

ESI-MS/MS 法对银莲花素 A 质谱裂解方式的研究

李 甫^{1,2}, 丁立生¹, 王明奎¹

(1. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以化学衍生结合电喷雾电离质谱(ESI-MS/MS)法研究银莲花素 A 的质谱裂解方式。将银莲花素 A 与三苯甲基氯反应, 产物经 ESI-MS/MS 分析发现, 银莲花素 A 在裂解过程中除了发生常规裂解以外, 还伴随着重排裂解发生。结果表明, 银莲花素 A 中糖的连接顺序不能仅用 ESI-MS/MS 来确定。

关键词:银莲花素 A; 电喷雾电离质谱(ESI-MS); 化学衍生; 裂解方式

中图分类号: O 657. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2008)02-76-04

Study on the Fragmentation Pathway of Raddeanin A by ESI-MS/MS

LI Fu^{1,2}, DING Li-sheng¹, WANG Ming-kui¹

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The fragmentation pathway of raddeanin A was studied by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS/MS) together with chemical derivatization. The derivative was prepared by raddeanin A and trityl chloride, and then analyzed by ESI-MS/MS. Not only normal fragmentation but also special fragmentation were observed. The mechanism of the special fragmentation was advised. The result indicates that the sequence of sugar moieties in raddeanin A can not be determined only by ESI-MS/MS.

Key words: raddeanin A; electrospray ionization mass spectrometry; chemical derivatization; fragmentation pathway

自 20 世纪 80 年代电喷雾质谱问世以来, 已广泛应用于天然产物的研究, 特别是皂苷、生物碱、黄酮和糖等的结构研究^[1-10]。由于它是一种软电离技术, 可直接用于难挥发的复杂混合物分析, 多级质谱的碎片离子能提供丰富的化合物结构信息。

银莲花素 A 是从银莲花属植物多被银莲花中分离得到的一个三萜皂苷, 其糖部分由鼠李糖

(rha)、葡萄糖(glc)和阿拉伯糖(ara)组成, 化学名为 3-O-[α -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖]齐墩果酸, 化学结构示于图 1, 该化合物对腹水性肝癌细胞有显著的抑制作用^[11]。用 ESI-MS/MS 对银莲花素 A 分析时发现, 正、负离子的二级质谱中除了出现常规的 M-146 碎片离子峰外, 还出现了特殊的 M-162 碎片离子峰, 提示其中三个糖的连接

好像为分支结构。但根据吴凤钊报道的银莲花素 A 全乙酰化物的电子轰击质谱数据和¹³CNMR数据,糖的连接应该是直链结构,并且用部分水解分离鉴定次级糖苷进行了确证^[12]。文献对其解释可分为两类:一类认为 M-162 碎片离子为失去糖链中间的葡萄糖所产生的^[13-14];另一些文献则认为 M-162 碎片离子为失去 O-rha 的同时伴随着氢原子重排所致^[15-17]。本工作对银莲花素 A 中葡萄糖的 6 位伯羟基进行化学衍生,然后用 ESI-MS/MS 分析以确定其具体的质谱裂解方式。

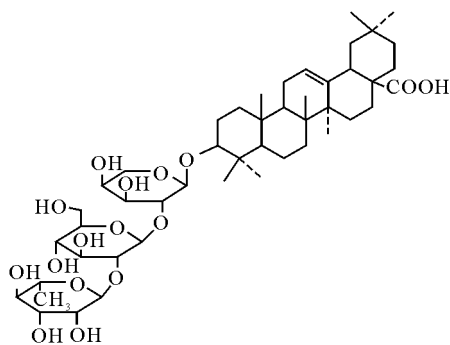


图1 银莲花素 A 的化学结构

Fig.1 Chemical structure of raddeanin A

1 试验部分

1.1 仪器与装置

LCQ 型质谱仪:美国 Thermo-Finnigan 公司产品,配置有 ESI 离子源和直接进样注射泵,离子阱质量分析器,Xcalibur 1.2 数据处理系统。

1.2 材料与试剂

吡啶(分析纯):用前经干燥处理;其他液体试剂均为分析纯;三苯甲基氯:分析纯,经真空干燥;银莲花素 A:从多被银莲花中分离得到。

取 89.6 mg(0.1 mmol)银莲花素 A 溶于无水吡啶(5 mL)中,加入 27.9 mg(0.1 mmol)三苯甲基氯,60 ℃下搅拌 10 h。产物经硅胶柱层析,以 V(甲醇):V(氯仿):V(水)=1:8:0.1 的混合溶液洗脱,得衍生化产物 12.6 mg,得率为 11.1%。取适量样品溶解于 V(甲醇):V(水)=9:1 的混合溶液,采用直接进样法进行电喷雾质谱分析。

1.3 质谱条件

正、负离子模式扫描;质量扫描范围 m/z 100~2 000;喷射电压 5 kV;毛细管温度 250 ℃;毛细管电压 ± 5 V;壳气(氮气)流速 20 L $\cdot$ min⁻¹;离子阱压力 3.2×10^{-3} Pa;注射泵进样速度 1.5 μ L $\cdot$ min⁻¹;正、负离子方式同时采集;二级质谱碰撞能量为 40%。

2 结果与讨论

2.1 银莲花素 A 电喷雾质谱研究

银莲花素 A 在正、负离子模式下的电喷雾一级和二级质谱图示于图 2,图 3。银莲花素 A 在正、负离子模式下分别形成 m/z 919.60[M+Na]⁺ 和 m/z 895.58[M-H]⁻ 的准分子离子峰,同时也分别出现二聚体的离子峰 m/z 1 815.44[2M+Na]⁺ 和 m/z 1 791.67[2M-H]⁻。二级质谱图中,正离子模式下出现了常规离子 m/z 875.53[M+Na-CO₂]⁺、773.49[M+Na-rha]⁺ 和 729.56[M+Na-rha-CO₂]⁺,同时还出现了特殊的离子 m/z 757.38[M+Na-162]⁺;负离子模式下除了出现了离子 m/z 749.43[M-H-rha]⁻、587.33[M-H-rha-glc]⁻ 和 455.39[M-H-rha-glc-ara]⁻,也出现了丰度很强的特殊离子 m/z 733.40[M-H-162]⁻。

对上述特殊离子的出现有如下 3 种解释:(1)银莲花素 A 的糖链中存在分支结构;(2)失去 O-rha 的同时伴随着一个氢原子的重排所产生的;(3)首先失去银莲花素 A 糖链中间的葡萄糖所产生的。但文献[9]已经排除了(1)的可能性,所以原因只能为(2)或(3)。为了确认失去的 162 碎片是否为葡萄糖,只需通过衍生化改变葡萄糖部分的质量数,比较分析衍生物和银莲花素 A 的裂解碎片就有可能解决这个问题。

2.2 银莲花素 A 与三苯甲基氯反应产物的电喷雾质谱研究

由于三苯甲基氯的空间位阻很大,作为银莲花素 A 中葡萄糖上的 6 位伯羟基选择性衍生化反应是合适的。三苯甲基衍生物在负离子模式下的一级和二级电喷雾质谱图示于图 4。一级谱图中主要出现 m/z 1 137.84[M-H]⁻ 的准分子离子峰,在该准分子离子的二级质谱图中,没有出现[M-H-162]⁻ 的碎片离子,但出现了 m/z 991.43[M-H-rha]⁻ 和丰度很强的 m/z

733.36[M-H-404]⁻的碎片离子,后者的 m/z 恰好与失去衍生化产物糖链中间的葡萄糖后的 m/z 完全吻合;同时还出现了 m/z 587.28[M-H-rha-404]⁻ 和 m/z 455.45[M-H-rha-404-ara]⁻ 的碎片离子。正离子模式下的二级质谱同样未出现[M+Na-162]⁺的碎片离子,不过出现的 m/z 756.81[M+Na-404]⁺的碎片离子峰丰度很弱,基峰为 m/z 917.41 的碎片

离子,该离子为分子离子失去三苯甲烷所产生的,示于图 5。

根据衍生生物的质谱裂解碎片分析,银莲花素 A 在质谱裂解过程中产生的 M-162 碎片离子为失去糖链中间的葡萄糖所致。文献所报道的这种重排裂解都发生在糖 1,2 位连接的位置,考虑到 1,2 位连接在空间上的距离比较近,推测其裂解机理示于图 6。

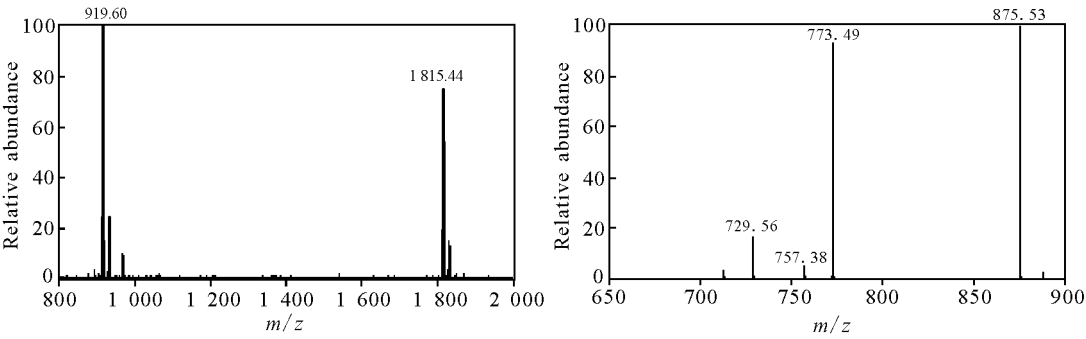


图 2 银莲花素 A 在正离子模式下的一级和二级质谱图
Fig. 2 MS and MS/MS spectrum of raddeanin A in positive ion mode

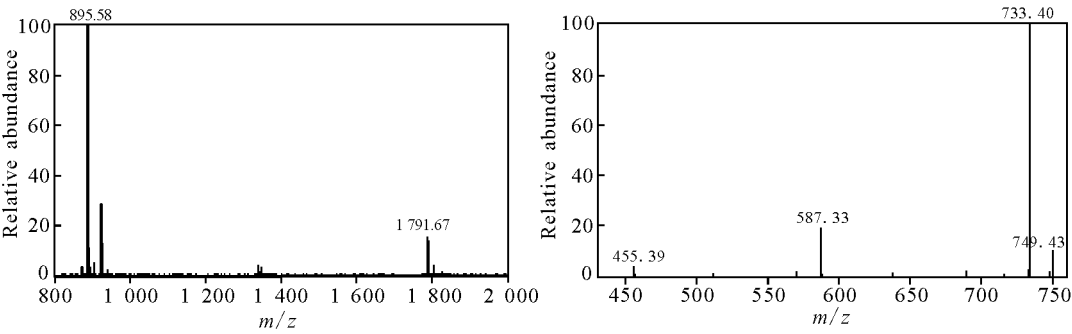


图 3 银莲花素 A 在负离子模式下的一级和二级质谱图
Fig. 3 MS and MS/MS spectrum of raddeanin A in negative ion mode

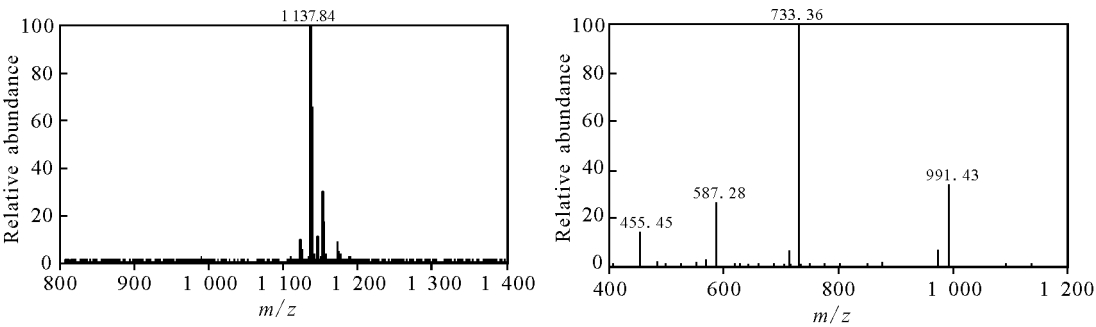


图 4 银莲花素 A 衍生化产物在负离子模式下的一级和二级质谱图
Fig. 4 MS and MS/MS spectrum of derivative of raddeanin A in negative ion mode

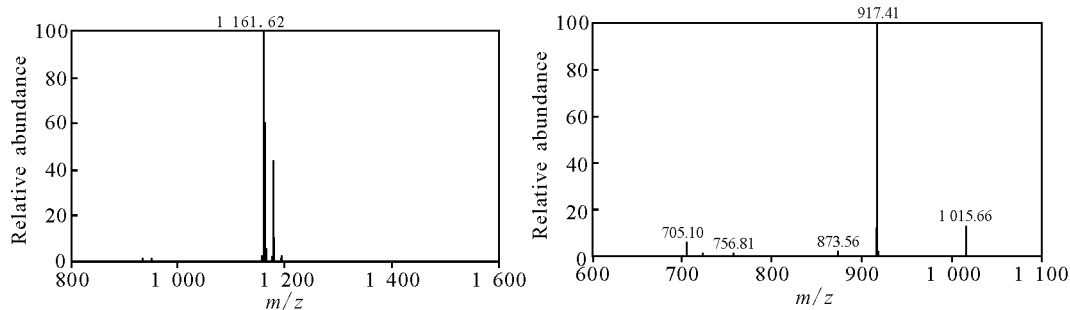


图 5 银莲花素 A 衍生化产物在正离子模式下的一级和二级质谱图

Fig. 5 MS and MS/MS spectrum of derivative of raddeanin A in positive ion mode

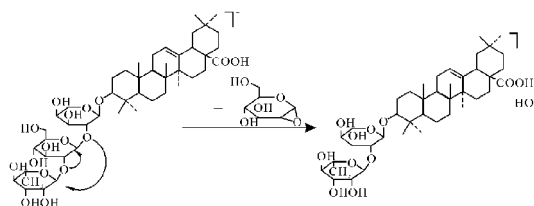


图 6 银莲花素 A 可能的重排裂解机理

Fig. 6 Proposed rearrangement

fragmentation mechanism of raddeanin A

事实上,这种裂解机理和常规的失去末端糖(Y 型断裂)的裂解机理很相似,只不过失去末端糖伴随着的是 2 位氢原子的重排,而这里则是伴随着整个末端糖(也处在葡萄糖的 2 位上)的重排。

从图 2 和图 3 可以看出,虽然在正、负离子模式下都发生了这种重排裂解,但在负离子模式下这种重排发生的几率明显要大得多,其原因可能与正、负离子模式下电荷的分布情况不同有关。正离子模式下电荷主要集中在加合的钠离子上;而负离子模式下电荷则主要分布在整个糖链上。从文献中发现,发生这种重排裂解的皂苷的末端糖均依次为鼠李糖和葡萄糖,连接位点为 1,2 连接,尚未见其他类型糖发生这种重排的文献报道,其原因值得进一步探讨。

3 结 论

本研究采用化学衍生结合 ESI-MS/MS 法证明银莲花素 A 在质谱裂解过程中伴随有重排裂解发生,并提出可能的裂解机理。结果表明,不能仅仅依靠 ESI-MS/MS 确定皂苷中糖的连接序列(直链结构或分支结构),特别是存在上述

糖链结构的皂苷,必要时需结合 2D-NMR 或衍生化加以确认。

参考文献:

- [1] FANG S P,HAO C Y,SUN W X,et al. Rapid analysis of steroidal saponin mixture using electrospray ionization mass spectrometry combined with sequential tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,1998,12(10):589-594.
- [2] GUO M Q,SONG F R,LIU Z Q,et al. Characterization of triterpenoidic saponin mixture in crude extracts from leaves of *Acanthopanax senticosus* harms by saponin structure correlation and mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta,2006,557 (1/2):198-203.
- [3] 李 锐,周 燕,杨永成,等. 无患子皂苷成分的串联质谱分析[J]. 高等学校化学学报,2006,27 (1):52-54.
- [4] 梁 勇,郭宝江,梁冠洪,等. 牛膝中三萜皂苷类化合物的电喷雾电离串联质谱研究[J]. 质谱学报,2005,26(1):10-13.
- [5] LI B,ABLIZ Z,TANG M J,et al. Rapid structural characterization of triterpenoid saponins in crude extract from *Symplocos chinensis* using liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,2006,1101(1/2):53-62.
- [6] CHAI W G,PISKAREV V,LAWSON A M. Negative-ion electrospray mass spectrometry of neutral underivatized oligasaccharides [J]. Anal Chem,2001,73(3):651-657.

(下转第 83 页)

2.2 讨论

(1)通过 GC/MS 分离鉴定,共鉴定出 44 种组分的化学结构及相对含量,其中乙醇含量最高,占全部检出成分的一半以上;其次为 *N,N*-二乙基-3-甲苯甲酰胺,中文名为避蚊胺(DEET),与该品牌驱蚊花露水标明特别添加的有效成分相符;其他成分主要为烯、醇、酯等。

(2)检出物质对花露水香味贡献各有不同,含量较多的体现为苯乙醇、异长叶烯、二氢茉莉酮酸甲酯、芳樟醇、二氢月桂烯醇、 α -己基肉桂醛、佳乐麝香、 β -紫罗酮、香茅醇、丁酸芳樟酯。

3 结 论

顶空萃取-气相色谱-质谱联用技术可对驱蚊花露水中挥发性成分进行有效的分析。该方法简单、快捷、无需其他溶剂,是分离鉴定驱蚊花露水产品的快速、灵敏的方法。

参考文献:

- [1] 符展明,姚聂婷. 顶空气相色谱法测定六神香水中的甲醇[J]. 分析仪器,1994(1):40-42.

[2] 张 强. 顶空气相色谱法测定香水中的甲醇[J]. 色谱,1995,13(2):145-146.

[3] 方瑞斌,王 建. 碳素基体固相微萃取-气相色谱法/质谱法测定香水中的有机挥发物[J]. 日用化学工业,2001(3):54-56.

[4] 吴 刚,戈 峰. 蚊虫驱避剂的研究概况[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2004,11(4):253-256.

[5] 邵万明. 蚊虫驱避剂概况及 DEET 的合成[J]. 湖北化工,1994(2):34-36.

[6] MATHEWS K H. Evidence for the formation of ether linkages during the synthesis of poly (ethlene phthalate)[J]. European Polymer Journal, 1993, 29(11):1 505-1 512.

[7] 济南市轻工研究所. 合成食用香料手册[M]. 北京:中国轻工出版社,1985:1-15.
- =====
- (上接第 79 页)

[7] CANCELLA M T,GAUCHER S P,DESAIRE H, et al. Combined partial acid hydrolysis and electrospray ionization-mass spectrometry for the structure determination of oligasaccharides [J]. Anal Chem,2000,72(13):2 901-2 907.

[8] CHEN M L,SONG F R,GUO M Q,et al. Analysis of flavonoid constituents from leaves of acanthopanax senticosus harms by electrospray tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2002,16:264-271.

[9] LI R,WU Z J,ZHANG F,et al. Differentiation of three pairs of aconite alkaloid isomers from aconitum nagarum var. lasiandrum by electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2006,20(2):157-170.

[10] 张 帆,彭树林,白冰如,等. 伏毛铁棒锤根中总生物碱的串联质谱分析[J]. 质谱学报,2006,27(2):71-73.

[11] 刘力生,肖显华,张龙弟,等. 多被银莲花素 A 对癌细胞 DNA,RNA,蛋白质和血浆 cAMP 含量的影响[J]. 中国药理学报,1985,6(3):189-192.

[12] 吴凤镔,朱子清. 中药竹节香附(Anemone raddeana Regel)化学成分的研究 II [J]. 化学学报,1984,42(3):253-258.

[13] KOVACIK V,HIRSCH J,KOVAC P,et al. Oligosaccharide characterization using collision-induced dissociation fast atom bombardment mass spectrometry: evidence for internal monosaccharide residue loss[J]. J Mass Spectrom,1995,30(7):949-958.

[14] CUI M,SUN W X,SONG F R,et al. Multi-stage mass spectrometric studies of triterpenoid saponins in crude extracts from Acanthopanax senticosus harms[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,1999,13(10):873-879.

[15] LEE M R,CHEN C M,HWANG B H,et al. Analysis of saponins from black bean by electrospray ionization and fast atom bombardment tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom,1999,34(8):804-812.

[16] 周 燕,李 锐,王兴明,等. 冻地银莲花中三萜皂苷的 HPLC/MSⁿ 分析[J]. 有机化学,2006,26(1):116-119.

[17] 李顺意,李 紫,王世敏,等. 高效液相色谱-质谱-质谱法快速鉴定中药竹节香附的皂苷[J]. 湖北大学学报:自然科学版,2000,22(4):382-386.