

· 论著 ·

高喜树碱衍生物 10-羟基-7-甲基-高喜树碱的电喷雾离子阱质谱分析

崔晓如¹, 关晓多¹, 缪震元², 张万年², 范国荣¹ (1. 第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海市药物代谢产物研究重点实验室; 2. 第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 应用电喷雾离子阱质谱对高喜树碱类衍生物 10-羟基-7-甲基-高喜树碱(TOP-01)进行质谱裂解分析,通过主要特征碎片离子研究其裂解规律。方法 样品溶液通过仪器自带的蠕动泵进样系统直接进样分析,采用离子阱质谱的多级离子碰撞裂解方式,寻找 TOP-01 的特征碎片离子。结果 TOP-01 在软电离模式下,主要产生的正离子碎片分别为 m/z 333、305、277、290 等,负离子碎片分别为 m/z 347、319、317、289、301 等。结论 TOP-01 在软电离模式下、正负离子模式下质谱裂解方式存在差异,其中主要产生的正负离子碎片分别为 333 和 347,本研究为高喜树碱及其衍生物的结构修饰及代谢研究等提供了参考依据。

[关键词] 高喜树碱衍生物; 10-羟基-7-甲基-高喜树碱; 电喷雾离子阱质谱; 结构解析

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)01-0024-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.01.007

Elucidation of 10-hydroxy-7-methyl-homocamptothecin by electrospray ion trap mass spectrometry

CUI Xiao-ru¹, GUAN Xiao-duo¹, MIAO Zhen-yuan², ZHANG Wan-nian², FAN Guo-rong¹ (1. Department of Pharmaceutical Analysis, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, School of Pharmacy, Second Military Medical University; 2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the fragments of 10-hydroxy-7-methyl-homocamptothecin (TOP-01) by electrospray ion trap mass spectrometry and deduce the MS/MS fragment pathway of it. **Methods** Samples were directly injected into the instrument and the fragments of the samples were yielded by using multi-stage ion trap mass spectrometry. **Results** Fragment ions m/z 333, 305, 277, 290 were generated at the positive ion mode and m/z 347, 319, 317, 289, 301 at the negative mode for TOP-01. **Conclusion** Differences existed in fragmentation pathway between positive and negative ESI-MS and the main fragmentation characteristics of TOP-01 were m/z 333 and 347 in positive and negative mode respectively. These results provided very important information for the structural modification and the drug metabolic research of homocamptothecin.

[Key words] homocamptothecin derivatives; 10-hydroxy-7-methyl-homocamptothecin; electrospray ion trap mass spectrometry; structure elucidation

喜树碱类(camptothecin, CPT)药物由于其独特的拓扑异构酶抑制作用,已成为近二十年来抗肿瘤药物研究的热点之一^[1]。目前,已经有3个CPT类衍生物伊立替康(inotecan, CPT211)、拓扑替康(topotecan, TPT)和羟基喜树碱(hydroxycamptothecin)分别在国内外上市,同时还有30多个CPT类衍生物正处在临床前或临床研究^[3]。但是,由于其严重的毒性反应,特别是出血性膀胱炎等^[2],使得喜树碱类化合物的应用受到限制。近年来,科学家们主要是通过对其母核的结构改造来寻求活性更

强、毒性更小的喜树碱类衍生物,其中高喜树碱类化合物,即将喜树碱类化合物E环的六元 α -羟基内酯环改造成七元的 β -羟基内酯环,显示出喜树碱类无法比拟的优越性,如体内代谢稳定性有了很大提高,同时细胞毒性也明显高于喜树碱类药物,种属差异变小,并且还出现了Topo I和Topo II双重抑制作用^[4]。目前,代表性化合物主要有二氟替康(diflomotecan, BN 80915)、依洛替康(elomotecan, BN 80927)和DB 90等,其中二氟替康和依洛替康已进入II期和I期临床研究^[5]。

10-羟基-7-甲基-高喜树碱是第二军医大学药学院药物化学教研室全合成的高喜树碱类衍生物之一,药理研究表明,该化合物具有明显的抗肿瘤活性。目前已经有一些关于高喜树碱及其衍生物体内

[作者简介] 崔晓如(1985-)女,硕士研究生。Tel: (021) 81871260。
[通讯作者] 范国荣。Tel: (021) 81871260, E-mail: Gourfan@yahoo.com.cn.

外代谢的研究报道^[6,7],但对于其质谱裂解规律尚未见报道。为了研究高喜树碱类化合物的结构特征及其裂解途径,笔者采用电喷雾离子阱质谱技术对 10-羟基-7-甲基-高喜树碱质谱裂解途径进行分析研究,找出主要的特征碎片离子及其质谱软电离裂解规律,为高喜树碱的结构修饰及该类化合物的代谢产物的寻找提供依据。

1 仪器与试剂

美国 Thermo Fisher 公司的 LCQ fleet 质谱仪,ESI 离子源,离子阱质量分析器,Xcalibur 数据处理软件。XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);HA-202M 电子天平(日本 A&D Company LTD.)。

10-羟基-7-甲基-高喜树碱原料药(批号:20100916 纯度 98.1%,由第二军医大学药物化学教研室提供);乙腈为德国 Merck 公司生产的色谱纯试剂;水为自制超纯去离子水(18.2 MΩ)。

2 实验方法

2.1 质谱条件 ①正离子模式:电喷雾电压 4.5 kV;鞘气流速为 35 arb;辅助气流速为 5 arb;毛细管温度 320 °C;毛细管电压 10 V;Tube lens 75 V;碰撞诱导解离能量 35 V。②负离子模式:电喷雾电压-4 kV;鞘气流速为 35 arb;辅助气流速为 5 arb;毛细管温度 320 °C;毛细管电压 -45 V;Tube lens -125 V;碰撞诱导解离能量 35 V。

2.2 样品溶液的配制 精密称量 10-羟基-7-甲基-高喜树碱原料药约 10 mg,分别置于 50 ml 量瓶中,用乙腈稀释定容至刻度,得标准储备液。精密量取适量,用乙腈逐级稀释至 1 μg/ml 的样品溶液待用。

3 结果

3.1 TOP-01 在正离子模式下的质谱解析 将 1 μg/ml 的 TOP-01 乙腈溶液直接注入质谱仪,质谱检测器调为正离子模式,获得其一级全扫描质谱图。从中可以观察到准分子离子峰 $[M+H]^+$ (m/z 393)。

在二级全扫描质谱图中,可以观察到 m/z 333 为最强离子峰,次之为 m/z 375,二个离子峰为准分子离子 $[M+H]^+$ (m/z 393) 失去一分子 H_2O 及进一步失去分子量为 42 的 CH_2CO 基团而生成的产物离子 $[M+H-18]^+$ 、 $[M+H-60]^+$ 。三级全扫描质谱显示二个主要离子峰 m/z 305、 m/z 277,其中 m/z 305 是 m/z 333 失去一分子 CO 而生成的产物离子。在四级全扫描质谱图中 m/z 277、 m/z 290 是三级离子碎片 m/z 305 分别失去一分子 $CH_2=CH_2$ 及分子量为 15 的 $[NH]$ 基团而生成的产物离子。由于三级

和四级质谱棒图中都有碎片离子峰 m/z 277,由此可推测三级碎片中的 m/z 277 可能是 m/z 333 同时失去一分子 CO 和 $CH_2=CH_2$ 的产物。其中正离子模式下质谱裂解棒图见图 1,化合物裂解碎片结构见图 2,裂解碎片结构树见图 3。

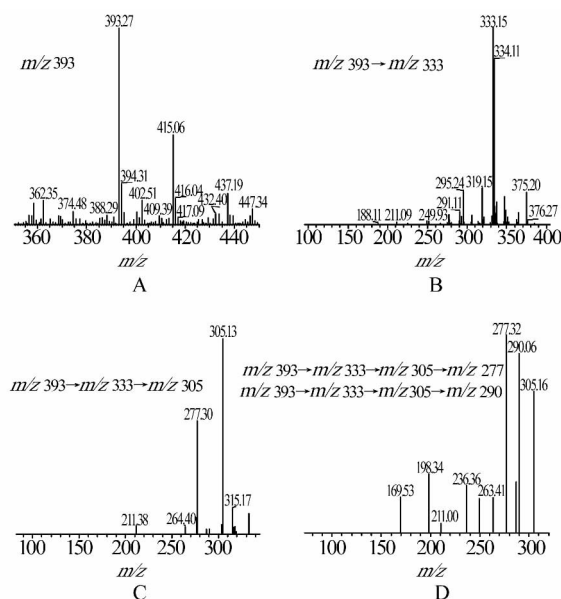


图 1 正离子模式下质谱裂解棒图

A- m/z 393 正离子的一级质谱图;
B- m/z 393→ m/z 333 正离子的二级质谱图;
C- m/z 393→ m/z 305 正离子的三级质谱图;
D- m/z 393→ m/z 277; m/z 393→ m/z 290 正离子的四级质谱图

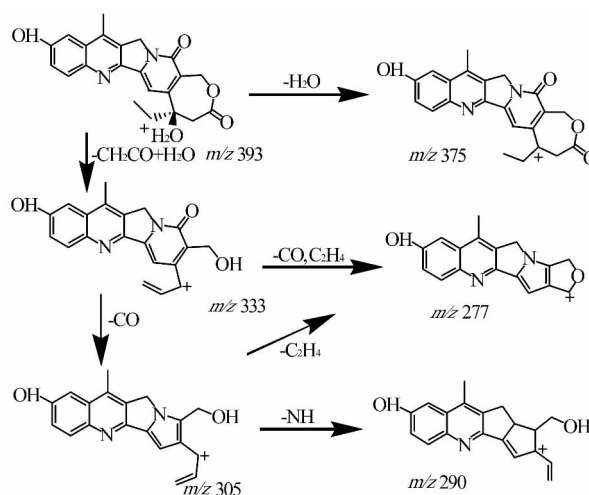


图 2 TOP-01 正离子模式下的裂解途径

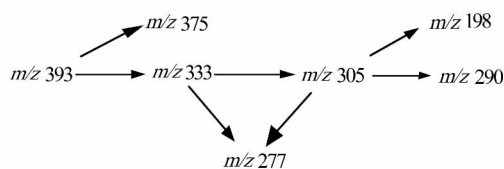


图 3 m/z 393 正离子模式下的裂解碎片结构树

3.2 TOP-01 在负离子模式下的质谱解析 将 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 TOP-01 乙腈溶液直接注入质谱仪, 质谱检测器调为负离子模式, 获得其一级全扫描质谱图。从中可以观察到准分子离子峰 $[\text{M-H}]^-$ (m/z 391)。

在二级全扫描质谱图中, 可以观察到 m/z 347 为最强离子峰, 此离子峰为准分子离子 $[\text{M-H}]^-$ (m/z 391) 失去一分子 CO_2 生成的产物离子 $[\text{M-H}-$

$44]^-$ 。三级全扫描质谱图中, m/z 319 和 m/z 317 是二级碎片分别失去一分子 CO 和 C_2H_6 生成的产物离子。四级全扫描质谱图中, m/z 289、 m/z 301 是三级离子碎片 m/z 319、317 分别失去一分子的 C_2H_6 和一个 $[\text{O}]$ 而生成的产物离子。其中负离子模式下质谱裂解棒图见图 4, 化合物裂解碎片结构见图 5, 裂解碎片结构树见图 6。

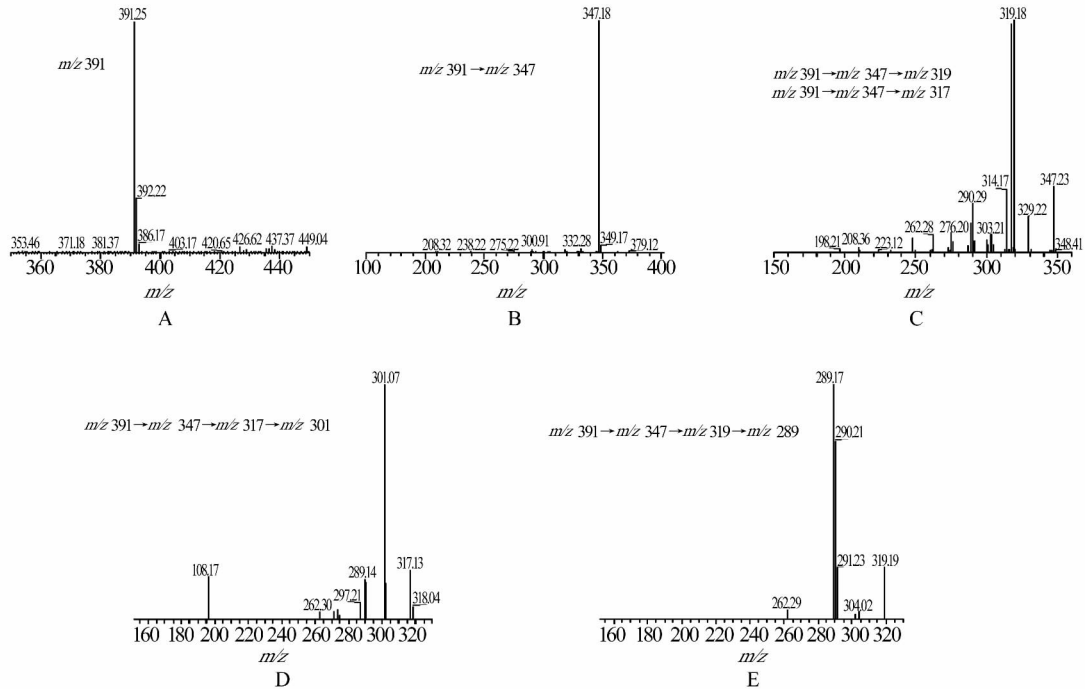


图 4 负离子模式下质谱裂解棒图

A- m/z 391 负离子的一级质谱图; B- m/z 391 \rightarrow m/z 347 负离子的二级质谱图; C- m/z 391 \rightarrow m/z 319、 m/z 391 \rightarrow m/z 317 负离子的三级质谱图; D- m/z 391 \rightarrow m/z 301 负离子的四级质谱图; E- m/z 391 \rightarrow m/z 289 负离子的四级质谱图

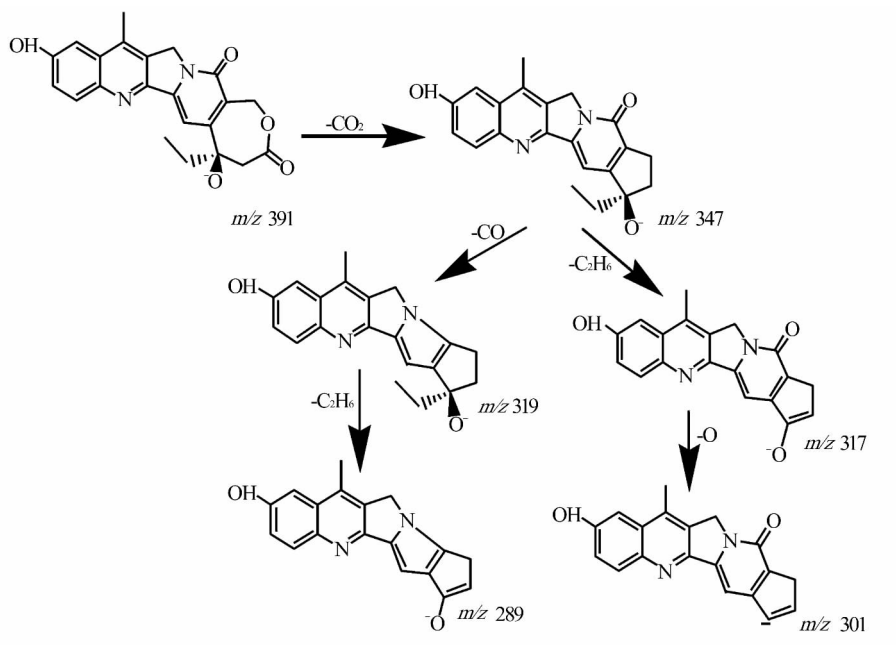


图 5 TOP-01 负离子模式下的离子阱质谱棒图

的影响。将提取液 pH 值分别调为 11 和 1, 超声处理 30 min, 用乙酸乙酯提取, 结果显示 pH 为 11 时杂质斑点比较少, 故选择用氨试液调节 pH 为 11, 超声 30 min, 再用乙酸乙酯萃取。

3.3 含量测定中供试品溶液制备方法的选择 分别比较了 50% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、乙醇溶剂对绿原酸及表儿茶素的提取效果, 结果发现 50% 乙醇提取效果最好。用 50% 乙醇超声 30、45、60 min, 结果显示超声处理 45 min 时已提取完全, 故选择用 50% 乙醇超声处理 45 min 作为样品的提取溶剂。

3.4 含量测定中流动相的选择 分别用: ① 甲醇-乙腈-0.5% 冰醋酸 (5:6:89); ② 甲醇-乙腈-0.25% 冰醋酸 (5:6:89); ③ 甲醇-乙腈-0.15% 冰醋酸 (5:6:89); ④ 甲醇-乙腈-0.10% 冰醋酸 (5:6:89); ⑤ 甲醇-乙腈-0.15% 冰醋酸 (7:6:87) 为流动相, 考察绿原酸、表儿茶素峰型及分离度试验, 结果发现 ①②③④ 对绿原酸峰型没有太大影响, ①②

表儿茶素出峰拖尾, ④ 表儿茶素峰前延, 最终选用 ⑤ 甲醇-乙腈-0.15% 冰醋酸 (7:6:87) 作为液相色谱的流动相。

3.5 检测波长的选择 经紫外扫描发现, 绿原酸在 264 nm 及 327 nm 波长处都有吸收峰, 最大吸收波长为 327 nm; 表儿茶素的最大吸收波长为 278 nm, 但表儿茶素在 327 nm 波长处没有吸收, 故选择 278 nm 作为绿原酸及表儿茶素的共同检测波长。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版. 二部 [S]. 2010: 901.
- [2] 李 珏, 贾 飞, 吴永江. 高效液相色谱法测定盐酸罗格列酮片的含量及有关物质 [J]. 药实践杂志, 2012, 30(1): 49.
- [3] 张 蜀, 邓 红, 林华庆, 等. 青荔颗粒的制备及质量标准的初步研究 [J]. 广东药学院报, 2010, 26(3): 252.

[收稿日期] 2012-06-25

[修回日期] 2012-09-28

(上接第 26 页)

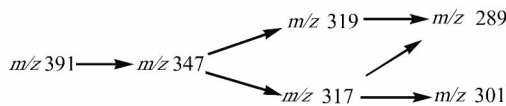


图 6 m/z 391 负离子模式下的裂解碎片结构树

4 讨论

利用电喷雾离子阱质谱, 根据软电离模式下能产生多级离子碎片的特点, 可以推测高喜树碱类衍生物母核裂解方式和碎片离子结构。高喜树碱类衍生物中, 七元内酯环、共轭的吡啶环结构及 20 位的乙基等容易发生断裂, 产生一系列碎片离子。其中正负离子模式下产生的碎片还存在一定的差异, 部分裂解规律和喜树碱类的相似^[8]。

正离子模式下, 七元内酯环中的羰基和其相连的亚甲基容易一起丢失, 20 位的羟基也易以水的形式丢失; C、D 环中的内酰胺结构容易分别失去 CO、[NH] 等碎片离子; 20 位的乙基不能像喜树碱类一样和临位的羰基发生麦氏重排, 而是直接丢失后使 20 位 C 和内酯环开裂形成的游离羟基成五元杂环。

负离子模式下, 内酯环中羰基和相邻的 O 容易以 CO₂ 的形式一起丢失; C、D 环中的内酰胺结构容易失去一分子的 CO 碎片离子; 20 位的乙基则是以 C₂H₄ 或者 C₂H₆ 的形式断裂丢失。

总之, 本研究采用电喷雾离子阱裂解方式对高喜树碱类化合物母核的质谱裂解方式做了初步的分析, 为高喜树碱及其衍生物的结构修饰与代谢研究提供了非常有用的信息。

【参考文献】

- [1] Hsiang YH, Hertzber R, Hecht S, et al. Camptothecin induced protein-linked DNA breaks vis mammalian DNA topoisomerase I [J]. J Biol Chem, 1985, 260: 14837.
- [2] Ganguly A, Das BB, Sen N, Leishman' topoisomerase I: an ideal chimera for unraveling the role of the small subunit of unusual bisubunit topoisomerase I from Leishmania donovani [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6286.
- [3] 谭慧心. 拓扑异构酶抑制剂研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 436.
- [4] 杨 松, 张万年. 高喜树碱——极具开发价值的拓扑异构酶抑制剂 [J]. 药学报, 2004, 39(5): 396.
- [5] 缪震元, 张万年, 游 亮, 等. 7-芳杂环高喜树碱的合成与抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(2): 105.
- [6] Yeh TK, Li CM, Chen CP, et al. Antitumor activities and pharmacokinetics of silatecans DB-67 and DB-91 [J]. Pharmacol Res, 2010, 61: 108.
- [7] Lavergne O, Harnett J, Rolland A, et al. BN 80927: a novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1999, 9: 2599.
- [8] 李 柯, 钟大放. 电喷雾离子阱质谱分析喜树碱及其衍生物 [J]. 质谱学报, 2003, 24(增刊): 37.

[收稿日期] 2011-04-09

[修回日期] 2012-06-30