

文章编号: 1004-4353(2016)03-0212-05

电喷雾三重四极杆串联质谱研究天然物中 紫杉烷类物质的裂解规律

李官, 李东浩, 马标*

(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要: 采用三重四极杆串联质谱研究了 7 种典型 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的裂解规律, 包括紫杉醇、巴卡廷 III、10-脱乙酰基巴卡廷 III、7-表-10-脱乙酰基紫杉醇、三尖杉宁碱、7-木糖苷紫杉醇、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇, 分析了这 7 种目标物的质谱行为, 并归属其裂解规律. 研究表明: 此类物质侧链与骨架连接处的 C—O 键易断裂, C—O 键断裂后脱去骨架上的乙酰基 (AcOH) 和苯甲酰氧基 (BzOH) 官能团. 在正离子模式下, 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的典型碎片离子 (m/z) 为: 569, 509, 527, 425, 387, 345, 327 ± 2 ; 共同的侧链 $[\text{Sc} + \text{H}]^+$ 碎片离子 (m/z) 为: 286, 264, 280, 308; 另外, 也能得到一些中性丢失离子 (m/z), 如: 122, 60, 18, 36.

关键词: 紫杉醇; 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质; 裂解规律; ESI-QQQ-MS/MS

中图分类号: Q93

文献标识码: A

Fragmentation characteristics of taxanes in natural plants by electrospray ionization tandem mass spectrometry

LI Gong, LI Donghao, MA Biao*

(*Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules*
(*Yanbian University*), Ministry of Education, Yanji 133002, China)

Abstract: The triple-quadrupole tandem mass spectrometry (MS/MS) was used to study the structure of 6-8-6-4 cyclic taxane diterpenoids, including taxol, baccation III, 7-epi-10-deacetyl baccation III, 10-deycetyl taxol, taxol B, 7-xylosyl taxol and 10-deacetyl-7-xylosyl taxol. The fragment behaviors of these compounds were analyzed and their fragmentation rules were assigned. The results showed that the C—O bond of the side chain and taxane ring was easily cleaved, and subsequently the acid (AcOH) and benzoyloxy (BzOH) functional substituents on the diterpene skeleton tend to fragment. In the positive ion mode, the typical fragment ions of 6-8-6-4 taxane diterpenoids are (m/z): 569, 509, 527, 425, 387, 345, 327 ± 2 ; common side chain $[\text{Sc} + \text{H}]^+$ fragment ions (m/z) are: 286, 264, 280, 308. In addition, some neutral lost ions (m/z): 122, 60, 18, 36 were also obtained.

Keywords: taxol; 6-8-6-4 ring taxanes; fragmentation characteristics; ESI-QQQ-MS/MS

0 引言

紫杉醇是一种具有抗癌作用的 6-8-6-4 环二萜类化合物, 因其独特的抗癌机理及其显著疗效而备受关注^[1-3]. 紫杉醇大多从红豆杉属植物中分

离获得, 但在红豆杉植物中其含量很低^[4], 而且红豆杉是国家一级保护植物且生长缓慢, 因此紫杉醇来源缺乏的问题亟待解决^[5]. 研究^[6]发现, 在自然界中经酰基和生物碱等在母核 6-8-6-4 环二萜

收稿日期: 2016-08-20

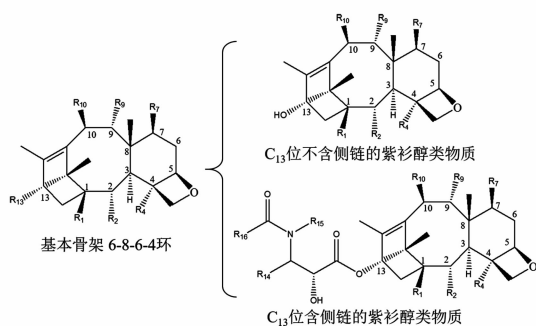
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21165020, 21265023)

* 通信作者: 马标(1991—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为有机分析化学; 李东浩(1965—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为样品前处理技术以及色谱分析.

骨架上进行不同的取代,可形成一系列不同的紫杉烷二萜类物质,具有抗癌的潜能.另外,此类紫杉烷类物质还可以通过诸如半合成、生物合成等方法转化成紫杉醇,这为缓解紫杉醇来源缺乏的问题提供了一个途径^[7].

为了全面、准确地在全类天然物中寻找紫杉烷二萜类化合物(Taxoids)的来源,减少假阳性结果^[8],需要系统地研究 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的骨架特征及具体结构,根据它们的特征碎片实现对该类物质的综合筛选^[9-10].目前,已经出现

了几种关于紫杉醇类物质裂解行为的研究^[11-12],但缺乏利用高灵敏、高通量的三重四极杆串联质谱(QQQ-MSMS)^[13]对各类型 6-8-6-4 环二萜类化合物裂解规律的探讨.因此,本文根据结构特征总结了包含典型骨架及侧链的 6-8-6-4 环物质(图 1),采用 QQQ-MSMS,研究 7 种典型含有 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的裂解模式,并根据此 7 种代表性物质的二级碎片结果,归属 6-8-6-4 环紫杉烷类物质的裂解规律,建立同时全面检测这 7 种目标物的串联质谱方法.



母核	编号	侧链结构式	侧链分子量	母核	编号	侧链结构式	侧链分子量
C ₁₃ 位不含侧链的紫杉醇类物质	a		181	C ₁₃ 位含侧链的紫杉醇类物质	a		71
	b		75		b		43
	c		99		c		55
	d		103		d		85
	e		147		e		149
	f		192		f		87
	g		149		g		57
	h		115		h		103

注: C₁₃ 位不含侧链的 6-8-6-4 环紫杉烷类物质的结构信息,包括:巴卡廷 III, 10-脱乙酰基巴卡廷 III; C₁₃ 位含有侧链的紫杉烷类物质的结构信息,包括:紫杉醇, 7-表-10-脱乙酰基紫杉醇, 三尖杉宁碱, 7-木糖苷紫杉醇, 7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇.

图 1 含 6-8-6-4 环紫杉烷类物质结构信息

1 材料与方法

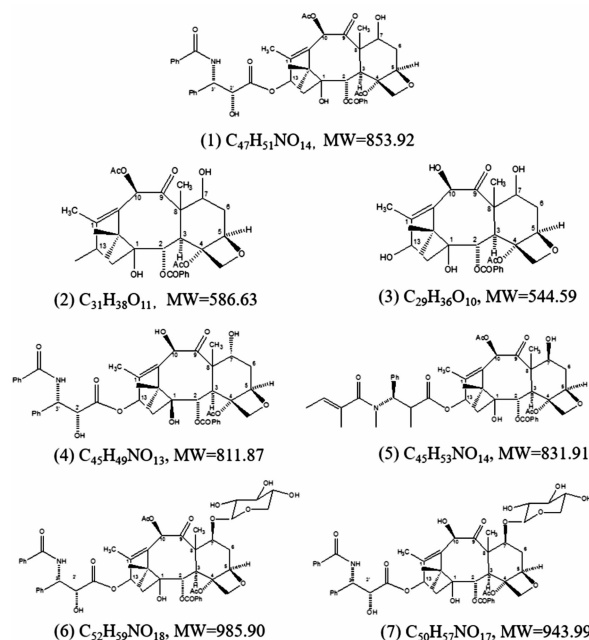
1.1 材料与试剂

紫杉烷二萜类标准品的结构信息如图 2 所示,其中包括:紫杉醇(taxol)、巴卡廷 III(baccation III)、10-脱乙酰基巴卡廷 III(10-deacetyl baccation III)、7-表-10-脱乙酰基紫杉醇(10-deacyetyl taxol)、三尖杉宁碱(taxol B)、7-木糖苷紫杉醇(7-xylosyl taxol)、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(10-deacetyl-7-xylosyl taxol). 上述 7 种含 6-8-6-4 环骨架的紫杉烷二萜类物质均购自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)公司;甲醇、水均为色谱纯,购自英国 Fisher Scientific 公司;甲酸(质谱级)购自 Sigma 公司;氮气由 NiGen LC-MS 系统(Agilent Technologies, USA)产生. 标准样品(固体粉末)在 4 ℃、干燥、黑暗条件下储存. 7 种目标物质均配制在甲醇溶剂中,标准溶液浓度为 100 μg/mL,并且在-16 ℃的黑暗条件下储存^[13].

1.2 质谱分析条件

利用液相进样系统将样品直接引入串联质谱

分析,仪器型号为安捷伦 1260 HPLC 系统联用安捷伦 6420 三重四级杆串联质谱. 离子化条件如



(1)紫杉醇; (2)巴卡廷 III; (3)10-脱乙酰基巴卡廷 III; (4)7-表-10-脱乙酰基紫杉醇; (5)三尖杉宁碱; (6)7-木糖苷紫杉醇; (7)7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇

图 2 7 种具有紫杉醇基本骨架的目标物的结构

下: ESI 电离源, 正离子扫描, 喷雾电压 4 kV, 雾化气 20 psi (1 psi \approx 6.9 kPa), 加热气 30 psi, 帘气 25 psi, 干燥气流速 10 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}$ C, 四极杆温度 100 $^{\circ}$ C, 停留时间 100 μ s. 采用二级全扫描模式, 扫描质荷比范围为 100~1 200. 数据处理软件为 Mass Hunter workstation version B.06.06. 离子化溶剂是水(0.1% 甲酸)和甲醇(0.1% 甲酸)的混合溶剂(体积比为 1 : 1), 流速为 0.3 mL/min.

2 结果与讨论

2.1 质谱条件对 6-8-6-4 环紫杉醇类物质裂解行为的影响

根据目标物质的基本骨架结构, 可将含 6-8-6-4 环的紫杉烷二萜类物质分为两大类, 即 C_{13} 位上无侧链结构和 C_{13} 位上含侧链结构^[14-15]. 本文以 10-脱乙酰基巴卡廷 III 为 C_{13} 位上无侧链结构物质的代表, 以紫杉醇为 C_{13} 位上含侧链结构物质的代表, 研究电喷雾离子化参数及质谱条件对 6-8-6-4 环紫杉醇类物质裂解行为的影响. 在不同干燥气温度等离子源条件下, 一级全扫描质谱出现 $[M+H]^+$ 的分子离子峰及 $[M+Na]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 等加合离子峰. 经过不同的碰撞(如图 3 所示)发现: 在低碰撞能(<10 eV)下, 母离子 $[M+H]^+$ 的峰很高, 碎片离子信息得到得很少, 且有效碎片峰强度很低, 这说明在该低能量下不利于灵敏、准确地分析物质结构; 在高碰撞能(>25 eV)

下, 母离子 $[M+H]^+$ 的峰消失, 形成很多较小的 m/z 碎片, 未能显示出有效的 m/z 信息, 这说明在高能量下也不利于物质结构的分析. 因此, 需要对每一种类型的物质离子化条件及碰撞能进行优化, 结果如表 1 所示.

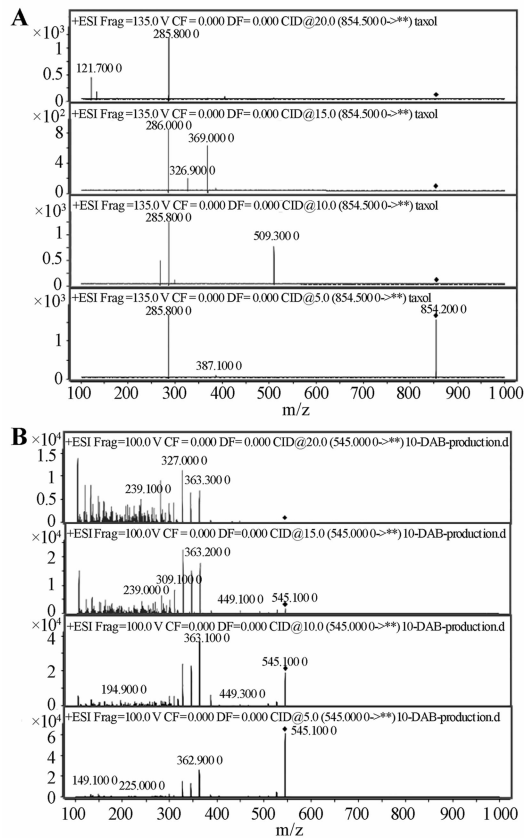


图 3 碰撞能对紫杉醇(A)和 10-脱乙酰基巴卡廷 III(B)二级裂解行为的影响

表 1 7 种紫杉烷二萜类物质三重四极杆串联质谱检测参数

目标物中文名称	目标物英文缩写	分子类型	分子量	母离子 (m/z)	毛细管出口电压/V	碰撞能/eV
紫杉醇	Taxol A	Sc-T 型	853.92	876 $[M+Na]^+$	100	25
10-脱乙酰基巴卡廷 III	10-DAB	M 型	544.59	545	110	10
巴卡廷 III	BAC III	M 型	586.63	587	100	12
7-表-10-脱乙酰基紫杉醇	7-epi-10-DAT	Sc-T 型	811.87	834 $[M+Na]^+$	150	20
三尖杉宁碱	Taxol B	Sc-T 型	831.91	832	100	10
7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇	7-xyl-10-DAT	Sc-T-Glu 型	943.99	966 $[M+Na]^+$	135	23
7-木糖苷紫杉醇	7-xylosyl taxol	Sc-T-Glu 型	985.90	1 008 $[M+Na]^+$	250	36

2.2 紫杉烷类物质的裂解行为研究

对 7 种典型的 6-8-6-4 环紫杉烷类物质进行二级裂解实验, 并分析各目标物具体裂解过程(见图 4). 紫杉醇的正离子 QQQ-MS/MS 谱如图 4 A 所示: 在一级质谱(MS full scan)中其主要的离子峰为 854 $[M+H]^+$ 和 876 $[M+Na]^+$, 在二级质

谱(MS/MS full scan)中产生 m/z 105、 m/z 285、 m/z 327 以及 m/z 509、 m/z 854 等碎片离子. 由紫杉醇二级谱图中的碎片离子分析可知其主要的裂解过程为: 紫杉醇分子经碰撞能解离后最先掉落侧链(Sc) m/z 285 形成较稳定的母核(T)碎片 m/z 509, 之后母核碎片再掉落不同数目的乙酸

(AcOH)和 2 号位上苯甲酰氧基(BzOH)官能团以及 H₂O 分子形成一系列的离子碎片.从巴卡廷 III 的正离子 QQQ-MS/MS 谱(图 4 B)可知:在一级质谱中其主要离子峰为 587[M+H]⁺和 610[M+Na]⁺,在二级质谱中产生 m/z 309、m/z 327、m/z 345、m/z 405 等碎片离子,这些离子分别是巴卡廷 III 分子掉落不同数目的 AcOH 和 2 号位上 BzOH 官能团以及 H₂O 形成的碎片(如图 4 B MS/MS full scan of BAC III 所示).对 7-木糖苷紫杉醇(F)和 7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(G)进行裂解行为分析发现,该类物质是热不稳

定的化合物.在 ESI 离子化过程时,这两种物质受热发生源内裂解,并且在一级全扫描过程中均有 m/z 286、m/z 327、m/z 372 以及 m/z 509、m/z 659、m/z 794 等碎片产生;经过碰撞诱导解离后碎片较少,但仍存在典型的特征子离子(如 m/z 663[M_{7-*xy*l-taxol + Na-Sc}]⁺和 m/z 390[Sc_{7-*xy*l-10-DAT + H}]⁺),这些特征碎片离子可被应用于多反应监测模式(MRM)对含木糖苷类的紫杉醇物质的检测中.7 种目标物的具体碎片形成过程如图 4 中各二级质谱图所示.

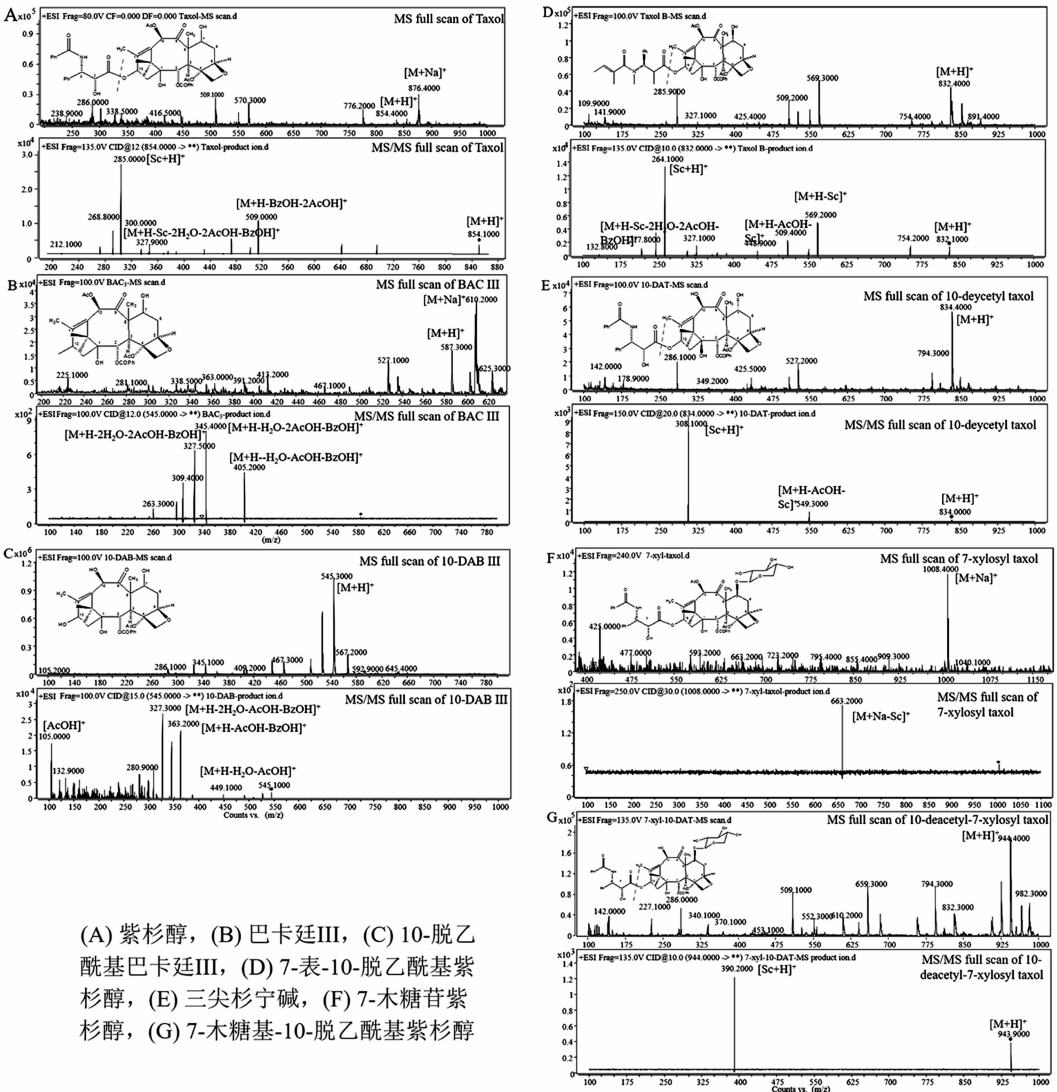


图 4 7 种目标物的一级全扫描 (MS full scan) 和二级质谱图 (MS/MS full scan)

2.3 归属紫杉烷类物质的裂解规律

通过研究 7 种典型目标物的裂解行为,归纳不同类型的 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的裂解规律(见图 5).C₁₃ 位上不含侧链物质(M 型)的裂解

规律为:该类物质易脱水,骨架上的 AcOH 和 BzOH 官能团易掉落形成碎片离子,同时丢失 m/z 60 和 105 的碎片,之后形成 m/z 327 的碎片;M 型物质形成的常见离子(m/z)有 327±2,405±2

和 105. C_{13} 位含有侧链物质包括侧链-母核(Sc-T)型和侧链-母核-木糖基(Sc-T-Glu)型, 其中 Sc-T 型物质的裂解规律为: 酯键易断裂, 形成 $[M+H-Sc]^+$ 和 $[Sc+H]^+$ 的碎片, 之后 6-8-6-4 环骨架发生裂解, 该裂解过程和无侧链的物质的裂解过程机理一致. Sc-T-Glu 型物质不仅 C_{13} 位含有侧链, C_9 位上还含有糖苷键与葡萄糖基团相连接; 该类化合物热不稳定, 在 ESI 离子化过程中极易分解. 因此, 归属 Sc-T-Glu 型物质的裂解规律可通过解析其在一二级质谱中的碎片离子来进行, 其裂解规律为: C_9 位先断裂形成 $[M+H-Glu]^+$ 即 $[Sc+T]^+$, 之后裂解行为和 Sc-T 型物质相一致. C_{13} 位上含侧链物质的常见离子(m/z)为: $327 \pm 2, 509, 569, [Sc+H]^+$ (如: 286, 264). 综上 6-8-6-4 环紫杉烷类物质由骨架形成的常见离子(m/z)有: 569, 509, 527, 425, 387, 345, 327 ± 2 , 由侧链形成的常见离子(m/z)有: 286, 264, 280, 308.

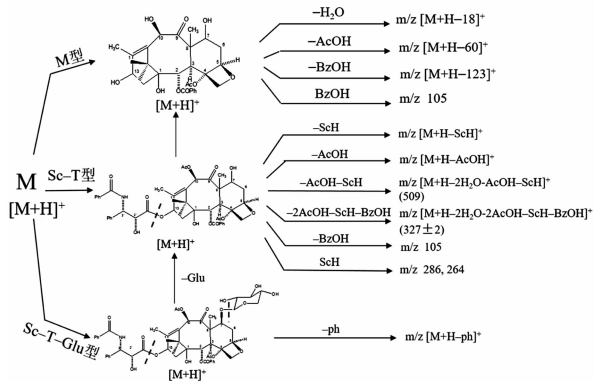


图 5 含 6-8-6-4 环三大类紫杉烷二萜类物质的裂解规律

3 结论

采用三重四级杆串联质谱一级和二级全扫描模式, 确定了 7 种典型的 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的最优裂解条件, 根据所得碎片离子分析了该类物质的裂解行为, 并归属了各类型 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的裂解规律. 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的侧链与骨架连接处的 C—O 键易断裂, 骨架上的乙酸基(AcOH)和苯甲酰氧基(BzOH)官能团易脱去. 在正离子模式下, 6-8-6-4 环紫杉烷二萜类物质的典型常见碎片离子(m/z)为: 569, 509, 527, 425, 387, 345, 327 ± 2 ; 共同的侧链 $[Sc+H]^+$ 碎片离子(m/z)为: 286, 264, 280, 308; 一些中性丢失离子(m/z)为: 122, 60, 18, 36. 本文研究结果可为筛选 6-8-6-4 环紫杉烷类物质提供参考.

参考文献:

- [1] 余响华, 邵金华, 袁志辉, 等. 植物细胞工程技术生产紫杉醇研究进展[J]. 西北植物学报, 2013, 33(6): 1279-1284.
- [2] Somayeh T, Mohammad A T, Hadi B, et al. Electrochemical determination of the anticancer drug taxol at a ds-DNA modified pencil-graphite electrode and its application as a label-free electrochemical biosensor[J]. Talanta, 2015, 134: 60-64.
- [3] 再帕尔·阿不力孜, 方起程, 梁晓天, 等. 利用质谱-质谱方法探讨紫杉烷类二萜化合物的裂解特征[J]. 科学通报, 1999, 44(7): 691-703.
- [4] 李媛, 李振宇. 天然抗癌药物: 紫杉醇[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学与医学版), 2006(4): 58-62.
- [5] 史清文. 天然药物化学史话: 紫杉醇[J]. 中草药, 2011, 42(10): 1878-1884.
- [6] Wang Y F, Shi Q W, Dong M, et al. Natural taxanes: developments since 1828. [J]. Chemical Reviews, 2011, 111(11): 7652-7709.
- [7] Supunnika Somjai peng, Angel Medina, Hanna Kwana, et al. Isolation, identification, and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of *Paraconiothyrium variabile* from english yew trees (*Taxus baccata*) [J]. J Funbio, 2015: 1878-6146.
- [8] Stefanowicz P, Prasain J K, K F Y, et al. Detection and partial structure elucidation of basic taxoids from *taxus wallichiana* by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(15): 3583-3591.
- [9] 赵春芳. 紫杉醇及紫杉烷的积累规律与代谢谱研究及其应用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2005.
- [10] Rasche F, Scheubert K, Hufsky F, et al. Identifying the unknowns by aligning fragmentation trees [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(7): 3417-3426.
- [11] 马文晓, 王浩, 王婷婷, 等. 电喷雾四极杆飞行时间质谱研究紫杉醇类药物的裂解规律[J]. 药学报, 2013(12): 1812-1816.
- [12] 马文晓. 紫杉醇细胞内药代动力学及紫杉醇类药物质谱裂解规律研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [13] Mari A, Montoro P, D'Urso G, et al. Metabolic profiling of *vitex agnus castus*, leaves, fruits and sprouts; analysis by LC/ESI/(QqQ) MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSⁿ [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2015, 102: 215-221.
- [14] 刘信平, 聂光华, 王艳. 紫杉醇 C-(13) 侧链的微观结构及光谱性质[J]. 原子与分子物理学报, 2014, 31(2): 213-217.
- [15] Ketchum R E B, Rithner C D, Qiu D, et al. Taxus, metabolomics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus*, x media, cell cultures [J]. Phytochemistry, 2003, 62(6): 901-909.