

积雪草苷和羟基积雪草苷的电喷雾质谱裂解机制研究

詹雪艳, 张燕玲, 张加余, 谭鹏, 冀娇娇, 董洁, 刘永刚

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要:以积雪草苷和羟基积雪草苷为研究对象,在正负离子模式下,获得其电喷雾离子阱三级质谱图,结合分子模拟方法,解析了其正负离子模式下二级质谱中基峰子离子的三级质谱裂解途径,并寻找其裂解规律。结果表明,以上两种皂苷化合物在正负离子模式下,分子离子均发生苷键的断裂,主要生成苷糖基的碎片离子;苷糖基在三级质谱裂解中主要发生脱水和交叉环切除的裂解反应,其质谱裂解途径应遵循苷糖基的脱水和缩环时不破坏分子内氢键的裂解规律。应用密度泛函(DFT)方法优化得到苷糖基能量最低的稳定构型,利用氢键识别模块对苷糖基可能形成的分子内氢键及其位置进行了预测。实验结果表明,推测的正负碎片离子与质谱裂解结果相符,从而验证了以上苷糖基的脱水和缩环规律的合理性。本实验结果丰富了乌苏烷型皂苷的电喷雾质谱裂解规律,可为乌苏烷型皂苷的结构鉴定提供更多支持。

关键词:乌苏烷型皂苷;ESI-MSⁿ;裂解途径;裂解规律

中图分类号:O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2015)04-0289-07

doi:10.7538/zpxb.youxian.2015.0015

Fragmentation Pathways and Patterns of Asiaticoside and Madecassoside in ESI-MSⁿ

ZHAN Xue-yan, ZHANG Yan-ling, ZHANG Jia-yu, TAN Peng,

JI Jiao-jiao, DONG Jie, LIU Yong-gang

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: To study the fragmentation pathways and patterns of asiaticoside and made-cassoside by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MSⁿ), the two compounds were analyzed by HPLC-ESI-MSⁿ in positive ion mode and negative ion mode respectively, and multi-stage mass spectrum diagrams of the above two compounds were obtained. Mass spectrometry fragments of asiaticoside and made-cassoside were analyzed under positive ion mode and negative ion mode, the stable configuration of sugar ions having the lowest energy was determined by calculation with density functional theory (DFT), and the fragments from the above two compounds mainly were the fragments of the anthocyanin glycosylation after the Glycoside bond of the molecular broke, and dehy-

收稿日期:2014-06-30;修回日期:2014-11-15

基金项目:北京市青年英才计划(YETP0815)资助

作者简介:詹雪艳(1978—),女(汉族),湖北鄂州人,博士,从事中药分析与中药质量评价研究。E-mail: snowzhan@126.com

通信作者:刘永刚(1981—),男(汉族),山东临沂人,博士,从事中药化学研究。E-mail: liuyg0228@163.com

网络出版时间:2015-05-25;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20150525.1527.001.html>

dration and cracking rings occurred in the fragments of the anthocyanin glycosylation in which the intramolecular hydrogen bonds were not destroyed. The intramolecular hydrogen bonding and dehydrogenation position in the anthocyanin glycosylation were predicted by calculating the molecular space bond length by Monitor Hbonds in the soft Discovery Studio 4.0, from which the positive and negative ions inferred are accord with the anthocyanin glycosylation fragments in the experiment, which confirms the rationality of the law of dehydration and cracking rings in the anthocyanin glycosylation fragments were guided by the law of dehydration and cracking rings of the anthocyanin glycosylation. The fragmentation pathways of the anthocyanin glycosylation fragments are explained by the calculation of the quantum chemistry at a molecular level, and can provide the basis for the chemical structure identification of ursane saponins.

Key words: ursane saponins; ESI-MSⁿ; fragmentation pathways; fragmentation patterns

积雪草苷和羟基积雪草苷为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 中的活性成分,属于乌苏烷型皂苷,具有促进创面愈合和抑制瘢痕形成的双重疗伤作用^[1],同时具有抗抑郁^[2]、抗惊厥^[3]和改善记忆^[4]等作用,还具有抗肿瘤^[5]、抗病原微生物^[6]等方面的生物活性,其化学结构示于图 1。

高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱(HPLC-ESI-MS)作为一种软电离技术,已成为研究物质结构与生物分子间相互作用的重要手段^[7-9]。为了使解析的裂解途径更合理,可利用量子化学计算以辅助推测化合物的电喷雾质谱裂解途径和裂解规律^[10-12]。目前,积雪草苷和羟基积雪草苷经电喷雾质谱裂解后,相关苷元离子和糖链

离子的裂解规律的报道较少。因此,本工作拟通过研究积雪草苷和羟基积雪草苷的电喷雾多级正负离子质谱裂解方式,总结其质谱裂解特征和裂解规律,以期为乌苏烷型化合物的结构鉴定提供相关的质谱资料和依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪;美国 Agilent 公司产品,配备在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、Chemstations 色谱工作站等;Agilent XCT 6320 型电喷雾离子阱质谱仪;美国 Agilent 公司产品;Satorious 十万分之一电子分析天平;德国 Satorious 公司产品。

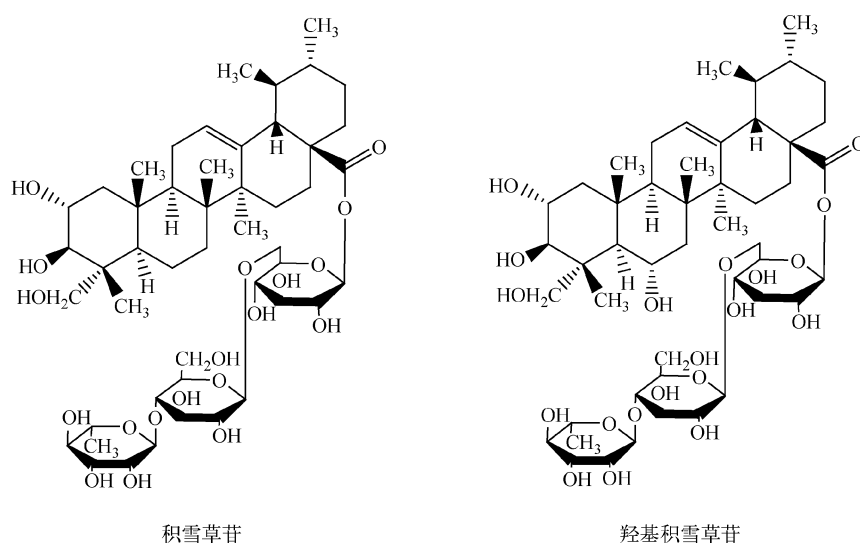


图 1 积雪草苷和羟基积雪草苷的结构式

Fig. 1 Chemical structures of asiaticoside and madecassoside

积雪草苷(批号:110892-200604)、羟基积雪草苷(批号:110893-200701)标准品:由中国食品药品检定研究院提供;乙腈(色谱纯):美国Fisher公司产品;甲酸:美国Sigma公司产品;实验用水:二次蒸馏水,并经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

1.2 实验条件

1.2.1 HPLC 条件 Agilent-XDB C18 色谱柱($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}\times 5\ \mu\text{m}$);流动相:乙腈-0.1%甲酸水溶液(25:75,V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:205 nm;柱温: $30\ ^\circ\text{C}$;进样量:10 μL 。

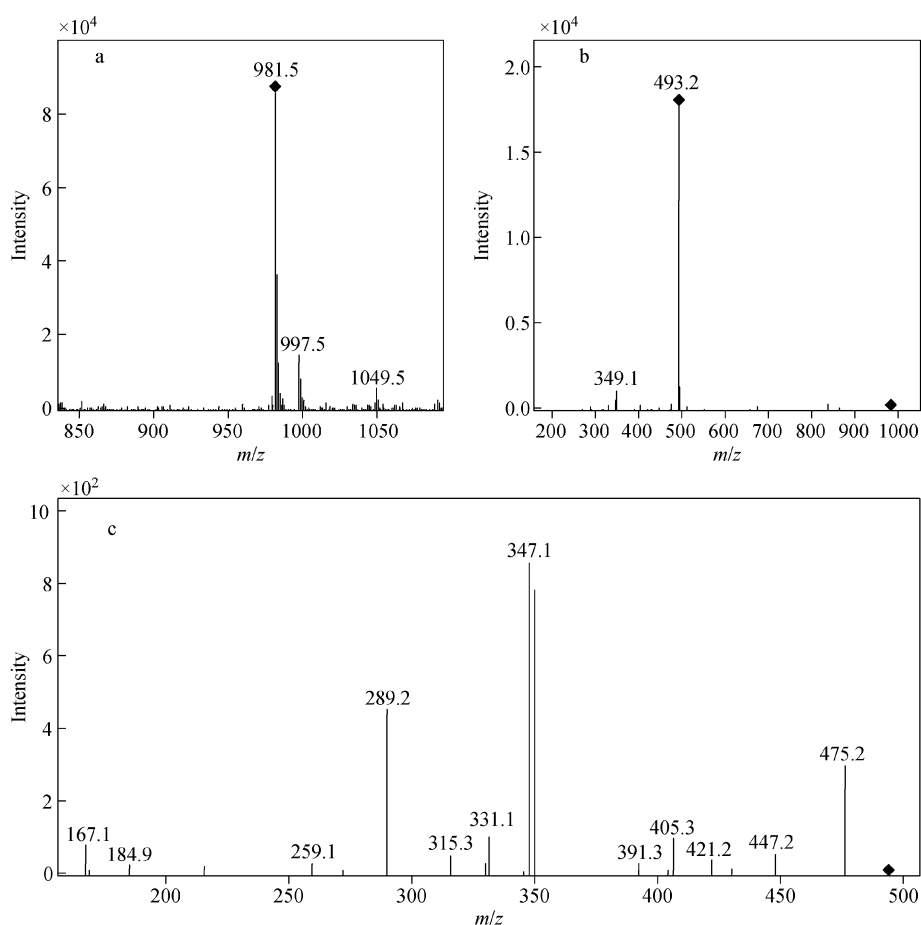
1.2.2 ESI-MS 条件 正负离子模式检测,雾化气和干燥气均为氮气(纯度 $>99.99\%$),碰撞气为氦气(纯度 $>99.99\%$);干燥气流速:11 L/min;雾化气压力:241.5 kPa;离子源电喷雾电压:3 500 V;毛细管温度: $350\ ^\circ\text{C}$;目标质量数:500;化合物稳定性:150%;离子阱驱动水平:100%;质量扫描范围: m/z 100~1 200;自

动多级质谱扫描模式;碰撞能量:1 V;小碎片增益:30%~200%。所得数据利用 Agilent 6300 离子阱工作站(6.1 版本)进行处理。

2 结果与讨论

2.1 正离子模式下的裂解途径

积雪草苷和羟基积雪草苷均是乌苏烷型的五环三萜皂苷,具有相同的糖链,二者的结构差异在于皂苷元6位上相差一个羟基。积雪草苷和羟基积雪草苷在正离子模式下的多级质谱图示于图2。在正离子模式下,积雪草苷和羟基积雪草苷一级质谱的准分子离子分别为 m/z 997.5 和 m/z 981.5,均为 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 离子,示于图2a。对选中的准分子离子进行碰撞诱导解离分析,在二级质谱图中,以上两个皂苷具有相同的碎片离子 m/z 493.2,根据文献[13]报道,标记为B型碎片离子,示于图2b。此碎片



注:a. 积雪草苷一级质谱图;b. 准分子离子峰 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 981.5 和 m/z 997.5 离子的二级质谱图;c. m/z 493 离子的三级质谱图

图2 正离子模式下,积雪草苷和羟基积雪草苷的多级质谱图

Fig. 2 Multi-stage mass spectra of asiaticoside and madecassoside in positive ion mode

离子为糖苷键断裂产生的糖基碎片离子,它的存在说明这两个皂苷均发生了糖苷键的断裂,正电荷均保留在糖基碎片离子一侧。在二级质谱图中没有观察到皂苷苷元部分的碎片离子,这与皂苷元的结构有关,糖链与苷元以酯键的形式连接,正离子模式下,糖苷键断裂时电荷强烈地保留在糖链的一侧,没有电荷竞争反应的发生^[14]。对糖链 B 型离子 m/z 493.2 进一步裂解得到三级质谱图,示于图 2c。其中 m/z 475.2、447.2、421.2、405.2、391.3、349.1 和 m/z 347.1、331.1、329、289.2、259.1、184.9、167.1 碎片离子均出现在积雪草苷和羟基积雪草苷的三级质谱图中,丰度最高的 m/z 347.1 为脱去末端鼠李糖所产生的碎片离子。

在图 2c 中能看到 m/z 493 离子继续丢失一分子水生成碎片离子 m/z 475,这表明在该条件下糖链发生了脱水反应。

已有研究表明,能形成氢键的取代基的结合能力强于不能形成氢键的取代基,质谱裂解中通常不能形成氢键的取代基更容易获取键断裂所需的能量而优先失去^[15]。为了明确苷糖基交叉环切除的位置,采用 Discovery Studio 4.0(DS)构建了糖链的模型,MM2(molecular mechanics 2)方法进行苷糖基结构的初步优化,应用 Gaussian 03 软件中的密度泛函(DFT)方法,在 B3LYP/6-31d 水平上进行结构优化,得到能量最低苷糖基的稳定构型。根据各个基团中氢、氧原子的电子云方向及其空间距离,利用 DS 中的氢键识别模块对分子中可能发生的分子内氢键进行预测,得到 3 个分子内氢键,示于图 3。量取各个氢键的距离,根据该距离推断氢键作用能力的强弱,结

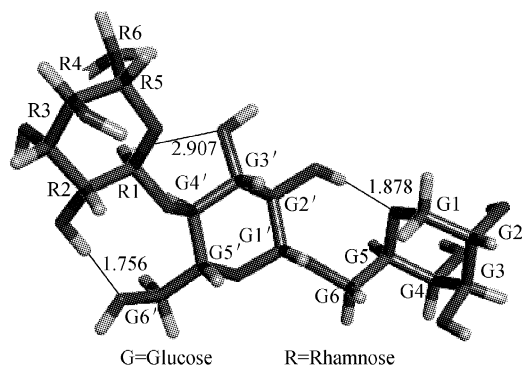


图 3 糖链中分子内氢键的位置示意图

Fig. 3 Intramolecular hydrogen bonds in sugar chain

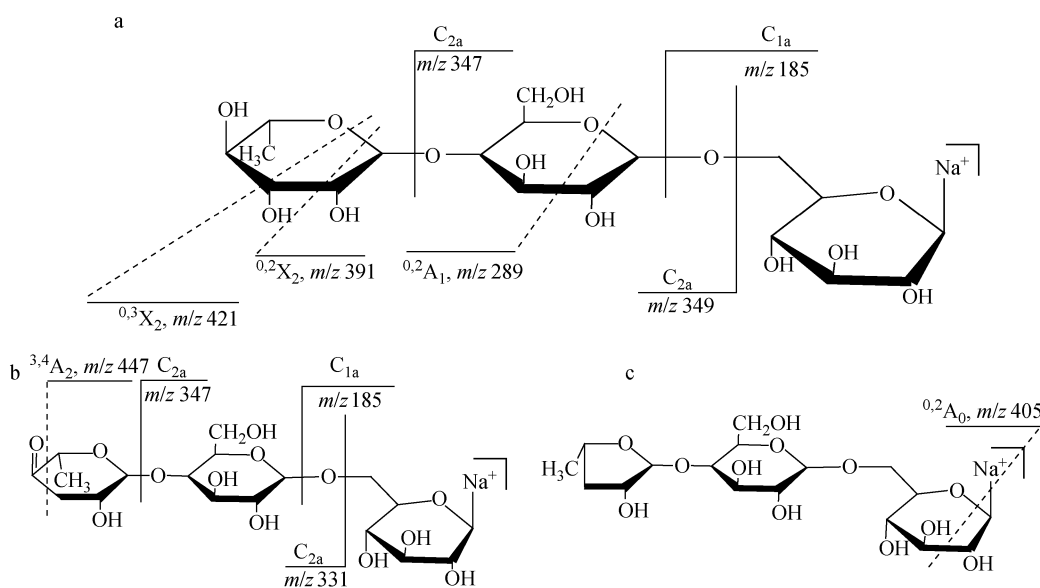
果表明,R2 位羟基 H 与 G6' 位羟基 O、G2' 位羟基 H 与葡萄糖 G 环中氧桥上 O 较易形成分子内氢键,氢键距离分别为 1.756 Å 和 1.878 Å,均小于氢键空间距离的阈值 2.5 Å^[15]。此外,葡萄糖 G3' 位羟基 O 与鼠李糖 R1 位上的 H,两原子间距离大于 2.5 Å,预测有形成氢键的倾向,但难以真正成键或所成氢键不稳定。

分子内氢键增强了 G6' 和 G3' 位羟基与鼠李糖的连接,也增强了 G2' 位羟基与葡萄糖 G 的连接,因此中间环葡萄糖 G' 只进行 0,2 键开裂,其余两个环交叉切除裂解遵循不破坏上述氢键的原则。根据此规律推导三级质谱中 m/z 493 离子的裂解途径,示于图 4。其中,图 4a 所示的裂解途径中产生的碎片离子与三级质谱图中的碎片离子很好地吻合,进一步验证了鼠李糖 R2 位羟基 H 与 G6' 位羟基 O、G2' 位羟基 H 与葡萄糖 G 环中氧桥上 O 形成氢键,以及糖链环交叉切除时保留分子内氢键的质谱裂解规律的合理性。

由于鼠李糖 R3 和 R4 位羟基,葡萄糖 G 上 G2、G3 和 G4 位羟基的电子云无法达到形成氢键的角度或原子间空间距离较大,而无法形成分子内氢键,因此推测此处羟基与碳链的结合能较小,但却容易与邻碳上的氢结合成 H₂O 后失去,对应的两个碳原子间形成双键,转变为烯醇式结构,由于烯醇式结构不稳定,进一步转化为酮式结构,裂解途径示于图 4b。根据图 4b 中碎片离子 m/z 475 的结构式,推测该离子易缩环脱去 CO 分子,得到 m/z 447 碎片离子,示于图 4c。

2.2 负离子模式下的裂解途径

在负离子模式下,积雪草苷和羟基积雪草苷的一级质谱图中的准分子离子分别为 m/z 957.5 和 m/z 973.5,是以上两化合物的 $[M-H]^-$ 离子,对该 $[M-H]^-$ 离子进行裂解得到负离子模式下的二级质谱图,示于图 5。积雪草苷裂解为 m/z 469.1、487.3 碎片离子,羟基积雪草苷裂解为 m/z 469.1、503.2 碎片离子。其中, m/z 487.3 和 m/z 503.2 分别是积雪草苷和羟基积雪草苷的苷元部分碎片离子, m/z 469.1 是皂苷的寡糖链片段负离子,该离子的存在表明负离子模式下糖苷键断裂时,电荷在糖链上或苷元上的保留发生竞争,电荷竞争反应的结果是糖链上部分碎片负离子的丰度强于苷元的碎片负离子。



注:a. 离子 m/z 493 的碎裂途径;b. 碎片离子 m/z 475 的碎裂途径;c. 碎片离子 m/z 447 的裂解途径

图 4 糖链加合离子 $[M+Na]^+$ 的裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathway of sugar adduct ions $[M+Na]^+$

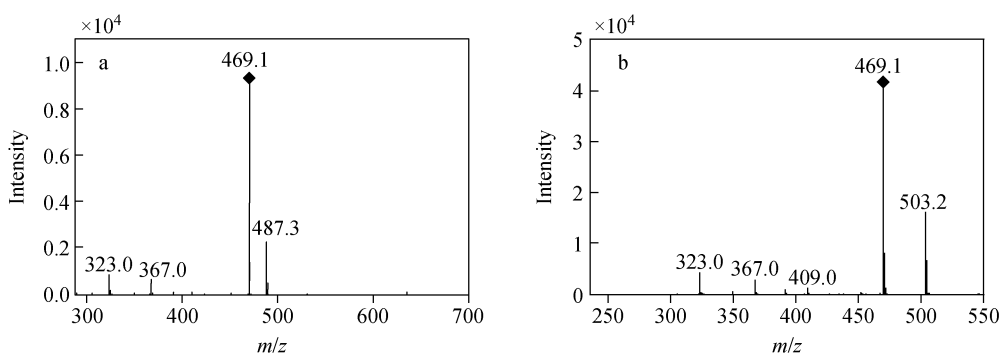


图 5 负离子模式下,积雪草苷(a)和羟基积雪草苷(b)的二级质谱图

Fig. 5 MS² spectrum of asiaticoside (a) and madecassoside (b) in negative ions mode

糖链碎片负离子 m/z 469 进一步裂解得到的三级质谱图示于图 6。根据不破坏分子内氢键的质谱裂解规律进行苷糖基交叉环切除,推测负离子模式下两皂苷的寡糖链负离子可能的裂解途径,示于图 7。苷糖基 $[M-H]^-$ 离子的脱氢位置可能是不能形成氢键的鼠李糖 R3 和 R4 位上的 H,葡萄糖 G 上 G2、G3 和 G4 位的 H,而该离子的中间环是 0,2 键断裂,生成的碎片离子主要是 C 型离子和 C 型离子交叉开环或失去一分子水产生的碎片离子。

2.3 讨论

积雪草苷和羟基积雪草苷均为乌苏烷型皂苷,在正负离子模式下,两者的电喷雾质谱裂解

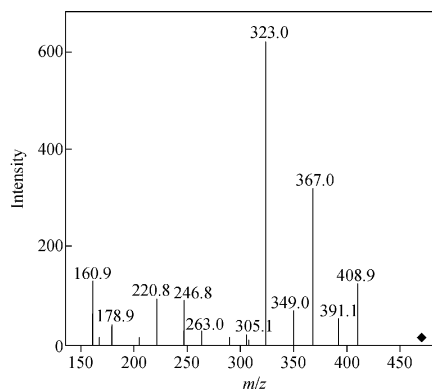


图 6 负离子模式下,糖链负离子 m/z 469 的三级质谱图

Fig. 6 MS³ spectrum of sugar negative ion m/z 469 in negative ion mode

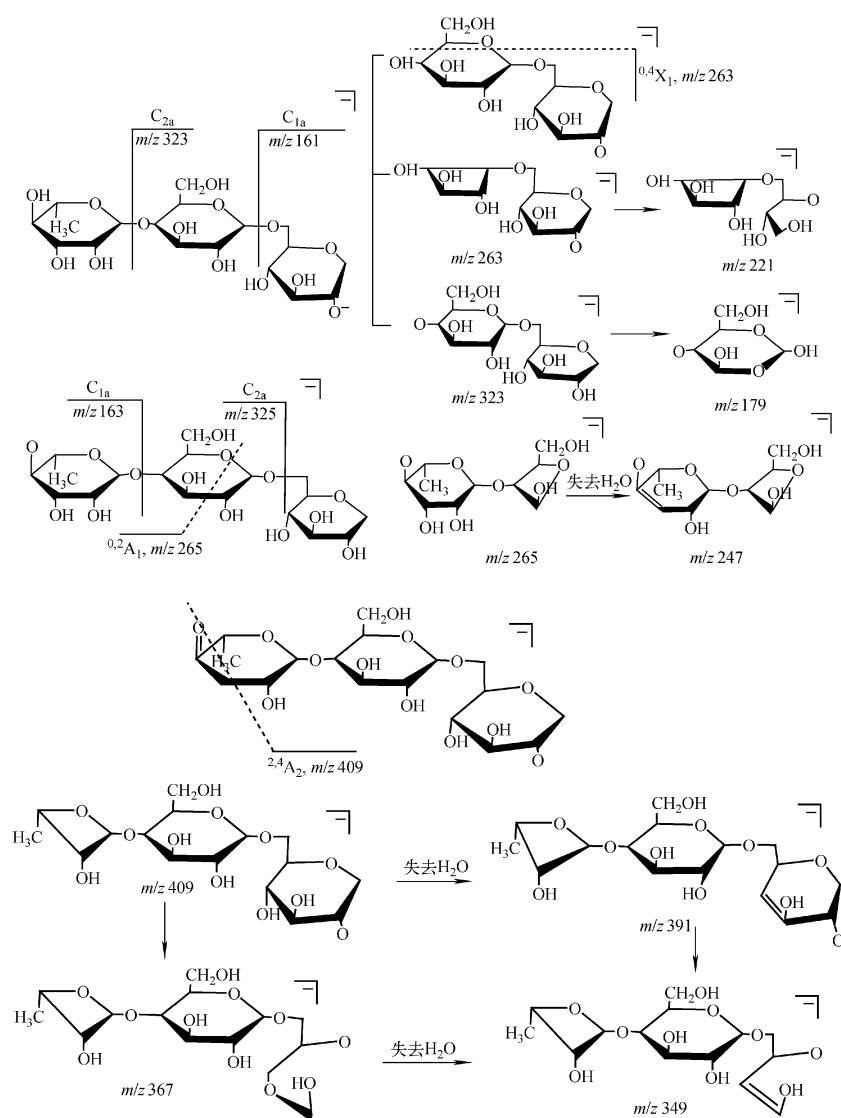


图7 负离子模式下,糖链负离子 m/z 469 的裂解途径

Fig. 7 Fragmentation pathway of sugar negative ion m/z 469 in negative ion mode

的二级质谱图中主要以糖苷键断裂所产生的苷糖基碎片离子为主。在本实验条件下,正负离子模式下其二级质谱中均只发生糖苷键的断裂,电荷更容易保留在糖链上,分别得到高丰度的苷糖基正负离子。

在积雪草苷和羟基积雪草苷三级质谱图中,苷糖基的碎裂方式主要有邻二羟基脱水和糖基交叉环切除。应用分子模拟方法,预测了糖链上羟基形成分子内氢键的位置。研究结果表明,苷糖基交叉环切除的位置与其分子内氢键有关,苷糖基环交叉切除时保留分子内氢键,同时苷糖基上邻二羟基脱水也发生在不能形成氢键的邻二羟基间。同时计算了苷糖基上

C—H键的键能,确定了负离子模式下苷糖基 $[M-H]^-$ 离子的脱氢位置,即 G2、G3、G4 位羟基 H 或 R3、R4 位羟基产生竞争脱 H,脱氢后在不同位置产生负电荷中心,得到不同类型的碎片离子,由此推测的裂解过程中产生的正负碎片离子与质谱裂解结果相符,从而验证了以上苷糖基的脱水和缩环规律的合理性。

3 结论

本研究应用分子模拟方法预测了积雪草苷和羟基积雪草苷糖链上可能存在的分子内氢键,推测了积雪草苷和羟基积雪草苷的三级质谱裂解途径,其质谱裂解途径遵循苷糖基的脱水和缩

环时不破坏分子内氢键的裂解规律。实验结果丰富了乌苏烷型皂苷的电喷雾质谱裂解规律,可为乌苏烷型皂苷的结构鉴定提供更多支持。

参考文献:

- [1] 翁小香,黄文武,孔德云. 积雪草中三萜类成分及其活性研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2011,42(9):709-716.
WENG Xiaoxiang, HUANG Wenwu, KONG Deyun. Progress of triterpenoids from *Centella asiatica* and their pharmacological activities[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2011, 42 (9): 709-716(in Chinese).
- [2] 曹尉尉,徐江平,赵娜萍,等. 积雪草总苷元对慢性应激抑郁大鼠的影响[J]. 药学实践杂志, 2012,30(2):121-124.
CAO Weiwei, XU Jiangping, ZHAO Naping, et al. Effects of total aglycone of *Centella asiatica* on depressed rats by chronic unpredicted mild stress [J]. Journal of Pharmaceutical Practice, 2012, 30(2): 121-124(in Chinese).
- [3] 梁鑫,李刚,袁橙,等. 积雪草苷的抗惊厥作用研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,(1):10.
LIANG Xing, LI Gang, YUAN Cheng, et al. Research on the anticonvulsant effect of asiaticoside[J]. Journal of Qiqihar Medical College, 2010, (1): 10(in Chinese).
- [4] 章卓,张红,姜鲜,等. 积雪草苷改善阿尔茨海默病大鼠记忆能力[J]. 泸州医学院学报,2012,35(6):564-567.
ZHANG Zhuo, ZHANG Hong, JIANG Xian, et al. Asiaticoside ameliorates the memory capacity on rat of Alzheimer's disease model[J]. Journal of Luzhou Medical College, 2012, 35 (6): 564-567(in Chinese).
- [5] 黄云虹,张胜华,甄瑞贤,等. 积雪草甙诱导肿瘤细胞凋亡及增强长春新碱的抗肿瘤作用[J]. 癌症, 2004,23(12):1 599-1 604.
HUANG Yunhong, ZHANG Shenghua, ZHEN Ruixian, et al. Asiaticoside inducing apoptosis of tumor cells and enhancing anti-tumor activity of vincristine[J]. Chinese Journal of Cancer, 2004, 23(12):1 599-1 604(in Chinese).
- [6] 张胜华,余兰香,甄瑞贤,等. 积雪草苷的抗菌作用及对小鼠实验性泌尿系统感染的治疗作用[J]. 中国新药杂志,2006,15(20):1 746-1 749.
ZHANG Shenghua, YU Lanxiang, ZHEN Ruixian, et al. Suppression of bacterial urinary infection in mice with asiaticoside[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2006, 15 (20): 1 746-1 749 (in Chinese).
- [7] 从蒲珠,李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 化学工业出版社,2001.
- [8] 孙维星,刘志强,刘淑莹. 电喷雾质谱在非共价生物—有机分子复合物研究中的应用[J]. 分析化学,1998,26(1):111-116.
SUN Weixing, LIU Zhiqiang, LIU Shuying. Application of electrospray mass spectrometry for study of specific noncovalent large biomolecule-organic molecule complexes in solution[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1998, 26 (1): 111-116(in Chinese).
- [9] SIMMONS D A, KONEMRANN L. Characterization of transient protein folding intermediates during myoglobin reconstitution by time-resolved electrospray mass spectrometry with on-line isotopic pulse labeling[J]. Biochemistry, 2002, 41 (6): 1 906-1 914.
- [10] 谭鹏,关君,刘永刚,等. 乌头碱去甲基代谢产物的量子化学计算[J],世界科学技术:中医药现代化,2011,13(5):792-795.
TAN Peng, GUAN Jun, LIU Yonggang, et al. Quantum chemistry calculation on demethylated metabolites of aconitine[J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2011, 13 (5): 792-795(in Chinese).
- [11] 王学杰,游金宗. 拉米夫定降解机理的量化研究[J]. 计算机与应用化学, 2011,28(2):192-196.
WANG Xuejie, YOU Jinzong. Theoretical study on the degradation mechanism of lamivudine[J]. Computers and Applied Chemistry, 2011, 28 (2): 192-196(in Chinese).
- [12] 崔培坤,张乃峰,王蒙,等. 大黄酸 ESI-IT-MS 质谱行为及碎片离子的量子化学研究[J]. 分析测试学报,2013,32(4):432-436.
CUI Peishen, ZHANG Naifeng, WANG Meng, et al. Studies on mass behavior and fragment ions of rhein by ESI -IT-MS and quantum chemistry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32 (4): 432-436(in Chinese).
- [13] DOMON B, COSTELLO C. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates [J]. Glycoconjugat J, 1988, (5): 397-409.
- [14] 刘淑莹,宋凤瑞,刘志强. 中药质谱分析[M]. 北京: 科学出版社,2012.
- [15] 陈兰慧. 乌头碱等中药有效成分质谱行为的量子化学研究[D]. 长春: 东北师范大学,2006.