

4种白藜芦醇类化合物的电喷雾多级质谱裂解规律研究^Δ

刘一*, 李媛, 赵立波, 方翼, 冯婉玉[#](北京大学人民医院药剂科, 北京 100044)

中图分类号 R972[·]6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0033-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.11

摘要 目的: 研究4种白藜芦醇类化合物的电喷雾多级质谱裂解规律。方法: 采用电喷雾离子源(ESI源), 对白藜芦醇、紫檀芪、白藜芦醇三甲醚和三乙酰基白藜芦醇进行多级质谱分析。根据结构分为正负2种离子检测方式(+/- MS), 含有酚羟基基团的白藜芦醇和紫檀芪采用负离子检测方式, 不含酚羟基基团的白藜芦醇三甲醚和三乙酰基白藜芦醇采用正离子检测方式。结果: 在正、负离子检测模式下, 4种白藜芦醇类化合物一级质谱特征信号分别为[M+H]⁺和[M-H]⁻。分子离子在二级质谱中裂解顺序为: 首先脱去苯环上对位, 即4'位上的取代基; 然后再依次脱去苯环间位, 即3,5位上的取代基; 最终苯环发生裂解。结论: 该质谱特征为白藜芦醇类化合物的结构分析和鉴定研究提供了参考依据。

关键词 白藜芦醇类化合物; 电喷雾多级质谱; 裂解规律

Study on the Fragmentation Pathways of 4 Kinds of Resveratrol Compounds by ESI-MSⁿ

LIU Yi, LI Yuan, ZHAO Li-bo, FANG Yi, FENG Wan-yu (Dept. of Pharmacy, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the fragmentation pathways of 4 kinds of resveratrol compounds by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MSⁿ). METHODS: ESI source was applied to analyze MSⁿ of resveratrol, pterostilbene, trimethoxystilbene, and triacetyresveratrol. Based on the structure of the compounds, ESI-MSⁿ method was used under positive and negative ion detection mode (+/- MS). Resveratrol and pterostilbene with phenolic hydroxyl groups were analyzed by negative ion detection mode, and the other 2 compounds without phenolic hydroxyl groups were analyzed by positive ion detection mode. RESULTS: Both under positive and negative ion detection modes, the mass spectrum characteristic signals of 4 kinds of resveratrols were [M+H]⁺ and [M-H]⁻, respectively. The fragmentation patterns of parent ions in MS² were as follows: firstly, took off the benzene ring substituents on the 4'-position, and then in turn took off between the benzene ring, i.e. 3,5 substituents, and ultimately cracking occurred in the benzene ring. CONCLUSION: These mass spectrum rules could provide reference for structural analysis and identification of resveratrol compounds.

KEY WORDS Resveratrol compounds; Electrospray ionization tandem mass spectrometry; Fragmentation pathways

白藜芦醇(Resveratrol), 又名芪三酚, 是一种具有生物活性的植物抗毒素, 广泛存在于葡萄、花生、虎杖等天然植物中。研究^[1-2]发现, 白藜芦醇具有预防心脏病、抑制血小板凝聚、调控脂质和脂蛋白代谢、抗氧化等作用, 特别是对癌症的起始、增进和扩展都有较强的抑制作用。因此, 近年来, 白藜芦醇的研究与应用引起了极大关注。但是, 在植物体中白藜芦醇含量较低, 不能满足研究者的需求。由于白藜芦醇类似物具有与白藜芦醇相似的结构和功能, 研究者期望通过对白藜芦醇类化合物的研究, 寻找具有更强生理活性的化合物。紫檀芪(Pterostilbene)是白藜芦醇的3,5-二甲基化产物, 是目前研究较多的白藜芦醇天然衍生物, 其广泛存在于葡萄、广西血竭和蜂胶中, 具有抗癌、降血脂、抗糖尿病的特性。在体外, 紫檀芪的抗真菌特性比白藜芦醇高5~10倍。另外, 白藜芦醇甲基化转移酶可以在体内或体外使白藜芦醇合成紫檀芪^[3]。白藜芦醇三甲醚(Trimethoxystilbene)是白藜芦醇的3,5,4'-三

甲基化产物, 具有非常强的抗血管生成作用, 其抑制内皮细胞增殖、生长、胶原质侵入和形态形成等活性是白藜芦醇的30~100倍, 并具有很强的血管靶向性, 可显著引起微管分解和微管蛋白解聚^[4]。三乙酰基白藜芦醇(Triacetyresveratrol)是白藜芦醇乙酰化后的衍生物, 乙酰化的白藜芦醇进入体内后, 在体内转变为白藜芦醇, 发挥其生物活性。乙酰化后的白藜芦醇与白藜芦醇相比具有稳定性增强、生物利用度高的特点, 具有抗炎、抗癌、抗菌等活性。上述4种白藜芦醇类化合物的结构见图1。

电喷雾质谱(ESI-MS)是近年来发展并完善起来的一种分析手段。作为一种新的软电离技术, 电喷雾电离既可以得到化合物的相对分子质量, 又能得到较为丰富的碎片结构信息, 在化合物结构解析中的应用越来越广泛^[5-8]。关于白藜芦醇类化合物的质谱裂解行为尚未见文献报道。因此, 本文选择上述4种具有较好生理活性的白藜芦醇类化合物, 采用三重四级杆线性离子阱串联质谱法对其进行多级质谱分析, 解析碎片离子结构, 总结质谱裂解规律, 为该化合物的结构分析和鉴定提供理论依据。

1 材料

AB SCIEX QTRAP5500型三重四级杆线性离子阱串联质谱

Δ 基金项目: 北京大学人民医院研究与发展基金资助项目(No. RDB-2010-28)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 临床药学、药物分析。电话: 010-88325989。E-mail: lyi1267@126.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 临床药学。电话: 010-88325750。E-mail: fengwanyu2000@yahoo.com.cn

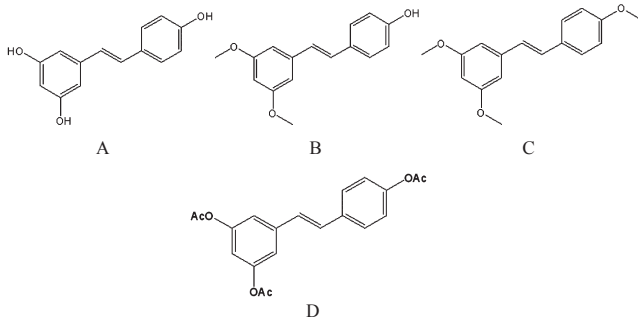


图1 白藜芦醇类化合物的结构

A. 白藜芦醇; B. 紫檀芪; C. 白藜芦醇三甲醚; D. 三乙酰基白藜芦醇

Fig 1 The structures of resveratrol compounds

A. resveratrol; B. pterostilbene; C. trimethoxystilbene; D. triacetylresveratrol

谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)和直接进样用注射泵、Analyst 1.5.1分析软件(美国Applied Biosystems公司)。

白藜芦醇(中国食品药品检定研究院,批号:111535-200502,纯度:>99.0%);紫檀芪(批号:20110312,纯度:99.89%);白藜芦醇三甲醚(批号:20110416,纯度:99.5%)和三乙酰基白藜芦醇(批号:20110523,纯度:99.5%)均购自杭州广林生物医药有限公司;甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 质谱条件

ESI;喷雾口位置:3:5;碰撞气压力:Medium;离子源电压: $\pm 4\ 500.0\ \text{V}$;检测方式:多级全扫描质谱;质量扫描范围:质荷比(m/z)50~800;注射泵进样流速:5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。样品溶于甲醇,过0.45 μm 滤膜。

2.2 质谱裂解研究

根据结构将4种白藜芦醇类化合物分为正负两种离子检测方式:第一种为含有酚羟基的白藜芦醇和紫檀芪,其在溶液中很容易解离为酸根离子,在负离子检测方式下灵敏度较高,得到准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$,因此选择负离子检测方式;第二种为不含酚羟基的白藜芦醇三甲醚和三乙酰基白藜芦醇,在正离子检测方式下响应较好,因此选择正离子检测方式进行多级质谱分析。

2.2.1 白藜芦醇的质谱解析。在负离子扫描模式下,白藜芦醇的全扫描一级质谱以准分子离子峰 $m/z\ 227\ [\text{M}-\text{H}]^-$ 为基峰,无聚合或加合离子。利用碰撞诱导解离(CID)- MS^n 质谱技术,选择 m/z 为227的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 准分子离子为母离子,进行二级质谱分析,得到了白藜芦醇的 MS^2 质谱图。该条件下得到了 m/z 为227的母离子的多个碎片离子,分别为 m/z 185、143、157(159)、117。这是由于CID能量加大,使得白藜芦醇发生键断裂而失去小分子中性分子和自由基产生的,电荷保留在质子亲和势较高的碎片离子上^[9]。其中,强度最大的 m/z 为143的离子是苯环上2,3位和1,6位间发生键断裂,失去1分子 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2^-$ 后产生的碎片离子; m/z 为185的碎片峰对应于苯环上2,3位和4,5位间发生键断裂失去1分子 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}[\text{CH}=\text{C}-\text{OH}]$ 后产生的离子;其余几个强度不一的离子可能是这几个离子进一步发生键断裂失去中性分子和自由基所产生的。为验证推测的正确性,选取 MS^2 中 m/z 为185和143的碎片离子为二级母离子进行 MS^3 质谱测定。质谱图见图2。

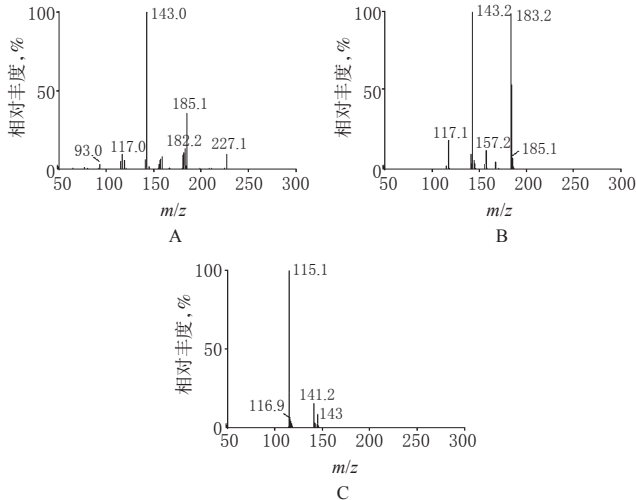


图2 白藜芦醇的质谱图

A. $m/z\ 227\ [\text{M}-\text{H}]^-$ 的 MS^2 质谱图; B. $m/z\ 185$ 的 MS^3 质谱图; C. $m/z\ 143$ 的 MS^3 质谱图

Fig 2 MS spectrum of resveratrol

A. MS^2 spectrum of $[\text{M}-\text{H}]^- m/z\ 227$; B. MS^3 spectrum of $m/z\ 185$; C. MS^3 spectrum of $m/z\ 143$

由图2可知, $m/z\ 143$ 碎片峰为 $m/z\ 185$ 离子发生键断裂失去1分子 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}[\text{CH}=\text{C}-\text{OH}]$ 产生的;除生成 $m/z\ 143$ 外,还可失去1分子 CH_2O_2^- 产生 $m/z\ 157$ 的碎片离子;对于 $m/z\ 117$ 离子,除可通过 $m/z\ 185$ 离子发生键断裂失去1分子 C_3H_5^- 生成外,还可经由 $m/z\ 143$ 失去1分子 C_2H_3^- 生成。 MS^3 质谱分析证实了 MS^2 质谱推断的正确性。基于以上分析,提出白藜芦醇的质谱裂解途径,见图3。

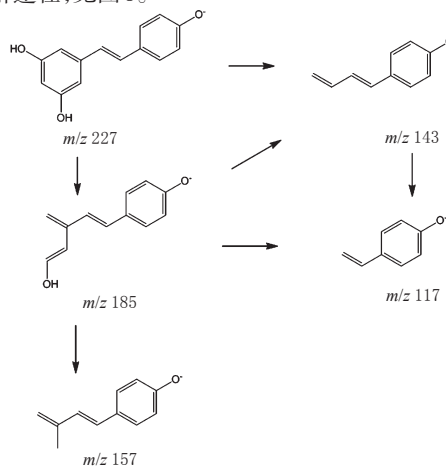


图3 白藜芦醇的质谱裂解规律

Fig 3 Fragmentation pathway of resveratrol

2.2.2 紫檀芪的质谱解析。负离子扫描模式下,紫檀芪的全扫描一级质谱以准分子离子峰 $m/z\ 255\ [\text{M}-\text{H}]^-$ 为基峰。以此准分子离子为母离子,进行二级质谱分析。该条件下得到了 m/z 为255母离子的多个碎片离子,分别为 $m/z\ 240$ 、225、197。经推测,其主要碎片离子 $m/z\ 240$ 和225,分别是母离子苯环上3,5位甲氧基侧链上C—O键发生断裂,依次失去1分子 $-\text{CH}_3$ 得到的; m/z 为197的碎片峰和 $m/z\ 225$ 之间相差28,这个结构最有可能是1分子 $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ 或1分子 $-\text{CO}$,由此,初步推测,如果是 $-\text{CH}_2\text{CH}_2$,则肯定是双键部分断裂,如果是 $-\text{CO}$,则肯

定是—OH相连的苯环发生断裂,因此,需通过 m/z 197离子的三级质谱图进行判断;其余几个强度不一的离子可能是这几个离子进一步发生键断裂失去中性分子和自由基所产生的。选取 MS^2 中 m/z 为240、225和197的碎片离子为二级母离子进行 MS^3 质谱测定。质谱图见图4。

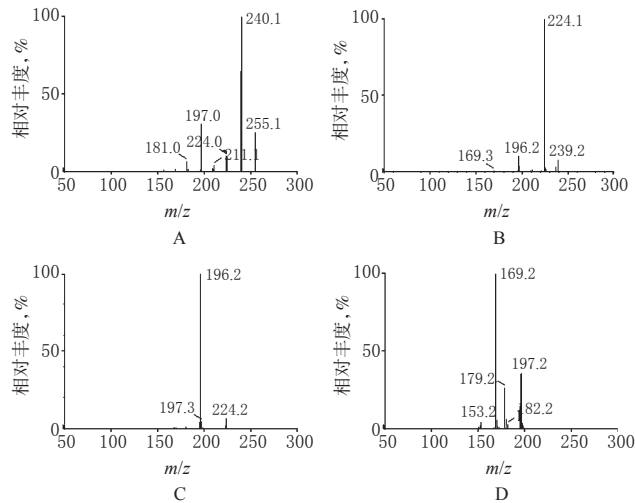


图4 紫檀芪的质谱图

A. m/z 255 $[M-H]^-$ 的 MS^2 质谱图; B. m/z 240的 MS^3 质谱图; C. m/z 225的 MS^3 质谱图; D. m/z 197的 MS^3 质谱图

Fig 4 MS spectrum of pterostilbene

A. MS^2 spectrum of $[M-H]^-$ m/z 255; B. MS^3 spectrum of m/z 240; C. MS^3 spectrum of m/z 225; D. MS^3 spectrum of m/z 197

由图4可知, m/z 225碎片峰为 m/z 240离子失去1分子 CH_3 产生的; m/z 为197的碎片峰进一步裂解后,得到 m/z 169的较强碎片离子,结合上述推测,可以判断 m/z 为197的碎片峰对应于 m/z 225碎片离子苯环上3'、4'位和4'、5'位间发生键断裂失去1分子—CHO后,发生环合反应产生的离子; m/z 169的碎片离子由 m/z 为197的碎片离子进一步脱去1分子 C_2H_2 得到。 MS^3 质谱分析为 MS^2 质谱推断提供了更确切的证据。基于以上分析,提出紫檀芪的质谱裂解途径,见图5。

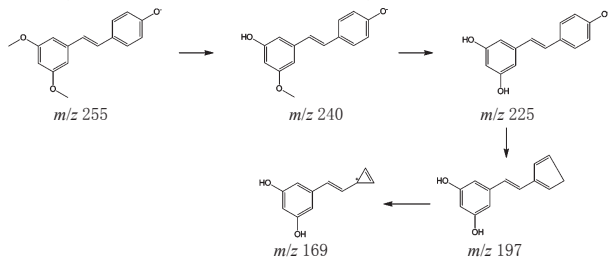


图5 紫檀芪的质谱裂解规律

Fig 5 Fragmentation pathway of pterostilbene

2.2.3 白藜芦醇三甲醚的质谱解析。白藜芦醇三甲醚和紫檀芪差别仅在于苯环4'位—OH被—OCH₃取代,是差别1个甲基的同系物。试验选择了正离子扫描模式,全扫描一级质谱以准分子离子峰 m/z 271 $[M+H]^+$ 为基峰。 m/z 为271的 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰,这是由于O原子含有孤对电子容易加合1个H质子形成正离子的缘故。选择 m/z 为271的 $[M+H]^+$ 准分子离子为母离子,进行二级质谱分析。该条件下得到了 m/z 为271母离子的多个碎片离子,分别为 m/z 256、240、225、197。经推测,其主要碎片离子 m/z 256、240和225分别是母离子苯环上

3、4'、5位甲氧基侧链上C—O键发生断裂,依次失去1分子—CH₃得到的;从各离子的信号强度来看, m/z 240的碎片离子信号强度比较大,所以,推测先脱去4'位上的—CH₃,然后再脱去3、5-位任一个—CH₃,这样从概率上解释了 m/z 240的碎片离子信号强度比较大的情况;另外,从化学分子结构上看,在双键连接的这一结构中,双键是一个吸电子的钝化基团,所以相对于对位取代基而言,间位的会更加稳定;其余几个强度不一的离子可能是这几个离子进一步发生键断裂失去中性分子和自由基所产生的。进一步选取 MS^2 中 m/z 为256、240和225的碎片离子为二级母离子进行 MS^3 质谱测定。质谱图见图6。

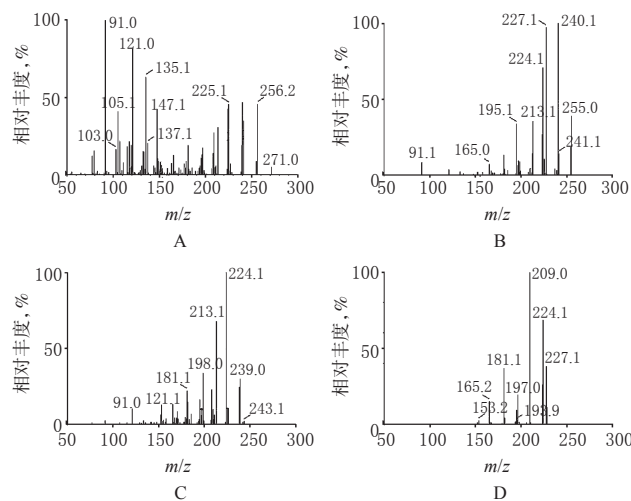


图6 白藜芦醇三甲醚的质谱图

A. m/z 271 $[M+H]^+$ 的 MS^2 质谱图; B. m/z 256的 MS^3 质谱图; C. m/z 240的 MS^3 质谱图; D. m/z 225的 MS^3 质谱图

Fig 6 MS spectrum of trimethoxystilbene

A. MS^2 spectrum of $[M+H]^+$ m/z 271; B. MS^3 spectrum of m/z 256; C. MS^3 spectrum of m/z 240; D. MS^3 spectrum of m/z 225

由图6可知, m/z 240碎片峰为 m/z 256离子失去1分子 CH_3 产生的; m/z 240碎片离子进一步失去1分子 CH_3 产生 m/z 225; m/z 225的碎片离子进一步裂解也产生了 m/z 为197的碎片峰,参考紫檀芪的裂解方式,可知 m/z 为197的碎片峰对应于 m/z 225碎片离子苯环上3'、4'位和4'、5'位间发生键断裂失去1分子CHO后,发生环合反应产生的离子。由结果可知,白藜芦醇三甲醚和紫檀芪裂解方式一致。基于以上分析,提出白藜芦醇三甲醚的质谱裂解途径,见图7。

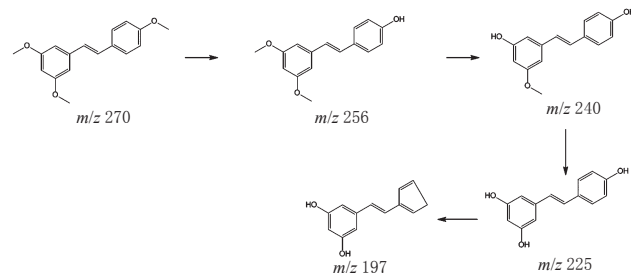


图7 白藜芦醇三甲醚的质谱裂解规律

Fig 7 Fragmentation pathway of trimethoxystilbene

2.2.4 三乙酰基白藜芦醇的质谱解析。正离子扫描模式下,三乙酰基白藜芦醇的全扫描一级质谱以分子离子峰 m/z 355 $[M+H]^+$ 为基峰。选择该准分子离子为母离子,进行二级质谱

分析。该条件下得到了 m/z 为 355 母离子的多个碎片离子, 分别为 m/z 313、271 和 229。经推测, 其主要碎片离子 m/z 313、271 和 229, 分别是母离子苯环上 3、4'、5 位乙酰基侧链上 C—O 键发生断裂, 依次失去 1 分子—COCH₃ 得到的; 从各离子的信号强度来看, m/z 271 的碎片离子信号强度比较大, 因此, 推断其脱去顺序, 与白藜芦醇三甲醚相似, 即先脱去 4' 位上的一 COCH₃, 然后再脱去 3、5-位任一个—COCH₃。为验证推测的正确性, 选取 MS² 中 m/z 为 313 和 271 的碎片离子为二级母离子进行 MS³ 质谱测定。质谱图见图 8。

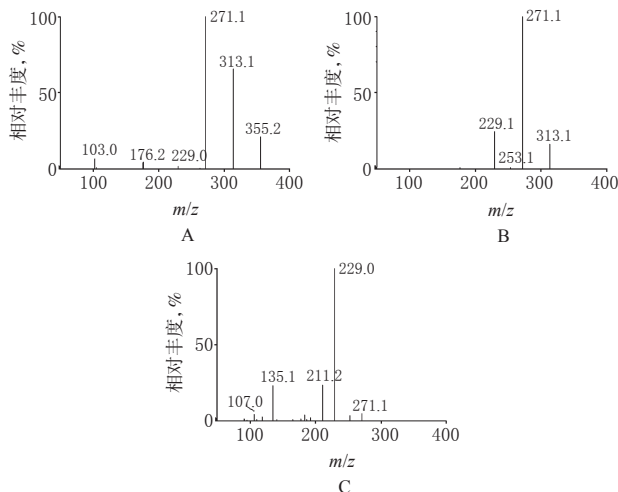


图8 三乙酰基白藜芦醇的质谱图

A. m/z 355 [M+H]⁺ 的 MS² 质谱图; B. m/z 313 的 MS³ 质谱图; C. m/z 271 的 MS³ 质谱图

Fig 8 MS spectrum of triacetylresveratrol

A. MS² spectrum of [M+H]⁺ m/z 355; B. MS³ spectrum of m/z 313; C. MS³ spectrum of m/z 271

由图 8 可知, m/z 271 碎片峰为 m/z 313 离子失去 1 分子—COCH₃ 产生的; m/z 271 碎片离子进一步失去 1 分子—COCH₃ 产生 m/z 229。由结果可知, 三乙酰基白藜芦醇和白藜芦醇三甲醚裂解方式一致。基于以上分析, 提出三乙酰基白藜芦醇的裂解途径, 见图 9。

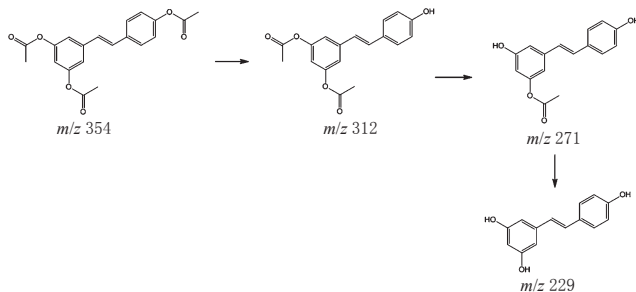


图9 三乙酰基白藜芦醇的质谱裂解规律

Fig 9 Fragmentation pathway of triacetylresveratrol

3 讨论

白藜芦醇类化合物具有与白藜芦醇相似的药理活性, 其中有些化合物的活性和选择性要强于白藜芦醇, 而且稳定性往往也好于白藜芦醇。因此, 白藜芦醇类化合物成为近年的研究热点。

本文结果表明, 在正、负离子检测模式下, 4 种白藜芦醇类化合物一级质谱特征信号分别为 [M+H]⁺ 和 [M-H]⁻。分子离子在二级质谱中裂解顺序为: 首先脱去苯环上对位, 即 4' 位上的取代基; 然后再依次脱去苯环间位, 即 3、5 位上的取代基; 最终苯环发生裂解。这 4 种化合物在正、负离子检测方式下, 裂解规律相似。这些质谱特征有助于白藜芦醇类化合物的结构分析和鉴定。本文侧重于研究白藜芦醇类单体化合物的裂解规律, 笔者下一步拟对同样具有多方面生物活性的白藜芦醇低聚体进行质谱裂解规律研究。

参考文献

- [1] Suh N, Luyengi L, Fong HH, *et al.* Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model[J]. *Anticancer Res*, 1995, 15(2): 233.
- [2] Goldberg DM. More on antioxidant activity of resveratrol in red wine[J]. *Clin Chem*, 1996, 42(1): 113.
- [3] 王俊芳, 李瑞国, 刘文, 等. 葡萄白藜芦醇主要衍生物的研究进展[J]. *园艺学报*, 2011, 38(4): 790.
- [4] Belleri M, Ribatti D, Nicoli S, *et al.* Antiangiogenic and vascular-targeting activity of the microtubule-destabilizing trans-resveratrol derivative 3, 5, 4'-trimethoxystilbene[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(5): 1 451.
- [5] Birendra NP, Ganguly AK, Michael LG. *Applied Electrospray Mass Spectrometry*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 142-181.
- [6] 焦豪妍, 许凤国, 田媛, 等. 氟喹诺酮类化合物电喷雾质谱裂解规律[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(6): 344.
- [7] 黄珺珺, 黄碧云, 季红, 等. 莫那可林 J 的电喷雾质谱裂解规律研究 (MS¹~MS⁶) [J]. *质谱学报*, 2009, 30(3): 154.
- [8] 刘继红, 曹书霞, 卢建莎, 等. 三磷酸腺苷的电喷雾质谱裂解规律研究[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(3): 283.
- [9] Barr JD, Bell AJ, Bird M, *et al.* Fragmentations and reactions of the organophosphate insecticide diazinon and its oxygen analog diazoxon studied by electrospray ionization ion trap mass spectrometry[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16(4): 515.

(收稿日期: 2012-03-31 修回日期: 2012-06-25)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅