

高效液相色谱-串联质谱法分析姜黄中微量的姜黄素类化合物

李 伟¹, 肖红斌¹, 王龙星¹, 梁鑫淼^{1,2*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023 ; 2. 华东理工大学药学院, 上海 200237)

摘要 :建立了同时检测中药姜黄中 3 种微量的姜黄素类化合物的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析方法。姜黄根茎经乙醇超声提取后,无需其他处理可直接进样分析。以 Microsorb C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离,乙腈和 0.1% 甲酸水梯度洗脱,在多反应监测模式(MRM)下对目标成分进行定性分析。利用质谱碎裂规律,分别对每个目标成分同时监测 8 个母离子/特征子离子对的反应过程,首次从姜黄中发现了 3 个微量的姜黄素类化合物成分。一次性完成了目标成分的同时定性,方法的检出限为 0.2 μg/L。结果表明,该方法具有简便、快速、准确、灵敏度高的优点,适用于中药复杂体系中姜黄素类化合物的分析检测。

关键词 :高效液相色谱-串联质谱法;多反应监测模式;姜黄素类化合物;微量成分;姜黄

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)03-0264-06 栏目类别 :研究论文

Analysis of minor curcuminoids in *Curcuma longa* L. by high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry

LI Wei¹, XIAO Hongbin¹, WANG Longxing¹, LIANG Xinmiao^{1,2*}

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China ;

2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract : A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method has been developed for the simultaneous analysis of three minor curcuminoids in the crude extract of *Curcuma longa* L. After ultrasonic extraction with ethanol, the sample was separated on a Microsorb C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the gradient elution of acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution as mobile phase, then detected by electrospray ionization tandem mass spectrometry in multi-reaction monitoring (MRM) mode. On the basis of analysis of the fragmentation patterns, the identification of the minor ones was achieved in a single experiment using MRM with 8 precursor-product ion transitions for each component. Using this technique, the three minor curcuminoids were observed in *C. longa* L. for first time and the limit of detection was 0.2 μg/L. The experimental results show that this method is simple, rapid, accurate, sensitive and suitable for the analysis of curcuminoids in the complex samples of traditional Chinese medicine.

Key words : high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); multi-reaction monitoring (MRM) mode ; curcuminoids ; minor constituents ; *Curcuma longa* L.

姜黄为姜科姜黄属植物姜黄(*Curcuma longa* L.)的干燥根茎,是一种常用中药,具有破血行气、通经止痛、祛风疗痹等功效^[1]。现代药理研究表明,其主要有效成分是姜黄素类化合物和挥发油类化合物^[2,3]。姜黄素类化合物为 1,7-二苯基庚烯类

(diarylheptanoids)成分,其中以姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素最为常见。近年来国内外许多文献相继报道了姜黄素类化合物具有抗癌、抗氧化、抗艾滋病、抗老年痴呆、抗炎、降血脂和保肝等广泛的药理活性^[4-10],因此对这类化合物的研究

* 通讯联系人:梁鑫淼,研究员,主要研究方向为中药的分离分析。Tel : (0411)84379519, E-mail : liangxm@dicp. ac. cn.

基金项目:国家杰出青年科学基金项目(20825518)、科技部国际合作项目(2007DFC30550)、辽宁省科技计划重大项目(2006226002)和大连市科技计划项目(2007J23JH032)。

收稿日期:2009-03-11

亦日趋活跃。

姜黄素类化合物的常用检测方法有高效液相色谱法、薄层扫描法、分光光度法。但这些方法只能检测上述3个常量的姜黄素类化合物^[11-16]。姜黄属植物中还含有许多微量的姜黄素类化合物,许多研究表明这些微量成分与3个常量成分有着相似甚至更好的药理活性^[16-20],因此分析检测这些微量姜黄素类化合物对发掘先导化合物和扩大药源有重要的意义。在姜黄属植物中,姜黄的根茎中姜黄素类化合物的含量最高,故本研究拟对其中的微量成分进行挖掘。高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)具有灵敏度高、抗干扰能力强、样品前处理简单的优点,是分析、鉴定中药复杂体系中化学成分的首选方法。但对于微量成分,在缺乏对照品的情况下,很难通过几次常规的LC-MS实验就能完成分离与检测,而且一些微量成分由于含量太低,以常规的全扫描方法很难检测得到。本文利用多反应监测(MRM)扫描方式的选择性和特异性,建立了一种高灵敏的微量姜黄素类化合物的HPLC-ESI-MS/MS分析方法。并以这种方法首次在姜黄中发现3个微量姜黄素类成分(见图1中的化合物4,5,6)。本文中所检测的6个姜黄素类化合物的结构式如图1所示。

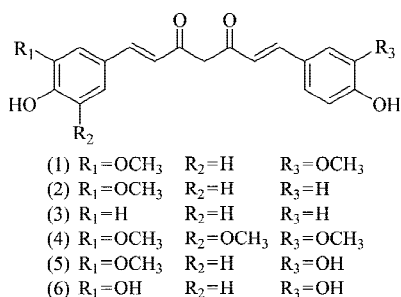


图1 6个姜黄素类化合物的结构式

Fig. 1 Structures of six curcuminoids

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Alliance 2695-996 液相色谱仪(美国 Waters 公司), Finnigan TSQ 三重四极杆质谱仪(美国 Thermo 公司)。

乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司),甲酸(色谱纯,美国 Acros 公司), Millipore 超纯水。

姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素标准品购于成都思科华生物技术有限公司。

姜黄根茎于2004年12月采挖于四川省崇州,由中国中医科学院西苑医院鉴定为姜科姜黄属植物姜黄的干燥根茎。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取2.5 mg 姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素标准品,用乙腈溶解并定容至50 mL 容量瓶中,配制成0.05 g/L 混合标准溶液,于4℃下保存。

1.3 色谱条件

色谱柱: Microsorb C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连依利特公司)。流动相:A 相为0.1% 甲酸,B 相为乙腈。样品的梯度洗脱条件: 0→45 min, 10% B→100% B; 45→50 min, 100% B。标准品的等度洗脱条件: 0→8 min, 70% B。流速1.0 mL/min。柱温30℃;检测波长254 nm;进样量5 μL。

1.4 质谱条件

电喷雾离子源(ESI);正离子扫描;MRM 模式检测;喷雾电压4.5 kV;毛细管温度350℃;吹扫气压力137.9 kPa;辅助气流速10 mL/min;质量扫描范围 m/z 100~1 000;二级质谱碰撞能量(CID) 20 eV。

1.5 样品前处理

准确取干燥粉碎的姜黄根茎1 g 置于50 mL 具塞锥形瓶中,加入10 mL 无水乙醇,混匀,超声萃取30 min,过滤。再次加入10 mL 无水乙醇重复萃取1次。过滤后合并滤液,以无水乙醇定容于25 mL 容量瓶中,以0.22 μm 有机滤膜过滤,滤液供分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离条件的优化

姜黄素类化合物是中等极性的化合物,适合以反相液相色谱模式分离。本实验采用 Microsorb C18 柱分离,考察了不同组成的流动相对目标化合物的色谱行为和离子化效率的影响。首先比较了乙腈-水和甲醇-水体系的分离效果,结果表明乙腈-水为流动相时,目标化合物的分离度和质谱信号响应都优于甲醇-水体系。由于姜黄素类化合物的分子结构中含有酚羟基基团,因此为了抑制色谱峰拖尾和改善峰形,需要在流动相中添加有机酸。考察了在乙腈-水流动相中分别添加不同比例的甲酸(0.05%, 0.1%, 0.2%)或乙酸(0.2%, 0.5%, 1%)对色谱峰形和质谱响应的影响,结果表明添加0.1% 甲酸时目标分析物获得了最优的色谱分离效果和质谱信号响应。故本文选用乙腈-水(含0.1% 甲酸)为流动相体系。图2为在优化条件下得到的姜黄提取物的色谱图。

2.2 质谱条件的优化

首先对0.05 g/L 的姜黄素(1)、去甲氧基姜黄素(2)和二去甲氧基姜黄素(3)混合标准溶液在正

离子模式下进行母离子全扫描,优化毛细管温度、喷雾电压、吹扫气压力、辅助气流速等参数,得到 3 个目标化合物最强的分子离子峰。然后在以上的质谱条件下,对选定的母离子进行子离子扫描,优化碰撞能量等参数。在优化的条件下得到图 3 中 3 个常量姜黄素类化合物的二级质谱图。

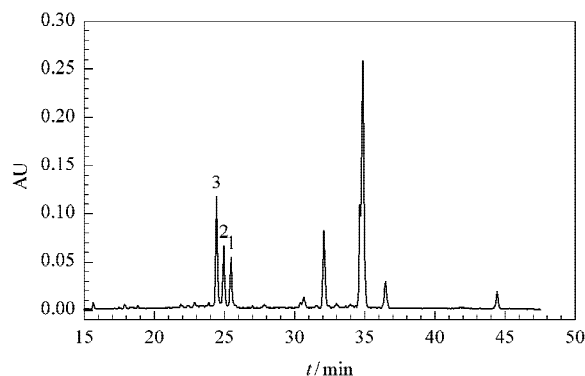


图 2 姜黄根茎提取物的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of the extract of *Curcuma longa* L. rhizomes

1. curcumin ;2. demethoxycurcumin ;3. bisdemethoxycurcumin.

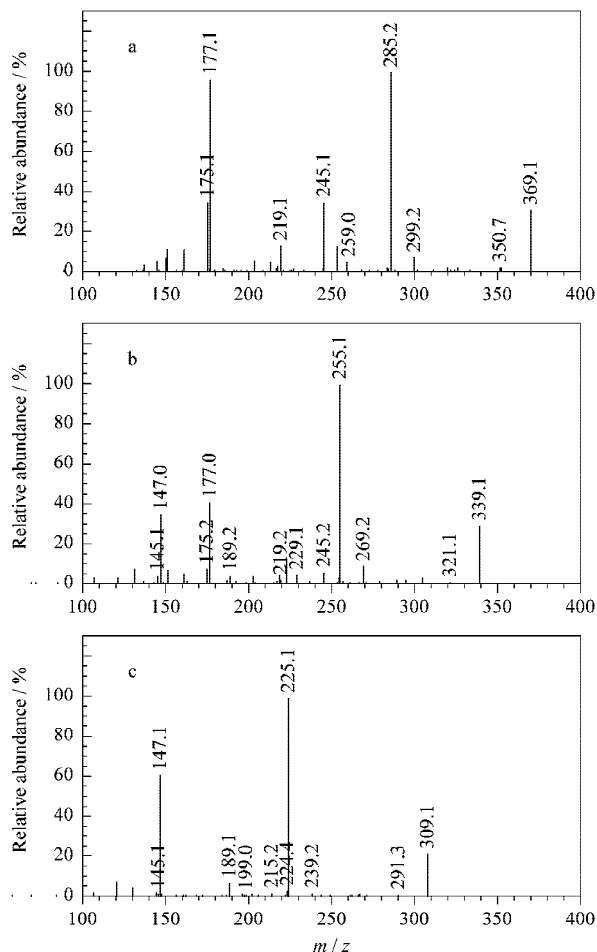


图 3 (a)姜黄素、(b)去甲氧基姜黄素和(c)二去甲氧基姜黄素的二级质谱图

Fig. 3 MS² spectra of (a) curcumin, (b) demethoxycurcumin and (c) bisdemethoxycurcumin

2.3 姜黄素类化合物的质谱碎裂规律

结构相近的化合物在质谱行为上表现为具有相似的质谱碎裂途径,这意味着获取常量组分的质谱信息后,可以对结构相近的微量组分的质谱行为进行预测。因此,我们首先对 3 个常量组分的质谱碎裂规律进行研究。

姜黄素类化合物在正离子和负离子模式下都有很好的响应,但在正离子模式下的碎片信息更为丰富,且碎裂多发生在中间碳链上。该规律更有利于同类化合物的结构推导,因此本实验中姜黄素类化合物结构信息的获取是在正离子模式下进行的。正离子模式下,姜黄素(1)、去甲氧基姜黄素(2)、二去甲氧基姜黄素(3)的一级质谱图仅出现准分子离子峰[$M + H$]⁺,没有其他加合离子和碎片离子出现。分别对它们的准分子离子峰[$M + H$]⁺进行子离子扫描,发现它们的质谱碎裂途径具有规律性,主要碎裂机理如图 4 所示。

图 1 中化合物 1 2 3 的准分子离子分别为 m/z 369 339 309,均发生 C3 - C4 键断裂并失去一个 1-芳香基-3-羟基-1,3-丁二烯中性分子,分别得到碎片离子 m/z 177,147/177,147;均发生重排反应并失去一个 1-羟基-3-羰基环丁烯中性分子,分别得到碎片离子 m/z 285,255,225;均发生重排反应并失去一个芳香基和氢原子,分别得到碎片离子 m/z 245,215/245,215;均发生重排并失去一个二羰基环丙烷中性分子,分别得到碎片离子 m/z 299,269,239;均发生重排并失去一个 1-羟基-5-羰基-1,3-环己二烯中性分子,分别得到碎片离子 m/z 259,229,199;均发生 O 转移并失去一个 3-芳香基-羧丙烯中性分子,分别得到碎片离子 m/z 175,145/175,145;均发生 H 转移并失去一个芳香基乙烯中性分子,分别得到碎片离子 m/z 219,189/219,189;均失去一个 H₂O 分子,分别得到碎片离子 m/z 351,321,291。该质谱断裂规律与文献[21]报道的基本一致。姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素的质谱碎裂途径相同,以上结果证实了结构相近的化合物在质谱行为上的相似性。

2.4 微量姜黄素类化合物的检测

据文献报道,曾有人从姜黄属植物 *Curcuma xanthorrhiza* 中分离出微量姜黄素类化合物 1-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮(4)^[18],从植物 *Curcuma domestica* 中分离出微量姜黄素类化合物 1-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-7-(3,4-二羟基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮(5)^[22]。但迄今为止,未见文献报道姜黄中存在这两种成分。而且根据自然界中姜黄素类

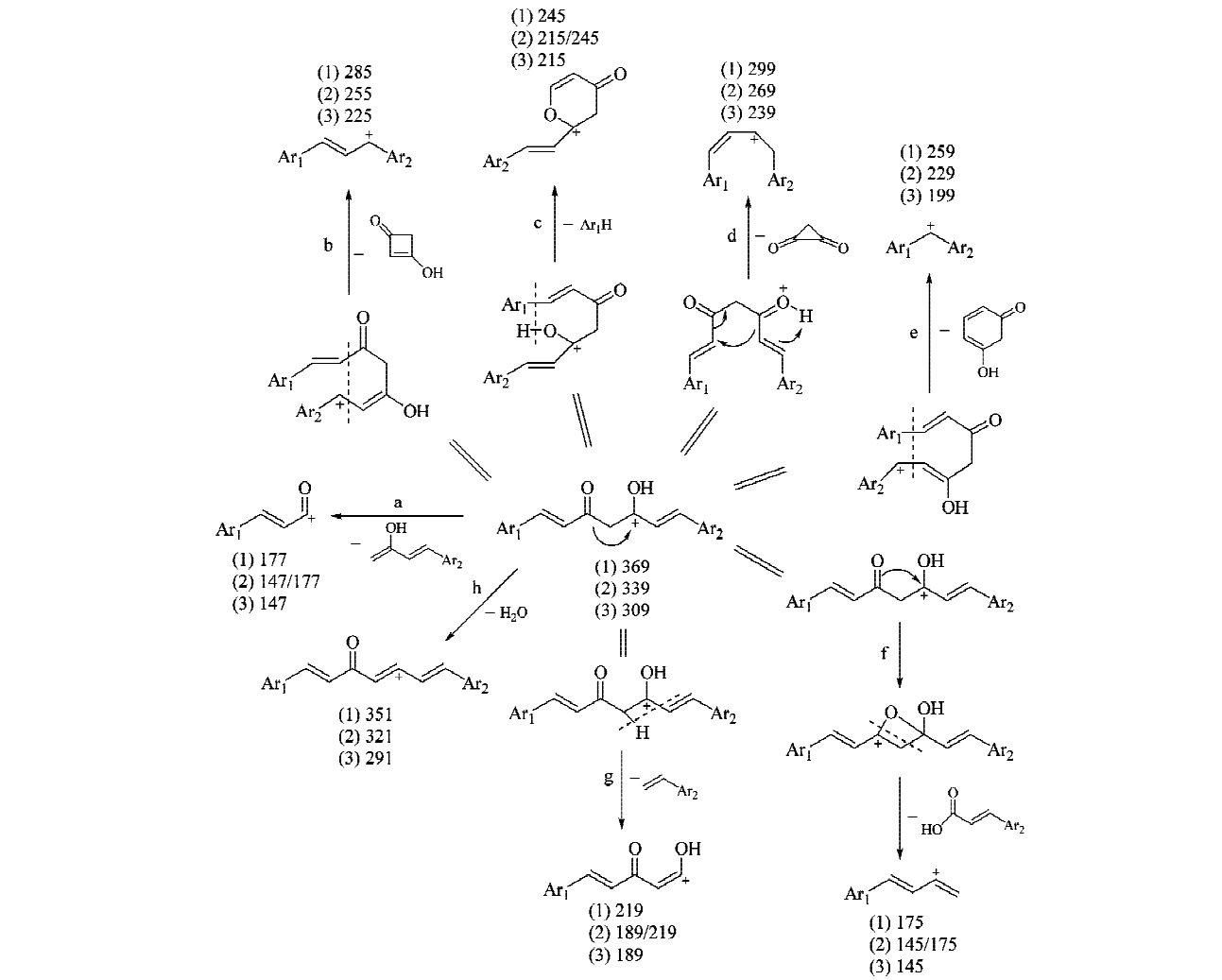


图 4 3 个常量姜黄素类化合物的质谱碎裂机理

Fig. 4 Fragmentation mechanisms of three major curcuminoids

化合物结构的取代特征,可以推测还应存在一个具有同样母核结构的微量姜黄素类化合物 1-(3,4-二羟基苯基)-7-(4-羟基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮(6)。但由于它们的含量太低,以全扫描模式在姜黄中检测不到这 3 个微量成分。采用多反应监测可以大大提高方法的灵敏度。这 3 个微量成分与 3 个常量化合物的母核结构相同,只是取代基不同,应具有相同的质谱碎裂途径,因此可以预测出它们在同样的质谱条件下应该产生的子离子,结果如表 1 所示。利用这些子离子信息,以多反应监测方式扫描目标物的母离子→一组特征子离子,对 3 个微量成分进行快速检测。在一次实验过程中,同时监测 24

个反应,即 m/z 399→207,177,315,275,245,329,175,205; m/z 355→177,163,271,245,231,285,161,205; m/z 325→147,163,241,215,231,255,145,189。若目标化合物在每级反应监测过程中出峰并且保留时间相同,便可以确认其存在,如图 5 所示化合物 4 的检测结果。实验结果表明,分别在保留时间 25.13,21.25 和 20.83 min 位置检测到化合物 4,5 和 6。本文首次在姜黄中发现这 3 个微量姜黄素类成分。

8 个特征离子对几乎涵盖了姜黄素类化合物所有的特征碎裂途径,其充分利用了化合物的结构特征,使定性结果可靠。以此方法对 3 个已知姜黄素

表 1 预测图 1 中化合物 4~6 产生的子离子

Table 1 Predicted product ions of the compounds 4~6 in Fig. 1

Compound No. in Fig. 1	Parent ion (m/z)	Product ions (m/z)							
		path a*	path b*	path c*	path d*	path e*	path f*	path g*	path h*
4	399	177/207	315	245/275	329	289	175/205	219/249	381
5	355	177/163	271	245/231	285	245	175/161	219/205	337
6	325	147/163	241	215/231	255	215	145/161	189/205	307

* For paths a~h, see Fig. 4.

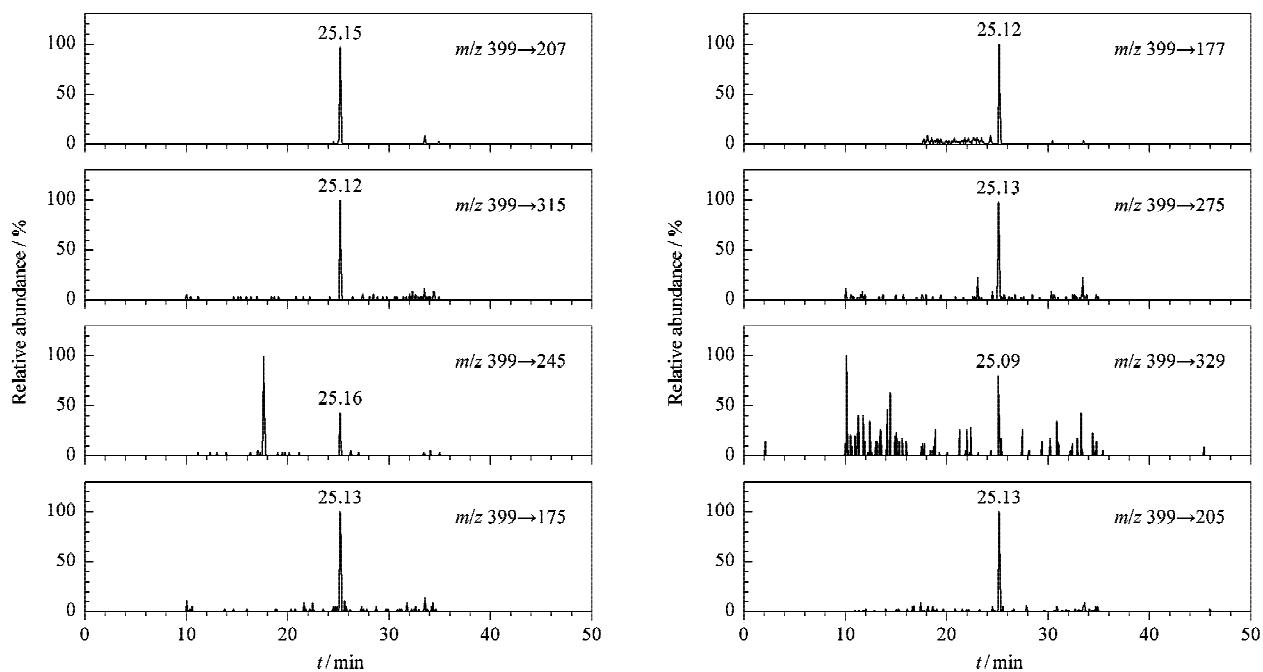


图 5 图 1 中化合物 4 的 MRM 色谱图

Fig. 5 MRM chromatograms of the compound 4 in Fig. 1

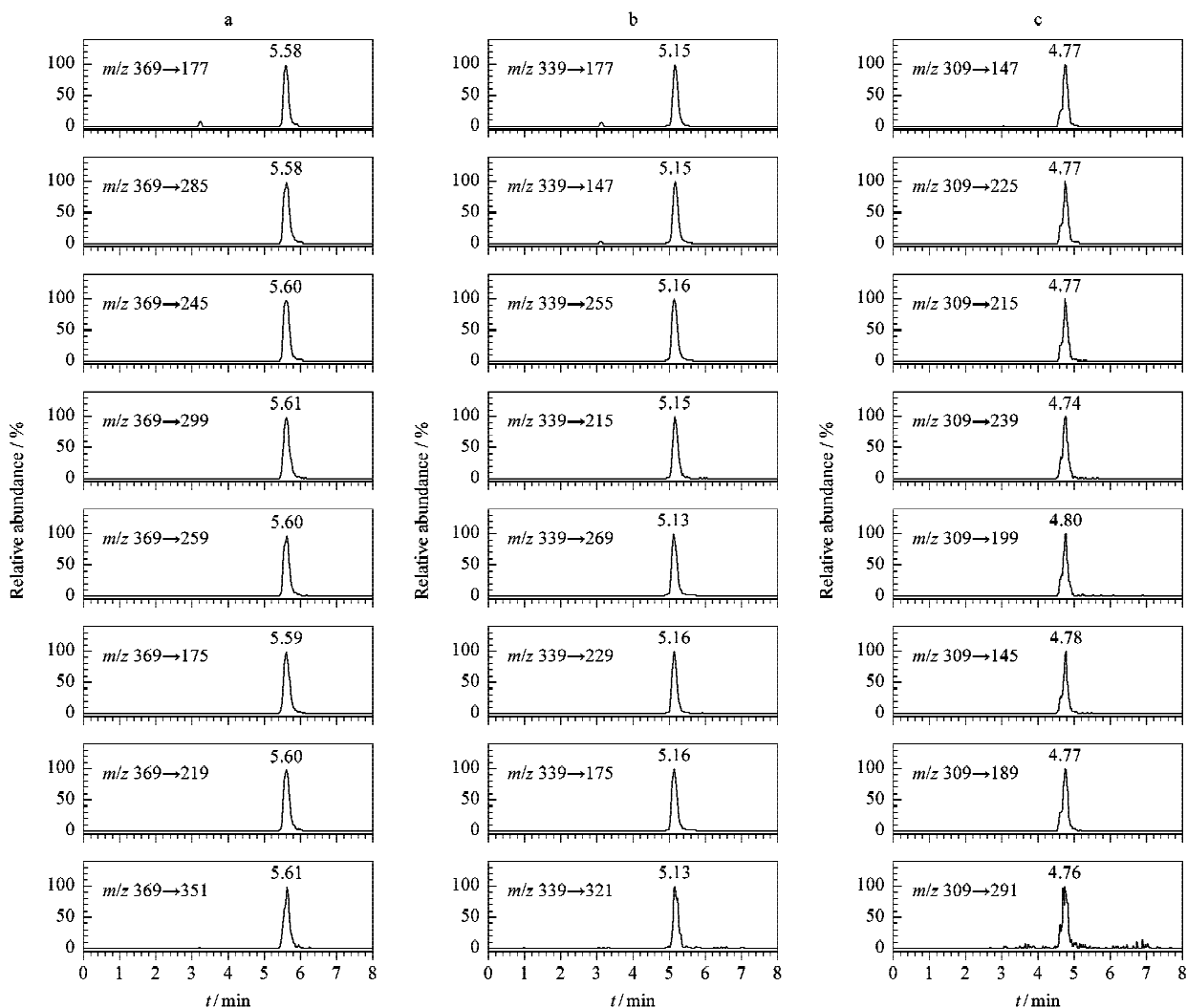


图 6 (a)姜黄素、(b)去甲氧基姜黄素和(c)二去甲氧基姜黄素标准品的 MRM 色谱图

Fig. 6 MRM chromatograms of three standards of (a) curcumin, (b) demethoxycurcumin and (c) bisdemethoxycurcumin

成分的标准品进行检测,结果如图6所示,目标化合物在每级反应监测过程中出峰并且保留时间相同,验证了该方法的可靠性。

由于具有高灵敏度和高选择性的优点,多反应监测模式被广泛地应用于定量分析,而将其应用于定性分析的报道则比较少见。本研究充分利用化合物的碎裂规律,同时监测目标化合物的多个母离子→特征子离子,将MRM模式成功地应用于化合物的定性分析。

2.5 灵敏度和特异性

配制一系列浓度的姜黄素类化合物标准工作溶液,在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定,在MRM模式下选择全扫描谱图中最强的离子 m/z 285作为监测目标(离子对 m/z 369→285)。结果表明,在当前实验条件下,方法的检出限为0.2 $\mu\text{g/L}$ (信噪比为3)。

在缺乏对照品的情况下,只用单一离子对扫描检测目标成分时,有时会有几个色谱峰同时出现,如图5中化合物4的母离子 m/z 399到子离子 m/z 245的反应监测过程中出现两个色谱峰,此时很难确定目标成分峰。当检测指标增加至8个母离子-子离子对时,目标成分便很好辨认。在每个MRM谱图中,同一保留时间均出现的色谱峰只有1个,即目标成分。

3 结论

本文采用高效液相色谱-串联四极杆质谱联用技术建立了姜黄中微量姜黄素类化合物的检测方法。母离子→一组特征子离子的MRM检测模式充分利用了化合物结构的特征性,为目标化合物的定性提供了可靠依据。在缺乏对照品的情况下,实现了3个微量姜黄素类化合物的一次性同时定性。与常规的LC-MS/MS全扫描方法相比,大大提高了灵敏度并缩短了分析时间。本方法不仅适用于姜黄素类化合物的检测,也为中药复杂体系中微量组分的快速定性提供了一种可以借鉴的分析方法。

参考文献:

- [1] Committee of Pharmacopoeia of People's Republic of China. The pharmacopoeia of People's Republic of China, Part 1. 2005 ed. Beijing: Chemical Industry Press (中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典,一部. 2005年版. 北京:化学工业出版社), 2005
- [2] Zeng Y C, Qiu F, Takahashi K, et al. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 55(6): 940
- [3] Liang G, Yang S L, Li X K. Chemistry (梁广, 杨树林, 李校堃. 化学通报), 2006, 69(6): 1
- [4] Simon A, Allais D P, Duroux J L, et al. Cancer Letters, 1998, 129(1): 111
- [5] Jayaprakasha G K, Rao L J, Sakariah K K. Food Chem, 2006, 98(4): 720
- [6] Du Z Y, Liu R R, Shao W Y, et al. Eur J Med Chem, 2006, 41(2): 213
- [7] Kim D, Park S Y, Kim J Y. Neuroscience Letters, 2001, 303(1): 57
- [8] Masuda T, Jitoe A, Isobe J, et al. Phytochemistry, 1993, 32(6): 1557
- [9] Ramirez-Tortosa M C, Mesa M D, Aguilera M C, et al. Atherosclerosis, 1999, 147(2): 371
- [10] Reddy A C P, Lokesh B R. Toxicology, 1996, 107(1): 39
- [11] Liu S Q, Liu Z H, Huang J A, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (刘硕谦, 刘仲华, 黄建安, 等. 分析化学), 2005, 33(3): 309
- [12] Shi X R, Tan R. Journal of Chinese Medicinal Materials (石雪蓉, 谭睿. 中药材), 2004, 27(12): 916
- [13] Li J L, Yu L R. Journal of Hunan College of Traditional Chinese Medicine (李吉来, 于留荣. 湖南中医学院学报), 1996, 16(3): 57
- [14] Han G, Zhang Y C, Liu S Y. Northwest Pharmaceutical Journal (韩刚, 张义春, 刘士勇. 西北药学杂志), 2005, 20(1): 15
- [15] Paramasivama M, Poi R, Banerjee H, et al. Food Chem, 2009, 113(2): 640
- [16] Jayaprakasha G K, Rao L J M, Sakariah K K. J Agric Food Chem, 2002, 50(13): 3668
- [17] Park S Y, Kim D. J Nat Products, 2002, 65(9): 1227
- [18] Masuda T, Isobe J, Jitoe A, et al. Phytochemistry, 1992, 31(10): 3645
- [19] Masuda T, Jitoe A, Isobe J. et al. Phytochemistry, 1993, 32(6): 1557
- [20] Suksamrarn A, Eiamong S, Piyachaturawat P, et al. Phytochemistry, 1994, 36(6): 1505
- [21] Jiang H L, Somogyi A, Jacobsen N E, et al. Rapid Comm Mass Spectrom, 2006, 20(6): 1001
- [22] Anayama R, Tamura Y, Yamanaka H, et al. Phytochemistry, 1993, 33(2): 501