

· 化学与分析 ·

基于 HPLC-ESI-MS/MS 技术分析痰热清胶囊和痰热清注射液化学成分的差异

张振华¹, 钟苹苹², 徐英^{1, 3*}

(1. 上海凯宝药业股份有限公司, 上海 201401; 2. 上海中医药大学, 上海 201203;
3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 阐明痰热清的化学成分以及痰热清胶囊与痰热清注射液化学成分的差异。方法: 采用高效液相色谱法串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)技术, 乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾离子源负离子模式下采集数据, 并通过准分子离子及二级碎片离子对化学成分进行鉴定。结果: 痰热清胶囊中鉴定有机酸类成分7个、黄酮类成分10个、环烯醚萜类成分4个、木脂素类成分3个、苯乙醇苷类成分9个、胆汁酸类成分4个以及未知成分4个等共41个化合物。其中, 经由对照品确证化学结构25个, 推测化合物结构16个(含4个未知成分)。痰热清注射液中共鉴定化合物23个, 相比胶囊注射液中连翘种苷异构体(3个), 獐芽菜苷, 连翘酯苷B, 异连翘酯苷A, 连翘酯苷A, 芦丁, 连翘种苷A异构体(2个), 金丝桃苷, aldosecologanin, 松脂素- β -D-葡萄糖苷/表松脂素-4'-O-葡萄糖苷/马台树脂醇-4'-O-葡萄糖苷异构体(2个), 连翘苷, 黄芩素, 牛磺鹅去氧胆酸和黄芩提取物中所含的1个未知化合物等18个成分均缺失, 可能是注射液无菌生产过程采用活性炭吸附、高温灭菌、配液等工艺以及过程控制中采用超滤技术, 从而造成两种制剂化学成分的差异。结论: 通过该研究建立的 HPLC-ESI-MS/MS 分析方法, 能有效表征痰热清胶囊和痰热清注射液的化学成分差异, 可以为两种制剂的质量控制提供依据。

[关键词] 痰热清胶囊; 痰热清注射液; 化学成分; 差异分析; 高效液相色谱串联质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0044-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120044

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1012.014.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:12

Comparison of Chemical Compositions Between Tanreqing Capsule and Tanreqing Injection by HPLC-ESI-MS/MS

ZHANG Zhen-hua¹, ZHONG Ping-ping², XU Ying^{1, 3*}

(1. Shanghai Kaibao Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201401, China;

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

3. Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the components in Tanreqing and clarify the differences between Tanreqing capsule and Tanreqing injection in chemical compositions. **Method:** An HPLC-ESI-MS/MS method was established and separation was performed with acetonitrile and 0.1% formic acid as mobile phase for gradient elution. Mass spectrometric data were obtained in electrospray ionization (ESI) negative ion mode, and the chemical components were identified with quasi-molecular ions and secondary fragment ions. **Result:** Forty-one compounds including organic acids (7 compounds), flavonoids (10 compounds), iridoids (4 compounds), lignans

[收稿日期] 20161018(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403089)

[第一作者] 张振华, 质量工程师, 从事中药质量控制研究, Tel:021-37572051, E-mail:kbzzh@sina.com

[通讯作者] * 徐英, 博士, 从事药物分析及新药研发, Tel:021-37572030-8031, E-mail:skyxu_1983@163.com

(3 compounds), phenylethanoid glycosides (9 compounds), bile acids (4 compounds) and 4 unknown components were detected in Tanreqing capsule by HPLC-ESI-MS/MS. Moreover, the chemical structures of 25 compounds were identified, and the chemical structures of 16 compounds (including 4 unknown components) were inferred by their fragmentation patterns. However, only twenty three compounds were found in Tanreqing injection with the losses of 18 chemical compositions including three isolates of suspensaside, sweroside, forsythoside B, isoforsythiaside A, forsythiaside A, rutin, two isolates of suspensaside A, hyperin, aldosecologanin, two isolates of pinoresinol- β -D-glucoside/epipinoresinol-4'-O-glucoside/matairesinol-4'-O-glucoside, phillyrin, baicalein, taurochenodeoxycholic acid (TCDCa) and one unknown compound derived from Scutellariae Radix extract. These differences in compositions between the two preparations may be caused by active carbon adsorption, high temperature sterilization, and blending system in aseptic production process and ultrafiltration technique in process control of Tanreqing injection product. **Conclusion:** The different chemical constituents in Tanreqing capsule and injection were characterized by the established HPLC-ESI-MS/MS method, which could provide the basis for the quality control of two preparations.

[**Key words**] Tanreqing capsule; Tanreqing injection; chemical components; comparative analysis; HPLC-ESI-MS/MS

痰热清注射液属国家二类新药,由黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花和连翘 5 味中药组成,具有清热解毒、止咳化痰的功效,临床主要用于治疗肺炎早期、急性支气管炎、慢性支气管急性发作及上呼吸道感染等^[1-2]。已有相关化学分析的报道多局限于痰热清注射液中黄芩苷,野黄芩苷,咖啡酸,绿原酸,新绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸,异绿原酸 A, B, C, 熊去氧胆酸,鹅去氧胆酸等主要成分的含量测定。痰热清胶囊于 2013 年上市,目前对其化学成分研究报道较少,尚不清楚胶囊中所含成分的概况^[3-4]。痰热清注射液的标准经过多次修订逐渐完善,而现行的痰热清胶囊标准中仅有薄层鉴别、含量测定等项,指标成分仅有黄芩苷和熊去氧胆酸,难以全面控制胶囊的质量。痰热清注射液和胶囊药材来源一致,制备过程中 5 种提取物的生产工艺也较为类似,但为加强注射液的生产过程控制,保证制剂的无菌水平,相比胶囊的生产工艺,注射液过程控制中额外增加了活性炭吸附、高温灭菌、配液和超滤等生产工艺,因此推测痰热清注射液和胶囊的化学成分可能有差异^[5]。由于山羊角中的成分以氨基酸类为主,本文建立的 HPLC-ESI-MS/MS 方法不适用于该类化合物的检测,故仅对痰热清胶囊和注射液中的黄芩、熊胆粉、金银花和连翘等相关化学成分进行比对,旨在阐明两种制剂化学成分的区别,寻找胶囊中其他指标性成分,对完善痰热清胶囊的质量控制体系具有重要的意义。高效液相色谱串联质谱技术以其简单、快速、有效鉴定中药复杂体系中化合物结构的强大优势,已广泛地应用到化学成分分析的研究

领域^[6-10]。本研究采用 HPLC-ESI-MS/MS 分析技术结合化合物的质谱裂解特征,分别鉴定痰热清胶囊和注射液中的化学成分并进行差异分析,为该胶囊的质量控制提供科学依据。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱系统(日本岛津公司), Finnigan LCQ DECA XP plus 型电喷雾离子阱质谱仪(包含 Xcalibur 2.0.7 SP1 数据处理软件,美国 Thermo Fisher Scientific 公司), BT25S 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司), Milli-Q 型超纯水制备仪(美国 Millipore 公司), Vortex Mixer 型涡旋仪(美国 Labnet 公司), KQ-250DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

痰热清胶囊(批号 1406101,规格 0.4 g/粒),痰热清注射液(批号 1409301,规格 10 mL/支)均由上海凯宝药业股份有限公司提供。29 个对照品的分类、名称、批号及来源见表 1,纯度均 $\geq 98\%$ 。乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,乙酸铵为 LC-MS 级(美国 Fisher 公司),水为 Milli-Q 纯水仪制备得到的超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Ultimate XB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% ~ 18% A; 5 ~ 35 min, 18% ~ 30% A; 35 ~ 72 min, 30% ~ 60% A; 72 ~ 75 min, 60% ~ 90% A; 75 ~ 80 min, 90% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μ L。

2.2 质谱条件 HPLC-ESI-MS/MS 系统,使用电喷

表 1 29 个对照品的分类、名称、批号及来源

Table 1 List of classifications, compound names, lot numbers and sources of 29 reference standards

分类	名称	批号	来源	
有机酸类	绿原酸	140601	上海欣拓贸易	
	新绿原酸	X-014-140801	有限公司	
	隐绿原酸	Y-067-140801		
	异绿原酸 A	140615		
	异绿原酸 B	Y-069-141122-1		
	异绿原酸 C	Y-070-140801		
	咖啡酸	MUST-14100803		
	咖啡酸乙酯	K-008-140730		
	黄酮类	芦丁	L-001-140730-2	上海欣拓贸易
		黄芩苷	150517	有限公司
汉黄芩苷		141214		
野黄芩苷		150024		
黄芩素		150320		
汉黄芩素		150415		
千层纸素 A		MUST-14112104		
千层纸素 A-7-		141007		
O-葡萄糖醛酸苷				
白杨素-7-O-		MUST-15011215		
葡萄糖醛酸苷				
木犀草苷	M-025-140909			
环烯醚萜类	獐芽菜苷	140401	上海欣拓贸易有 限公司	
	连翘苷	150118	上海欣拓贸易有 限公司	
木脂素类	连翘酯苷 A	L-012-140730	上海欣拓贸易有 限公司	
	异连翘酯苷 A	Y-184-140801		
	异连翘酯苷 B	L-0130140730		
胆汁酸类	牛磺胆酸	BCBL3778V	美国 Sigma-	
	胆酸	C57K069	Aldrich 公司	
	熊去氧胆酸	SLBB3885V		
	鹅去氧胆	126K1501		
	牛磺鹅去氧胆酸	4-WHH-172-3	多伦多研究化学 品公司	
	牛磺熊去氧胆酸	PM6ZE-EL	梯希爱(上海)化 成工业发展有限 公司	

雾离子源(ESI)进行负离子模式全扫描;离子源工作参数:电喷雾电压 3 kV,套管透镜补偿电压 10 V,毛细管温度为 350 °C,毛细管电压 15 V,鞘气气流 45 arb,辅助气气流 15 arb,碰撞气氦气,分流比例 2:1,质量数扫描范围 m/z 100 ~ 1 200, MS^2 相对碰撞能为 21% ~ 55%。

2.3 对照品溶液制备 取表 1 中 29 个对照品适量,精密称定,加 70% 甲醇制成每个对照品质量浓度均为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

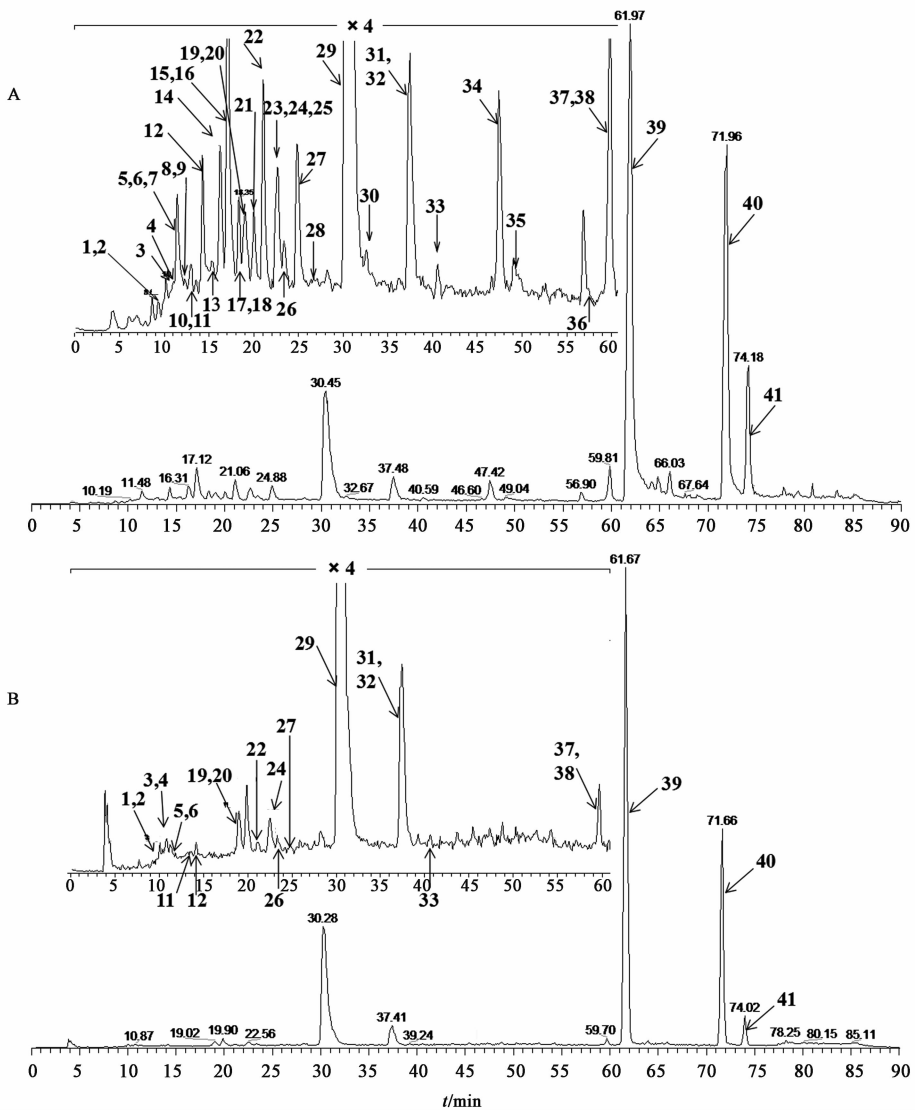
2.4 供试品溶液制备 取痰热清胶囊内容物,研细,混匀,取约 50 mg,精密称定,加入 70% 甲醇

1 mL,超声 15 min,取上清溶液,加 70% 甲醇稀释至 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,经 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过,取续滤液作为胶囊供试品溶液。取痰热清注射液原液 1 mL,经 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过,取续滤液作为注射液供试品溶液。

2.5 对照品 HPLC-ESI-MS/MS 分析 根据化合物母核结构差异将 29 个对照品分为有机酸类、黄酮类、环烯醚萜类、木脂素类、苯乙醇苷类和胆汁酸类。质谱数据显示,獐芽菜苷和连翘苷的一级质谱出现 $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$ (基峰),胆酸、熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的一级质谱出现 $[2\text{M} - \text{H}]^-$ (基峰),其他对照品的一级质谱基峰均为 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。有机酸类二级质谱则容易出现 m/z 191 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^-$, m/z 179 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ 和 m/z 135 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5 - \text{CO}_2]^-$ 等碎片离子;黄酮苷则易丢失糖基生成苷元,而苷元易丢失 H_2O (18 Da), CO (28 Da) 和 CH_3 (15 Da) 等小分子碎片以及母核结构 C 环的 RDA (Retro Diels-Alder, RDA) 裂解;獐芽菜苷、连翘苷和苯乙醇苷以丢失糖基或咖啡酸部分为典型特征;牛磺酸结合型胆汁酸出现丢失 H_2O (18 Da) 和含 S 小分子碎片,游离型胆汁酸则在二级质谱中则易出现 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 等碎片。

2.6 痰热清胶囊化学成分的质谱分析 通过与对照品保留时间、质谱裂解行为比较,确证痰热清胶囊中 25 个化合物的结构;根据 ESI 一级质谱和二级质谱数据,并通过与文献及化合物的裂解行为比对,推测痰热清胶囊中 16 个化合物结构,其中含未知成分 4 个。质谱图见图 1,化合物一级二级质谱数据及鉴定结果详见表 2。

2.6.1 有机酸类化合物结构推导 有机酸类是金银花提取物中主要成分,新绿原酸(3 号峰),隐绿原酸(5 号峰)和绿原酸(6 号峰)的一级质谱均给出 m/z 353 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 的准分子离子峰,二级质谱中 3 个化合物的碎片均为 m/z 191 $[\text{M} - \text{H} - \text{caffeoyl}]^-$, m/z 179 $[\text{caffeic acid} - \text{H}]^-$ 和 m/z 135 $[\text{caffeic acid} - \text{H} - \text{CO}_2]^-$,因裂解途径相同,只能通过与对照品保留时间比对才能确证化学结构^[6-7];同样采用对照品确证咖啡酸 {保留时间 (t_R) = 13.66 min, m/z 179 $[\text{M} - \text{H}]^-$ } (11 号峰)的结构。异绿原酸 B (22 号峰),异绿原酸 A (24 号峰)和异绿原酸 C (27 号峰)互为同分异构体,一级质谱中均出现 m/z 515 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 的准分子离子峰,二级质谱碎片特征也较为相似,以 m/z 353 $[\text{M} - \text{H} - \text{caffeoyl}]^-$ 和 m/z 179 $[\text{caffeic acid} - \text{H}]^-$ 等一些离子碎片为主,因此通过



0 ~ 60 min, 放大因子为 4

图 1 负离子模式下痰热清胶囊 (A) 和痰热清注射液 (B) HPLC-ESI-MS/MS 总离子流

Fig. 1 HPLC-ESI-MS total ion profile of Tanreqing capsule (A) and Tanreqing injection (B) in negative ion mode

保留时间的差异进行相互区别^[6, 8-9]。

2.6.2 黄酮类化合物结构推导 黄酮类化合物大多存在于黄芩和金银花中,黄酮苷以丢失糖基生成苷元为主要特征,而黄酮苷元则依据母核结构的不同产生不同的碎片离子。 $t_R = 17.41$ min (16 号峰)的芦丁,一级质谱数据为 m/z 609 $[M - H]^-$ 的准分子离子峰,二级碎片以 m/z 301 $[M - H - Rha - Glc]^-$ (rhamnose, Rha; glucose, Glc) 苷元碎片为主,同时还存在 m/z 463 $[M - H - Rha]^-$ 和苷元母核 C 环 RDA 裂解后形成的碎片离子 m/z 179^[10-11]。金丝桃苷 (18 号峰),野黄芩苷 (19 号峰),木犀草苷 (20 号峰),黄芩苷 (29 号峰),千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷 (31 号峰),白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷 (32 号峰) 和汉黄芩苷 (33 号峰) 以丢失 Glc 或葡萄糖醛

酸分子分别形成苷元碎片离子 m/z 300, 285, 285, 269, 283, 253, 283 为主,而一些共有碎片离子如 m/z 175 和 m/z 157 在苷元裂解中并未检测到,由此可推知这些碎片并非来源于苷元母核结构断裂,可能是葡萄糖醛酸碎片离子和其继续丢失 1 分子 H_2O 后生成^[7-9, 12]。黄芩素 (35 号峰) 的二级碎片主要为 m/z 251 $[M - H - H_2O]^-$,同时还存在 m/z 241 $[M - H - CO]^-$, m/z 223 $[M - H - H_2O - CO]^-$, m/z 197 $[M - H - CO - CO_2]^-$ 和母核 C 环 RDA 裂解后形成的碎片离子 m/z 169 和 m/z 153^[8];汉黄芩素 (38 号峰) 的二级碎片以 m/z 268 $[M - H - CH_3]^-$ 为主,同时还存在母核 B 环断裂后的碎片离子 m/z 177^[8]。

2.6.3 环烯醚萜类化合物结构推导 从痰热清胶

表 2 痰热清胶囊和痰热清注射液中各化学成分的鉴定分析

Table 2 Qualitative analysis of chemical constituents in Tanreqing capsule and Tanreqing injection

No.	t_R /min	检测模式	一级质谱 m/z	二级质谱 m/z	化合物	归属	痰热清 注射液	参考文献
1	9.84	$[M-H]^-$ $[2M-H]^-$	375 751	315, 205, 163, 135	未知	连翘	+	-
2	9.88	$[M-H]^-$	461	315, 297, 205, 163, 143, 135	连翘酯苷 E	连翘	+	[6, 10, 15]
3*	10.19	$[M-H]^-$	353	191, 179, 135	新绿原酸	金银花	+	[6]
4	10.96	$[M-H]^-$	389	345, 209, 183, 165, 121	马钱子苷	金银花	+	[6, 13-14]
5*	11.48	$[M-H]^-$	353	191, 179, 135	隐绿原酸	金银花	+	[6]
6*	11.80	$[M-H]^-$	353	191, 179, 135	绿原酸	金银花	+	[7]
7	11.89	$[M-H]^-$	639	621, 529, 477	连翘种苷异构体	连翘	-	[10, 16]
8	12.41	$[M-H]^-$	639	621, 529, 477	连翘种苷异构体	连翘	-	[10, 16]
9	12.93	$[M-H]^-$	639	621, 529, 477	连翘种苷异构体	连翘	-	[10, 16]
10*	13.13	$[M+HCOO]^-$	403	357, 195, 179, 161, 131, 125	獐芽菜苷	金银花	-	[6, 9, 14]
11*	13.66	$[M-H]^-$	179	135	咖啡酸	金银花	+	[9]
12	14.31	$[M-H]^-$	403	371, 223, 179, 161, 143	断氧化马钱子苷	金银花	+	[9, 14]
13*	15.79	$[M-H]^-$	755	593	连翘酯苷 B	连翘	-	[10]
14*	16.21	$[M-H]^-$	623	461, 443, 179	异连翘酯苷 A	连翘	-	[6]
15*	17.12	$[M-H]^-$	623	461, 443, 203, 179	连翘酯苷 A	连翘	-	[10]
16*	17.41	$[M-H]^-$	609	591, 463, 343, 301, 271, 179	芦丁	金银花	-	[10-11]
17	18.88	$[M-H]^-$	621	541, 487, 469, 459, 441, 233, 203, 179	连翘种苷 A 异构体	7 连翘	-	[10]
18	18.88	$[M-H]^-$	463	300	金丝桃苷	金银花	-	[7]
19*	19.18	$[M-H]^-$	461	401, 357, 293, 285, 175	野黄芩苷	黄芩	+	[8]
20*	19.22	$[M-H]^-$	447	327, 285	木犀草苷	金银花	+	[8-9]
21	20.02	$[M-H]^-$	621	541, 487, 469, 459, 441, 233, 203, 179	连翘种苷 A 异构体	连翘	-	[10]
22*	21.06	$[M-H]^-$	515	353, 335, 299, 255, 203, 179	异绿原酸 B	金银花	+	[6, 8]
23	21.63	$[M-H]^-$	519	357	松脂素- β -D-葡萄糖苷/表松脂素-4'-O-葡萄糖苷/马台树脂醇-4'-O-葡萄糖苷	连翘	-	[7, 10]
24*	22.63	$[M-H]^-$	515	353, 335, 299, 255, 203, 179	异绿原酸 A	金银花	+	[6, 8-9]
25	22.74	$[M-H]^-$	757	595, 525, 493, 487, 322	aldosecologanin	金银花	-	[9, 14]
26	23.42	$[M-H]^-$	1 091	803, 733, 571, 445, 375	未知	连翘	+	-
27*	24.88	$[M-H]^-$	515	353, 335, 299, 255, 203, 179	异绿原酸 C	金银花	+	[6, 8-9]
28	27.11	$[M-H]^-$	519	357	松脂素- β -D-葡萄糖苷/表松脂素-4'-O-葡萄糖苷/马台树脂醇-4'-O-葡萄糖苷	连翘	-	[7, 10]
29*	30.36	$[M-H]^-$	445	269, 175	黄芩苷	黄芩	+	[8, 12]
30*	32.77	$[M+HCOO]^-$	579	532, 371	连翘苷	连翘	-	[6-7]
31*	37.48	$[M-H]^-$	459	355, 283, 268, 175, 157	千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷	黄芩	+	[8]
32*	37.76	$[M-H]^-$	429	253, 175, 157	白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷	黄芩	+	-
33*	40.59	$[M-H]^-$	459	283, 268, 175, 155	汉黄芩苷	黄芩	+	[8]
34	47.23	$[M-H]^-$	269	251, 241, 225, 197, 169	未知	黄芩	-	-
35*	49.14	$[M-H]^-$	269	251, 241, 223, 197, 169, 153, 123	黄芩素	黄芩	-	[8]
36*	57.50	$[M-H]^-$	498	434, 416, 373	牛磺鹅去氧胆酸	熊胆粉	-	[17]
37*	59.18	$[2M-H]^-$	815	371, 363, 343, 325, 289, 251	胆酸	熊胆粉	+	[17]
38*	59.42	$[M-H]^-$	283	268, 177, 137	汉黄芩素	黄芩	+	[8]
39*	61.97	$[2M-H]^-$	783	391	熊去氧胆酸	熊胆粉	+	[17]
40*	71.96	$[2M-H]^-$	783	391	鹅去氧胆酸	熊胆粉	+	[17]
41	74.18	$[2M-H]^-$	779	389	未知	熊胆粉	+	-

注：“*”表示化合物结构经对照品确证；“+”表示化合物存在于相应的制剂中；“-”表示未检测到化合物；痰热清胶囊中 41 个成分均检出。

囊中检测到 4 个环烯醚萜类成分,分别为马钱子苷(4 号峰),獐芽菜苷(10 号峰),断氧化马钱子苷(12 号峰)和 aldosecologanin(25 号峰),其中除獐芽菜苷化学结构经对照品确证外,其他 3 个化合物均根据裂解行为和文献推测而得。马钱子苷、断氧化马钱子苷和 aldosecologanin 一级质谱分别生成准分子离子峰 m/z 389 $[M - H]^-$, m/z 403 $[M - H]^-$ 和 m/z 757 $[M - H]^-$, 而獐芽菜苷则形成 m/z 403 $[M + HCOO]^-$ 基峰。马钱子苷的二级质谱数据显示主要碎片 m/z 345 $[M - H - CO_2]^-$, 同时还出现 m/z 209 $[M - H - Glc - H_2O]^-$, m/z 183 $[M - H - Glc - CO_2]^-$, m/z 165 $[M - H - Glc - H_2O - CO_2]^-$, 均与文献报道一致^[6, 13-14]。獐芽菜苷的二级质谱数据出现 m/z 357 $[M - H]^-$, m/z 195 $[M - H - Glc]^-$, m/z 125 $[M - H - Glc - CO_2 - C_2H_2]^-$ 和部分糖碎片离子 m/z 179, 161, 131 等^[6, 9, 14]。 $t_R = 14.31$ min 的 12 号峰断氧化马钱子苷,其二级质谱数据出现碎片离子 m/z 371 $[M - H - CH_3OH]^-$, m/z 223 $[M - H - Glc - H_2O]^-$, 同样还有一些糖碎片离子 m/z 179, 161, 143^[9, 14]。Aldosecologanin 的二级质谱数据以丢失 1 分子葡萄糖生成 m/z 595 $[M - H - Glc]^-$ 为主,还存在一些环烯醚萜类成分特有的碎片离子,如 m/z 577 $[M - H - Glc - H_2O]^-$ 和 m/z 525 $[M - H - Glc - H_2O - C_3O]^-$, 这些碎片信息与文献数据一致^[9, 14]。

2.6.4 木脂素类化合物结构推导 木脂素类是连翘提取物中一类特有成分,痰热清胶囊中共检测到 3 个木脂素化合物,分别为 23, 28 和 30 号峰(连翘苷)。 t_R 分别为 21.63 min 和 $t_R = 27.11$ min 的 23 号峰和 28 号峰,两者互为同分异构体,碎片信息一致,其一级碎片及二级碎片离子分别为 m/z 519 $[M - H]^-$ 和 m/z 357 $[M - H - Glc]^-$, 经文献比对推测可能为松脂素- β -D-葡萄糖苷/表松脂素-4'-O-葡萄糖苷/马台树脂醇-4'-O-葡萄糖苷^[7, 10]。连翘苷(30 号峰)的一级质谱数据为 m/z 579 $[M + HCOO]^-$ 基峰,而二级质谱数据反而出现 m/z 532 $[M - H]^-$ 和 m/z 371 $[M - H - Glc]^-$ 等碎片^[6-7]。

2.6.5 苯乙醇苷类化合物结构推导 痰热清胶囊中共鉴定 9 个苯乙醇苷类化合物,且均来自于连翘。所有的苯乙醇苷化合物的一级碎片均为 $[M - H]^-$ 的准分子离子峰,其中 7, 8 和 9 号峰互为异构体,14 和 15 号峰互为异构体,17 和 21 号峰互为异构体。根据文献报道,连翘酯苷 E(2 号峰)的二级质谱数据主要有 m/z 315 $[M - H - Rha]^-$, m/z 297 $[M -$

$H - Glc - H_2O]^-$ 和 m/z 135 $[M - H - Rha - Glc - H_2O]^-$ 等碎片离子,但主要碎片 m/z 205 推测可能是在丢失 Rha 基础上苯环结构(110 Da)断裂形成^[6, 10, 15]。7, 8 和 9 号峰为连翘种苷的异构体,其二级碎片离子均为 m/z 621 $[M - H - H_2O]^-$, m/z 477 $[M - H - caffeoyl]^-$, m/z 529 碎片为直接丢失 110 Da 碎片后形成^[10, 16]。连翘酯苷 B(13 号峰)则直接丢失咖啡酸侧链后生成 m/z 593 $[M - H - caffeoyl]^-$ 碎片离子,连翘酯苷 A 和异连翘酯苷 A 也同样存在 m/z 461 $[M - H - caffeoyl]^-$, 而且还存在 m/z 443 $[M - H - caffeoyl - H_2O]^-$ 和 m/z 179 $[caffeic\ acid - H]^-$ 碎片^[6, 10]。 t_R 分别为 18.88 min (17 号峰)和 20.02 min (21 号峰)的连翘种苷 A 异构体,出现咖啡酸部分丢失后形成碎片 m/z 459 $[M - H - caffeoyl]^-$ 和相继丢失水后的碎片 m/z 441 $[M - H - caffeoyl - H_2O]^-$ 以及咖啡酸分子 m/z 179 $[caffeic\ acid - H]^-$, m/z 487 和 m/z 469 则为基峰相继中性丢失 134 Da 碎片和水分子后生成,该裂解特征与文献报道一致^[10]。

2.6.6 胆汁酸类化合物结构推导 胆汁酸类化合物源自于痰热清中的熊胆粉提取物,熊胆粉药材中胆汁酸多为牛磺酸结合型和游离型结构,但经提取后大部分的结合型胆汁酸水解成游离态结构。痰热清胶囊中共检测到 4 个胆汁酸,分别为牛磺鹅去氧胆酸(36 号峰),胆酸(37 号峰),熊去氧胆酸(39 号峰)和鹅去氧胆酸(40 号峰),其中牛磺鹅去氧胆酸含量较少。除牛磺鹅去氧胆酸一级质谱数据的基峰是 $[M - H]^-$, 其他 3 个化合物的基峰均为 $[2M - H]^-$ 。牛磺鹅去氧胆酸的二级质谱数据中,出现的 m/z 434 $[M - H - SO_2]^-$, m/z 416 $[M - H - H_2SO_3]^-$ 和 m/z 373 $[M - H - C_2H_7NO_3S]^-$ 碎片皆为牛磺酸部分裂解后生成^[17]。胆酸二级质谱数据中,存在 m/z 371 $[M - H - 2H_2O]^-$, m/z 363 $[M - H - CO_2]^-$, m/z 343 $[M - H - 2H_2O - CO]^-$, m/z 325 $[M - H - 3H_2O - CO]^-$, m/z 289 $[M - H - H_2O - CO_2 - C_4H_8]^-$ 和 m/z 251 等碎片离子。熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸互为差向异构体,产生二级的主要碎片离子为 m/z 391 $[M - H]^-$ ^[17]。

2.6.7 其他未知成分 痰热清胶囊中检测到 4 个未知成分, t_R 分别是 9.84 min (1 号峰), 23.42 min (26 号峰), 47.23 min (34 号峰)和 74.18 min (41 号峰),分别来自于连翘、黄芩和熊胆粉提取物中。由其二级质谱裂解行为推知,1 号峰的化合物结构可

能与连翘酯苷 E 的结构较为类似,34 号峰可能为黄酮苷元,41 号峰可能为胆汁酸类化合物。

2.7 痰热清胶囊和痰热清注射液化学成分比较

由于痰热清胶囊制备过程的工艺相对注射液而言较为简单,化学成分损失较少其所含的成分更丰富。因此,本实验中主要考察胶囊中的化学成分,再与注射液成分进行比较,结果见表 2。两种制剂中相同的成分有连翘酯苷 E,新绿原酸,马钱子苷,隐绿原酸,绿原酸,咖啡酸,断氧化马钱子苷,野黄芩苷,木犀草苷,异绿原酸 B,异绿原酸 A,异绿原酸 C,黄芩苷,千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷,白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷,汉黄芩苷,胆酸,汉黄芩素,熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸等,还有分别来自于连翘和熊胆粉中的 3 个未知成分;仅存于胶囊中的成分为连翘种苷异构体(3 个),獐芽菜苷,连翘酯苷 B,异连翘酯苷 A,连翘酯苷 A,芦丁,连翘种苷 A 异构体(2 个),金丝桃苷,aldosecologanin,松脂素- β -D-葡萄糖苷/表松脂素-4'-O-葡萄糖苷/马台树脂醇-4'-O-葡萄糖苷(2 个),连翘苷,黄芩素和牛磺熊去氧胆酸等,还有 1 个可能来自于黄芩的未知成分。上述结果表明痰热清注射液提取物的制备工艺差别如活性炭吸附、高温灭菌、配液等以及过程控制中采用超滤技术,其中部分成分可能被水解或截留而损失,但两者的主要成分差别不大。

3 讨论

3.1 痰热清注射液制备方法的选择 由于痰热清注射液为液体制剂,不同于固体药材的制备。因此,本实验比较了按 1:1 比例与甲醇混合,超声 15 min 后制得的注射液供试品溶液与痰热清注射液原液进行检测比较,结果发现痰热清注射液原液进样,检测到的成分相对更多,化合物的信号响应更佳。因此,痰热清注射液的制备方法选为原液过滤后直接进样。

3.2 痰热清胶囊制备中超声提取时间的考察 本实验比较了 3 种不同超声提取时间(10, 15, 30 min)对痰热清胶囊提取的影响。以提取率、分离效果为考察指标,结果表明 3 种不同超声提取时间色谱峰的分离效果差异不明显,但超声提取时间为 15 min 时,痰热清胶囊中成分整体提取率较高。因此,超声提取时间选定为 15 min。

3.3 方法中碰撞能的考察 根据每个化合物的理化性质不同,在进行二级质谱检测时,需要对每个对照品的碰撞能进行考察,最终确定最佳碰撞能。考察结果表明大部分化合物在 21% ~ 40% 均能碎裂,

但胆汁酸类结构较为特殊,为甾烷类结构,碎裂过程中需较大的碰撞能(40% ~ 55%)。因此,在制剂成分分析时的二级碎片采集过程中需额外设定碰撞能。

3.4 痰热清化学成分与临床疗效的关系 痰热清组方中以黄芩为君药,其味苦性寒,具有清热燥湿,泻火解毒的功效;熊胆粉和山羊角均为臣药,熊胆粉性寒,山羊角味苦咸性寒,具有平肝息风,清热解毒等作用;金银花为佐药,味甘性寒,以助清热解毒、宣肺化痰;连翘味苦性微寒,具有清热宣透作用,又可引诸药入肺经为使药^[18]。现代药理实验研究证明,黄芩的药效组分是黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素等黄酮类成分,其中黄芩苷与解热作用的关联度较大^[19-20];熊胆粉中主要组分为牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和熊去氧胆酸等胆汁酸类成分,熊胆粉具有显著的解热镇痛、镇咳、祛痰、平喘、抗病毒和抑菌等作用,其中熊去氧胆酸(商品名优思弗)更是广泛应用于临床各种肝病的治疗^[21-22];金银花中的有机酸类成分也具有明显的抑菌、抗炎、解热、抗病毒等作用;连翘中以连翘酯苷 A 和连翘苷等为主的苯乙醇苷类和木脂素类成分具有抗病毒、抑菌、解热、抗氧化等药理作用^[23]。本文采用 HPLC-ESI-MS/MS 技术分析痰热清方后发现其主要组分即为黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、连翘酯苷等,与文献报道的单味药材药效组分相似,而痰热清的功效也与药效组分的药理作用类似,因此可以推知上述化学成分可能为痰热清组方的药效物质。

尽管痰热清注射液和痰热清胶囊组方相同,但经过 HPLC-ESI-MS/MS 技术分析后,发现 2 种剂型由于生产工艺的差异可能导致化学成分不同,2 种制剂中均含有主要成分如黄芩苷、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸等,而少量甚至微量成分如黄芩素、连翘种苷、连翘种苷 A 等则在注射液中未检测到。痰热清注射液临床主要用于风温肺热病痰热阻肺证,而胶囊则主要用于风温肺热病风热袭肺证,治疗的病种相同,但证候稍有不同,可能是两者化学成分差异的影响,而且胶囊经过胃肠道口服吸收和肝脏代谢,与注射液静脉给药的代谢方式不同,会影响组方中化学成分药效的发挥^[24-25]。

综上所述,采用高效液相色谱串联质谱技术分别对痰热清胶囊和痰热清注射液中所含化合物种类进行分析,结果表明胶囊中成分更为复杂,注射液成分相对较少,从而有利于注射液的风险控制。该方

法简便、快速,对于一些未知化合物结构探索,药物的物质基础研究具有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] 雷卫平, 吴英梅, 林翠芬. 痰热清注射液的临床应用[J]. 国际医药卫生导报, 2005, 11 (14): 110-113.

[2] 王琴, 潘静. 痰热清注射液的药理作用和临床应用[J]. 华北国防医药, 2010, 22 (1): 41-43.

[3] 姜玉霞, 聂桂华, 刘乃强. HPLC-ELSD 法测定痰热清注射液中黄芩苷、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸 3 种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (14): 1862-1864.

[4] LIU S Y, XUE D S, PAN J C, et al. Screening and identification of multiple components in Tanreqing injection using RP-HPLC combined with DAD and ESI-TOF/MS [J]. Chin J Nat Med, 2014, 12 (7): 535-541.

[5] 薛东升, 张小利, 王国明, 等. 超滤在痰热清注射液制备中的应用研究[J]. 中成药, 2012, 34 (8): 1479-1483.

[6] JIA W, WANG C, WANG Y, et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medical preparation Lianhua-Qingwen capsule by UPLC-DAD-QTOF-MS [J]. Sci World J, 2015, 2015 (6): 731765.

[7] CUI Y, WANG Q, SHI X W, et al. Simultaneous quantification of 14 bioactive constituents in *Forsythia suspensa* by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2010, 21 (3): 253-260.

[8] 向青, 王小花, 林慧, 等. HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 法的银黄颗粒主要成分定性定量研究[J]. 中成药, 2015, 37 (1): 105-112.

[9] 李小琴, 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): 895-904.

[10] GUO H, LIU A H, YE M, et al. Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21 (5): 715-729.

[11] Dubber M J, Sewram V, Mshicileli N, et al. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37 (4): 723-731.

[12] WEI F H, CHEN M T, LUO C H, et al. Developing an absorption-based quality control method for Hu-Gan-Kang-Yuan capsules by UFLC-QTOF-MS/MS screening and HPLC-DAD quantitative determination [J]. Molecules, 2016, 21 (5): E592.

[13] CHEN H, CHEN X, HAN Q, et al. A new strategy for quality control and qualitative analysis of Yinhuang preparations by HPLC-DAD-MS/MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404 (6/7): 1851-1865.

[14] Kucharska A Z, Fecka I. Identification of iridoids in edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevest.) by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS [J]. Molecules, 2016, 21 (9): E1157.

[15] 简龙海, 胡青, 钟吉强, 等. LC-MS/MS 法测定痰热清注射液中连翘酯苷 E 的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33 (3): 435-438.

[16] 曾建勋, 马奕斌, 李瑞明, 等. 高效液相色谱飞行时间质谱分析连翘水煎液的有效成分[J]. 中药材, 2013, 36 (4): 581-583.

[17] QIAO X, YE M, LIU C F, et al. A tandem mass spectrometric study of bile acids: interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers [J]. Steroids, 2012, 77 (3): 204-211.

[18] 韩宏锋, 路西明. 痰热清注射液药理与临床[J]. 河南科技大学学报:医学版, 2006, 24 (1): 78-79.

[19] 刘晶晶, 张贵君, 彭慧, 等. 黄芩清热燥湿和泻火解毒药效组分分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15 (11): 78-80.

[20] 孟庆刚, 王微, 李强, 等. 黄芩解热作用的谱效关系研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34 (6): 379-383.

[21] 陈瑞兰, 徐伟, 沙玫, 等. 熊胆粉化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14 (7): 61-64.

[22] 顾惠中. 优思弗(熊去氧胆酸)临床应用[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(2): 52-53.

[23] 夏伯候, 王智民, 林丽美, 等. 银翘药对的药理学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (3): 80-82.

[24] 刘维军, 孙丽, 李笃印. 痰热清注射液治疗急性肺炎(痰热壅肺证)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (10): 220-222.

[25] 张黎莉, 李展, 徐晓月, 等. 痰热清胶囊的主要药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10 (3): 37-40.

[责任编辑 顾雪竹]