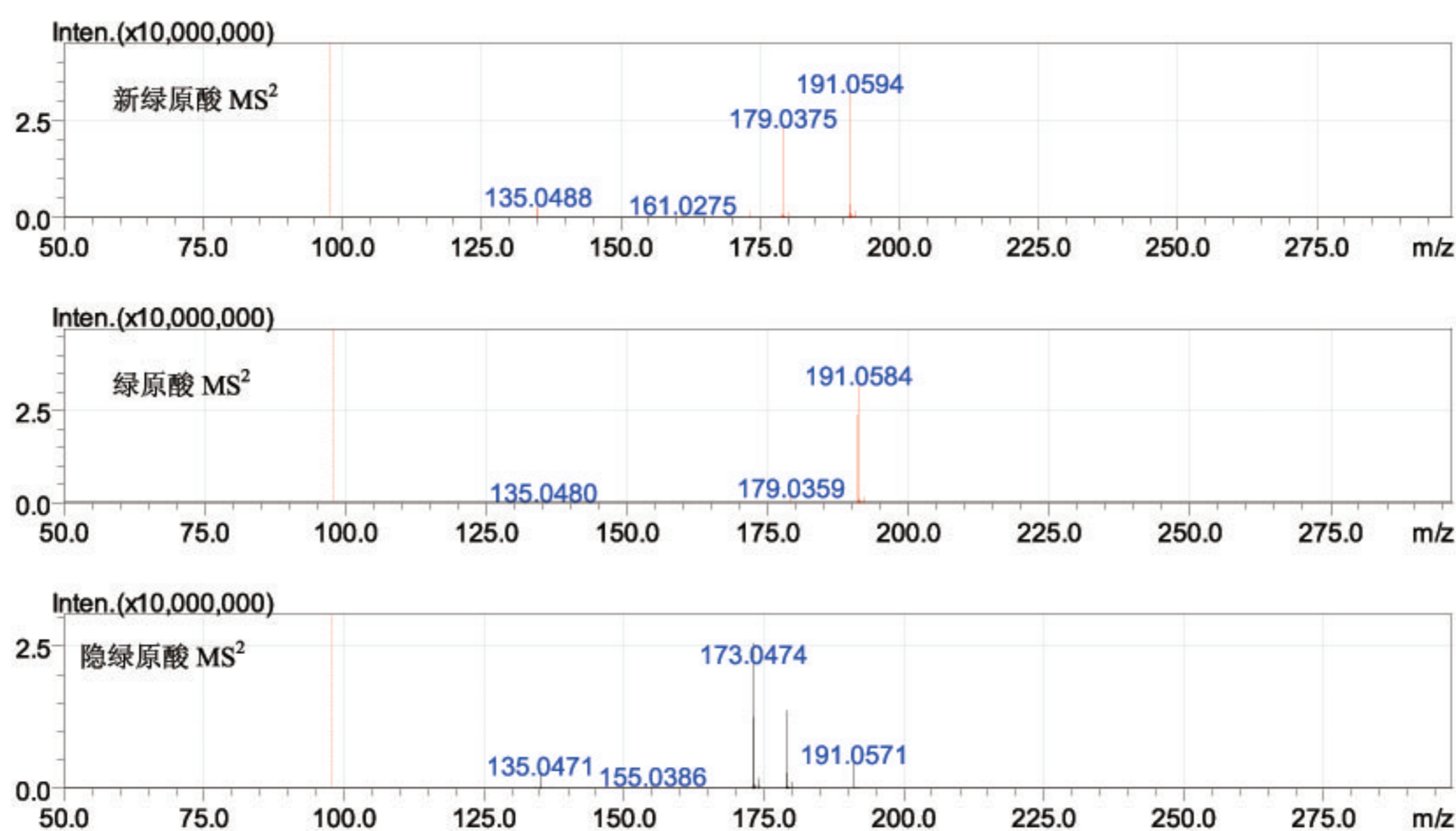


图3 2、5、6号组分MS<sup>2</sup>质谱图

根据多级质谱图的精确质量数信息可以推导出新绿原酸的裂解过程：

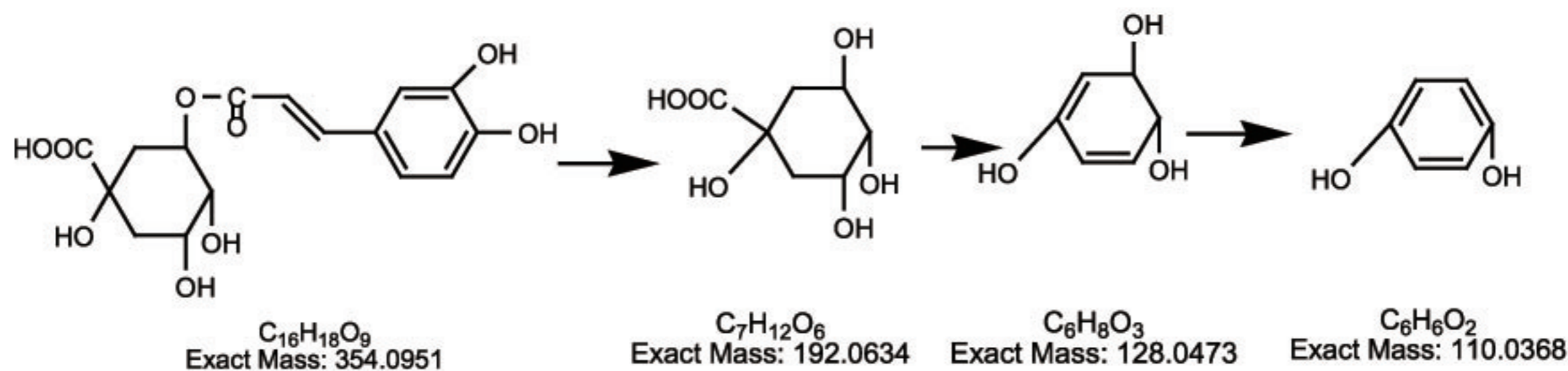


图4 负离子模式下绿原酸可能的质谱裂解途径

11、12、13号组分的保留时间分别为18.26min，18.76min，21.82min，它们的碎片离子种类和数量基本相同，但丰度存在差别。12号组分在MS<sup>3</sup>谱中以 $m/z$ 191.057为基峰，参考文献，可以推断咖啡酰基取代位置为3-，5-，即异绿原酸C。其它两个组分，MS<sup>3</sup>谱中以 $m/z$ 173.047， $m/z$ 179.038的丰度较高，可以确定含有4-咖啡酰基取代基。根据在反向柱上的洗脱顺序，可以推断分别为异绿原酸B和异绿原酸A。

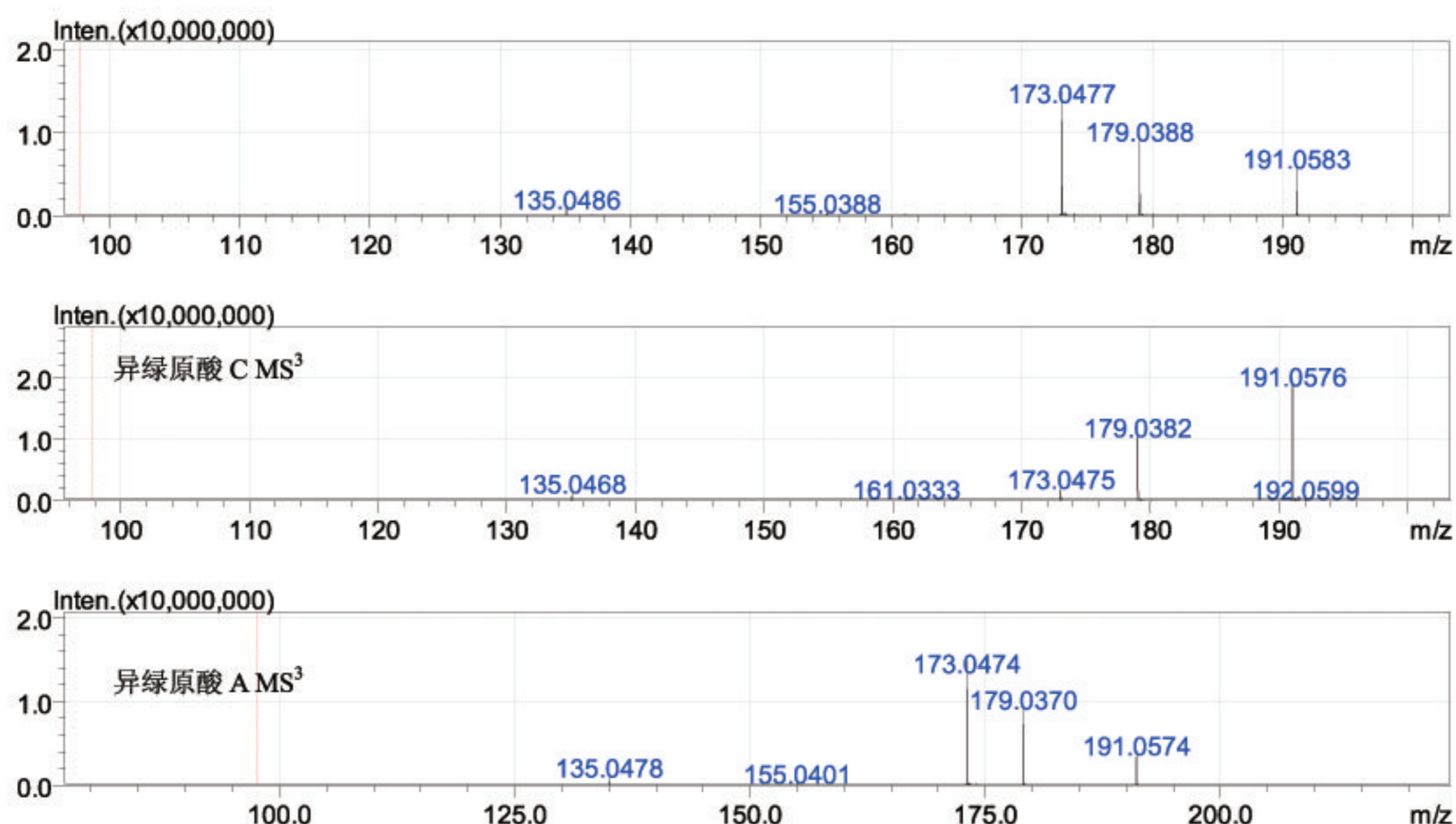


图5 11、12、13号组分MS2质谱图

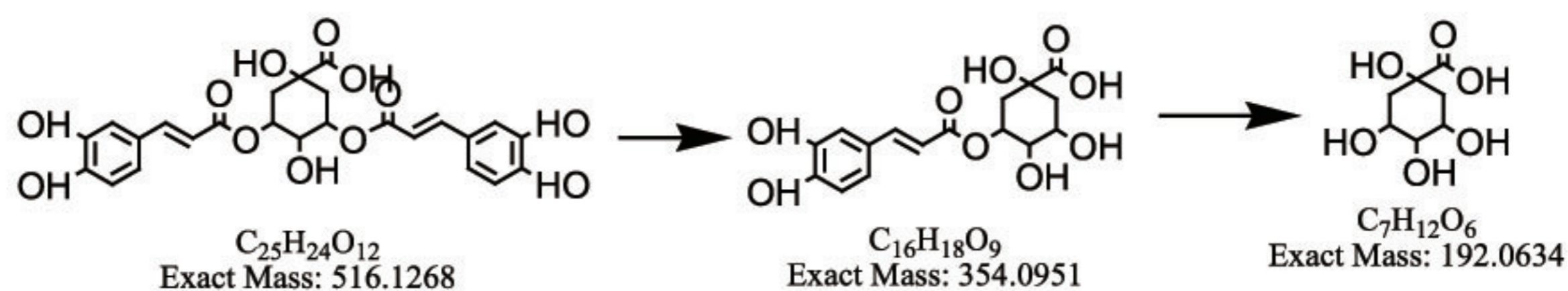


图6 负离子模式下异绿原酸C可能的质谱裂解途径

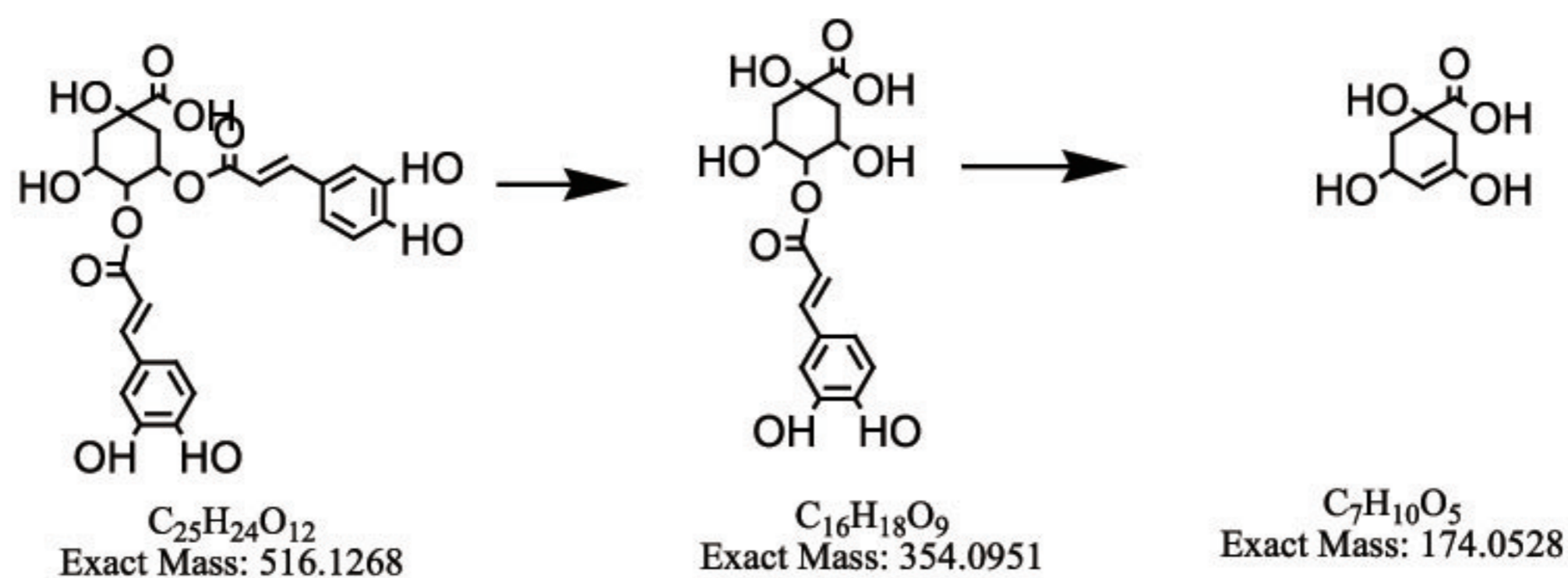
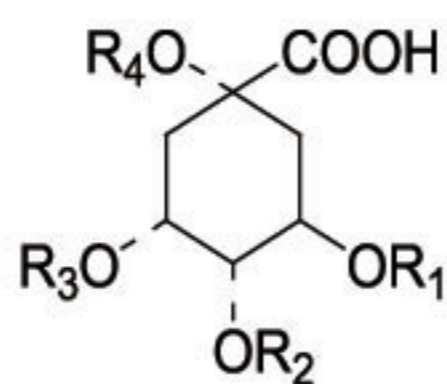


图7 负离子模式下异绿原酸A、B可能的质谱裂解途径



2	新绿原酸	R1=Caffeoyl	R2=R3=R4=H
4	绿原酸	R3=Caffeoyl	R1=R2=R4=H
5	隐绿原酸	R2=Caffeoyl	R1=R2=R4=H
11	异绿原酸 C	R2= R3=Caffeoyl	R1= R4=H
12	异绿原酸 B	R1= R3=Caffeoyl	R3=R4=H
13	异绿原酸 A	R1= R2=Caffeoyl	R2= R4=H

图8 咖啡酰奎宁酸类化合物的结构式

1号组分的保留时间为5.54分钟,在负离子模式下,可观察到 $[M-H]^-$ 离子( $m/z=375.1294$ ),在它的多级质谱中,产生了 $[M-H-glc]^-$ ( $m/z213.0876$ )、 $[M-H-glc-CO_2]^-$ ( $m/z169.0903$ )、 $[M-H-glc-CO_2-H_2O]^-$ ( $m/z151.0798$ ),根据这些信息,结合参考文献,推测它为8-表马钱子酸,其可能的裂解过程如下:

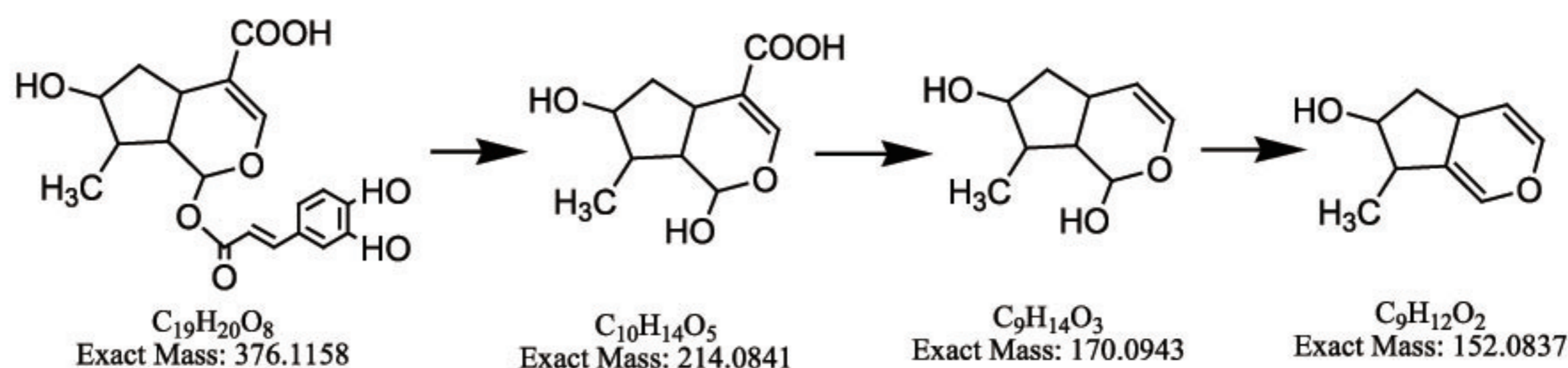


图9 负离子模式下8-表马钱子酸可能的质谱裂解途径

## 2) 木质素类化合物

木质素类化合物是存在于植物纤维中的一种芳香族高分子化合物,具有消炎、止痛的作用。本次检测在样品中共检测出三种此类物质,即总表中10、14、17号组分

化合物10、14号是一对同分异构体,它们的保留时间分别为18.26min、20.18min,但它们的基峰离子有所不同,10号产生的是 $[M-H]^-$ 离子( $m/z=519.1900$ ),14号产生的则是 $[M+HCOO]^-$ 离子( $m/z=565.1928$ )。它们在 $MS^2$ 有相同的 $[M-H-Glc]^-$ 离子( $m/z=357.135$ ), $MS^3$ 有相同的 $m/z=151.043$ 的碎片离子,说明它们的结构非常相似。根据文献以及洗脱顺序,推测它们分别为松脂素-4'-O型 $\beta$ -D-葡萄糖苷和表松脂素-4''-O型 $\beta$ -D-葡萄糖苷。17号化合物通过与对照品对照确定为连翘苷。

上述三个化合物的结构式见下图,11号组分的可能裂解过程见

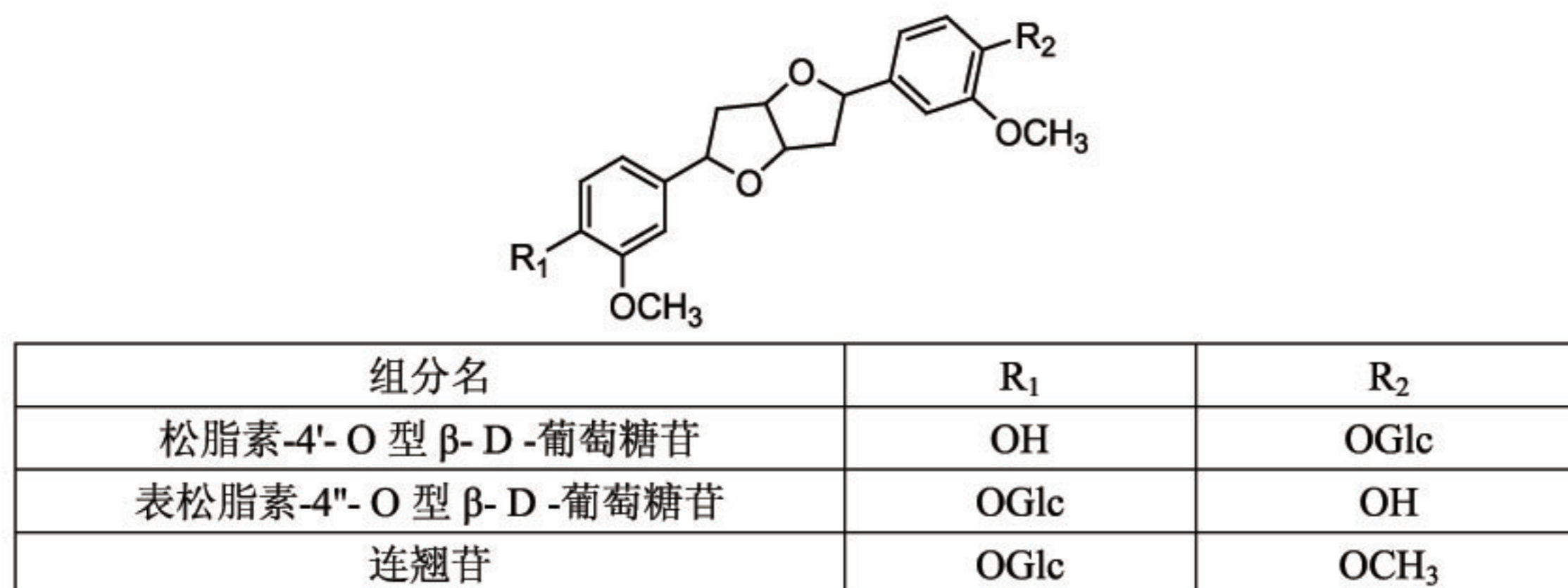


图10 木质素类化合物的结构式

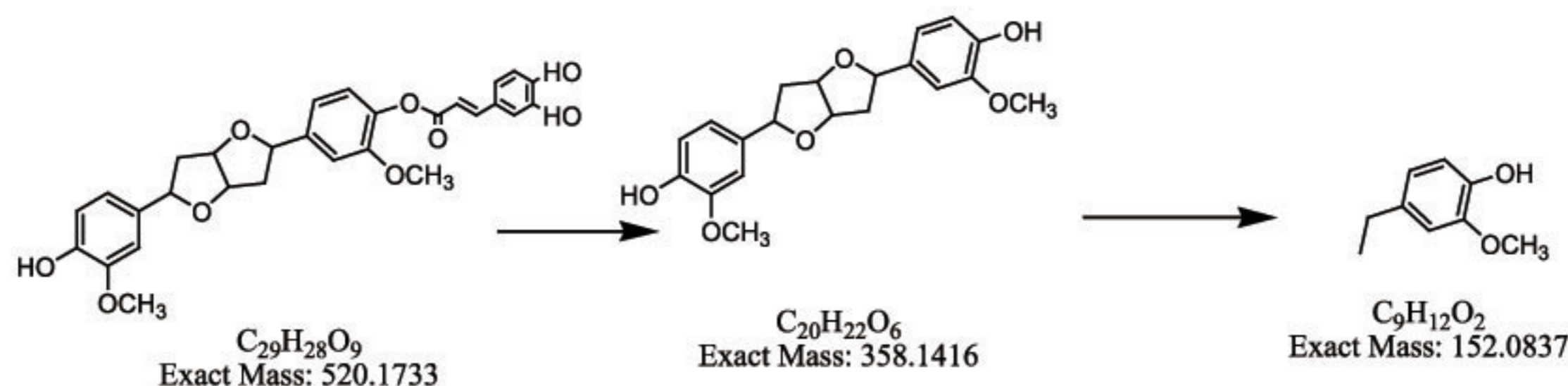


图11 负离子模式下松脂素-4'-O型 $\beta$ -D-葡萄糖苷可能的质谱裂解途径

## 3) 苯乙醇苷类化合物

苯乙醇苷类化合物是一类含(羟基、甲氧基)取代苯乙基和(羟基、甲氧基)取代肉桂酰基,通常以 $\beta$ -葡萄糖为母核的含有酯键及氧苷键的天然糖苷,广泛存在于连翘中。近年来许多研究表明,该类化合物具有抗菌、抗炎、抗病毒等作用,尤其以抗菌活性最为显著。

本次检测在样品中共检测出5种苯乙醇苷类化合物，即总表中3, 4, 7, 8, 9。它们的保留时间分别为24.49min, 26.78min, 27.28min, 27.99min, 31.32min。它们都有共同的碎片离子 $m/z$ 461.1688,  $m/z$ 315.1080,  $m/z$ 135.0489, 说明它们有相同的母核，只是取代基不同。根据标准品的出峰时间和裂解规律，确认4号和9号分别为连翘脂苷E和连翘脂苷A。3号比连翘脂苷E少14D, 猜测可能是少一个甲基-CH<sub>3</sub>, 7号、8号的分子量与连翘脂苷A相同, 碎片离子也基本相同, 因此推测, 它们为连翘脂苷A的同分异构体, 可能是咖啡酰基和鼠李糖残基的取代位置有所差异, 但具体部位还有待进一步研究。

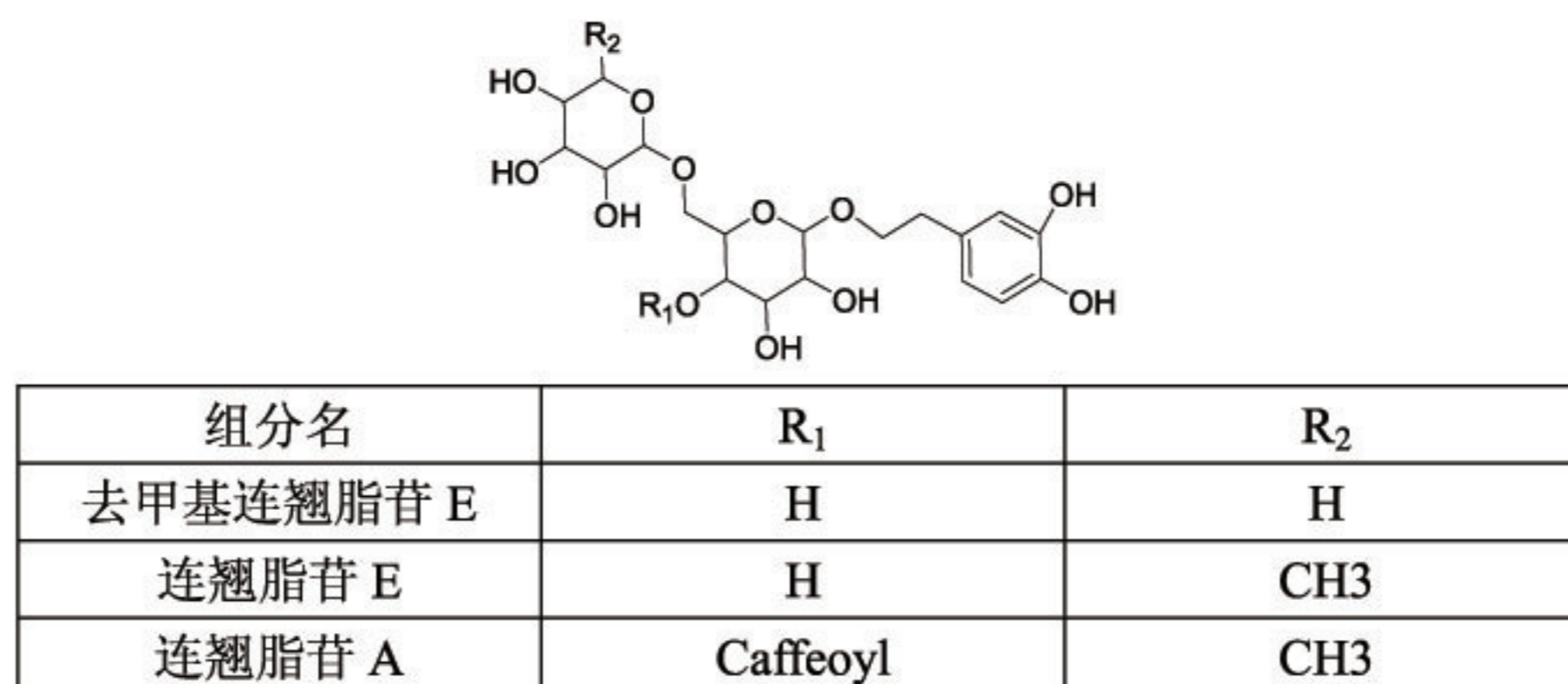


图12 苯乙醇苷类化合物的结构式

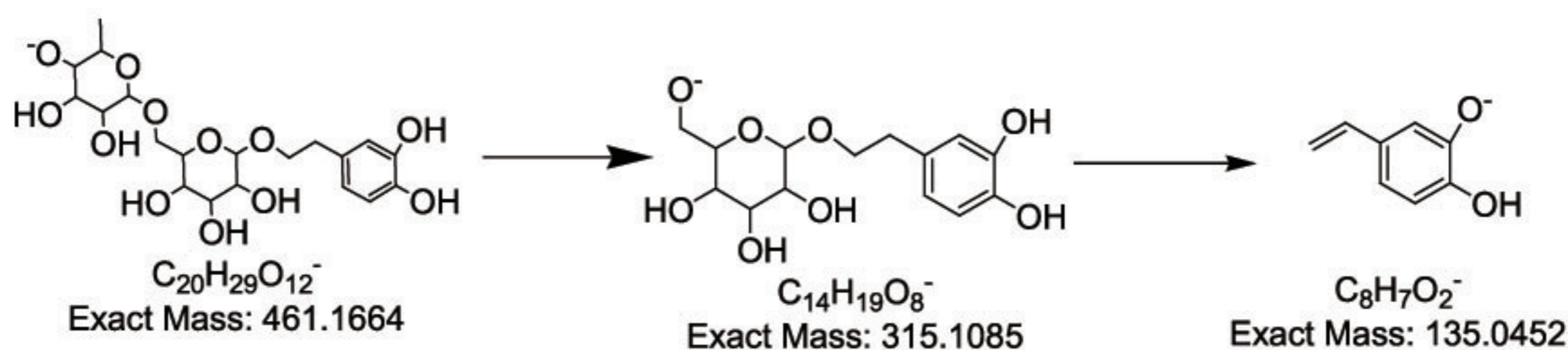


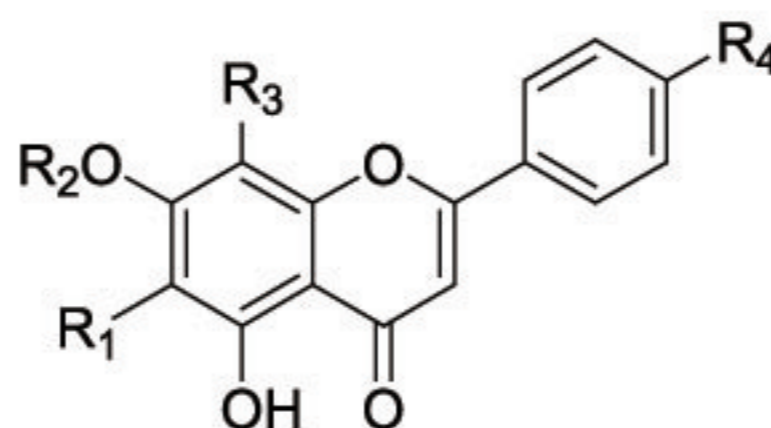
图13 负离子模式下连翘脂苷E可能的质谱裂解途径

#### 4) 黄酮及其苷类化合物

黄酮及其苷类是金银花和黄芩中的主要成分，具有多种药理作用，其中包括：抗氧化作用、消炎作用等。本次检测在样品中共检测出五种黄酮及其苷类化合物，即总表中15、17-20号组分。

15、17、18号组分对应的保留时间分别为24.49min、26.78min和27.28min，均产生了相同的[M-H]<sup>-</sup>离子 ( $m/z=445.0789$ )，碎片离子的种类和数量基本相同，说明它们具有相同的母核，但碎片的丰度存在差别，15、17号峰MS<sup>2</sup>的基峰为 $m/z$ 269.0467，18号峰MS<sup>2</sup>的基峰为 $m/z$ 427.0711，说明取代基的位置有所不同，根据文献及洗脱顺序，推测它们分别为黄芩苷、去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷、黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷。

19号组分与以上组分相同，产生[M-176]<sup>-</sup>离子，中性丢失一分子葡萄糖醛酸，通过与已知黄酮类化合物对比，推断该峰为汉黄芩苷。通过与标准品对比，20号组分为黄芩素。



ID	组分名	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
15	黄芩苷	OH	Glucuronide	H	H
17	去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷	H	Glucuronide	OH	H
18	黄芩素-6-O-葡萄糖醛酸	OGlucuronide	H	H	H
19	汉黄芩苷	H	Glucuronide	OCH <sub>3</sub>	H
20	黄芩素	OH	H	H	H

图14 苯乙醇苷类化合物的结构式

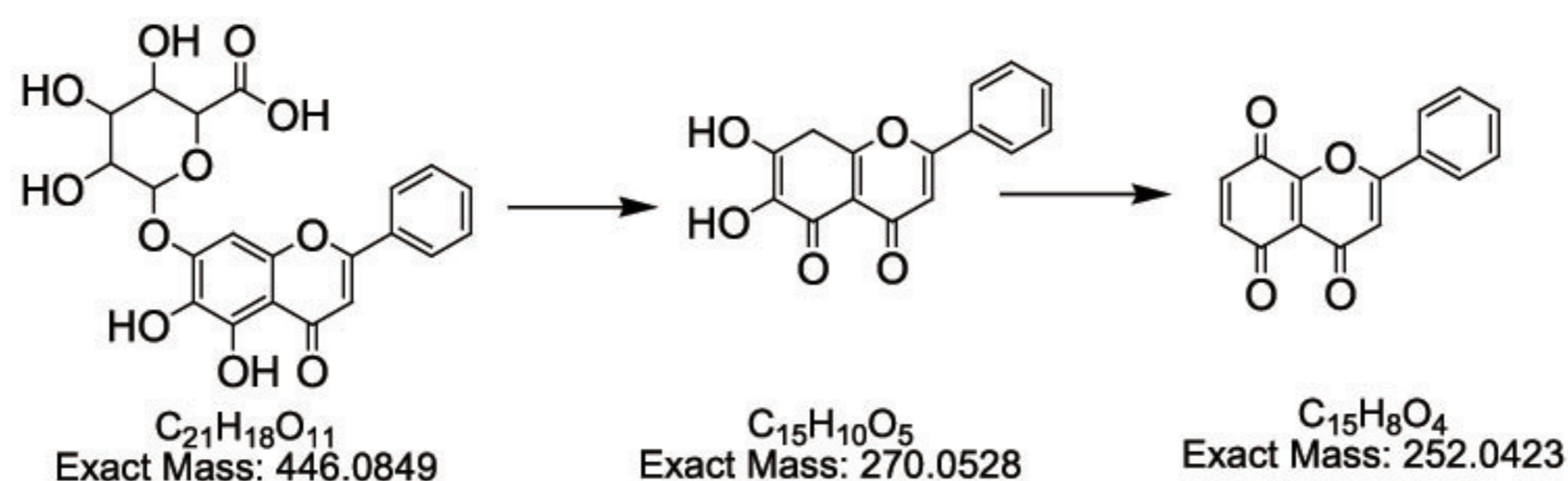


图15 负离子模式下黄芩苷可能的质谱裂解途径

## 结论

使用LCMS-IT-TOF系统对双黄连注射液进行定性分析，在复杂基底中检测到黄酮及其苷类化合物、苯乙醇苷类化合物、木质素类化合物和有机酸类化合物四大类20种化合物，分子式预测结果的误差均小于6ppm，多达四级的碎片提供了可靠的结构信息，使各组分的预测结果和碎片信息与标准品和文献相吻合，从而提高了定性的准确性。此次试验证明，LCMS-IT-TOF是对双黄连注射液这类复杂化合物的全面定性的强有力的工具。