

5种缬草素类成分电喷雾质谱裂解规律研究

王春国, 刘勇, 石晋丽*, 肖瑶, 史淑宁, 侯文慧, 王子健

(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨缬草素类成分中的单烯型(二氢缬草素)、二烯型(缬草素, 乙酰缬草素)和四烯型(baldrinal, homobaldrinal)5种化合物在电喷雾多级质谱下的裂解规律。方法:采用电喷雾离子化源(Electron Spray Ionization, ESI源)多级质谱,极性检出正离子检测模式(MS^+)进行多级碎片解析。结果:归纳总结了单烯型、双烯型和四烯型3类缬草素成分在正离子模式的电喷雾多级质谱裂解规律。结论:该类化合物有着较强的裂解规律,可用于缬草素类化合物的快速结构鉴定、定量分析和药代动力学研究。

[关键词] 缬草素类成分;电喷雾多级质谱;质谱裂解规律

缬草素类成分(valepotriates)是广泛分布于缬草属 *Valeriana* L. 中的一类重要天然产物。在欧洲用于镇静安神的缬草制剂产品多达几十个,缬草素类成分被认为是发挥疗效的主要活性成分^[1-2],目前分离得到的缬草素类成分有几十种,近年来还发现该类成分具有抑制豚鼠回肠节律性收缩、抗肿瘤、抗菌及潜在的抗艾滋病毒等药理活性^[2-7]。越来越多研究表明缬草属植物发挥药理作用不是单一化合物,有可能是多种化合物的协同作用,由此对缬草素类成分或同系组分的快速鉴定和分析显得尤为重要。电喷雾质谱(ESI-MS)作为一种软电离方法,已成为研究植物中同类化合物或具有同系组分的重要手段并得到广泛的应用^[8-10]。本文以缬草属中3类常见化合物单烯型缬草素类(二氢缬草素)、双烯型缬草素类(缬草素、乙酰缬草素)及四烯型缬草素类(baldrinal, homobaldrinal)为例,探讨上述3类成分中5种缬草素类化合物的ESI-MS裂解途径,以阐明它们在ESI源质谱下的裂解机制,为快速鉴定和痕量分析含有缬草素类及其同系组分化合物提供参考。

1 材料

Agilent 1100 系列液-质联用仪; Agilent Trap XCT plus 型离子阱质谱仪、高压二元泵、二极管阵列检测器、自动进样器、柱温箱、Chemstations 化学工作

站(美国安捷伦公司);二氢缬草素、缬草素、乙酰缬草素、baldrinal 和 bomobaldrinal 对照品本实验室自制(HPLC 峰面积归一化法计算 >99%);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为双蒸水,并经 0.45 μm 滤膜滤过。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 50 mm, 5 μm),流动相为水-乙腈(32:68),体积流量 0.8 mL · min⁻¹,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 质谱条件

ESI 离子源,离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压 3 500 V,正离子检出模式,雾化压力 275.8 kPa,干燥氮气流速 10 L · min⁻¹,扫描范围 m/z 100 ~ 1 000。

2.3 样品处理

将二氢缬草素,缬草素,乙酰缬草素,baldrinal 和 bomobaldrinal 5种化合物精密称取各 1 mg 左右,置于 25 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。样品经 0.45 μm 滤膜滤过,通过自动进样器进样 5 μL 进行分析。结果负离子模式下 5 种化合物质谱响应很低,无法检测到准分子离子,仅分析正离子模式裂解规律,多级碎片结果见表 1。

2.4 单烯型缬草素裂解途径分析

在 ESI 正离子模式下,二氢缬草素准分子离子峰出现 m/z 447 [$M + \text{Na}$]⁺ 峰,在二级质谱中出现 3 个丰度较高的碎片离子 m/z 分别为 345, 261, 161, 见图 1。其中 m/z 345 是由于 1 位酯键丢失形成的 [$M + \text{Na} - \text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$]⁺ 碎片离子; m/z 261 是由于 1 位酯键丢失和 11 位酯键断裂形成的 [$M + \text{Na} -$

[稿件编号] 20121016007

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102-201-018);北京中医药大学研究生项目(2011jyb22x5039)

[通信作者] * 石晋丽,博士,教授, Tel: (010) 84738623, E-mail: shijl@vip.sina.com

表1 正离子模式下5种化合物的多级碎片信息

Table1 (+)ESI-MS and (+)ESI-MSⁿ fragmentaion for isolated five compounds

化合物	[M + Na] ⁺	[M + H] ⁺	MS ²	MS ³	MS ⁴
1	447.3	-	345.1 261.0 161.0	200.9, 173, 154.7, 133, 105.1	
2	445.2	-	415.2 313.1 219.0 131.1	176.9, 149.0, 121, 93, 131	103
3	503.2	-	401.1 219.0	176.9, 149.0, 121, 93.3, 131.0	103.1
4	-	219.0	176.9 149.0 121.0 93.2	149.0, 121.1, 93.2	131.1, 121.1, 105.1, 93.2
5	-	261.0	176.9 148.9 121.0	159.0, 121.0, 148.9	130.9, 121.0, 105.1, 93.2

C₅H₁₀O₂ - C₅H₈O]⁺碎片离子; *m/z* 161 是由于 1,7,11 位 3 个酯键丢失同时丢失 Na 形成的碎片离子,而在 7 位酯键丢失的同时 8,10 位环氧结构发生重排生成 10 位醛基结构^[5]。

在三级质谱中出现 *m/z* 为 201, 173, 155, 133, 105 等 5 个碎片离子, 见图 1, 其中 *m/z* 201 是由于

m/z 261 丢失 7 位酯键所形成的碎片离子; *m/z* 173 是由于 *m/z* 201 中 4 位 (-CH₂OH) 异裂同时 1,2 位吡喃环开环(+2H)后所形成的碎片离子; *m/z* 173 进一步丢失 1 分子 H₂O 会形成 *m/z* 155 [M + Na]⁺, 133 [M + H]⁺ 的碎片离子; 而 *m/z* 133 丢失 1 分子 CO 形成 *m/z* 105 的碎片离子, 质谱裂解途经见图 2。

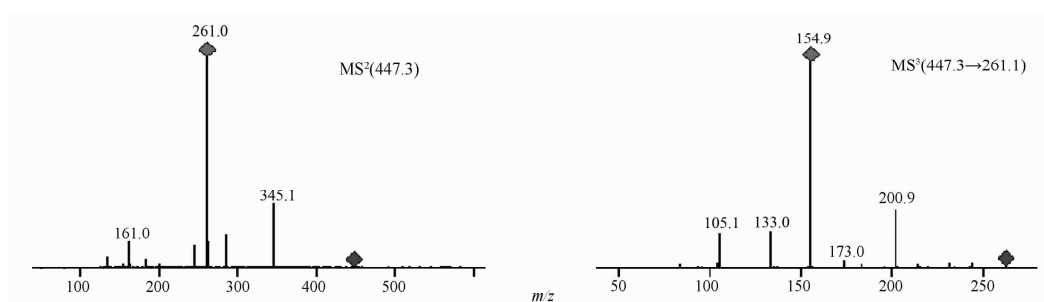


图1 二氢缬草素在正离子模式下的2~3级质谱图

Fig.1 The MS²⁻³ of didrovaltrate

2.5 双烯型缬草素裂解途经分析

2.5.1 缬草素 正离子模式下缬草素(valtrate)出现 *m/z* 445 [M + Na]⁺ 峰, 在二级质谱中出现 3 个丰度较高的碎片离子, *m/z* 分别为 415, 313 和 219, 见图 3, 其裂解途经为 *m/z* 415 为 8,10 位环氧基团丢失形成的 [M + Na - CH₂O]⁺ 碎片离子; *m/z* 313 是 8,10 环氧结构和 1 位酯键同时丢失形成的 [M + Na - CH₂O - C₅H₁₀O₂]⁺ 碎片离子; 而 *m/z* 219 的形成是由于 8,10 位环氧结构发生重排反应, 生成醛

基, 1,7 位 2 个酯键同时丢失而形成的 [M + H - 2C₅H₁₀O₂]⁺ 碎片离子^[5]。

通过选择母离子 *m/z* 219 进行碰撞诱导裂解(CID)在三级质谱中出现 *m/z* 为 177, 149, 131, 93 等碎片离子, 其中 *m/z* 177 是由于 11 位酯键(-CH₂CO)断裂形成的; *m/z* 149 是由母离子断裂 11 位酯键(-CH₂CO)后进一步中性丢失 1 分子 CO 形成的 [M + H]⁺ 碎片离子; *m/z* 121 是由母离子断裂 11 位酯键(-CH₂CO)后中性丢失 2 分子 CO 形成的

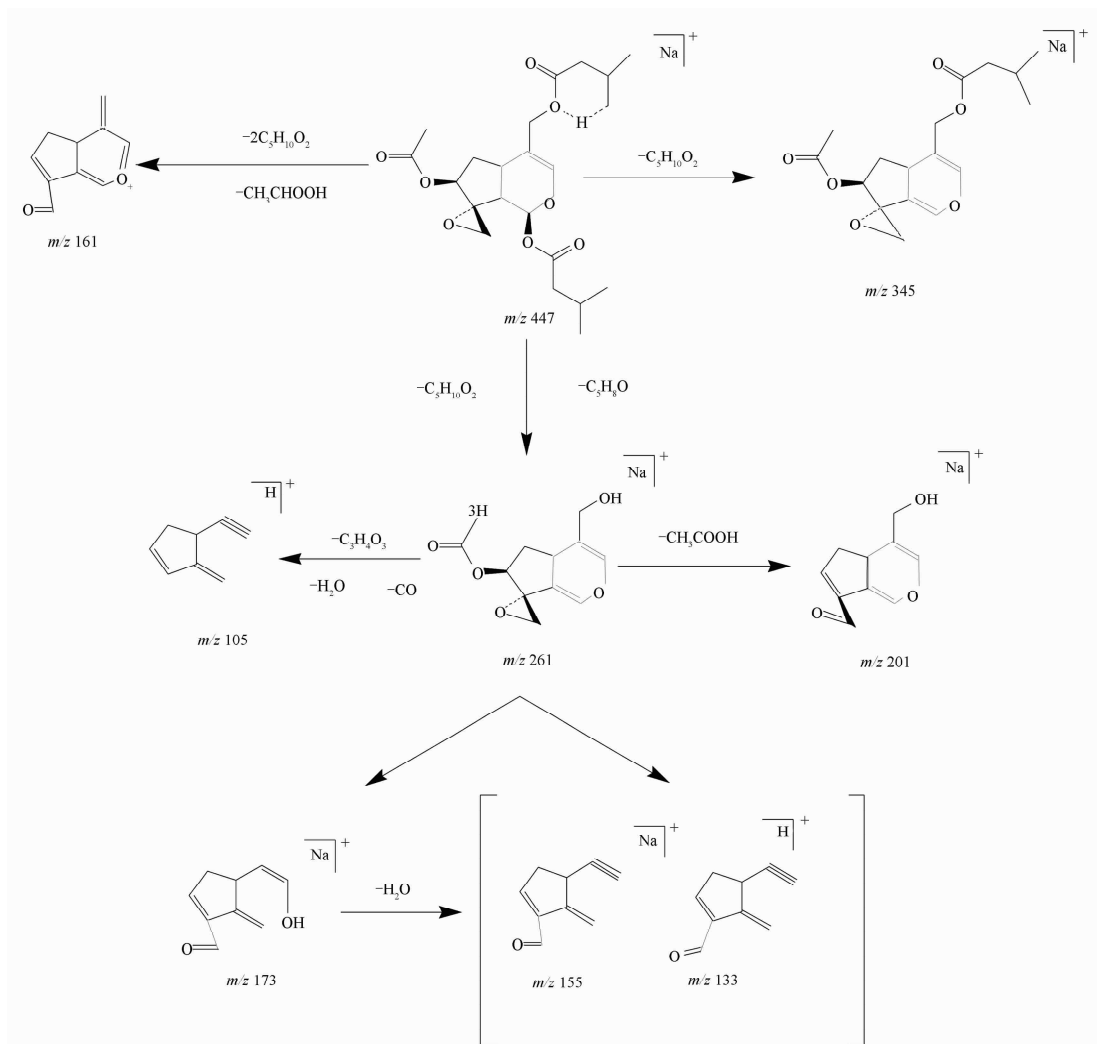


图2 二氢缬草素在正离子模式下的质谱裂解途径

Fig. 2 MS fragment pathways of didrovaltrate under positive mode

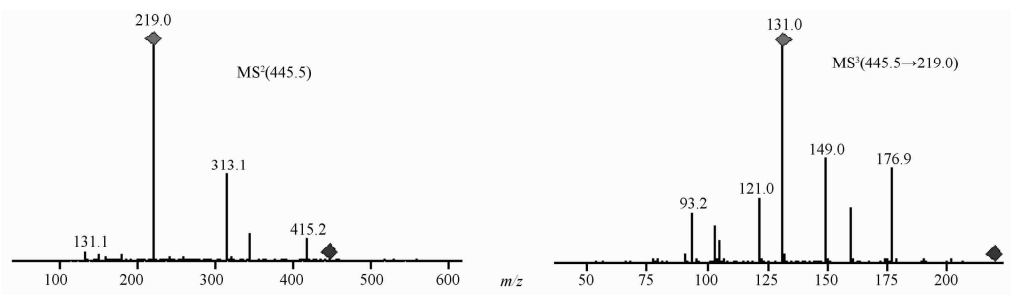


图3 缬草素在正离子模式下的2~3级质谱图

Fig. 3 The MS²⁻³ of valtrate

[M + H]⁺ 碎片离子; m/z 131 是由母离子断裂 11 位酯键(-CH₂CO)后中性丢失 1 分子 CO 和 1 分子 H₂O 形成的 [M + H]⁺ 碎片离子; m/z 93 是由母离子断裂 11 位酯键(-CH₂CO)中性丢失 3 分子 CO 形成的

[M + H]⁺ 碎片离子。质谱裂解途径见图 4。

2.5.2 乙酰缬草素 在 ESI 正离子模式下, 正离子模式下乙酰缬草素 (acevaltrate) 出现 m/z 503 [M + Na]⁺ 峰, 在二级质谱中出现 2 个丰度较高的

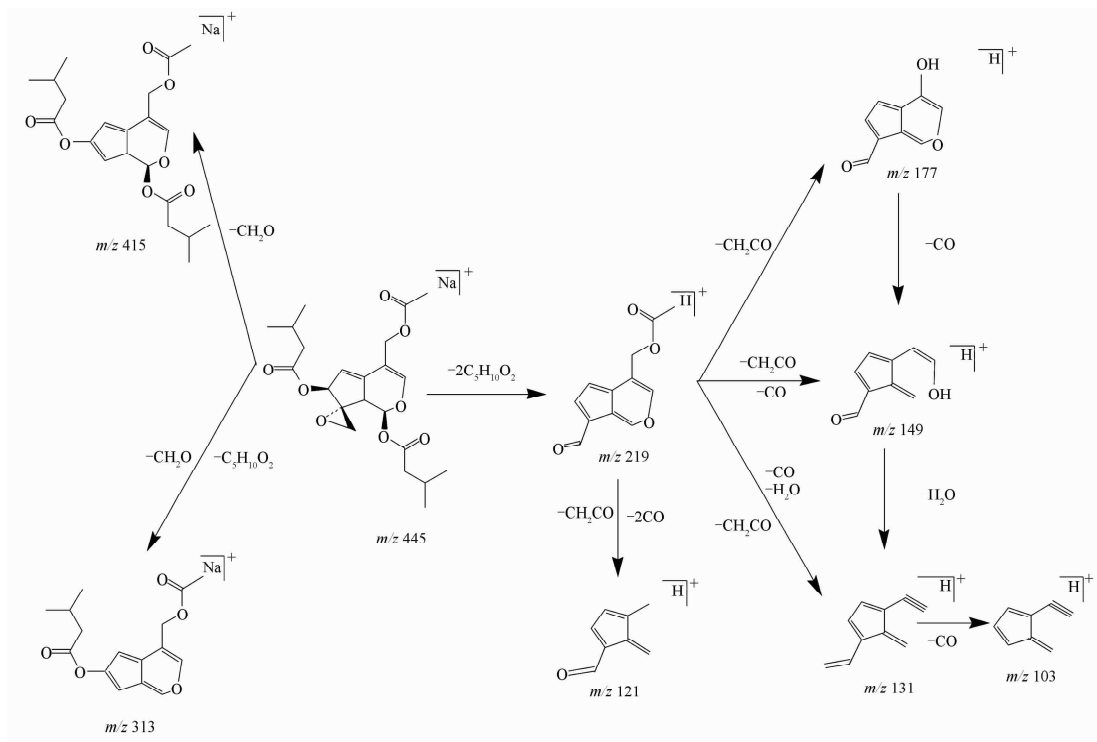


图 4 缬草素在正离子模式下的质谱裂解途径

Fig. 4 MS fragment pathways of valtrate under positive mode

碎片离子, m/z 分别为 401 和 219, 见图 5, 其裂解途径为 m/z 401 为 1 位酯键丢失形成的 $[M + Na - C_5H_{10}O_2]^+$ 碎片离子; 而 m/z 219 的形成是由于 8, 10 位环氧结构发生重排反应, 生成醛基, 同时 1, 7

位 2 个酯键同时丢失而形成的 $[M + H - C_5H_{10}O_2 - C_7H_{12}O_4]^+$ 碎片离子。

在三级质谱中出现 m/z 为 177, 149, 131, 121 和 93 等 5 个碎片离子, 见图 5, 其裂解行为见图 6。

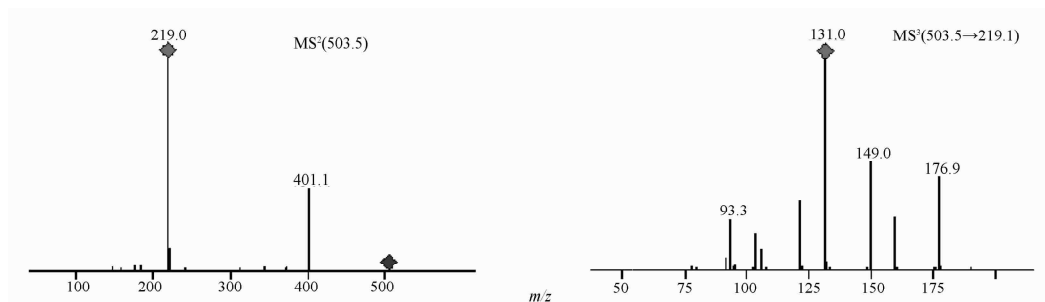


图 5 乙酰缬草素在正离子模式下的 2~3 级质谱图

Fig. 5 The MS²⁻³ of acevaltrate

2.6 四烯型缬草素 (baldrial 和 homobaldrial) 的质谱裂解途径分析

Baldrial 和 homobaldrial 的区别点只是 11 位羧基取代不同, baldrial 11 位是乙酰基 (AC) 而 homobaldrial 11 位是异戊酰基 (IV)。Baldrial 和 homobaldrial 可以看成是双烯型缬草素类质谱裂解形

成的中间稳定性很高的碎片, 所以四烯型缬草素的裂解规律与双烯型缬草素低端的质谱裂解很类似见图 7, 其质谱裂解行为见图 8。

3 讨论

以上 5 个化合物在负离子模式下质谱响应均很低, 无法检测到准分子离子, 可能是因为该类成分环

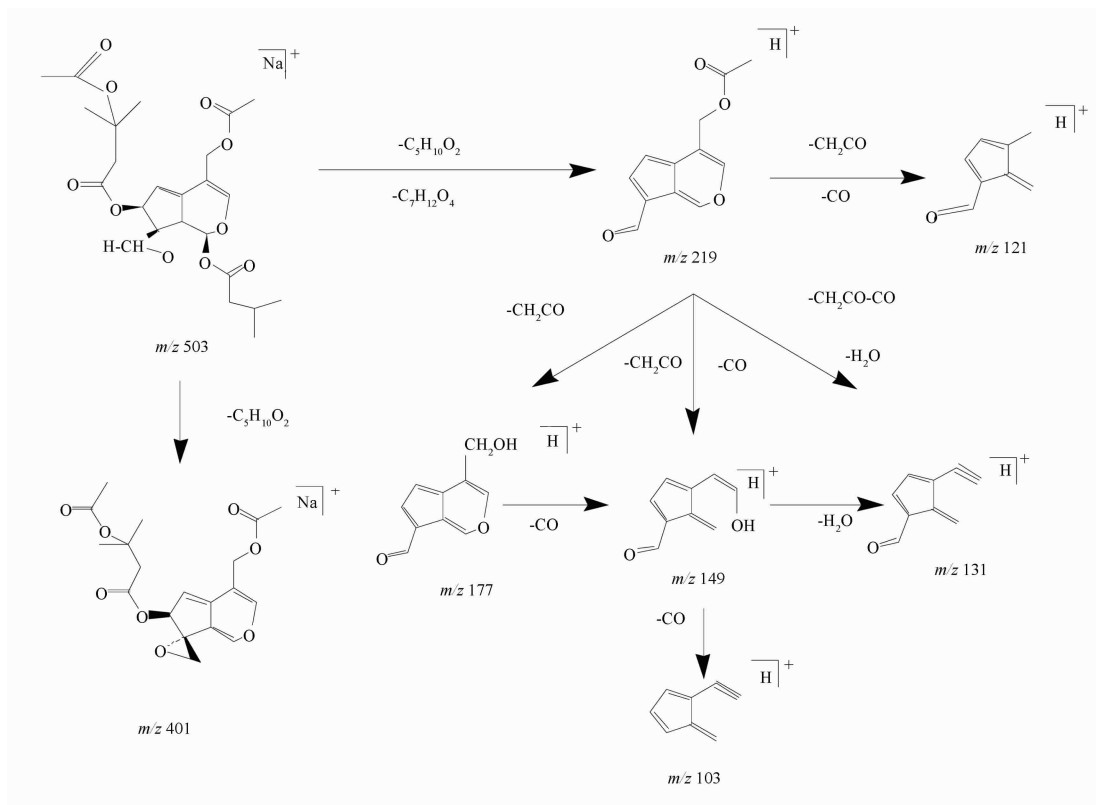


图6 乙酰缬草素在正离子模式下的质谱裂解途径

Fig. 6 MS fragment pathways of acevaltrate under positive mode

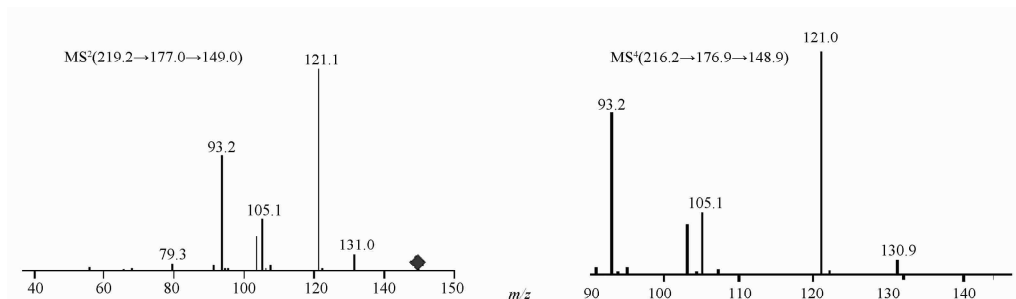


图7 Baldrinal 和 homobaldrinal 在正离子模式下的4级质谱图

Fig. 7 The MS⁴ of baldrinal and homobaldrinal

戊烷-C-吡喃母核结构被多个酯基占据(单烯型和双烯型缬草素)或存在稳定共轭体(四烯型缬草素),造成结构中没有活泼的质子供其在离子阱内电离。

在 ESI 正离子模式下,单烯型缬草素和双烯型缬草素准分子离子峰通常出现 $[M + Na]^+$ 峰,其钠加合离子在失去 1,7 位 2 个酯基基团后所形成的碎片离子均呈现质子加合离子,这种碎裂模式提示 $[M + Na]^+$ 中的钠离子最有可能处在 1,7 位上的酯基基团上;而四烯型缬草素准分子离子峰通常出现

$[M + H]^+$ 峰,提示质子最有可能处在吡喃环上,据此可初步判断此类成分的相对分子质量。

单烯型缬草素的质谱裂解机制与双烯型相比差异甚远,主要体现 2 种类型的缬草素在 7 和 11 位的酯基呈现出相反的稳定性,由此得出三酯结构的断裂情况是判断该类化合物的关键。从母核中电子云分布情况看,2 类缬草素中的 1 和 11 酯基位分别受吡喃环中环氧醚键和吡喃环 3,4 位双键吸电子影响,但单烯型缬草素中的 7 位酯基缺少 5,6 双键吸

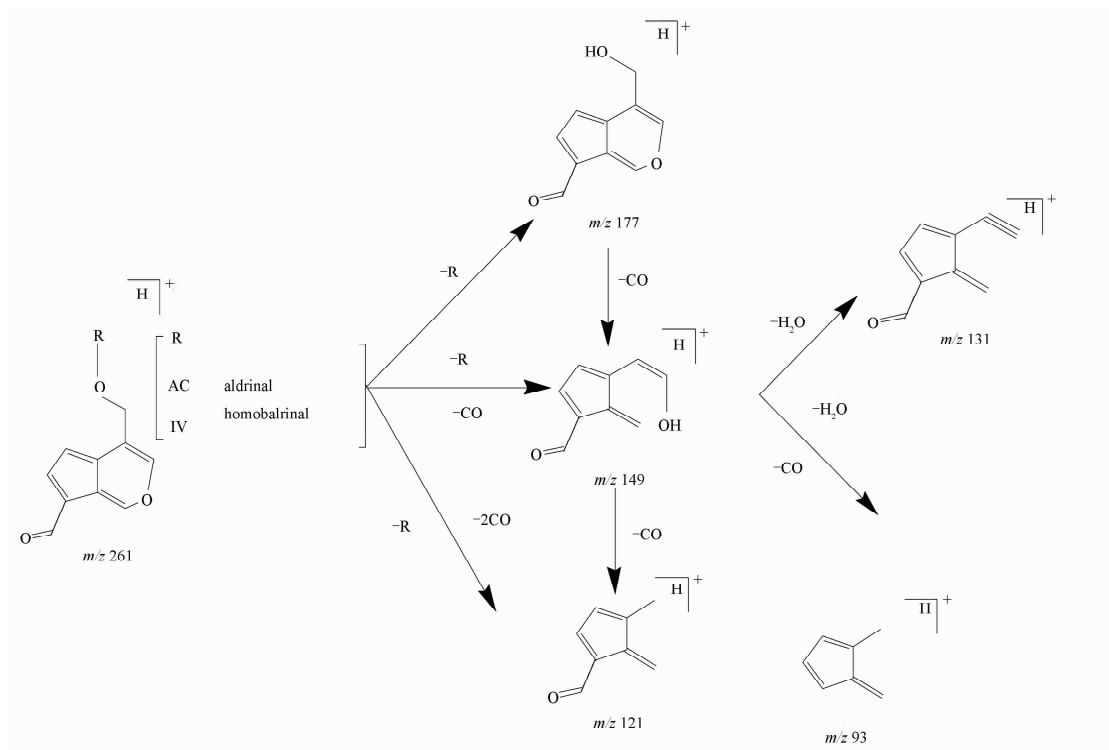


图8 Baldrinal 和 homobaldrinal 在正离子模式下的质谱裂解途径

Fig. 8 MS fragment pathways of baldrinal and homobaldrinal under positive mode

电子诱导效应影响,趋于稳定。因此,单烯型缬草素酯基稳定性顺序:7位酯基 > 11位酯基 > 1位酯基;双烯型缬草素:11位酯基 > 7位酯基 > 1位酯基。

目前,已从缬草属植物中分离得到含有酯键的缬草素类成分有几十种,这些同系组分的酰基取代多位于C1, C7, C11位^[15-16]。有研究发现缬草素类成分核磁规律明显取决于缬草素中母核结构类型和酰氧基的定位,由于母核中存在的双键及环氧醚键,使其1, 7, 11位处在不同的化学环境,并呈现出一定的规律性^[12, 17]。本文通过ESI-MS裂解探讨三酯结构中化学键的稳定性与其有类似的结论。

四烯型缬草素与双烯型缬草素类质谱裂解形成的中间稳定性很高的碎片完全吻合,都会形成 m/z 为 177, 159, 149, 121, 131, 103 等碎片离子,这说明缬草素在质谱碎裂中会首先形成缬草醛类成分,文献研究表明四烯型缬草素是双烯型缬草素的降解产物^[11-14]。

所获得的缬草素素类的质谱裂解规律可以应用于大多数此3类化合物的质谱分析提供数据依据,对缬草素类化合物的快速结构鉴别、定量分析和药代动力学研究起到一定的参考作用。

[参考文献]

- [1] 石晋丽, 刘勇, 肖培根. 缬草属植物·化学成分与药理作用[J]. 国外医学·植物药分册, 2003, 18(6): 231.
- [2] Wagner H, Jurcic K. On the spasmolytic activity of valeriana extracts [J]. *Planta Med*, 1979, 37(1): 84.
- [3] Bounthanh C, Bergmann, C, Beck J P, et al. Valepotriates a new class of cytotoxic and antitumor agents [J]. *Planta Med*, 1981, 41(1): 21.
- [4] Lin S, Shen Y H, Li H L, et al. Iridoids and lignans from *Valeriana jatamansi* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72: 650.
- [5] Fuzzati N, Wolfender J L, Hostettmann K, et al. Isolation of antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude valerianaceae extracts [J]. *Phytochem Anal*, 1996, 7: 76.
- [6] Tamura S, Shimizu N, Fujiwara K, et al. Bioisostere of valtrate, anti-HIV principle by inhibition for nuclear export of Rev [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 2159.
- [7] Tamura S, Fujiwara K, Shimizu N, et al. Concise synthesis of 5, 6-dihydrovaltrate leading to enhanced Rev-export inhibitory congener [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 5975.
- [8] Scalbert A, Brennan L, Feihn O, et al. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research [J]. *Metabolomics*, 2009, 5(4): 435.
- [9] 章飞芳, 张峰, 薛兴亚, 等. 中药组分的系统化学表征 [J].

世界科学技术——中医药现代化, 2006(3):85.

- [10] 孙明谦, 卢建秋, 张宏桂, 等. 延胡索甲素和延胡索乙素的电喷雾质谱研究[J]. 中药材, 2008, 31(11): 1671.
- [11] Thies P W. Die konstitution der valepotriate; Mitteilung über die wirkstoffe des baldrians [J]. Tetrahedron, 1968, 24: 313.
- [12] 张振学, 姚新生. 药用植物缬草的化学研究进展[J]. 中国

药物化学杂志, 2000, 10(3): 226.

- [13] Bos R, Woerdenbag H J, Hendriks H. Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations [J]. Phytochem Anal, 1996, 7:143.
- [14] 黄宝康, 郑汉臣, 秦路平. 蜘蛛香的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2007, 3: 134.

Mass spectrum characterization of five valepotriates by electrospray ionization tandem mass spectrometry

WANG Chun-guo, LIU Yong, SHI Jin-li^{*}, XIAO Yao, SHI Shu-ning, HOU Wen-hui, WANG Zi-jian
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss mass spectrum characterization of five valepotriates including ‘monoene’ type (didrovaltrate), ‘diene’ type (valtrate, acevaltrate) and ‘four-olefinic’ type (baldrinal and homobaldrinal) by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MSⁿ). **Method:** This study was carried out on the basis of electrospray ionization tandem mass spectrometric method and analysis of multistage fragments. **Result:** The fragmentation patterns and structural assignment of ‘monoene’ type, ‘diene’ type and ‘four-olefinic’ type valepotriates in ESI-MSⁿ under positive mode were summarized. **Conclusion:** The compounds have a strong pyrolysis rules and it can provide reference date for valepotriates in rapid structural identification, quantitative analysis and pharmacokinetic study.

[Key words] valepotriates; electrospray ionization tandem mass spectrometry; fragmentation pathways

doi:10.4268/cjcmm20130422

[责任编辑 孔晶晶]