

绣线菊二萜生物碱电喷雾质谱研究

赵沛基, 范黎明, 沈月毛*

(中科院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要: 描述了应用电喷雾二级串联质谱的撞击能量差别来确定不同骨架的二萜生物碱的方法。在优化质谱条件后, 分析 9 个绣线菊二萜生物碱裂解途径。结果表明: Hetisine 型二萜生物碱二级裂解比 Atisine 型二萜生物碱二级裂解所需的能量高, 因此可以用电喷雾二级串联质谱的撞击能量差别来简便快速地鉴定粉花绣线菊不同变种中二萜生物碱的结构类型。

关键词: 绣线菊; 电喷雾串联质谱; 二萜生物碱; 撞击能量

中图分类号: O 657. 63; Q 949. 751. 8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2004)03-235-04

Studies on Electrospray Ionization Mass Spectra of Diterpene Alkaloids From *Spiraea japonica*

ZHAO Pei-ji, FAN Liming, SHEN Yue'mao*

(The State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: The successful detection method of skeleton types of diterpene alkaloids from *Spiraea japonica* var using the difference of collision energy of electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI/MS²) was described in great detail. By the analysis of MS fragmentations of 9 diterpene alkaloids from *Spiraea japonica* var, it indicated that under the optimized instrumental conditions, hetisine-type diterpene alkaloids were more stable than atisine-type alkaloids. The collision energy for the secondary dissociation of atisine-type diterpene alkaloids was obviously lower than that for hetisine-type ones. So the difference of collision energy in electrospray MS² can be used as evidence to identify the structural types of diterpene alkaloids isolated from *Spiraea japonica* simply and rapidly. The report of this identification method is the first found in domestic references.

Key words: *Spiraea japonica*; electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI/MS²); diterpene alkaloid; collision energy

收稿日期: 2003-12-15; 修回日期: 2004-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070087)

作者简介: 赵沛基(1974~), 男(白族), 在职研究生, 主要从事植物次生代谢的研究。E-mail: plenty@mail.kib.ac.cn

*通讯作者: 沈月毛, 研究员, 主要从事次生代谢产物的生物合成。E-mail: yshen@public.km.yn.cn



粉花绣线菊 (*Spiraea japonica*) 系蔷薇科 (Rosaceae) 绣线菊属 (*Spiraea*) 植物, 本种变异性强, 在我国有 7 个变种, 即光叶变种 (*S. japonica* var. *fortunei*)、渐尖变种 (*S. japonica* var. *acuminata*)、裂叶变种 (*S. japonica* var. *incisa*)、急尖变种 (*S. japonica* var. *acuta*)、椭圆叶变种 (*S. japonica* var. *ovalifolia*)、无毛变种 (*S. japonica* var. *glabra*) 和星花变种 (*S. japonica* var. *stellaris*)。各变种在云南省均有分布, 其中渐尖变种和光叶变种在民间用于通经、通便、利尿、月经不调等疾病^[1]。粉花绣线菊的化学成分研究始于 1964 年, 国内外学者相继发表多篇报道。从研究结果看, 粉花绣线菊复合群中富含 C₂₀ 二萜生物碱, 主要有 A_{tisine} (阿替素异叶乌头碱) 型和 H_{etisine} (赫替素异叶乌头素) 型两大类, 并且其分布具有一定的规律性。从滇西、滇中、滇东和贵阳产的粉花绣线菊的不同变种中分离得到了不同类型的二萜生物碱, 组成及含量在不同的变种中表现出极大的差异。郝小江等^[2]认为不同类型的生物碱是粉花绣线菊不同变种在进化过程中适应环境的结果, 二萜生物碱 A_{tisine} 型具有向 H_{etisine} 型进化的趋势, 并认为我国西南的横断山区可能是这一类群的分化中心。因此分析其中两种二萜生物碱不同的骨架类型, 可为粉花绣线菊化学分类和进化的研究提供必要的证据。

绣线菊二萜生物碱在常规检测的紫外波长范围内, 无明显紫外吸收, 因此不能采用紫外吸收 (UV)、高效液相色谱 (HPLC) 等技术做定性

和定量的分析。本工作尝试应用二级串联质谱断裂撞击能量的差别, 希望能够高效、快速、准确分辨粉花绣线菊不同变种中两种二萜生物碱的骨架类型。

1 实验部分

1.1 主要仪器

Finnigan Advantage LCQ: 美国热电 (Thermo) 公司产品; Waters 2695 高效液相色谱仪 (HPLC): 美国 Waters 公司产品。

1.2 主要试剂

甲醇: 色谱纯; 甲酸: 分析纯; 纯净水。

1.3 质谱条件

喷雾电压 5.20 kV; 柱前压 1.5 MPa; 毛细管电压 47.0 V, 温度 250.0 °C; 离子透镜补偿电压 30.0 V。在上述条件下, 绣线菊二萜生物碱的离子传输效率最高, 离子强度最大。

1.4 实验样品

9 个绣线菊二萜生物碱, 包括 4 个 A_{tisine} 型: 绣线菊胺 (Spiramine) A/B、Spiramine C/D、Spiramine T 和绣线菊酰胺 (Spiramide); 5 个 H_{etisine} 型: 绣线菊啶 (Spiradine) A、Spiradine B、Spiradine C、绣线菊嗪 (Spirazine) III 和 Spirazine V/VI, 其结构分别示于图 1。每一样品称取 1 mg, 溶解在 5 mL 甲醇中。测试时, 将样品稀释 20 倍。所有样品均从粉花绣线菊 (*Spiraea japonica*) 的不同变种中分离获得, 是粉花绣线菊中的主要生物碱^[3]。

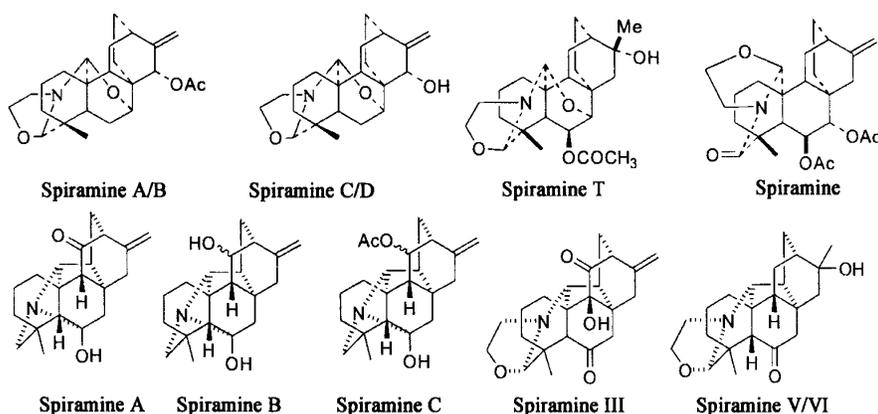


图 1 9 个二萜生物碱的结构

Fig 1 Geometric structures of nine di-terpene alkaloids

1.5 实验方法

绣线菊二萜生物碱直接进样, 用 Waters 2695 HPLC 的流动相推进, 流动相为甲醇-水混和液(95 : 5, 体积比), 其中水相含 0.5% 甲酸, 流速为 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。对准分子离子峰进行二级质谱裂解, 裂解撞击能量强度选择以获得准分子离子峰的丰度为二级子离子的 1/3, 二级母离子的丰度为三级子离子的 1/2 时的实际撞击能量强度为裂解撞击能量强度。

2 实验结果

在最优化的条件下, 选定母离子(准分子离

子峰), 调整裂解撞击能量, 得到准分子离子和相应的二萜生物碱的二级裂解图谱。两种二萜生物碱的裂解途径示于图 2。A tisine 型的生物碱在二级裂解时, 撞击能量较低, 子离子包含有主要的单一的碎片, 在二级裂解过程中主要是失去一个水分子或者乙酸分子, 失去碎片的位置是环上连有羟基或乙酯基的碳原子; Hetisine 型的生物碱在进行二级裂解时, 主要是失去一个水分子或者乙酸分子, 但它所需的能量更高。两种类型二萜生物碱的三级质谱裂解的撞击能量差别没有明显的规律性, 而且在三级裂解中, 有些生物碱产生的碎片不稳定或产生多个碎片。

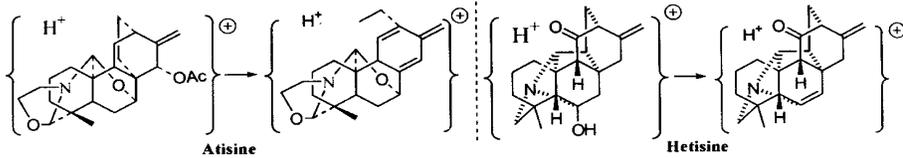


图 2 两种二萜生物碱的裂解途径

Fig 2 Fragmentation pathway of two types di-terpene alkaloid

如表 1 所列, 在选定了子/母离子的相对丰度时, A tisine 型二萜生物碱二级裂解的撞击能量在基准撞击能量的 30% 以下(包括 30%), 而 Hetisine 型的二萜生物碱二级裂解的撞击能量

则在 34% 以上。因此, 通过调整绣线菊二萜生物碱的二级裂解图谱, 根据裂解撞击的能量, 可以准确鉴定两种不同的二萜生物碱的类型。

表 1 不同类型生物碱的多级裂解数据

Table 1 MSⁿ mass data of different type alkaloids

Type	Alkaloid name	Quasimolecular ion	MS ²		MS ³	
			Fragment ion	Collision energy/%	Fragment ion	Collision energy/%
A tisine	Spiramine A/B	400	340	28	312	35
	Spiramine C/D	358	340	30	312	36
	Spiramine T	418	358	28	340	35
	Spiramide	458	398	22	338	29
Hetisine	Spiradine A	312	294	37	266	35
	Spiradine B	314	296	36	268	34
	Spiradine C	356	296	34	278	30
	Spirazine III	370	352	37	352	35
			342	36	342	35
	Spirazine V/VI	358	330	36	286	38
340			36	322	37	

3 讨论

A tisine 型和 Hetisine 型二萜生物碱在骨架上的主要区别是 C-20 和 C-14 的连接与否, Hetisine 型二萜生物碱的 C-20 和 C-14 是以 C—C 键相连, 而 A tisine 型二萜生物碱的 C-20 和 C-14 没有连接, 推测该 C—C 键的存在增加了化合物裂解的稳定性。

在研究了两种类型, 9 个已知绣线菊二萜生物碱的二级裂解后, 发现两种类型化合物裂解时在撞击能量上的差别有规律。进一步对更多种绣线菊二萜生物碱, 及其混合物组分的分析检测, 认为撞击能量的差别可用于分辨两种类型的生物碱。但有以下两点值得注意:

(1) 由于在不同的仪器上, 优化得到的质谱条件可能不同, 所以撞击能量的绝对数值可能与本研究报道的不同, 但是两种类型的生物碱在二级裂解的撞击能量存在较大的差异, 可以通过测定相应的标准品来确定;

(2) 在测定工作中, 所用于测定的二萜生物碱的数量有限, 而天然产物的结构类型多样, 有可能存在一些结构特异而含量极低的化合物不

遵循本研究所报道的规律。本研究的意义和创新点在于用简便、快捷的方式来鉴别粉花绣线菊不同变种中二萜生物碱的骨架类型, 而在粉花绣线菊不同变种中的主要生物碱均已经过结构鉴定, 并且符合所发现的规律。

多级串联质谱已经广泛的应用在生物学、化学和药物学的研究中, 但利用串联质谱在二级裂解时的撞击能量的差别区分不同骨架二萜生物碱的类型来研究相关化学分类及相关类群的进化问题, 在国内尚未见报道。

参考文献

- [1] 吴征镒主编 云南种子植物名录(上册) [M] 昆明: 云南人民出版社, 1984 542~ 543
- [2] 郝小江, 聂磊, 孙航, 等 粉花绣线菊复合群的化学分类研究 [J] 云南植物研究, 1997, 19(3): 297~ 303
- [3] Hao Xiaojiang, Shen Yuemao, Li Ling, et al The Chemistry and Biochemistry of Spiraea japonica Complex [J] Current Medicinal Chemistry, 2003, 10 (1): 1 241~ 1 253
- [32] Grieves GA, Buchanan JW, Reddic JE, et al Photodissociation of Exohedral Transition Metal-C₆₀ Complexes [J] Int J Mass Spectrom, 2001, 204: 223~ 232
- [33] Ross MM, Callahan JH. Formation and Characterization of Carbon Molecule-helium (C₆₀He⁺) [J] J Phys Chem, 1991, 95(15): 5 720~ 5 723
- [34] Saunders M, Jimenez-Vázquez HA, Cross RJ, et al Probing the Interior of Fullerenes by ³He NMR Spectroscopy of Endohedral ³He@C₆₀ and ³He@C₇₀ [J] Nature, 1994, 367: 256~ 258
- [35] Caldwell KA, Giblin DE, Gross ML. High-energy Collisions of Fullerene Radical Cations With Target Gases: Capture of the Target Gas and Charge Stripping of C₆₀ bul⁺, C₇₀ bul⁺, and C₈₄ bul⁺ [J] J Am Chem Soc, 1992, 114 (10): 3 743~ 3 756
- [36] Ren XY, Liu ZY, Zhu TQ, et al Gas-phase Ion-molecule Reactions of Neutral C₆₀ With the Plasmas of Trimethylsilyl Ethers and *ab initio* Study on the Structures [J] J Mol Struct (Theochem), 2003, 664, 665: 247~ 254
- [37] Ma L, Liu Z, Wang W, et al Gas-phase Ion-molecule Reactions of Neutral C₆₀ With the Plasmas of Alkylmethyl Ethers and Primary Alcohols [J] J Phys Chem A, 1999, 103(43): 8 634 ~ 8 639
- [38] Kan SZ, Byun YG, Freiser BS. Formation of Metallacyclic Fullerene C₆₀ Derivatives via Gas-phase Ion-molecule Reactions [J] J Am Chem Soc, 1995, 117(3): 1 177~ 1 178
- [39] Sun J, Bohme DK. Gas-phase Reactions of Fullerene Cations C₆₀(x⁺) (x = 1-3) With Pyrrolidine and Piperidine: Sequential Reactions With C₆₀(+) [J] Int J Mass Spectrom, 2000, 195: 401~ 409
- [40] Petrie S, Bohme DK. Laboratory Studies of Ion/Molecule Reactions of Fullerenes: Chemical Derivatization of Fullerenes Within Dense Interstellar Clouds and Circumstellar Shells [J] Astrophysical Journal, 2000, 540 (2): 869~ 885

(上接第 248 页)