

高效液相色谱-电喷雾四级杆飞行时间质谱分析生姜中的姜辣素类化合物

王丽^{1,2}, 方磊², 赵恒强², 王珊珊², 杜金华¹, 王晓^{2*}

(1. 山东农业大学 食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018;

2. 山东省分析测试中心 山东省大型精密仪器应用技术重点实验室, 山东 济南 250014)

【摘要】 建立高效液相色谱-电喷雾四级杆飞行时间质谱快速分析鉴定生姜中姜辣素类化合物的方法。采用 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm)分析,二元线性梯度洗脱,柱后流出液采用电喷雾四级杆飞行时间质谱正离子模式检测。根据电喷雾四级杆飞行时间质谱给出的母离子及二级碎片离子精确相对分子质量信息,结合相关文献,从生姜中分析鉴定了25种姜辣素,并用对照品对方法进行了验证。本方法快速、准确,可用于生姜中姜辣素类化合物的快速分析。

【关键词】 高效液相色谱-电喷雾四级杆飞行时间质谱; 生姜; 姜辣素类化合物

生姜即新鲜姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的根茎,味辛性微温,归肺、脾、胃经,解表散寒,温中止呕,化痰止咳^[1],是一种应用广泛的药食两用植物。生姜中姜辣素不仅是其主要呈味物质,也是其呈现多种药理作用的主要功能因子,故研究姜辣素有十分重要的意义。姜辣素可分为姜酚类、姜烯酚类、姜酮类、姜二醇等,分子结构中都存在1个3-甲氧基-4-羟基苯的结构片段^[2]。由于姜辣素种类多,结构相似,分离困难,故发展其快速分析、鉴定方法就显得十分必要。已经报道的姜辣素类化合物分析方法包括:高效液相色谱(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)和高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)^[3-9]。然而,HPLC技术需要结合标准品对未知化合物进行定性分析;GC-MS技术已广泛应用于生姜的分析,但由于姜辣素的低挥发性,部分姜辣素不易被检测到;HPLC-MS技术将液相色谱强大的分离能力和质谱的高灵敏度、高选择性和提供结构信息等功能结合起来,特别是高分辨飞行时间质谱能提供化合物的精确相对分子质量信息,并推断出化合物的分子式,因而特别适合中草药、天然产物中复杂

化合物的分析鉴定。本研究拟采用高效液相色谱-电喷雾四级杆飞行时间质谱(HPLC-ESI-Q-TOF-MS)技术分析生姜中的姜辣素类化合物,为快速阐明生姜中姜辣素类化合物组成提供分析方法支持。

1 材料

KQ3200型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;BUCHI旋转蒸发器,瑞士BUCHI公司;SP-722型可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;Agilent 6520高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱仪(HPLC-Q-TOF)(包括Agilent超高效液相色谱仪,高压二元梯度泵,DAD检测器及Masshunter Qualitative Analysis Software B.02.00版化学工作站)。

生姜采自山东莱芜,由山东中医药大学李佳博士鉴定为 *Z. officinale* 的新鲜根茎;乙腈(色谱纯)购于山东禹王实业有限公司;水为Milli-Q超纯水;95%乙醇为分析纯;6-gingerol, 8-gingerol 和 10-gingerol 对照品(自制,纯度均大于98%)。

2 方法

2.1 样品制备

称取10 g生姜,切成5 mm左右粒径的碎片,置入具塞烧瓶中,加入20 mL 95%乙醇,超声处理30 min;将提取液过滤蒸干后得到生姜总提取物;取约10 mg总提取物用1 mL甲醇溶解后过0.45 μm的微孔有机滤膜,待用。

2.2 对照品溶液制备

分别称取5 mg 6-gingerol, 2 mg 8-gingerol 和 2 mg 10-gingerol 对照品于5 mL量瓶中用甲醇定容,

• 3467 •

【稿件编号】 20110721006

【基金项目】 山东省科技攻关项目(2010GSF10287)

【通信作者】 * 王晓,研究员,研究方向为中药化学与中药质量控制, Tel: (0531) 82605319, E-mail: wangx@keylab.net

【作者简介】 王丽,硕士研究生,主要研究方向为天然产物分离纯化, E-mail: guest108800@163.com

待用。

2.3 色谱条件

Inertsil ODS-SP 色谱柱,二元梯度洗脱,流动相 A 为乙腈,B 为水。0 min,10% A;0~25 min,10%~60% A;25~70 min,60%~100% A。进样量 20 μL ,流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 280 nm。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),采用正离子模式检测;脱气溶剂气流量 10 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,脱气溶剂温度 325 $^{\circ}\text{C}$,喷雾气压 241.3 kPa,离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压 4.0 kV。一级质谱扫描范围 m/z 100~1 000,二级质谱扫描范围 m/z 50~1 000。

3 结果

3.1 色谱质谱条件优化

高效液相色谱技术常用于生姜中姜辣素类化合物的分离,本研究采用 2.1 所述方法处理样品,采用反相液相色谱柱用于其分离研究,并对色谱条件作了进一步优化。考察了甲醇-水和乙腈-水作为流动相时的色谱分离效果,结果表明,采用乙腈-水作为流动相时生姜总提取物中各色谱峰分离较好,因此选择乙腈-水作为流动相用于生姜提取物的分离。生姜总提取物组成较为复杂,采用等度洗脱的方式难以达到基线分离,因此,本研究采用梯度洗脱用于其分离研究。在本研究优化的色谱条件下,对照品和生姜总提取物的液相色谱图见图 1。从图中可以看出,各化合物分离度高、峰型较好、信号较强,可以实现生姜总提取物的良好分离。

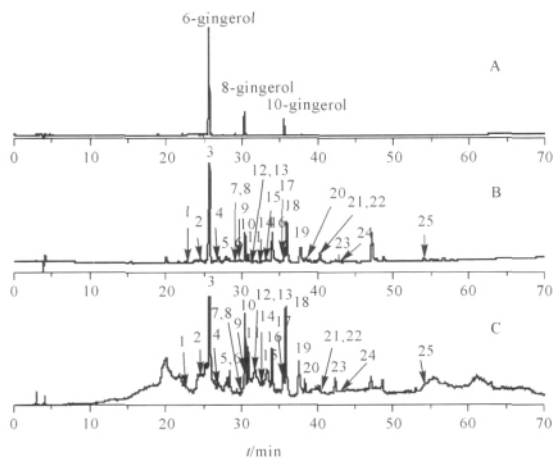


图1 对照品(A)、生姜总提取物(B)的HPLC图和正离子模式总离子流图(C)

本研究采用对照品,对质谱条件作了进一步优化,以获得最佳灵敏度。结果表明:在正离子模式下,各化合物信号较强。进一步采用对照品,对喷雾气压力、干燥气体流速、干燥气温度、毛细管电压、破碎电压等质谱条件进行了优化,获得了最佳条件。在本研究优化的色谱、质谱条件下,生姜总提取物总离子流图(TIC)见图1。

3.2 生姜中姜辣素类化合物 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析

采用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术,在本研究优化的色谱质谱条件下对生姜总提取物进行分析。根据测得的生姜总提取物中各化合物的准分子离子峰和二级质谱碎片离子峰的精确质量信息,结合对照品,并参考相关文献对生姜中的 25 种化合物进行了准确鉴定,结果见表 1。

3.2.1 3 种已知姜辣素类化合物的鉴定 从表 1 可以看出,峰 3,10 和 18 在 m/z 294.182 7, 322.214 0 和 350.245 2,产生 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰,采用 Masshunter 软件初步推断分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4$, $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 和 $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$,由此计算出理论相对分子质量为 294.183 1,322.214 4 和 350.245 7,理论值与实测值误差均在 5×10^{-6} 以内。峰 3,10 和 18 二级质谱中均产生 m/z 137 的碎片离子峰,推测可能是因为加氢后在烷基链上靠近苯环的第 1 个碳与第 2 个碳中间断裂,产生 $[\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2]^+$ 的碎片离子,此推断与文献中关于姜酚类化合物质谱裂解规律的报道相吻合^[14]。进一步参考对照品的保留时间及准分子离子峰和二级质谱碎片离子峰的精确质量信息,峰 3,10,18 可准确鉴别为 6-gingerol,8-gingerol 和 10-gingerol^[14]。通过对照品验证可知:依据 Q-TOF-MS/MS 给出的母离子和二级碎片离子对化合物进行鉴定,方法准确、可靠,可用于生姜中姜辣素类化合物的分析鉴定。

3.2.2 多个未知峰的鉴别 对于生姜总提取物中没有对照品的未知峰,进一步采用 TOF-MS/MS 提供的准分子离子和二级碎片离子的精确相对分子质量信息进行了鉴定。由表 1 可知,正离子模式下的分子离子,相对分子质量的测定值与理论值相差很小,均在 5×10^{-6} 以内;22 个未知峰鉴定结果见表 1。

例如,峰 1,12,19,22 和 24,从一级质谱可以看出它们相对分子质量依次递增 28(C_2H_4),推测为生姜中的一类同系物;它们分别在 m/z 248.198 3,

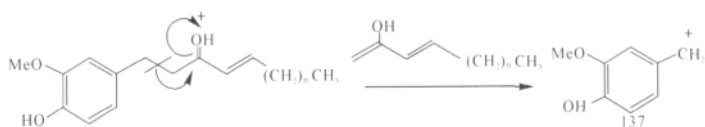
表 1 生姜总提取物的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 数据及成分鉴定

峰号	化合物名称	t_R /min	分子式	理论值 m/z	一级质谱 m/z	二级质谱 m/z	误差 1×10^{-6}	文献
1	4-shogaol	23.69	$C_{15}H_{20}O_3$	248.142 3	248.198 3	137.059 7	1.21	[10]
2	6-gingerdiol	24.56	$C_{17}H_{28}O_4$	296.198 8	296.198 5	137.092 3	-1.61	[11]
3	6-gingerol	25.71	$C_{17}H_{26}O_4$	294.183 1	294.182 7	137.048 8	-1.36	[12]
4	1-dehydro-6-gingerdione	27.78	$C_{17}H_{22}O_4$	290.151 8	290.151 4	163.074 4 137.059 3 151.074 9 177.082 6 191.106 2	-1.38	[13]
5	6-gingerdione	28.11	$C_{17}H_{24}O_4$	292.167 5	292.167 0	191.106 2 177.082 6 151.074 9 151.134 4	-1.71	[11]
6	methyl-6-gingerol	28.23	$C_{18}H_{28}O_4$	308.198 8	308.198 5	261.185 3	-0.97	[6]
7	3-or 5-acetoxy-6-gingerdiol	28.29	$C_{19}H_{30}O_5$	338.209 3	338.209 0	191.106 7 177.090 4 137.059 5	-0.89	[6]
8	8-gingerdione	28.33	$C_{19}H_{28}O_4$	320.198 8	320.198 3	137.059 3 163.074 8 177.090 5	-1.56	[15]
9	acetoxy-6-gingerol	30.39	$C_{19}H_{28}O_5$	336.193 7	336.193 6	137.013 3 163.054 4	-0.30	[6]
10	8-gingerol	30.80	$C_{19}H_{30}O_4$	322.214 4	322.214 0	137.059 2	-1.24	[12]
11	diacetoxy-4-gingerdiol	31.05	$C_{19}H_{28}O_6$	352.196 9	352.224 9	177.090 9 151.075 0	-4.81	[6]
12	6-shogaol	31.06	$C_{17}H_{24}O_3$	276.172 5	276.172 1	137.098 1	-1.45	[10]
13	6-paradol	31.50	$C_{17}H_{26}O_3$	278.254 1	278.241 0	137.059 6	-0.46	[10]
14	10-gingerdione	33.22	$C_{21}H_{32}O_4$	348.230 1	348.229 7	177.022 3	-1.15	[15]
15	methyl-acetoxy-6-gingerol	33.91	$C_{20}H_{30}O_5$	350.209 3	350.208 9	151.092 6	-1.14	[6]
16	methyl-3-or 5-acetoxy-6-gingerdiol	34.10	$C_{20}H_{32}O_5$	352.226 0	352.266 0	127.093 3 99.063 0	2.84	[6]
17	acetoxy-8-gingerol	35.06	$C_{21}H_{32}O_5$	364.225 0	364.224 6	137.059 3	-1.10	[6]
18	10-gingerol	35.73	$C_{21}H_{34}O_4$	350.245 7	350.245 2	137.048 9 163.074 9	-1.43	[12]
19	8-shogaol	36.08	$C_{19}H_{28}O_3$	304.203 8	304.203 4	137.057 0	-1.31	[10]
20	1-dehydro-8-gingerdione	37.76	$C_{19}H_{26}O_4$	318.182 9	318.219 2	177.053 3	-0.63	[6]
21	acetoxy-10-gingerol	41.83	$C_{23}H_{36}O_5$	392.256 3	392.256 0	137.059 3	-0.76	[6]
22	10-shogaol	41.84	$C_{21}H_{32}O_3$	332.235 1	332.234 7	137.059 7	-1.20	[10]
23	1-dehydro-10-gingerdione	42.11	$C_{21}H_{30}O_4$	346.214 4	346.213 9	177.084 6	-1.44	[6]
24	12-shogaol	42.40	$C_{23}H_{36}O_3$	360.266 4	360.266 0	137.048 3	-1.11	[6]
25	1-dehydro-12-gingerdione	54.87	$C_{23}H_{34}O_4$	374.245 2	374.245 3	177.057 0	0.27	[6]

276.172 1, 304.203 4, 332.234 7 和 360.266 0 处产生 $[M+H]^+$ 峰, 采用 Masshunter 软件初步推断出分子式分别为 $C_{15}H_{20}O_3$, $C_{17}H_{24}O_3$, $C_{19}H_{28}O_3$, $C_{21}H_{32}O_3$ 和 $C_{23}H_{36}O_3$ 。二级质谱给出主要碎片离子为 m/z 137, 推测其断裂途径见图 2, 根据相关文献报道^[6] 推测它们分别为 4-shogaol, 6-shogaol, 8-shog-

aol, 10-shogaol 和 12-shogaol。

峰 13 二级质谱给出的主要碎片离子为 m/z 137, 与峰 1, 12, 19, 22 和 24 有相似的裂解规律。且峰 13 在 m/z 278.241 0 产生 $[M+H]^+$ 峰, 采用 Masshunter 软件初步推测分子式为 $C_{17}H_{26}O_3$, 分子式比峰 12 多 2H, 推测可能是由于碳链上双键不



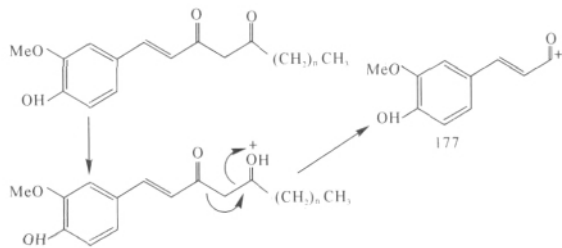
4-shogaol $n=2$; 6-shogaol $n=4$; 8-shogaol $n=6$; 10-shogaol $n=8$; 12-shogaol $n=10$ 。

图2 峰1,12,19,22和24的裂解途径

稳定加氢引起的^[6],故推测峰13为6-paradol。

峰6在 m/z 308.1985 产生 $[M+H]^+$ 峰,采用 Masshunter 软件初步推断分子式为 $C_{18}H_{28}O_4$,分子式比峰3多 CH_2 ,可能是苯环上甲基取代氢的结果,推测峰6为 methyl 6-gingerol^[13-14]。

峰4,20,23和25从一级质谱可以看出相对分子质量依次递增28(C_2H_4),可以推测为生姜中的一类同系物,分别在 m/z 290.1514,318.2192,346.2139和374.2453处产生 $[M+H]^+$ 峰,采用 Masshunter 软件初步推断它们分子式分别为 $C_{17}H_{22}O_4$, $C_{19}H_{26}O_4$, $C_{21}H_{30}O_4$ 和 $C_{23}H_{34}O_4$ 。二级质谱给出的碎片离子中都有一个 m/z 177的碎片离子峰,推断其裂解途径见图3^[6],推测峰4,20,23和25分别为 1-dehydro-6-gingerdione,1-dehydro-8-gingerdione,1-dehydro-10-gingerdione 和 1-dehydro-12-gingerdione。峰5,8和14在 m/z 292.1670,320.1983和348.2297处产生 $[M+H]^+$ 峰,采用 Masshunter 软件初步推断它们分子式分别为 $C_{17}H_{24}O_4$, $C_{19}H_{28}O_4$ 和 $C_{21}H_{32}O_4$,分子式分别比峰4,20和23多2H,推测它们分别为 6-gingerdione,8-gingerdione 和 10-gingerdione。

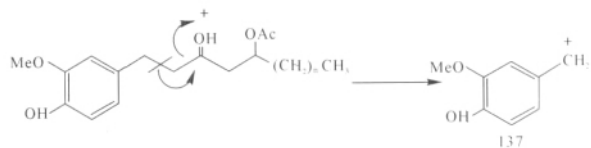


1-dehydro-6-gingerdione $n=4$; 1-dehydro-8-gingerdione $n=6$; 1-dehydro-10-gingerdione $n=8$;
1-dehydro-12-gingerdione $n=10$ 。

图3 峰4,20,23和25的裂解途径

峰9,17和21从一级质谱可以看出相对分子质量依次递增28(C_2H_4),推测为生姜中的一类同系

物,在336.1936,364.2246,364.2246和392.2560处产生 $[M+H]^+$ 峰,采用 Masshunter 软件初步推断分子式分别为 $C_{19}H_{28}O_5$, $C_{21}H_{32}O_5$ 和 $C_{23}H_{36}O_5$,分子式分别比峰3,10和18多 C_2H_2O ,推断其裂解方式见图4^[6],推测它们分别为 acetoxy-6-gingerol,acetoxy-8-gingerol 和 acetoxy-10-gingerol。峰15在 m/z 350.2089处产生 $[M+H]^+$ 峰,采用 Masshunter 软件初步推断分子式为 $C_{20}H_{30}O_5$,分子式比峰9多 CH_2 ,推测是峰9苯环上的氢被甲基取代,参考相关文献^[6],推断为 methyl acetoxy-6-gingerol。



acetoxy-6-gingerol $n=4$; acetoxy-8-gingerol $n=6$; acetoxy-10-gingerol $n=8$ 。

图4 峰10,18和21的裂解途径

4 结论

本研究成功的建立了高效液相色谱-电喷雾四级杆飞行时间质谱分析生姜中的姜辣素类化合物的方法。在本研究优化的色谱质谱条件下,生姜中的姜辣素类化合物得到了较好的分离,根据获得的各化合物的母离子和二级离子的精确相对分子质量信息,参照部分对照品和相关文献,对生姜中的25种姜辣素类化合物的进行了快速准确鉴定,为生姜及其产品的质量控制在潜在药效物质基础的探寻提供了一种快速高效的方法。

【参考文献】

- [1] 李计萍,王跃生,马华,等. 干姜与生姜主要化学成分的比较研究[J]. 中国中药杂志 2001,26(11):748.
- [2] 卢传坚,欧明,王宁生. 姜的化学成分分析研究概述[J]. 中药新药与临床药理 2003,14(3):215.
- [3] Wohlmuth H, Leach D N, Smith M K, et al. Gingerol content of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Ros-

- coe [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(14): 5772.
- [4] Jiang H, Somogyi A, Timmermann B N, et al. Instrument dependence of electrospray ionization and tandem mass spectrometric fragmentation of the gingerols [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(20): 3089.
- [5] Jiang H, Timmermann B N, Gang D R. Characterization and identification of diarylheptanoids in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 21(4): 509.
- [6] Jiang H, Solyom A M, Timmermann B N, et al. Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(20): 2957.
- [7] Jolad S D, Lantz R C, Chen G J, et al. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE₂ production [J]. Phytochemistry, 2005, 66(13): 1614.
- [8] Jolad S D, Lantz R C, Solyom A M, et al. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE₂ production [J]. Phytochemistry, 2004, 65(13): 1937.
- [9] Rai S, Mukherjee K, Mal M, et al. Determination of 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale*) using high-performance thin-layer chromatography [J]. J Sep Sci, 2006, 29: 2292.
- [10] Hiroe Kikuzaki, Yoko Kawasaki, Nobuji Nakatan. Structure of antioxidative compounds in ginger [M]// Chi-Tang Ho, et al. Food Phytochem Cancer Pre II, USA: American chemical society, 1994: 237.
- [11] 战琨友, 王超, 徐坤, 等. 气相色谱-质谱技术分析姜油树脂中的挥发性及非挥发性成分 [J]. 色谱, 2006, 26(6): 692.
- [12] Chu-Chin Chen, Robert T Rosen, Chi-Tang Ho. Chromatographic analyses of gingerol compounds in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracted by liquid carbon dioxide [J]. J Chromatogr A, 1986, 360: 163.
- [13] 张雪红, 甘春芳, 洪艳艳. 6-姜酚的有机波谱分析 [J]. 化工技术与开发, 2005, 34(6): 40.
- [14] 黄雪松. 10-姜酚的质谱分析 [J]. 质谱学报, 1998, 20(2): 49.
- [15] Phillip Denniff, Ian Macleod, Donald A. Whiting. Syntheses of the (±)-[n]-gingerols (pungent principles of ginger) and related compounds through regioselective aldol condensations: relative pungency assays [J]. J Chem Soc Perkin Trans I Org Chem, 1981(0): 82.

Analysis of gingerol-related compounds in fresh ginger by HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

WANG Li^{1,2}, FANG Lei², ZHAO Hengqiang², WANG Shanshan², DU Jinhua¹, WANG Xiao^{2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

2. Shandong Analysis and Test Center, Shandong Academy of Sciences, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] To establish a rapid method for analysis of gingerol-related compounds in fresh ginger by using high performance liquid chromatography coupled with electron spray ionization-quadrupole-time of flight mass/mass spectrometry (HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS). The gingerol-related compounds in fresh ginger was separated by an Inertsil ODS-SP column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using a binary eluent under gradient conditions. The analytes were detected by ESI-Q-TOF-MS/MS in positive ion mode to obtain MS and MS/MS spectra and to extract molecular weights. From the MS data, the accurate molecular weights of gingerol-related compounds were obtained, and from the MS/MS data, the (+) ESI-Q-TOF-MS/MS fragments were obtained. 25 gingerol-related compounds were identified from fresh ginger by attentive studying on the mass spectra of compounds and comparing with reference data reported in the literature, respectively. This method was certified to be accurate and reliable and can be used for the rapid analysis of gingerol-related compounds in fresh ginger.

[Key words] HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS; fresh ginger; gingerol-related compounds

doi: 10.4268/cjcm20112417

[责任编辑 孔晶晶]