

## EGC/GC 和 EGCG/GCG 的 ESI-IT-TOF 质谱裂解规律研究

刘国强<sup>1</sup>,董 静<sup>2</sup>,王 弘<sup>1</sup>,万乐人<sup>2</sup>,端裕树<sup>2</sup>,陈世忠<sup>1</sup>

(1. 北京大学医学部药学院,北京 100191;

2. 岛津国际贸易(上海)有限公司北京分公司,北京 100020)

摘要:利用离子阱飞行时间质谱仪的高质量准确度、高分辨率、多级测定的性能,对表没食子儿茶素/没食子儿茶素(EGC/GC)和表没食子儿茶素没食子酸酯/没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG/GCG)(二组对映异构体)的质谱裂解规律进行了研究,并利用氢/氘交换的方法对其裂解方式进行了确证。研究发现,儿茶素对映异构体间具有相同的质谱裂解途径,即使在多级质谱中也无明显区别,仅碎片离子的相对丰度存在差异。二级质谱中,EGC/GC在B环丢失CO<sub>2</sub>,且其A、B环都可失去C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O。<sup>1,4</sup>A<sup>-</sup>、<sup>1,3</sup>A<sup>-</sup>、<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>和[M-H-B环]<sup>-</sup>四个碎片离子是EGC/GC的特征性离子,通过此四离子质荷比的变化,可推测A环上的取代情况。因EGCG/GCG的结构上都含有没食子酸的取代基,在二级质谱中均可见m/z 169的特征性离子峰,此离子可用于EGCG/GCG和EGC/GC的区分。

关键词:表没食子儿茶素/没食子儿茶素(EGC/GC);表没食子儿茶素没食子酸酯/没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG/GCG);氢氘(H/D)交换;质谱裂解

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2009)05-0287-08

Study on the Fragmentation Pathways of  
EGC/GC and EGCG/GCG Using ESI-IT-TOFLIU Guo-qiang<sup>1</sup>, DONG Jing<sup>2</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, WAN Le-ren<sup>2</sup>,  
DUAN Yu-shu<sup>2</sup>, CHEN Shi-zhong<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100191, China;

2. Shimadzu International Trading (Shanghai) Co. Limited, Beijing Office, Beijing 100020, China)

**Abstract:** The fragmentation pathways of EGC/GC and EGCG/GCG (two group stereoisomers) were studied using the ion-trap time-of-flight (IT-TOF) mass spectrometer with the advantages of high mass accuracy, high resolution, multistage analysis. Hydrogen/deuterium exchange method was used to elucidate the fragmentation processes. The results show that catechin stereoisomers possess the same fragmentation pathways except for some differences in the relative abundances of product ions, and can not be differentiated even in MS<sup>n</sup> spectrum. The loss of CO<sub>2</sub> for EGC/GC occurs at B ring and the loss of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O involve

收稿日期:2009-03-05;修回日期:2009-07-06

基金项目:国家“973”计划(批准号:2006CB504707)资助

作者简介:刘国强(1984~),男(汉族),江西九江人,硕士研究生,生药学专业。E-mail:lgq19840713@yahoo.com.cn

通信作者:陈世忠(1962~),男(汉族),陕西西安人,副教授,从事天然药物化学研究。E-mail:chenshizhong66@163.com

both A ring and B ring. The ions of  $^{1,4}A^-$ ,  $^{1,3}A^-$ ,  $^{1,2}A^-$  and  $[M-H-B\text{ ring}]^-$  are characteristic product ions for EGC/GC, and it can be used to propose the substituent group of A ring through the  $m/z$  shift of these ions. The ion at  $m/z$  169 corresponded to the gallic acid anion is characteristic fragmentation of EGCG/GCG, which is helpful for differentiating EGCG/GCG and EGC/GC.

**Key words:** epigallocatechin/gallocatechin(EGC/GC); epigallocatechin gallate/gallocatechin gallate(EGCG/GCG); hydrogen/deuterium(H/D) exchange; mass fragmentation

茶叶中的儿茶素(catechin)属于黄烷醇类化合物,其中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)为其主要成分。研究表明,EGCG 是儿茶素中抗氧化作用最强的成分,具有明显的清除体内自由基、抗癌、抗炎、抗突变、抗衰老及改善肝功能等生物活性,现已被列为潜在的抗癌药物在中美等国被研究<sup>[1]</sup>。没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)是 EGCG 的对映异构体,而 GCG 和 EGCG 分别是茶叶中没食子儿茶素(GC)和表没食子儿茶素(EGC)与没食子酸形成的酯,均具有诸多的药理活性,如抗氧化活性<sup>[1]</sup>、抗菌活

性<sup>[2]</sup>、抗癌<sup>[3-5]</sup>及其他抗心血管疾病<sup>[6-8]</sup>等作用。

鉴于液相色谱-质谱联用技术在茶叶中儿茶素的定性和定量研究的广泛应用<sup>[9-12]</sup>,阐明儿茶素类化合物的质谱裂解规律就显得尤为重要。本工作应用 LC/MS-IT-TOF 质谱仪在负离子模式下对儿茶素对映异构体 EGC/GC 和 EGCG/GCG(结构示于图 1)的质谱裂解规律进行研究,通过氢/氘(H/D)交换反应确证相关质谱裂解途径和碎片离子的结构,阐明上述 4 种儿茶素类化合物的裂解规律。

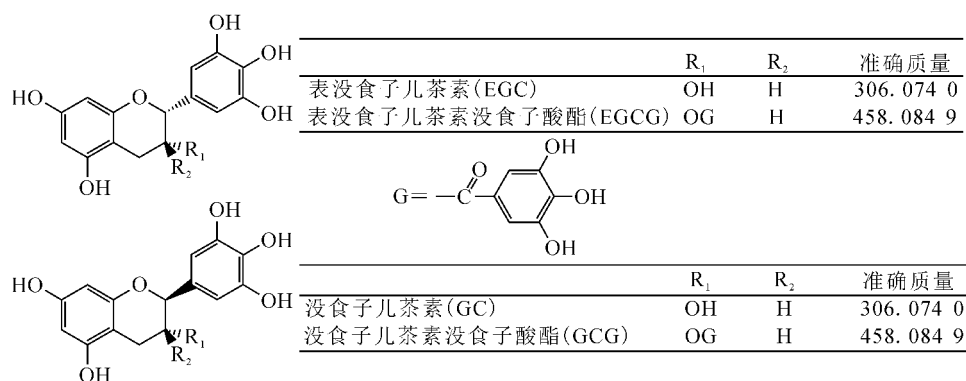


图 1 所研究的儿茶素类化合物结构及其准确质量

Fig. 1 Chemical structures and exact masses of tea catechins studied in this paper

## 1 试验部分

### 1.1 仪器与装置

LC/MS-IT-TOF 质谱仪;日本岛津公司产品,配有 ESI 离子源和直接进样注射泵。

### 1.2 材料与试剂

EGC/GC, EGCG/GCG (99.8%); 美国 Sigma-Aldrich 公司产品;重水(99.9%);德国 Merck 公司产品;实验用水为 Milli-Q 超纯水。

### 1.3 试验方法和条件

取适量样品溶解于水或重水中,在负离子模式下,采用直接进样法进行电喷雾质谱分析,流速为  $3 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,喷雾电压  $-3.5 \text{ kV}$ ,检测电

压  $1.8 \text{ kV}$ ,毛细管温度  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ,曲形去溶剂管温度  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ,雾化气( $\text{N}_2$ )流速  $1.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离子阱压力  $3.8 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ ,飞行时间分析器压力  $2 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ ,碰撞气 Ar, CID 能量 50%, CID 气体 50%,母离子选择宽度 1 u,数据采集范围  $m/z$  100~400。

## 2 结果与讨论

### 2.1 EGC/GC 和 EGCG/GCG 负离子模式下的电喷雾质谱裂解

分别比较了负离子模式下的 EGC/GC 和 EGCG/GCG 两对对映异构体的电喷雾质谱碎

片,得知对映异构体间具有相同的质谱裂解途径,仅碎片离子的相对丰度存在差异,列于表 1,

表 2。因此仅选用 EGC 和 EGCG 进行裂解规律的阐述。

表 1 EGC 和 GC 二级质谱中所得碎片离子的预测分子式,测定及计算的质荷比,测定值对计算值的误差和碎片离子相对丰度

Table 1 Predicted formula, measured and calculated mass/charge ratios and mass errors of ESI-MS<sup>2</sup> product ions obtained from the [M-H]<sup>-</sup> of EGC and GC with relative abundances in parentheses

预测分子式	测定的质荷比	计算的质荷比	误差
[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	287.053 8(4/3)	287.056 1	-8.01
[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	261.074 1(18/13)	261.076 8	-10.34
[M-H-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>-</sup>	247.021 5(10/9)	247.024 8	-13.36
[M-H-2C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	221.043 3(68/68)	221.045 5	-9.95
[M-H-CO <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	219.065 2(63/57)	219.066 3	-5.02
[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	179.034 8(100/100)	179.035 0	-1.12
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup>	165.019 4(32/29)	165.019 3	0.61
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	137.024 7(26/20)	137.024 4	2.19
<sup>1,4</sup> A <sup>-</sup>	125.025 5(33/31)	125.024 4	8.80

表 2 EGCG 和 GCG 二级质谱中所得碎片离子的预测分子式,测定及计算的质荷比,测定值对计算值的误差和碎片离子相对丰度

Table 2 Predicted formula, measured and calculated mass/charge ratios and mass errors of ESI-MS<sup>2</sup> product ions obtained from the [M-H]<sup>-</sup> of EGCG and GCG with relative abundances in parentheses

预测分子式	测定的质荷比	计算的质荷比	误差
[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	331.043 4(38/37)	331.045 9	-7.55
[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	305.063 8(19/17)	305.066 7	-9.51
[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	287.054 3(3/4)	287.056 1	-6.27
[C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	193.013 6(5/3)	193.014 2	-3.11
[C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	169.015 6(100/100)	169.014 2	8.28

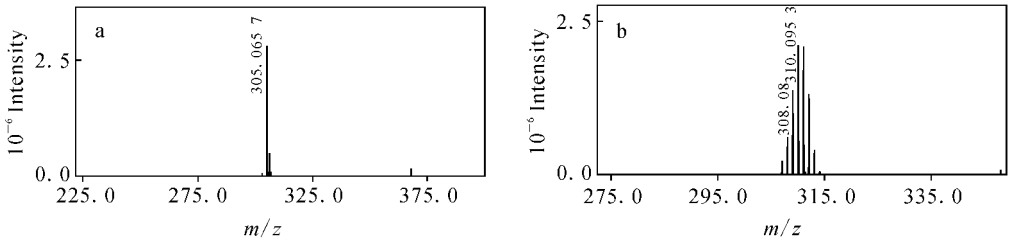
## 2.2 EGC 的氢/氘交换反应和质谱裂解规律研究

EGC 的结构中含有 6 个酚羟基,在研究 EGC 的氢/氘交换反应时可发现,除了羟基上的活泼氢外,苯环上的氢也可被氘代,示于图 2,选择其中 8 个氢被氘代的 EGC 进行多级质谱来阐明其质谱裂解规律。

由图 3a 所示的 EGC 二级质谱可知,得到了 4 个特征性的碎片离子  $m/z$  125.025 5、137.024 7、165.019 4 和 179.034 8。推测其为 C 环的 1,4 键(<sup>1,4</sup>A<sup>-</sup>)、1,3 键(<sup>1,3</sup>A<sup>-</sup>)、1,2 键(<sup>1,2</sup>A<sup>-</sup>)断裂后,产生包含 A 环的碎片及丢失 B 环所得的碎片,示于图 4a。为确定其质谱裂解规律和碎片结构,采用 EGC(D<sub>8</sub>)进一步证明,EGC(D<sub>8</sub>)的分子离子峰 [M(D<sub>8</sub>)-D]<sup>-</sup> ( $m/z$  312.109 2) 产生的  $m/z$  128.044 8、140.044 7、

168.039 和 183.059 5 四个碎片离子的质量分别比未氘代的增加了 3、3、3 和 4,示于图 3b。可知,EGC 除了 6 个羟基氢被氘代外,A 环上的 2 个氢也被氘代,其结构示于图 4b。氘代前后的差异使 [M(D<sub>8</sub>)-D]<sup>-</sup> ( $m/z$  312.109 2) 的多级质谱对 EGC 质谱裂解方式的阐明具有确证意义。

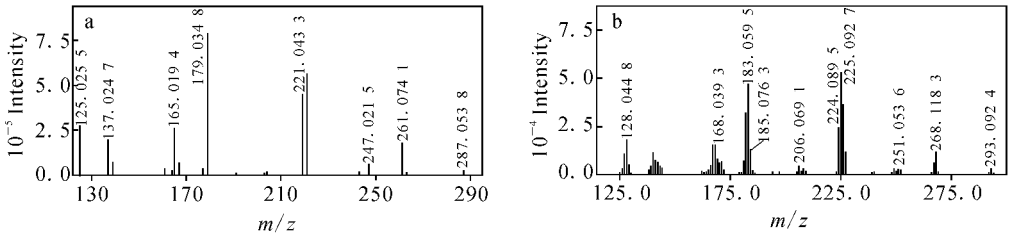
在 [M-H]<sup>-</sup> ( $m/z$  305.065 7) 的二级质谱中可见,失去 2 个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 得到  $m/z$  221.043 3 的离子。而由相对应的氘代离子 [M(D<sub>8</sub>)-D]<sup>-</sup> ( $m/z$  312.109 2) 得到  $m/z$  225.092 7 (丢失 C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>O 和 C<sub>2</sub>HDO) 的碎片可知,EGC 丢失的 2 个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 分别发生在 A 环和 B 环,示于图 5。 $m/z$  221.043 3 又进一步发生中性分子的丢失,如失去 H<sub>2</sub>O、CO 和 CO<sub>2</sub>。



注:a. 未被氘代的 EGC;b. 氘代的 EGC

图 2 被分析化合物的一级质谱图

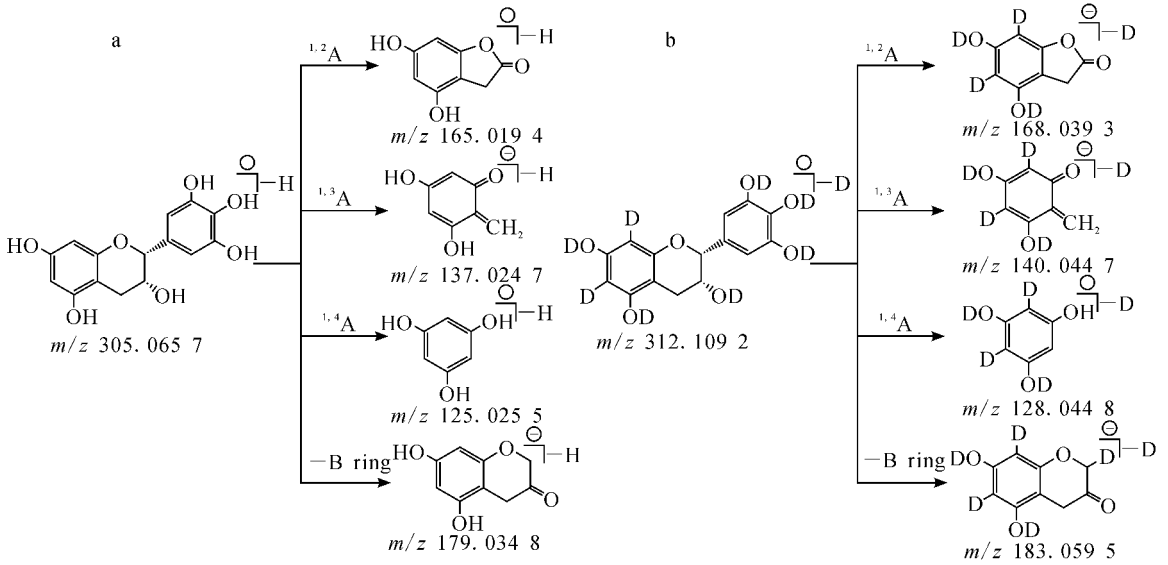
Fig. 2 MS spectrum of analytes



注:a.  $[M-H]^-$  ( $m/z$  305); b.  $[M(D_8)-D]^-$  ( $m/z$  312)

图 3 EGC 的碎片离子

Fig. 3 The product ion mass spectrum for EGC



注:a.  $[M-H]^-$  ( $m/z$  305); b.  $[M(D_8)-D]^-$  ( $m/z$  312)

图 4 EGC 的 4 个特征性离子裂解方式

Fig. 4 The fragmentation pathways of 4 characteristic ions for EGC

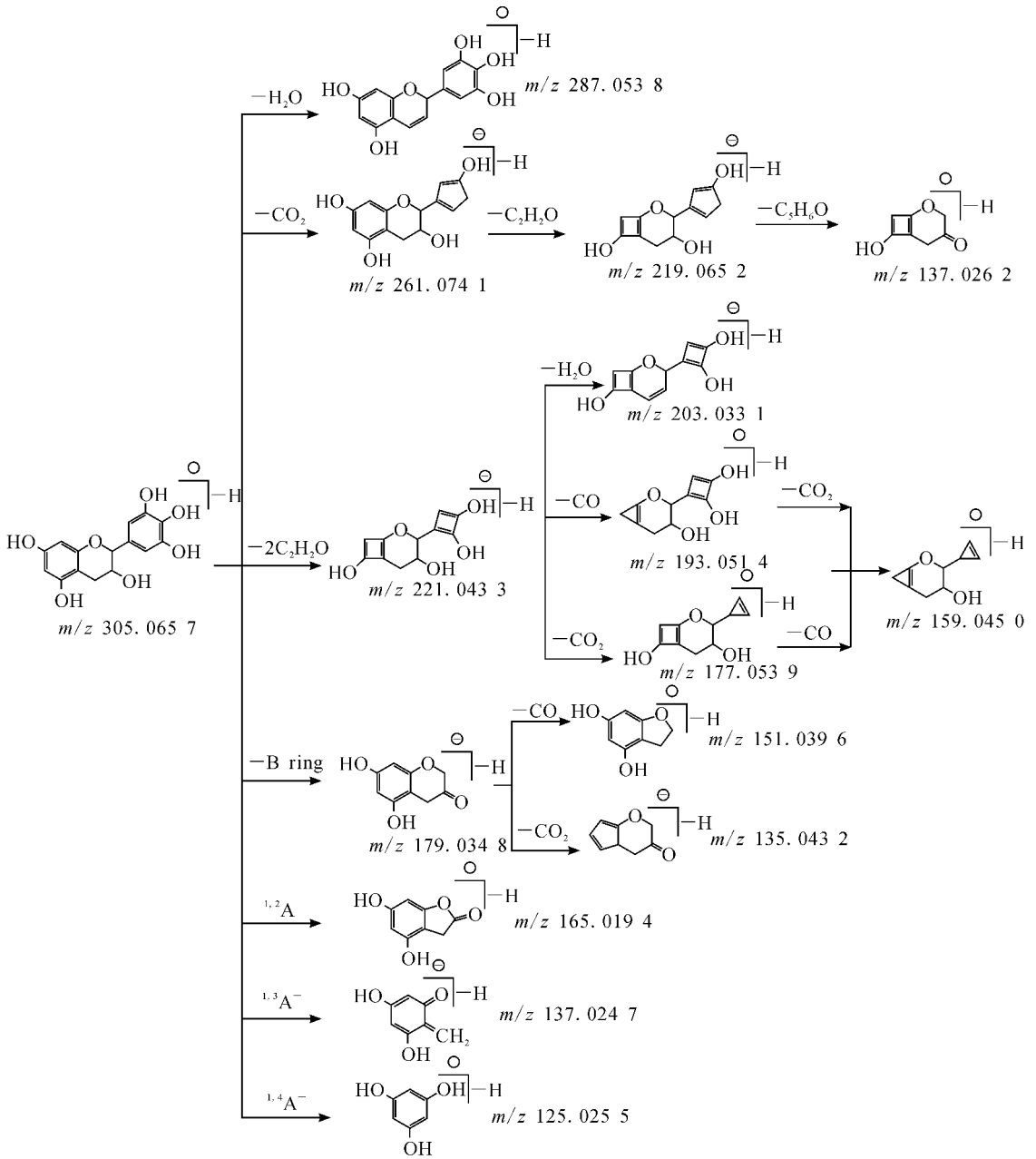


图 5 EGC 的质谱裂解途径

Fig. 5 The fragmentation pathways of EGC

$[M-H]^-$  ( $m/z$  305.0657) 失去  $CO_2$  得到  $m/z$  261.0741。考虑到  $[M-H-CO_2]^-$  进一步裂解产生  $C_2H_2O$  的丢失得到  $m/z$  219.0652,  $[M-H-CO_2-C_2H_2O]^-$  再裂解发生  $C_5H_6O$  的丢失得到  $m/z$  137.0262, 故推测  $CO_2$  的丢失发生在 B 环。相应的氘代离子  $[M(D_8)-D-CO_2]^-$  ( $m/z$  268.1183) 得到  $m/z$  224.0961 (丢失  $C_2D_2O$ ) 碎片离子, 意味着从  $[M-H-CO_2]^-$  上丢失的  $C_2H_2O$  仅涉及到 A 环的断裂, 确证了 EGC 在 B 环上发生  $CO_2$  的中

性丢失, 示于图 6。

$m/z$  287.0538 是  $[M-H]^-$  ( $m/z$  305.0657) 失去  $H_2O$  所得, 离子的丰度很弱, 其三级质谱中未出现离子峰。相对应的  $[M(D_8)-D]^-$  ( $m/z$  293.0924) 中可见失去 HDO 产生  $m/z$  293.0924 碎片, 证明失水发生在 C 环。

二级质谱图中的碎片离子  $m/z$  179.0348 可发生  $CO$  和  $CO_2$  的中性丢失, 分别得离子  $m/z$  151.0396 和  $m/z$  135.0432。

### 2.3 EGCG 的质谱裂解规律研究

EGCG 是由 EGC 上的  $-OH$  被没食子酸酯化所得, 二级质谱示于图 7。其中  $m/z$  331.043 0 碎片是由 EGCG 失去 B 环所得, 此离子可进一步裂解得到离子  $m/z$  193.012 9。考虑到  $m/z$  193.012 9 四级质谱图中可失去  $CO$ 、 $CO_2$  和  $C_2O_3$  ( $CO+CO_2$ ), 得  $m/z$  165.017 4、149.020 1 和 121.024 9, 由此推测 EGCG 在失去 B 环的时候应有 1 个环化的过程, 此后再经过 1 个 RDA 过程, 得到碎片离子  $m/z$  193.012 9, 示于图 8。

$m/z$  305.067 5 碎片是由  $[M-H]^-$  ( $m/z$  457.076 2) 失去没食子酰基所得, 此离子之后的裂解途径与 EGC 相似。 $m/z$  287.053 2 是由  $[M-H]^-$  ( $m/z$  457.076 2) 失去没食子酸基所得, 此离子可进一步通过 C 环的 1,4 键 ( $^{1,4}A^-$ ) 断裂得  $m/z$  125.028 3。

二级质谱中出现的离子  $m/z$  169.019 5 是其特征性离子, 此离子的存在可说明结构中没食子酸根的存在。

据此, 推测 EGCG 的质谱裂解规律示于图 8。

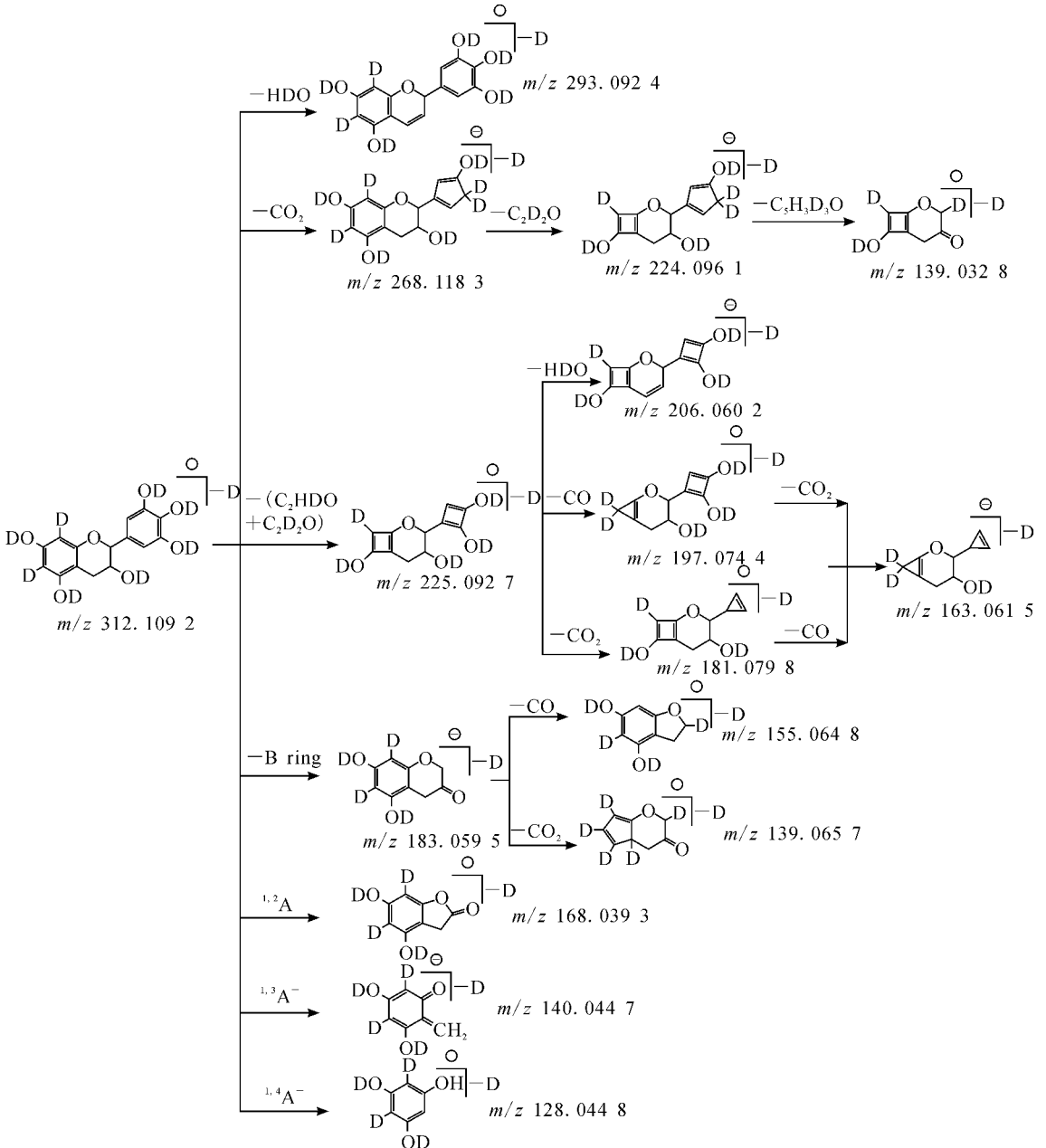


图 6 8 个氢被氘代的 EGC 的质谱裂解途径

Fig. 6 The fragmentation pathways of EGC( $D_8$ )

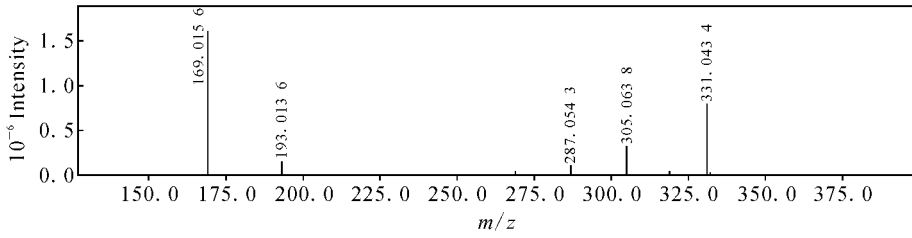


图 7 EGC 的二级质谱图

Fig. 7 The MS<sup>2</sup> spectrum of EGC

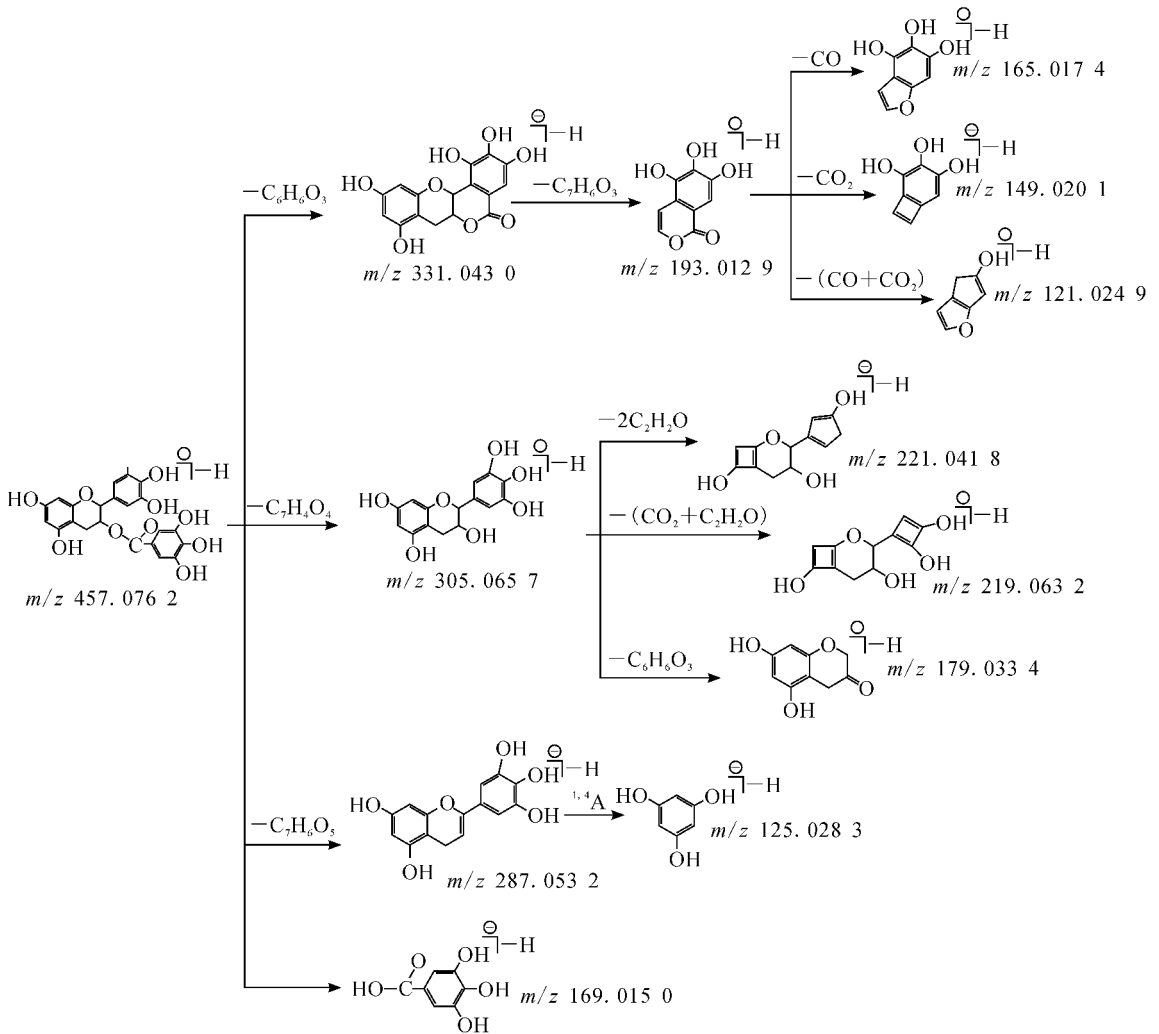


图 8 EGC 的质谱裂解途径

Fig. 8 The fragmentation pathways of EGC

### 3 结论

本工作应用 ESI-IT-TOF 法研究了 4 种儿茶素类化合物(两组对应异构体)的质谱裂解规律,并利用氢/氘交换的方法确证了相关质谱裂

解途径和碎片离子结构。氢/氘交换的方法对质谱裂解规律的阐明具有重大的辅助作用,相信此技术能广泛的应用于其他黄酮类化合物的质谱规律研究。

## 参考文献:

- [1] VALCIC S, BURR J A, TIMMERMANN B N, et al. Antioxidant chemistry of green tea catechins: new oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals[J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(9):802-810.
- [2] HIRASAWA M, TAKADA K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against candida albicans[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 53: 225-229.
- [3] SHIMIZU M, SHIRAKAMI P, MORIWAKI H. Targeting receptor tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechin, EGCG[J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9:1 034-1 049.
- [4] KUZUHARA T, SUGANUMA M, FUJIKI H. Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention[J]. *Cancer Letters*, 2008, 261:12-20.
- [5] LANDIS-PIWOWAR K R, HUO C D, CHEN D. A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9):4 303-4 310.
- [6] KANG W S, LIM I H, YUK D Y. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate[J]. *Thrombosis Research*, 1999, 96:229-237.
- [7] SON D J, CHO M R, JIN Y R. Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism through arachidonic acid pathway[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2004, 71:25-31.
- [8] KAO Y H, HIIPAKKA R A, LIAO S. Modulation of obesity by a green tea catechin[J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72:1 232-1 233.
- [9] SHEN D D, WU Q L, WANG M F. Determination of the predominant catechins in acacia catechu by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54:3 219-3 224.
- [10] MATA-BILBAO M D L, ANDRES-LACUEVA C, ROURA E. A new LC/MS/MS rapid and sensitive method for the determination of green tea catechins and their metabolites in biological samples[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 8 857-8 863.
- [11] MASUKAWA Y, MATSUI Y, SHIMIZU N. Determination of green tea catechins in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 834:26-34.
- [12] LI H J, DEINZER M L. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins[J]. *Anal Chem*, 2007, 79:1 739-1 748.

## 2010 年《岩矿测试》征订启事

《岩矿测试》是中国地质学会岩矿测试专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办的分析测试技术科技期刊。国际标准刊号:ISSN 0254-5357;国际刊名代码 CODEN: YACEEK;国内统一刊号:CN 11-2131/TD。

《岩矿测试》的宗旨是突出服务于地球科学和地质找矿事业以及促进岩矿测试技术的发展;根据国家地质工作的重点由单一资源向资源环境并重的转变,主要报道国内与分析科学、资源环境、地球科学相关的新技术、新方法、新理论和新设备等研究成果、动态、评述及相关实践经验。

《岩矿测试》于 1982 年创刊,国内外公开发刊。近年来刊物地位不断提高,是中文核心期刊,被美国《化学文摘》、英国《分析文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、中国科技核心期刊等数据库收录。

《岩矿测试》为双月刊,大 16 开,双月出版;国内邮发代号 2-313;国际书店发行代号 BM4089;广告经营许可证:京西工商广字第 0227 号;定价 10.00 元/本,全年 60.00 元。

《岩矿测试》编辑部地址:北京西城区百万庄大街 26 号,国家地质实验测试中心(邮政编码 100037);电话:010-68999562,68999563;传真:010-68999563;E-mail:ykes\_zazhi@163.com, ykes\_zazhi@sina.com;《岩矿测试》网站(在线投稿):http//www.ykes.ac.cn