

两种油菜素内酯甾醇类植物激素的多级质谱分析

霍飞凤, 白玉*, 刘虎威*

北京分子科学国家重点实验室, 生物有机与分子工程教育部重点实验室, 北京大学化学与分子工程学院分析化学研究所, 北京 100871

* 联系人, E-mail: yu.bai@pku.edu.cn, hwliu@pku.edu.cn

2009-08-20 收稿, 2009-11-20 接受

国家自然科学基金重点项目(90717002)、国家自然科学基金青年基金(20805001)、中央高校基本科研业务费和教育部留学回国人员启动基金资助

摘要 利用电喷雾离子阱质谱仪对 28-高油菜素内酯(28-homobrassinolide, 28-h-BL)和 28-表高油菜素内酯(28-homobrassinolide, 28-h-BL)两种植物激素进行了多级(MS^n , $n = 1, 2, 3, 4$)碎裂质谱分析, 详细阐明了它们在此实验条件下的裂分机理, 并为定性区别这两种异构体提供了潜在的可能。

关键词

油菜素内酯
裂解
离子阱质谱

油菜素内酯甾醇类植物激素(Brassinosteroids)的研究始于 1971 年, Michell 等人^[1]在筛选植物的花粉时发现一种粗提取物可以有效促进豆类秧苗的生长。1979 年, Grove 等人^[2]从油菜的花粉中分离出一种具有内酯结构的类固醇化合物, 并且利用 X-射线晶体衍射第一次确定了它的结构, 命名为 brassinolide (BL)。此后, 人们陆续发现了超过 50 种的天然油菜素内酯甾醇类化合物, 这些化合物的发现极大地激发了研究者的研究兴趣。1998 年, 在日本千叶举行的第 16 届国际植物生长物质学会会议上, 油菜素内酯甾醇类激素被正式确认为继生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸、乙烯之后的第六类植物激素。

正如图 1 所示, 所有的油菜素内酯甾醇类激素都衍生自 5α -甾烷, 并且可以根据 A 环、B 环及侧链结构的不同进行分类。侧链的不同决定了它们含碳的个数, 由此可以被区分成 C-27 油菜素内酯甾醇类植物激素, C-28 油菜素内酯甾醇类植物激素, C-29 油菜素内酯甾醇类植物激素。总体来看, 油菜素内酯甾醇类植物激素可以通过下面所列的官能团来归类^[3]:

- (1) B 环为七元环内酯类结构;
- (2) 在 C-2/C-3 位上含有羟基;
- (3) B 环为 C-6 位上含有氧原子;
- (4) B 环不含氧原子;

- (5) B 环 C-6 位含有氧原子, 并且 C-1 位上有羟基;
- (6) 侧链上 C-22 和 C-23 位上含有羟基。

油菜素内酯甾醇类植物激素的化学结构对于它们的生理活性起着至关重要的作用, 微小空间构象的改变都能引起生理活性的显著变化。总体而言, B 环为七元环的油菜素内酯甾醇类植物激素比六元环的结构有着较高的生物活性, B 环含氧的六元环结构与七元环不相上下, 但 B 环不含氧的结构基本没有生理活性。

植物激素在各种植物组织中分布广泛, 如花粉、茎、种子、叶子、花粉囊、花, 甚至是一些有趣的植物器官中, 如虫瘿。通常, 年轻的正在生长中的植物组织含有更多油菜素内酯甾醇类植物激素, 尤其是花粉和未成熟种子中, 含量较高。尽管如此, 油菜素内酯甾醇类植物激素在植物体内的含量还是要远远低于其他植物激素。在未成熟的花粉中, 它们的含量也仅为 1~100 ng/g (湿重), 而在年轻的根和叶子中, 含量低至 0.1 ng/g (湿重)。

尽管如此低的含量, 油菜素内酯甾醇类植物激素已经被证明对植物的生长发育有着独一无二的调控作用。然而, 它们的生理机能还没有完全被探明, 如关于油菜素内酯甾醇类植物激素在植物体内的生物合成、代谢、降解以及信号转导等的信息还是相当

英文版见: Huo F F, Bai Y, Liu H W. Fragmentation study of two brassinolides by ion trap tandem mass spectrometry. Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-3191-7

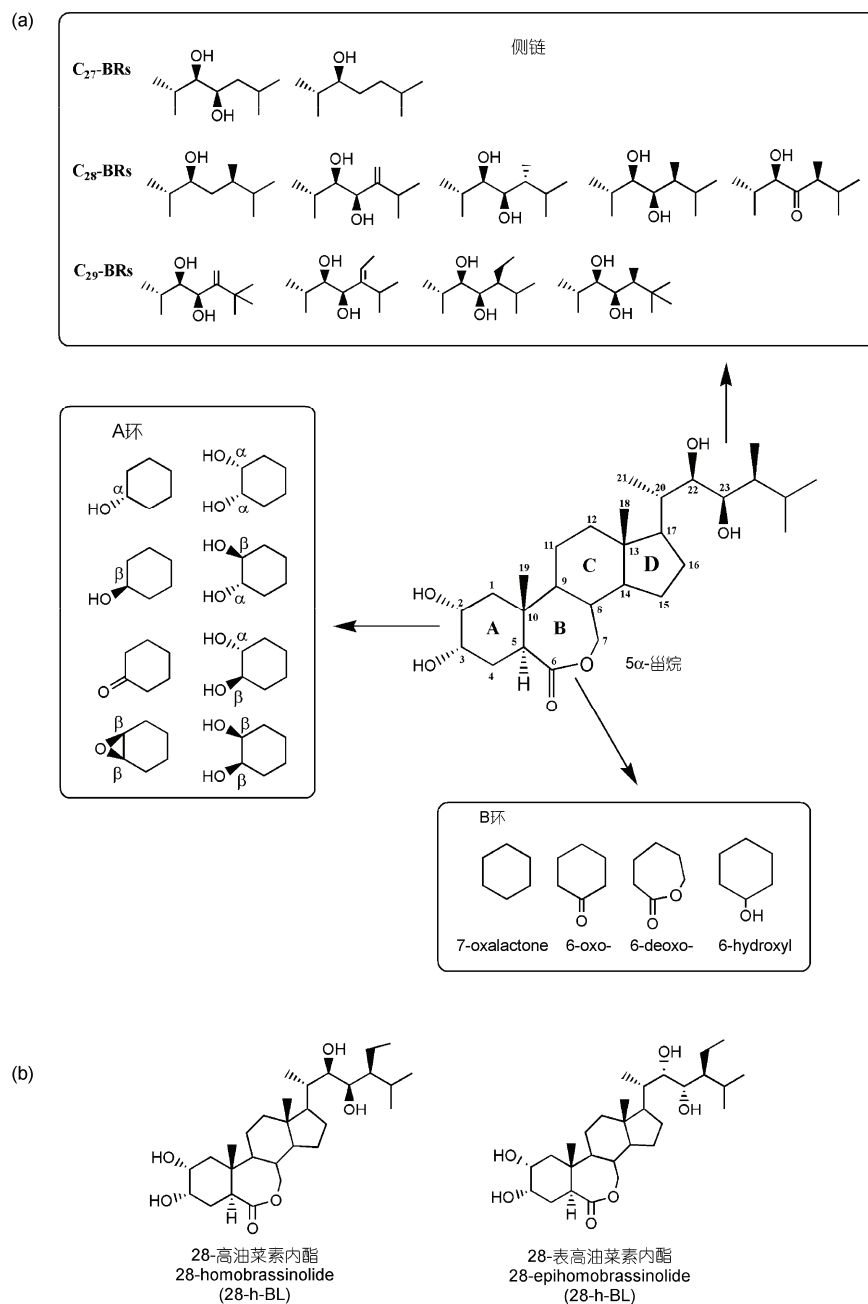


图 1 天然油菜素内酯甾醇类植物激素在 A 环、B 环及侧链上不同的取代基(a), 28-h-BL 和 28-e-BL 的化学结构(b)

模糊的。因此,亟需开发高灵敏度、高选择性的新的分析方法对它们进行可靠、准确的鉴定。20 世纪 90 年代初期,气相色谱/质谱联用(gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)技术是用来鉴定新油菜素内酯类化合物的主要手段,但是灵敏度和检测限往往受限。随着高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)和液相色谱-质谱联用(LC/MS)技术的发展,液质联技术开始取代气质

联用技术作为普遍的分析手段。Gamoh 等人^[5]研究小组利用奈硼酸衍生化油菜素内酯甾醇类植物激素; Svatoš 等人^[6]采用丹磺酰-氨基苯硼酸衍生化油菜素内酯甾醇类植物激素,取得了较高的灵敏度,可以用来鉴定植物中的痕量油菜素内酯甾醇类植物激素; Swaczynová 等人^[7]利用将 24-epicastasterone carboxymethyloxime (24-epiCS-CMO)偶联到牛血清蛋白上,免疫兔子得到抗体后,与液相色谱/质谱联用技术结

合, 可以达到 0.005~50 pmol 的检测限。

由于油菜素内酯甾醇类植物激素含量极低, 异构体种类多, 且对植物生长有着极为重要的作用, 因此非常有必要从不同角度来对其进行研究, 为相关植物激素的定性研究提供基础数据, 甚至对于研究它们在植物体内的代谢过程都是非常有帮助的。本文选择了两种具有很强的生化活性, B 环为七元环的油菜素内酯甾醇类植物激素异构体, 28-h-BL 和 28-eh-BL (图 1), 并利用离子阱多级串联质谱考察了其特征的碎裂路径。这两种化合物属于 C-28 油菜素内酯甾醇类植物激素, 它们之间唯一的区别在于 C-22 和 C-23 位上羟基空间取向的不同。本部分工作为首次利用多级串联质谱技术来详细探讨这两种油菜素内酯甾醇类植物激素异构体化合物的裂解机理。我们希望这部分工作可以为分析化学家和植物学家研究这类激素和其他植物激素提供一些基础分析数据。

1 材料与方法

(i) 试剂。色谱级别的乙腈、甲醇和甲酸来自美国迪马公司。28-h-BL 和 28-eh-BL 购自上海威迪生化有限公司(南昌), 纯度在 90% 以上。两种样品溶于甲醇, 配制浓度为 0.1 mg/mL。

(ii) 仪器及条件。所有的分析都采用安捷伦 1100 液相色谱仪, 在线连接至安捷伦 XCT 离子阱质谱仪, 电喷雾电离源(electro spray ionization, ESI), 正模式检测。实验过程中利用 ZORBAX XCD-C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm; Agilent Technologies)进行样品中的杂质初步分离。流动相为 80:20 的乙腈:水, 含 0.1% 甲酸, 流速为 1 mL/min, 利用三通分流来控制进入质谱的流速。部分实验采用质谱直接进样法完成。质谱仪碎裂参数设置如下: 喷雾器, 50 psi; 干燥气(N₂) 流速, 10.0 L/min; 干燥气温度, 350 °C; 毛细管电压, -3.5 kV; skimmer 电压, 40 V。毛细管出口端电压和碎裂振幅随着产物离子的不同而变化。

2 结果与讨论

图 2 显示了 28-h-BL 和 28-eh-BL 在正离子模式下全扫描电喷雾质谱图。基峰 m/z 495 对应的是 28-h-BL 和 28-eh-BL 的质子化的准分子离子峰, $[M+H]^+$; m/z 517 为其钠离子加合物, $[M+Na]^+$ 。 m/z 477 和 459 离子是由 m/z 495 进一步分别丢失一个水和两个水分子形成的。

为了进一步研究这两种油菜素内酯类化合物的裂解机理, 我们采用了多级串联质谱进行研究, (ESI-MSⁿ, $n = 2, 3, 4$)。因为部分羟基位于手性位点, 可以帮助解释丢失水的情况, 进而研究裂解机理的异同。图 3 是两种油菜素内酯的二级质谱图。 m/z 477, 459, 441, 423, 405 等一系列离子是通过丢失不同数目的水分子产生的。通过对比谱图发现两种异构体的二级碎裂图谱没有明显差别。两个化合物进一步的多级碎裂谱图轮廓也类似, 因此在下面的讨论中裂解机理将通过 28-eh-BL 来阐述, 略去部分与 28-eh-BL 结果类似的 28-h-BL 的质谱数据。

图 4 为 28-eh-BL 的三级质谱图。利用谱图中得到的数据, 可以帮助我们确定失水的位置。因为只有

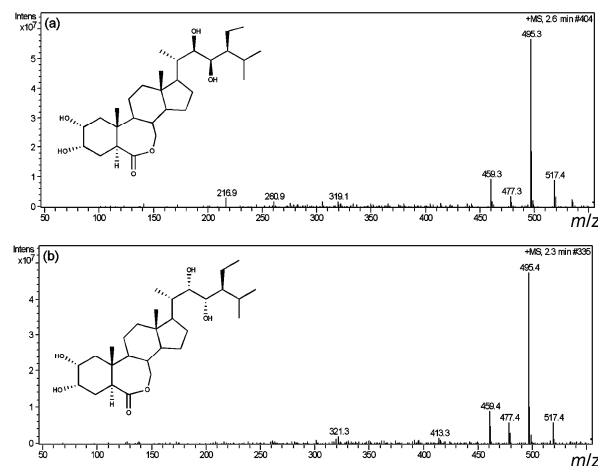


图 2 28-h-BL(a)和 28-eh-BL(b)的全扫描 ESI 质谱图

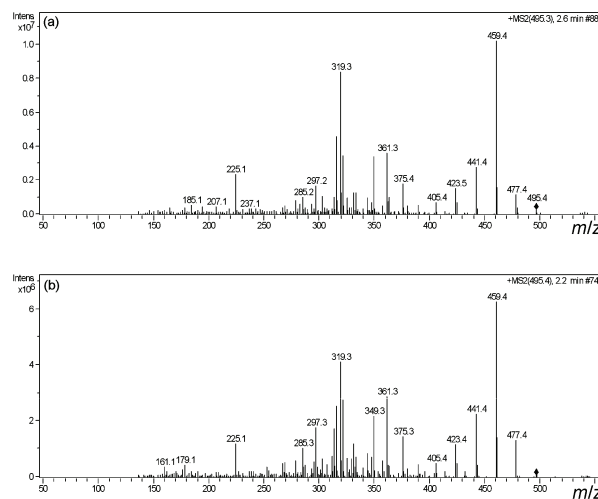


图 3 m/z 495 离子的二级质谱图
(a) 28-h-BL; (b) 28-eh-BL

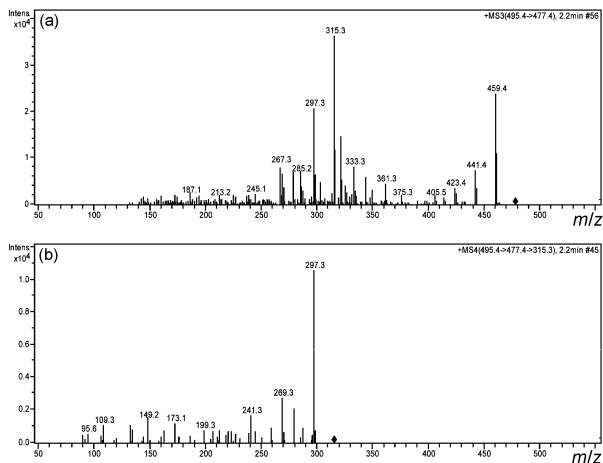


图4 28-eh-BL的多级质谱图
(a) MS^3 m/z 495→477; (b) MS^4 m/z 495→477→31

C-2 或 C-3 位上水的丢失才能产生 m/z 315 离子(图 4(a)), 而且 C-22 和 C-23 键的断裂可以进一步消去 2-乙基-3-甲基正丁醛(图 4(b)). 正如图 5 所示, 共轭结构可以增加 m/z 315 离子的稳定性. 随后, m/z 315 离子进一步的失去一个水, 生成 m/z 297 离子.

图 6 为 28-eh-BL 的多级质谱图. m/z 495 的离子失去两个水后形成具有共轭双键的 m/z 459 离子. 随后,

侧链以及两个氢的消除, 导致了 m/z 319 离子的产生. m/z 319 离子强度的不同是这两个异构体三级质谱图(MS^3 , 495→459)的主要区别, 对于 28-eh-BL, m/z 319 离子的丰度仅为 m/z 441 离子的 38%, m/z 375 离子的 47%, 而对于 28-h-BL 其相应的数值分别是 91%和 95%. 这一现象可能有助于在实际样品的分析中区分这两种异构体. m/z 319 离子进一步丢失水分子, 生成 m/z 301 和 m/z 283 离子. 同时, C-19 位上甲基的离去和甲醛的消除, 形成了 m/z 247 离子. 类似地, m/z 225 离子可以通过 m/z 319 离子丢失两个水分子、一分子甲醛和一分子一氧化碳而形成.

m/z 459 离子丢失侧链上 C_3H_6 连同 C-19 位上的脱乙酰化作用可以导致 m/z 375 离子的生成, 相应的 m/z 357, 339, 321, 293, 279 离子的碎裂生成过程可以通过以上的分析类比得到(图 7).

在图 3 的 m/z 495 离子的二级质谱图中, m/z 441 离子可以通过 m/z 495 离子丢失 3 个水分子形成. 实验结果显示, 28-eh-BL 和 28-h-BL 这两种异构体的三级质谱图(MS^3 , m/z 495→441)也类似(图 8), 其中一个微小的差异就是 m/z 313 离子的相对强度略有不同; 28-h-BL 与 28-eh-BL(谱图略)的四级质谱图轮廓

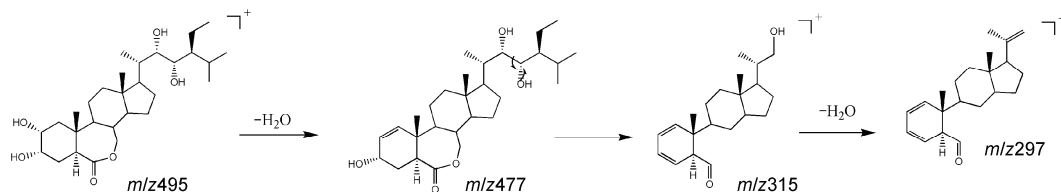


图5 28-eh-BL 的 m/z 477 离子在电喷雾质谱条件下的可能碎裂途径

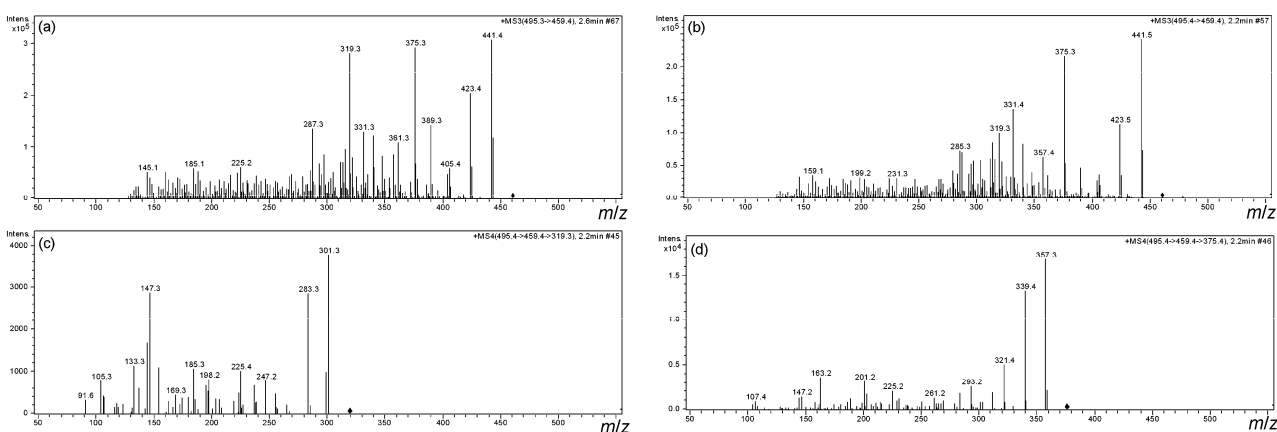


图6 28-eh-BL 和 28-h-BL 的多级质谱图

(a) 28-h-BL 的三级质谱图, MS^3 m/z 495→459; (b) 28-eh-BL 的三级质谱图, MS^3 m/z 495→459; (c) 28-eh-BL 的四级质谱图, MS^4 495→459→319; (d) 28-eh-BL 的四级质谱图, MS^4 495→459→375

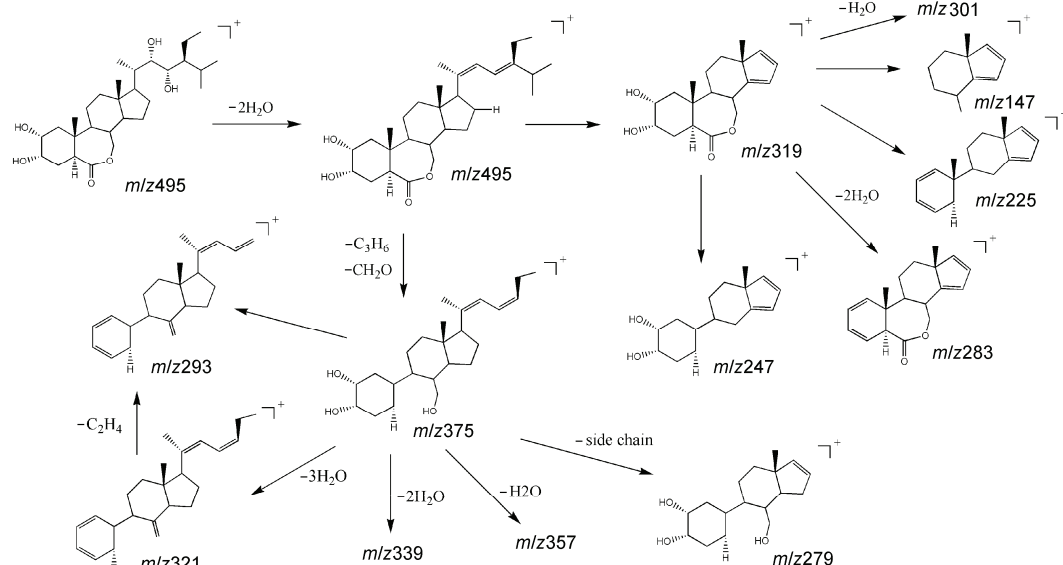
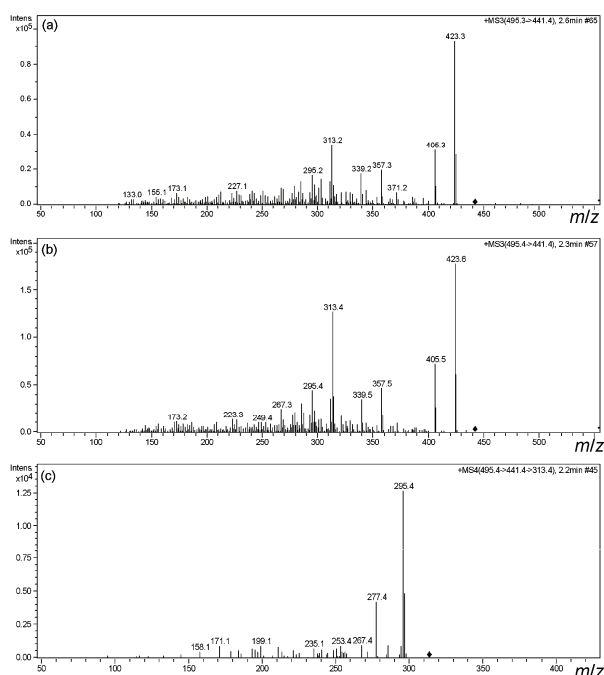

 图 7 28-eh-BL 的 m/z 459 离子在电喷雾质谱条件下的可能碎裂路径


图 8 28-eh-BL 和 28-h-BL 的多级质谱图

(a) 28-h-BL 的三级质谱图, MS^3 m/z 495 $\rightarrow$ 441; (b) 28-eh-BL 的三级碎裂图, MS^3 495 $\rightarrow$ 441; (c) 28-eh-BL 的四级碎裂谱图, MS^4 495 $\rightarrow$ 441 $\rightarrow$ 313

(MS^4 495 $\rightarrow$ 441 $\rightarrow$ 313)相似。对于 m/z 441 的离子, C-22 和 C-23 键的断裂可以产生 m/z 357 离子, 进一步失去 CH_3CHO 会形成 m/z 313 离子。

图 9 展示了 28-eh-BL 的多级质谱图。对于 m/z 405 离子, 六元环的共振结构能增加离子稳定性。中性水分子

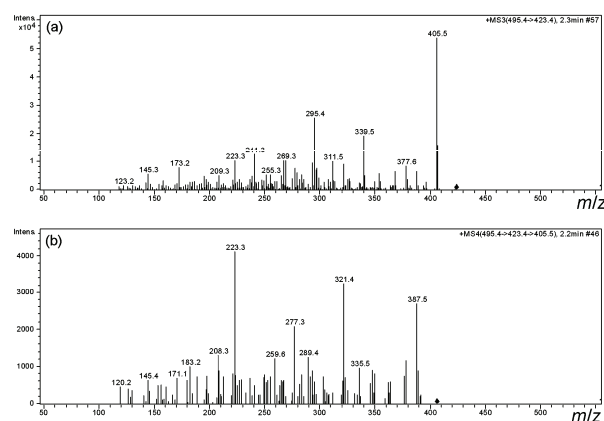


图 9 28-eh-BL 的多级质谱图

(a) MS^3 m/z 495 $\rightarrow$ 423; (b) MS^4 m/z 495 $\rightarrow$ 423 $\rightarrow$ 405

丢失, 可以产生 m/z 387 离子, 其中强度最大的 m/z 223 离子可以通过侧链和 CH_3COH 的丢失而生成。图 10 是据此提出的可能碎裂路径。

3 结论

本文利用离子阱多级串联质谱, 对 28-h-BL 和 28-eh-BL 的裂解机制进行了细致分析, 并且对比了它们的质谱数据, 提出了可能的裂解规律。可见两种异构体的碎裂行为基本一致; 水分子的消除、侧链的断裂以及 B 环的开环反应是它们主要的裂解行为, 两个异构体三级质谱图中生成 m/z 319 离子强度的不同可能成为区分两种异构体的方法。

