

# 大黄酸离子阱内分子离子反应的研究

## No.LCMS-IT-TOF-008

**摘要：**采用离子阱-飞行时间串级质谱(LCMS-IT-TOF)对大黄酸对照品进行多级质谱裂解规律的研究。使用电喷雾电离源(ESI)在负离子检测模式获得大黄酸[M-H]<sup>-</sup>离子的MS<sup>1</sup>-MS<sup>5</sup>质谱数据。根据多级质谱结果,分析、总结大黄酸的裂解规律。大黄酸的MS<sup>2</sup>质谱图显示特殊裂解碎片m/z257.0466,对此碎片进行进一步的分析,证明为大黄酸丢失CO<sub>2</sub>中性碎片产生的MS<sup>2</sup>碎片离子m/z 239.0359与H<sub>2</sub>O分子发生反应生成的复合物。

**关键词：**大黄酸 裂解规律 离子阱反应

蒽醌类化合物(如图1所示)是许多中草药的活性成分,具有较多种类的衍生物以及较高的含量。同时,蒽醌化合物也被大量用于染料工业。以蒽醌母核为原料,经化学反应可得到范围广泛的染料中间体,形成色谱系全,性能优越的染料类别。目前,蒽醌染料已有400多个品种。

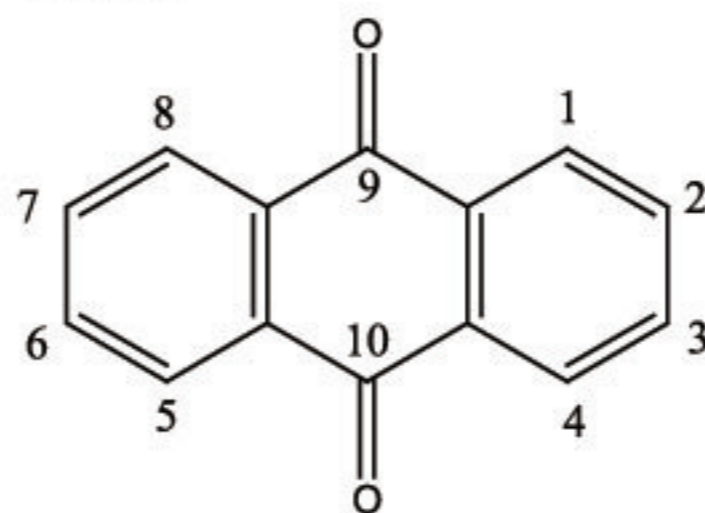


图1 蒽醌母核结构

天然存在的蒽醌类成分在蒽醌母核上常有羟基、羟甲基、甲氧基和羧基取代,大黄酸是重要的蒽醌化合物,在多种中药材中具有广泛的分布。本文采用电喷雾-离子阱/飞行时间质谱对大黄酸的裂解规律进行系统的研究。

## 实验部分

### 1、仪器

ShimadzuLCMS-IT-TOF系统,包括LC-20AD×2(输液泵),SIL-20AC(自动进样器),CTO-20AC(柱温箱),SPD-M20A(二极管阵列检测器),CBM-20A(控制器),DGU-20A3(在线脱气机),LCMS-IT-TOF(离子阱-飞行时间串级质谱仪),Wako主动分流阀。

### 2、样品制备及实验条件

将对照品使用适量甲醇溶解并充分振荡配制成浓度为10 μg/mL的溶液,使用自动进样器进样,不经色谱柱分离进行分析,直接将样品注入质谱仪进行分析。流动相:乙腈:水=80:20;进样量1 μL;流速0.1mL/min。

电喷雾电离(ESI):正离子模式喷雾电压4.5 kV,负离子模式喷雾电压-3.5 kV;加热模块(HB)温度:200°C;曲线脱溶剂管(CDL)温度:200°C。

碰撞诱导解离(CID)参数:(1)碰撞能量:MS<sup>1</sup>~MS<sup>3</sup>:50%;MS<sup>4</sup>:40%;MS<sup>5</sup>:35%;MS<sup>6</sup>:22%;(2)碰撞气比例:MS<sup>1</sup>~MS<sup>3</sup>:50%;MS<sup>4</sup>~MS<sup>6</sup>:70%;(3)碰撞时间:MS<sup>1</sup>~MS<sup>6</sup>:30msec。雾化气采用氮气(纯度≥99.5%),流速1.5L/min,检测器电压1.70kV。高纯氩气(纯度≥99.99%)作为CID碰撞气及冷却气。使用三氟醋酸钠(2.5 mmol/L)溶液对正、负离子模式m/z100-1000的范围进行质量数校正。

使用自动采集模式,每一级自动选择基峰离子作为下一级的母离子进行碎裂。

数据分析由LCMSsolution 3.50工作站完成。结合分子式预测软件对多级质谱碎片作出综合分析,得到化合物的分子式及碎片信息。

## 结果与讨论

### 1、对照品多级质谱裂解规律研究

#### 1.1 大黄酸裂解规律

大黄酸是具有羧基取代的蒽醌化合物，具有较强的酸性，结构式如图2所示。大黄酸在负离子模式下易生成 $[M-H]^-$ 离子，而正离子模式下则未有相应的 $[M+H]^+$ 离子生成。因此，采用LCMS-IT-TOF系统对大黄酸的 $[M-H]^-$ 离子进行系统分析，获得其负离子模式 $MS^1-MS^5$ 多级质谱数据，图2显示了大黄酸各级的主要碎片以及可能的裂解规律。

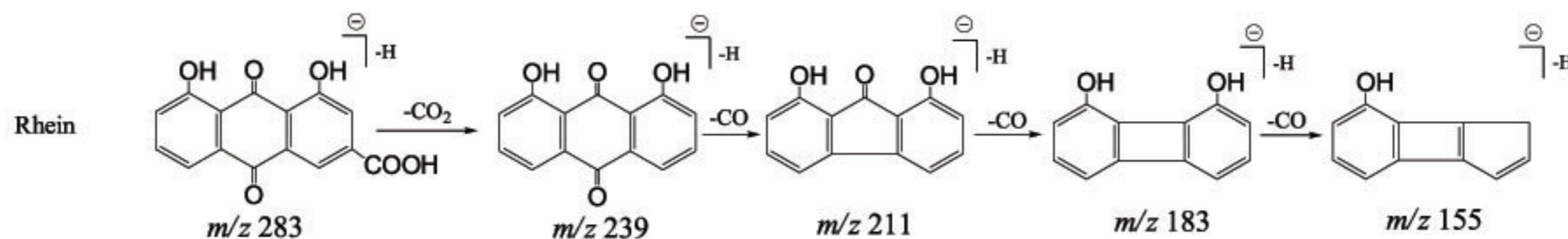


图2 大黄酸 $[M-H]^-$ 离子可能的裂解规律示意图

#### 1.2 大黄酸 $MS^2$ 碎片离子 $m/z$ 257.0466分析

在大黄酸的裂解过程中，其 $MS^2$ 谱图中，除由 $MS^1$ 母离子 $m/z$ 283.0243失去 $CO_2$ 中性碎片得到的 $m/z$ 239.0344碎片离子，还生成了 $m/z$ 257.0450碎片离子，如图3所示：

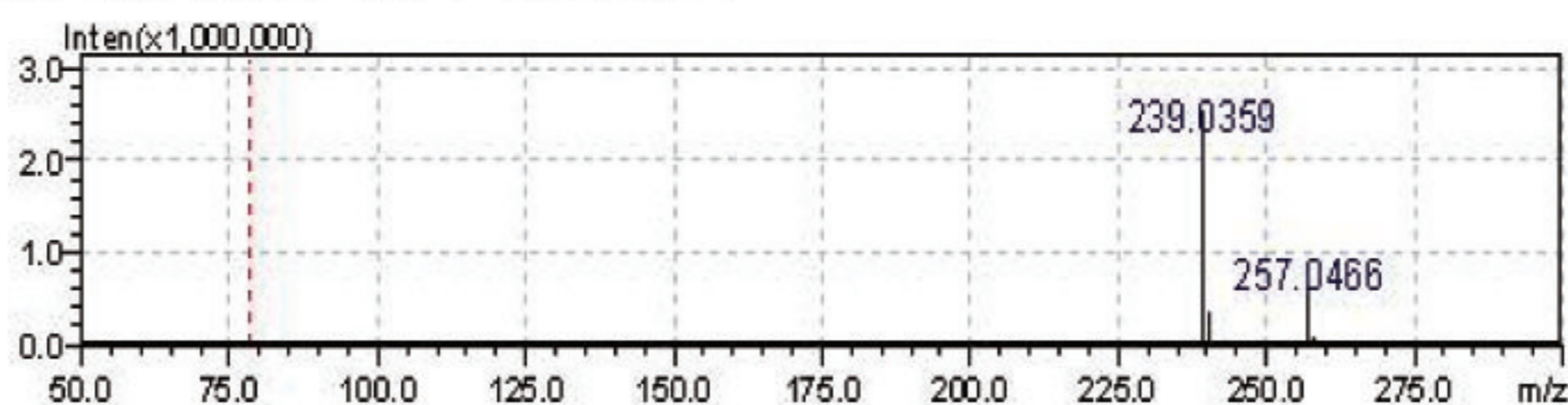


图3 以 $m/z$ 283.0243为母离子生成的 $MS^2$ 级谱图

进一步分析 $m/z$ 257.0450离子。母离子 $m/z$ 283.0243与 $m/z$ 257.0450离子之间的质量差异为25.9793Da，使用分子式预测软件对此质量数进行预测，在1Da的误差范围内，未得到可信的预测结果。而大黄酸的结构中也不具有生成25.9793Da中性碎片的结构特征。比较 $m/z$ 257.0450离子与 $m/z$ 239.0344离子，发现二者的质量差异为18.0106Da，经分子式预测软件鉴定为 $H_2O$ 分子。

因此，根据以上分析，推测 $m/z$ 257.0450离子并不是由母离子 $m/z$ 283.0243直接产生，而是由 $m/z$ 239.0344离子通过离子阱内反应与一分子 $H_2O$ 发生加合反应，生成共聚物，从而得到 $m/z$ 257.0450离子。

为确定 $m/z$ 257.0450离子为阱内反应产物，选择 $m/z$ 257.0450离子为母离子进行碎裂，得到图4所示的多级碎片。

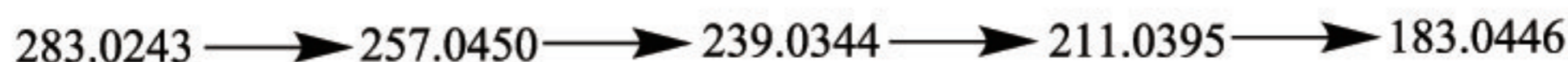
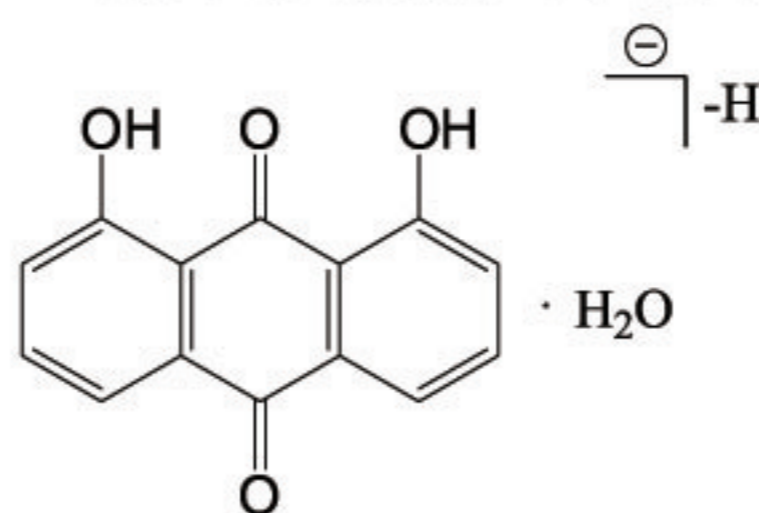


图4 以 $m/z$  257.0450离子为母离子获得多级碎片

$m/z$ 257.0450离子的 $MS^3$ 碎片离子为 $m/z$ 239.0344，二者之间相差18.0106Da，鉴定为 $H_2O$ 分子。进一步比较发现，2个 $m/z$ 239.0344离子（由 $m/z$ 257.0450离子得到的和由母离子 $m/z$ 283.0243直接生成的）具有相同的下级碎片，如图4所示，从而显示二者具有相同的结构。通过以上分析，可知 $m/z$ 257.0450离子是 $m/z$ 239.0344离子与一分子水发生加合反应得到的加合产物，而不是由母离子 $m/z$ 283.0243直接失去特定中性碎片生成的碎片离子， $m/z$ 257.0450的可能结构如图5所示。 $m/z$ 257.0450离子的多级质谱如图6所示。



Chemical Formula:  $C_{14}H_9O_5$   
Exact Mass: 257.0455

图5  $m/z$ 257.0450离子可能的结构式

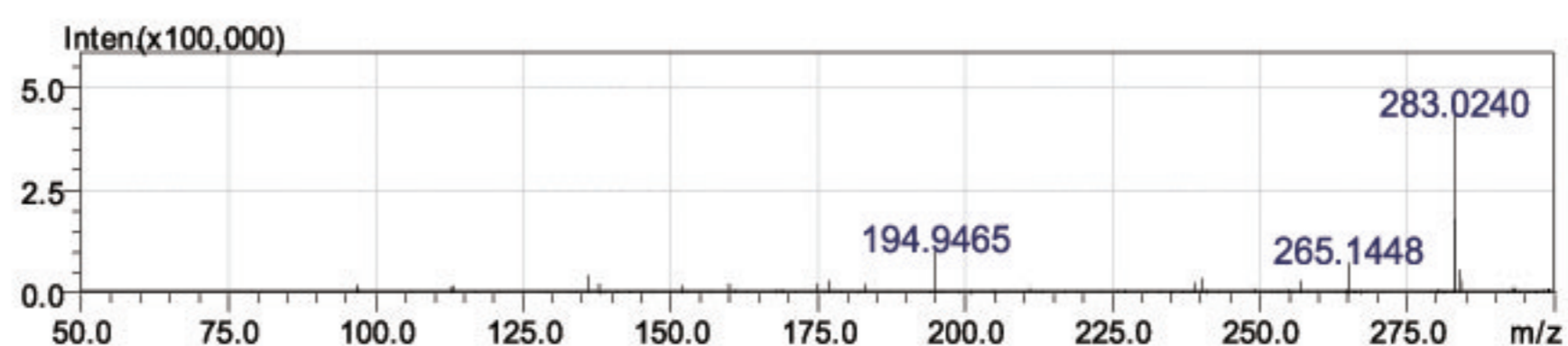
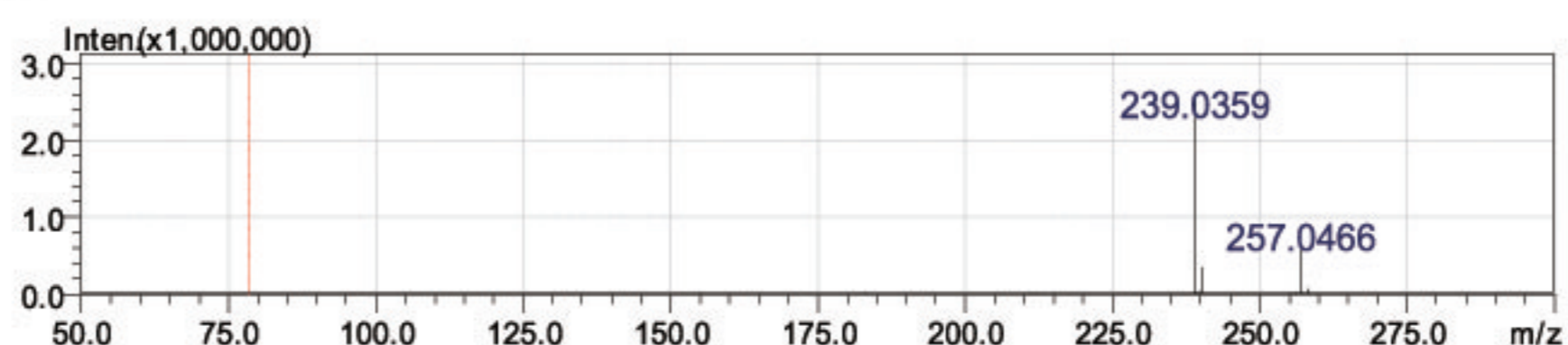
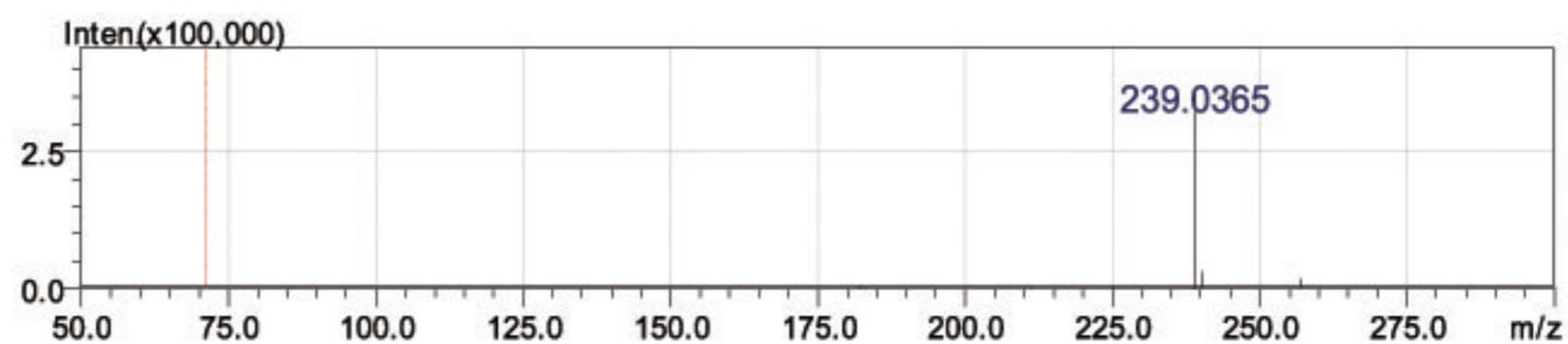
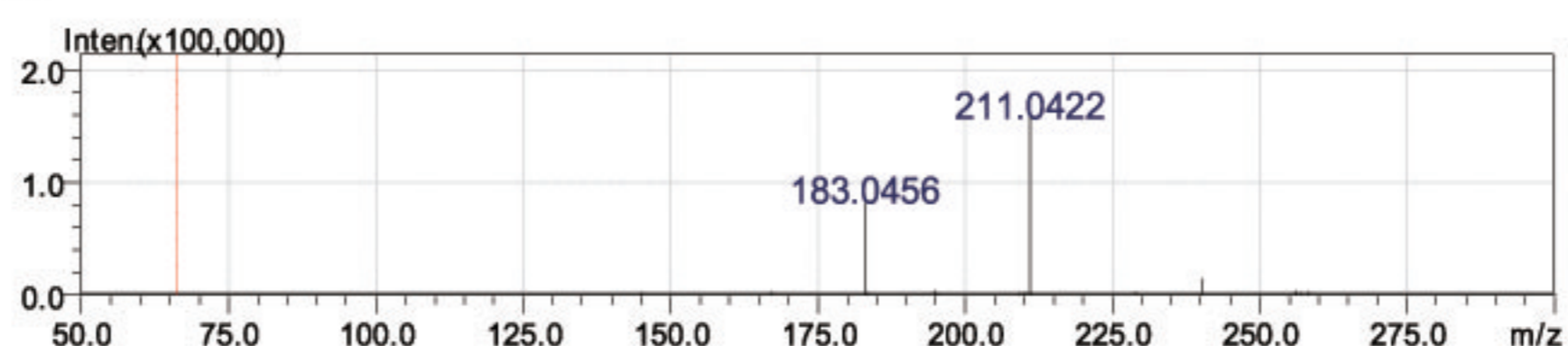
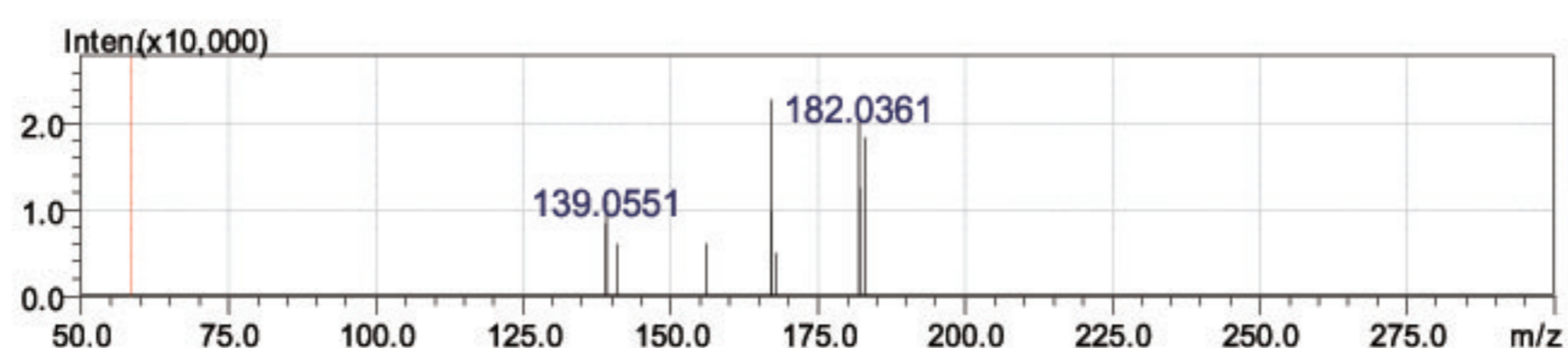
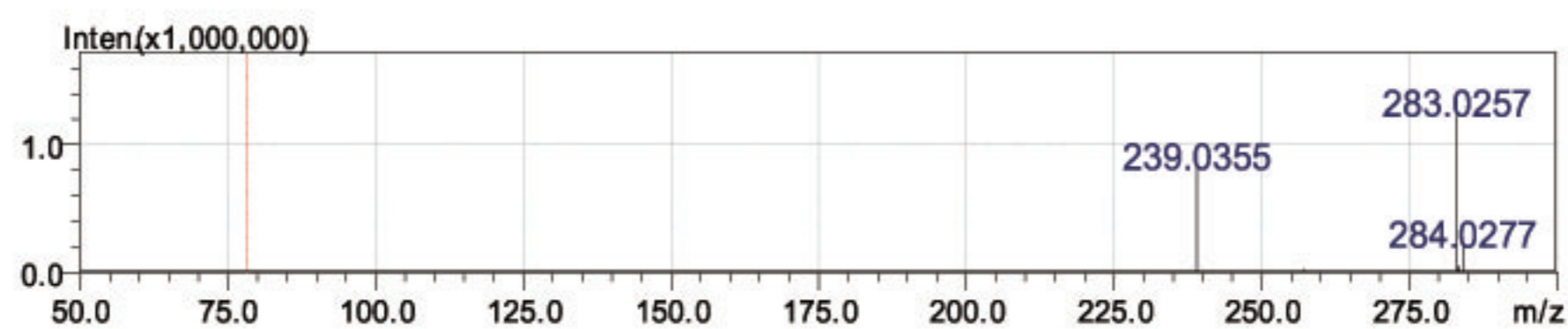
MS<sup>1</sup>MS<sup>2</sup> Precursor: 283.0200MS<sup>3</sup> Precursor: 257.0500MS<sup>4</sup> Precursor: 239.0400MS<sup>5</sup> Precursor: 211.0400

图6 m/z257.0450离子的多级质谱图

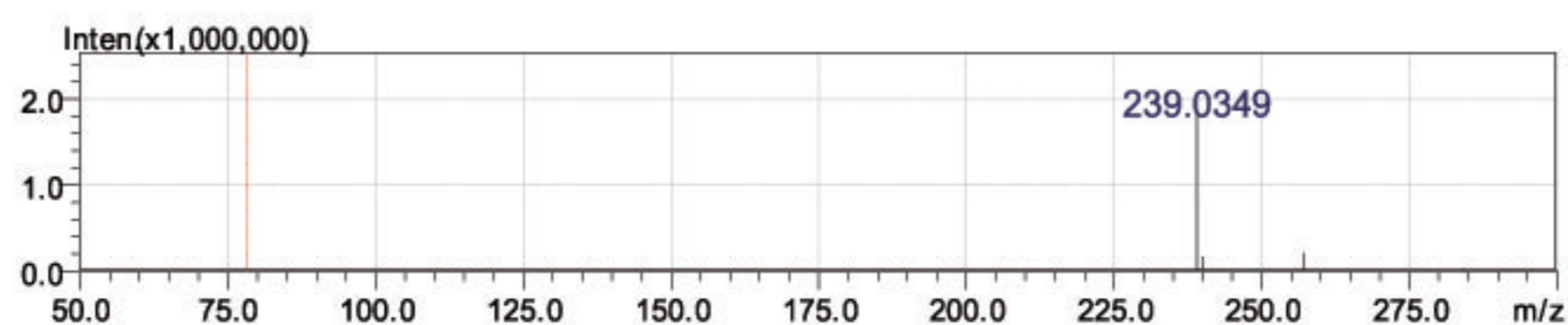
### 1.3 离子阱内分子离子反应条件的研究

在研究大黄酸裂解过程中发现，大黄酸MS<sup>2</sup>碎片离子生成了明显的加合物。改变质谱条件中的碰撞能量比例，即施加在端盖电极上的射频电压幅值，大黄酸中分子离子反应发生强度的变化情况。图7显示了在MS<sup>2</sup>级碰撞能量分别为10%、30%、40%、60%、200%和400%时得到的谱图。

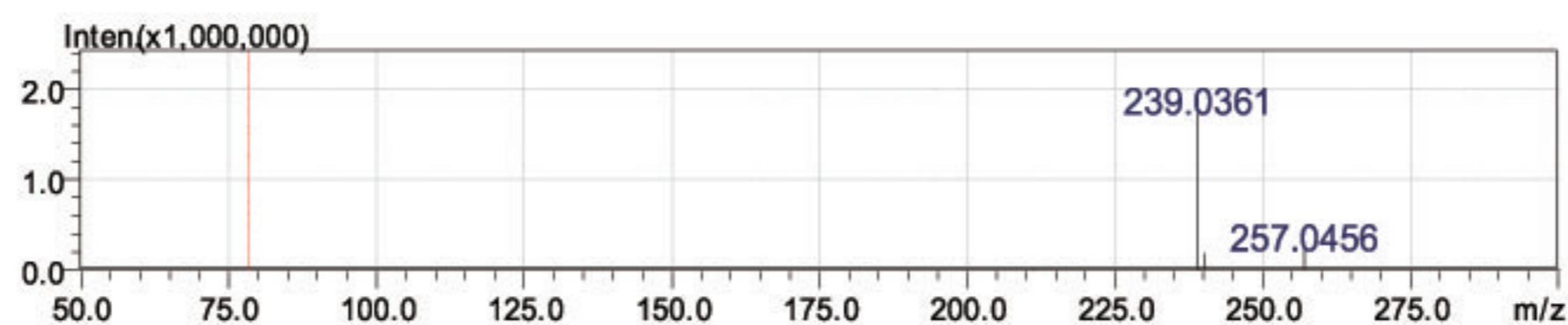
Energy: 10%



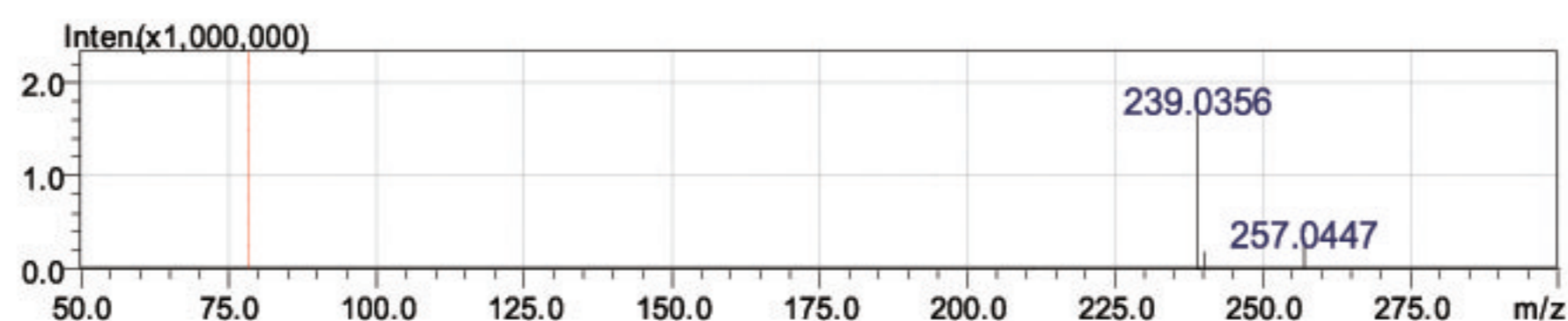
Energy: 30%



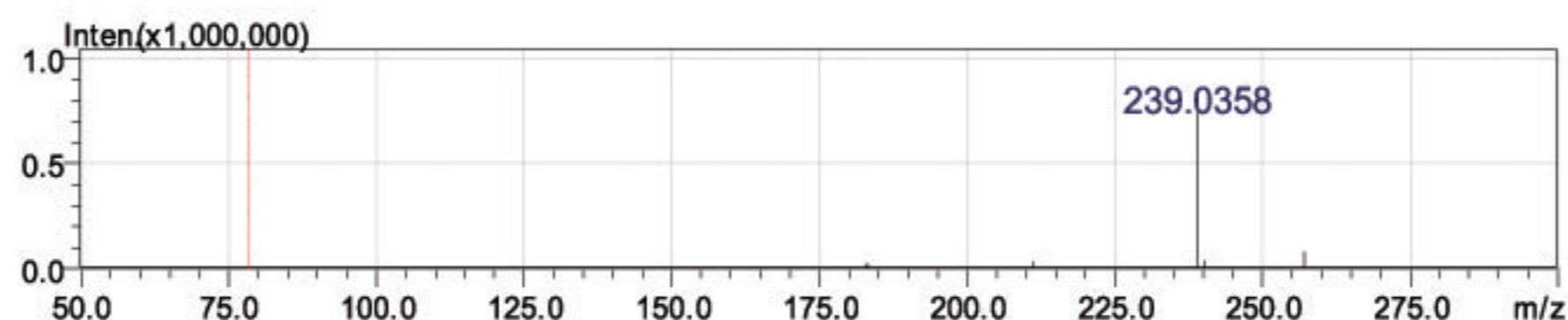
Energy: 40%



Energy: 60%



Energy: 200%



Energy: 400%

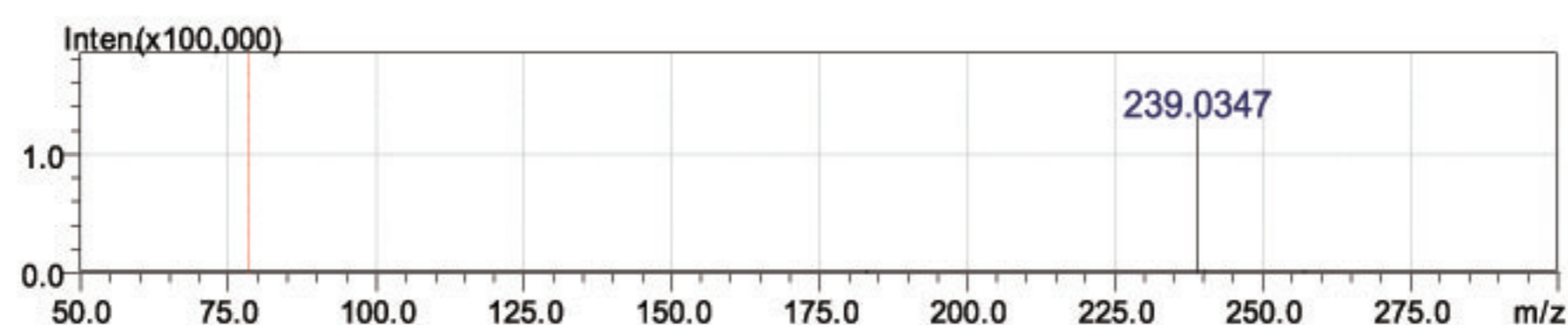
图7 不同碰撞能量得到的MS<sup>2</sup>级谱图

表1对上述变化进行总结,显示在不同碰撞能量下生成的加合物离子的绝对强度及相对强度。通过表1可知,m/z 257.0450离子在碰撞能量40–180%的范围内可稳定生成。

表1 加合物离子m/z 257.0450在相应碰撞能量下生成的绝对强度与相对强度

	<i>Energy</i> (%)	<i>Collision Gas</i> (%)	<i>m/z 257 Int.</i>	<i>Rel. Int.</i> (%)
1	10	50	0	0
2	20	50	极弱	0
3	30	50	极弱	0
4	40	50	106685	10.79
5	50	50	130635	11.66
6	60	50	114080	11.88
7	70	50	119557	11.94
8	80	50	108925	12.26
9	90	50	101115	12.34
10	110	50	85241	11.36
11	150	50	63499	10.61
12	180	50	46952	10.11
13	200	50	极弱	0
14	230	50	极弱	0
15	400	50	0	0

图8分别以碰撞能量及加合物离子相对强度为横、纵坐标得到曲线图，显示了生成加合物离子强度随碰撞能量变化的趋势。

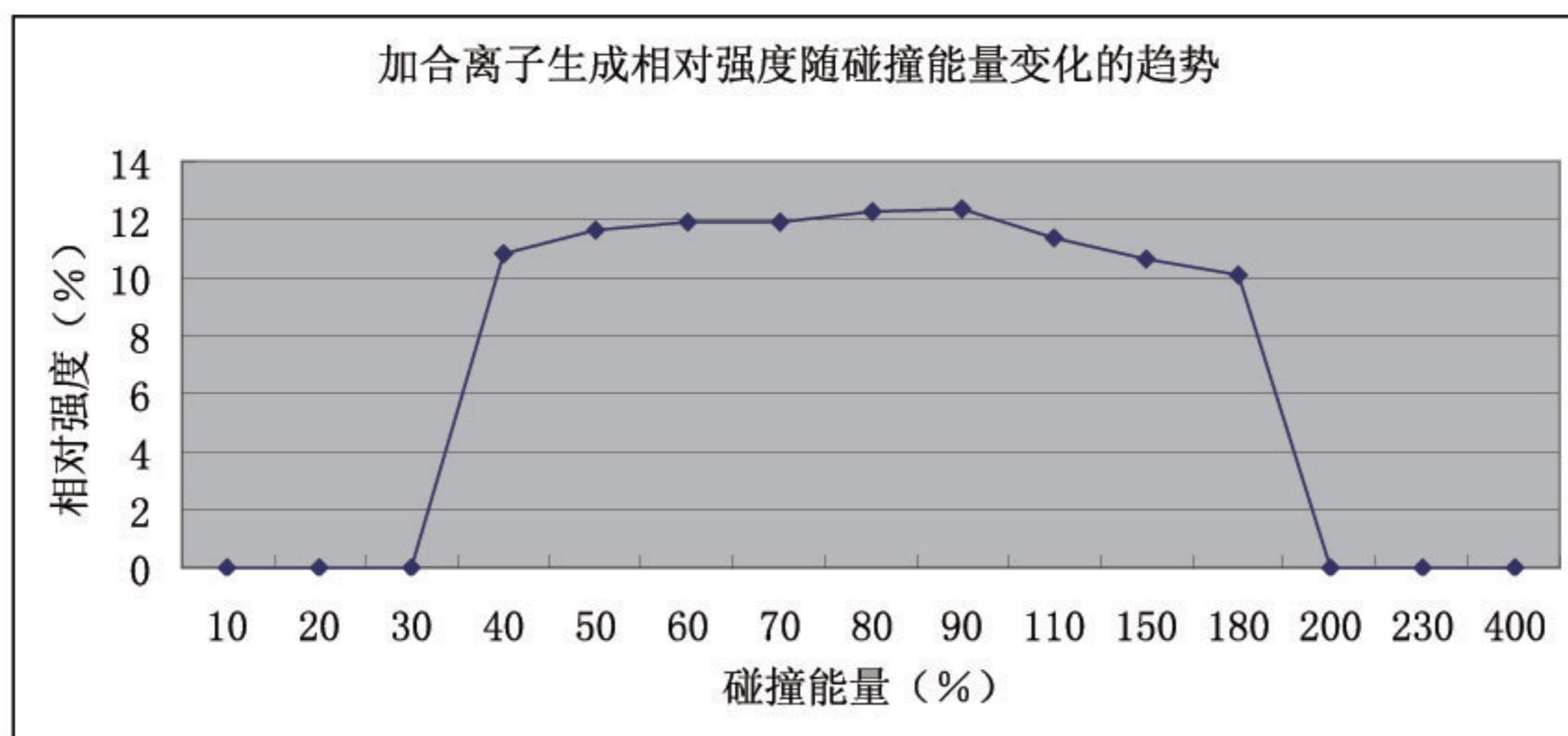


图8 加合离子生成相对强度随碰撞能量变化的趋势

## ■ 结论

在研究大黄酸在负离子模式下的裂解规律的过程中，发现其MS<sup>2</sup>级离子中存在加合产物，是由同一级的碎片离子与水分子反应生成的复合物。改变碰撞能量，研究此种特殊加合产物的生成效率随碰撞能量改变而发生变化的情况，发现其在一定的能量范围内可稳定生成。

本实验在研究大黄酸碎裂规律的基础上对离子阱内产生的特殊碎片进行分析：在离子阱内不仅会发生解离反应，同样也会发生加合反应，产生稳定的加合产物。对于此现象还需进行深入研究，阐明其发生的原因及影响因素等。