

西地那非衍生物的电喷雾离子阱质谱研究

邢杰, 孙璐, 钟大放

(沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 辽宁, 沈阳 110016)

摘要: 采用电喷雾离子阱质谱法对 4 种西地那非衍生物进行了质谱研究, 获得了它们的结构碎片信息, 通过比较它们的异同对其质谱裂解途径进行解析, 发现它们的 (+)ESI-MS² 质谱生成磺酰基 S-C 键和 S-N 键断裂、亚甲氧基 C-O 键断裂以及磺酰基重排后 C-S 键断裂的碎片, 基峰为亚甲氧基 C-O 键断裂产生, 其 (+)ESI-MS³ 质谱生成脱 NH₃、脱 CO、脱 NH=C=O 以及异环开裂碎片, 这些特征可用于阐明西地那非衍生物及其结构类似物的结构。

关键词: 西地那非衍生物; 电喷雾离子阱质谱; 裂解途径

中图分类号: O623.54; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2002)01-0001-06

西地那非(sildenafil, 商品名 Viagra)为吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮类化合物, 是由美国 Pfizer 公司研制开发, 1998 年 3 月于美国上市, 临床用于治疗性功能障碍。关于采用电喷雾质谱作为检测手段研究西地那非在体内的代谢, 已有文献^[1]报道, 但对其质谱碎片特征并无充分的解析。本实验的 4 种化合物为西地那非衍生物(sildenafil derivative, SD)是首次合成, 其药理活性尚在考察中。这类化合物分子结构中含有的官能团有磺酰基, 吡唑并嘧啶环、派嗪环以及嘧啶环与苯环之间的亚甲氧基, 4 种化合物的结构及分子量如图 1 和表 1 所示。本文分析和讨论了它们的质谱断裂机制, 并对其碎片进行了较为详细的解析, 其结果将有助于阐明对西地那非衍生物及其结构类似物的结构。

1 实验部分

1.1 药品与试剂

西地那非衍生物由沈阳药科大学药物合成教研室宫平教授提供, 结构已经过 IR, UV, NMR 和 MS 确证; 甲醇为色谱纯, 水为二次重

蒸馏水。实验时取样品适量, 用甲醇-水(50:50)配制成浓度约为 10 μmol/L 的待测溶液。

1.2 仪器与 ESI-MSⁿ 分析条件

美国 Finnigan 公司 LCQ 液相色谱-质谱联用仪, 包括电喷雾离子化源(ESI)以及 LCQ 1.0 数据处理系统, 并配有直接进样用注射泵和 250 μL 进样器, 具有软电离和多级离子阱质谱功能; Highchem 公司 Mass Frontier 2.0 质谱解析软件。

正离子检测: 离子源喷射电压: 4.50 kV; 毛细管温度: 180 °C; 毛细管电压: 6.25 V; 鞘气: 氮气, 流速: 0.75 L/min; 辅助气: 氮气, 流速: 0.15 L/min; 碰撞气: 氮气; 检测方式 LC/MSⁿ (n=1~3) 全扫描质谱; 注射泵直接进样; 溶液流速: 10 μL/min。

2 结果与讨论

2.1 西地那非衍生物的质谱行为分析

采用电喷雾离子化方式对 SD1~4 四种西地那非衍生物进行质谱分析, 结果表明, 正离子检测方式下可以得到较强的准分子离子[M+

收稿日期: 2002-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号 39930180)

作者简介: 邢杰(1978~), 女(汉族), 山东滨州人, 硕士, 药物分析专业

$H]^+$ 峰,而负离子检测方式下则没有检测到准分子离子 $[M-H]^-$,这与化合物本身的性质有直接联系。这类化合物结构中的吡唑环和哌嗪环含有碱性氮原子,在正离子检测方式下易与 H^+ 结合,形成准分子离子 $[M+H]^+$,从而被检测。采用正离子检测方式对4种西地那非衍生物进行电喷雾质谱检测时,除了准分子离子 $[M+H]^+$ 外,同时还检测到它们各自的聚合离子 $[2M+Na]^+$,如图2所示。据文献报道^[2],聚合离子的

产生与被分析物的浓度有关,这一离子在确证化合物的分子量方面是一个有利的信号离子。本实验中,这个聚合离子的丰度相对较强,为了使准分子离子信号增强,实验中给予一个比较强的源内碰撞诱导解离电压(sid)30 V时,聚合离子消失,同时准分子离子 $[M+H]^+$ 峰强度增加,往往在对此类化合物进行定量分析时,需对这类聚合离子进行考察。

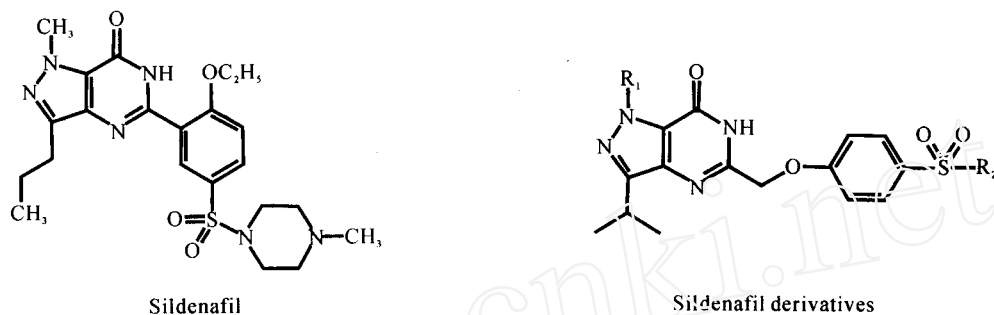


图 1 西地那非及其衍生物的结构

Fig. 1 The Structure of the Sildenafil and Sildenafil derivatives

表 1 西地那非的分子量

Table. 1 The molecular masses of the SDS

No.	R ₁	R ₂	分子式	分子量
1	-CH ₃		C ₂₀ H ₂₆ N ₆ O ₄ S	446
2	-C ₂ H ₅	-NH ₂	C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O ₄ S	391
3	-C ₂ H ₅		C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	474
4	-C ₂ H ₅		C ₁₉ H ₂₄ N ₆ O ₄ S	460

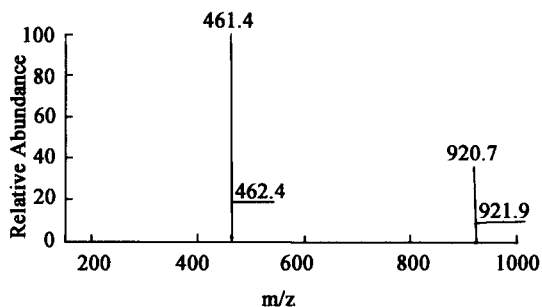


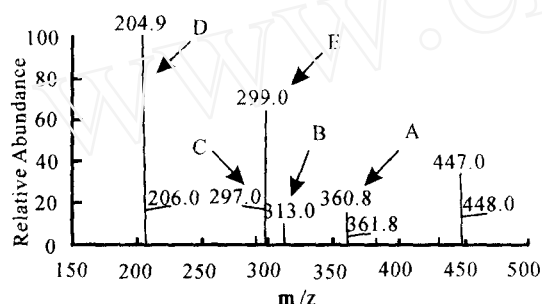
图 2 SD-4 ESI-MS 谱图

Fig. 2 ESI-MS of SD-4

采用电喷雾离子阱技术对化合物进行多级质谱分析可以获得结构方面的许多信息,本实验对4种西地那非类化合物分别进行了ESI-MSⁿ (n=1~3)质谱分析,对4种西地那非衍生物的结构以及碎片离子进行比较,在实验中发现,它们在裂解过程中主要经历了四条裂解途径,产生A、B、C和D四类离子,如图3所示(以SD-1为例),4种SD化合物产生的多级质谱碎片信息总结在表2中。

表 2 西地那非衍生物的 ESI-MSⁿ(n=1~3)信息
Table 2 ESI-MSⁿ(n=1~3) of Sildenafil derivatives

Compound	M. W.	MS		MS ²	MS ³ of fragment D
		[M+H] ⁺	(m/z)	(m/z, %relative abundance)	
SD-1	446	447		361(19), 313(10),	196(44), 188(66), 177(90), 164(100), 162(32)
				299(66), 297(30), 205(100)	
SD-2	391	392		375(60), 327(20),	210(30), 202(76), 191(90), 178(100), 176(36)
				311(10), 219(100)	
SD-3	474	475		375(20), 327(20),	210(30), 202(76), 191(90), 178(100), 176(42)
				311(15), 219(100)	
SD-4	460	461		375(17), 327(10),	210(32), 202(50), 191(90), 178(100), 176(40)
				313(50), 311(20), 219(100)	

图 3 SD-1 ESI-MS² 谱图Fig. 3 ESI-MS² of SD-1

质谱解析软件推测, A 离子可由磺酰基 S-N 键发生异裂(i 裂解)产生。实验结果表明, SD-1 和 SD-4 产生的 A 离子质荷比分别为 m/z 361 和 m/z 375, 相差 14 u, 与它们分子量的差值相同, 说明脱去的碎片为它们结构中相同的部分; 而 SD-2、3 和 4 产生的 A 离子的质荷比相同 (m/z 375), 说明脱去的碎片为它们结构中不同的部分, 再根据脱去碎片的质量数, 推测出发生断裂的键为磺酰基 S-N 键, 证明软件给出的此裂解途径确实存在。途径 A 的断裂部位与文献报道中的西地那非^[1]的位点相同, 裂解机制属于 S-N 键电荷诱导消除, 四种化合物的 A 离子丰度表明, SD-2 A 离子的丰度比其它化合物高很多, 在结构的特点上是因为 SD-2 的 R₂ 基团为 NH₂, 体积与哌嗪基相比小得多, 比较容易脱去。裂解机制推测见裂解途径 1 的途径 A。

在二级碎片中存在一个丰度约 10% 的 B 碎片离子, 这些离子有时可以给出很有价值的质谱裂解信息, 尽管丰度很低。SD-1 和 SD-4 产生的 B 离子质荷比分别为 m/z 313 和 m/z 327, 相差 14 u, 与它们分子量的差值相同, 说明脱去的碎片为它们结构中相同的部分; 而 SD-2、3 和 4 产生 m/z 327 相同碎片, 说明脱去的碎片为它们结构中不同的部分, 这些信息与推测 A 离子产生的过程相似, 极有可能 B 离子是在 A 离子的基础上进一步断裂生成的, 与 A 离子的质量数相比, 差值为 48, 再根据脱去碎片的质量数, 推测途径 B 为化合物分子结构中断裂磺酰基 S-N 键后再脱去 SO, 脱去 SO 的机制, 文献[3]中曾有报道, 首先磺酰基上的一个氧重排到苯环的邻位, 此时 S 原子带一对孤对电子, 而后苯环 C-S 之间的键断裂。裂解机制推测见裂解途径 1 的途径 B。

采用质谱解析软件对 C 离子进行分析, 推测质谱断裂的位点为磺酰基 S-C 键, 与 A 离子相同, 属于异裂(即 i 裂解)。SD-1 和 SD-4 产生的 C 离子质荷比分别为 m/z 297 和 m/z 311, 相差 14 u, 与它们分子量的差值相同, 说明脱去的碎片为它们结构中相同的部分; 而 SD-2、3 和 4 产生 m/z 311 相同碎片, 说明脱去的碎片为它们结构中不同的部分, 再根据脱去碎片的质量数, 推测出断裂的键为磺酰基 S-C 键。途径 C 的断裂部位与文献报道中的西地那非^[1]相同, 裂解机

制属于磺酰基 S-C 键的电荷诱导消除。具体裂解机制推测见裂解途径 1 的途径 C。

SD-1 和 SD-4 产生的 D 离子质荷比分别为 m/z 205 和 m/z 219, 相差 14 u, 与它们分子量的差值相同, 说明脱去的碎片为它们结构中相同的部分; 而 SD-2、3 和 4 产生 m/z 219 相同碎片, 说明脱去的碎片为它们结构中不同的部分; 再根据脱去碎片的质量数, 推测出断裂的键为亚甲氧基 C-O 键。裂解机制见裂解途径 1 的途径 D。

4 种西地那非衍生物二级碎片离子的丰度值表明, 这类化合物最易产生的碎片离子是离子 D。为了获得这类西地那非衍生物详细的碎片离子信息和特征断裂规律, 对碎片 D 进行三级质谱分析。共产生五个主要的碎片离子: -41 u (a), -28 u (b), -43 u (c), -17 u (d) 和 -9 u (e), 其质谱图见图 4。由于 a 离子脱去的碎片离子的质量数为奇数, 根据氮律, 若碎片为中性分子, 碎片中一定含有奇数个氮原子, 若碎片为自由基, 碎片中或者不含氮原子或者含有偶数个氮原子, a 离子为失去 41 个质量数得到, 碎片不可能含有偶数个氮原子, 若不含氮原子, 分子中没有可以产生脱去 41 u 碎片的自由基, 所以 41 u 为一中性分子, 且含有 1 个氮原子, 推测是由于异环开裂产生, 吡唑并嘧啶环发生 RDA (Retro Diels-Alder) 反应^[4], 此反应涉及到一系列 H 的重排反应^[5]。a 离子的丰度在三级碎片离子中较高, 说明 SD 类化合物易发生异环开裂, 所形成的碎片共轭性很高, 使得离子的稳定性增加, 从而使 a 离子的丰度增强。由于 SD-1 的三级质谱中 b 离子为脱去 28 u 产生, SD-1 的丰度与 SD-2、3 和 4 相似, 说明 b 离子为脱去一分子 CO 产生。c 离子结构的推测与 a 离子相似, 为脱去 $\text{NH}=\text{C}=\text{O}$ 产生, 形成一个四元环共轭结构。d 离子为脱去 17 u 形成, 即脱去一分子 NH_3 产生。a~d 离子产生的机制见裂解途径 2。四种化合物均产生 -9 u 的 e 离子, 实际是 a 离子产生的加合离子 $[\text{a}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$, 用乙腈溶解样品后再进行实验, 此离子消失, 说明推测正确。

对 SD-1 和 4 进行 ESI-MS² 分析时, 发现 SD-1 和 4 均产生一个丰度中等的脱去 148 u 碎片离子, 见图 5, 设为途径 E, 与 C 离子相比 (脱去 146 u), E 离子多 2 个单位质量数。推测为磺酰基 S-C 键断裂同时 1 个氢发生转移产生。而

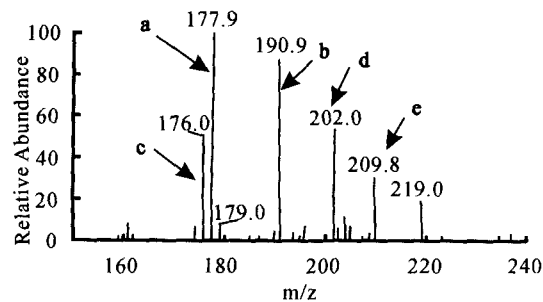


图 4 SD-4 碎片 DESI-MS 谱图

Fig. 4 ESI-MS³ of fragment D of SD-4

SD-2 和 3 没有此途径, 可能与哌嗪环 N 原子上游离质子有关。对离子 E 进行三级全扫描质谱分析, 得到一个碎片离子为离子 D, 这一信息可以辅助解释 E 离子的产生机制, 裂解途径见裂解途径 1 的途径 E。

2.2 西地那非衍生物的质谱行为的特征

通过比较 4 种西地那非衍生物各级碎片离子的关系, 发现在正离子检测方式下, 它们的质谱断裂方式存在共性, 即 MS² 质谱都生成磺酰基 S-N 键断裂、磺酰基 S-C 键断裂、亚甲氧基 C-O 键断裂以及磺酰基重排后 C-S 键断裂碎片, 裂解机制同属于以电荷为中心诱发的裂解 (异裂)。质谱裂解产生的特征二级碎片离子为亚甲氧基 C-O 键断裂所产生, 其 MS³ 质谱主要生成脱嘧啶环 CO, 脱 NH_3 , 脱 $\text{NH}=\text{C}=\text{O}$ 以及 RDA 重排碎片, 这些碎片离子均为相对比较稳定的共轭体系, 使离子的稳定性增加, 从而使离子的丰度增强。这些结果显示了西地那非及其结构类似物的质谱特征, 从而有助于这类化合物及其结构类似物结构的阐明。

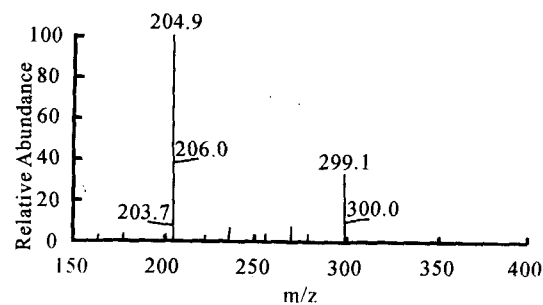
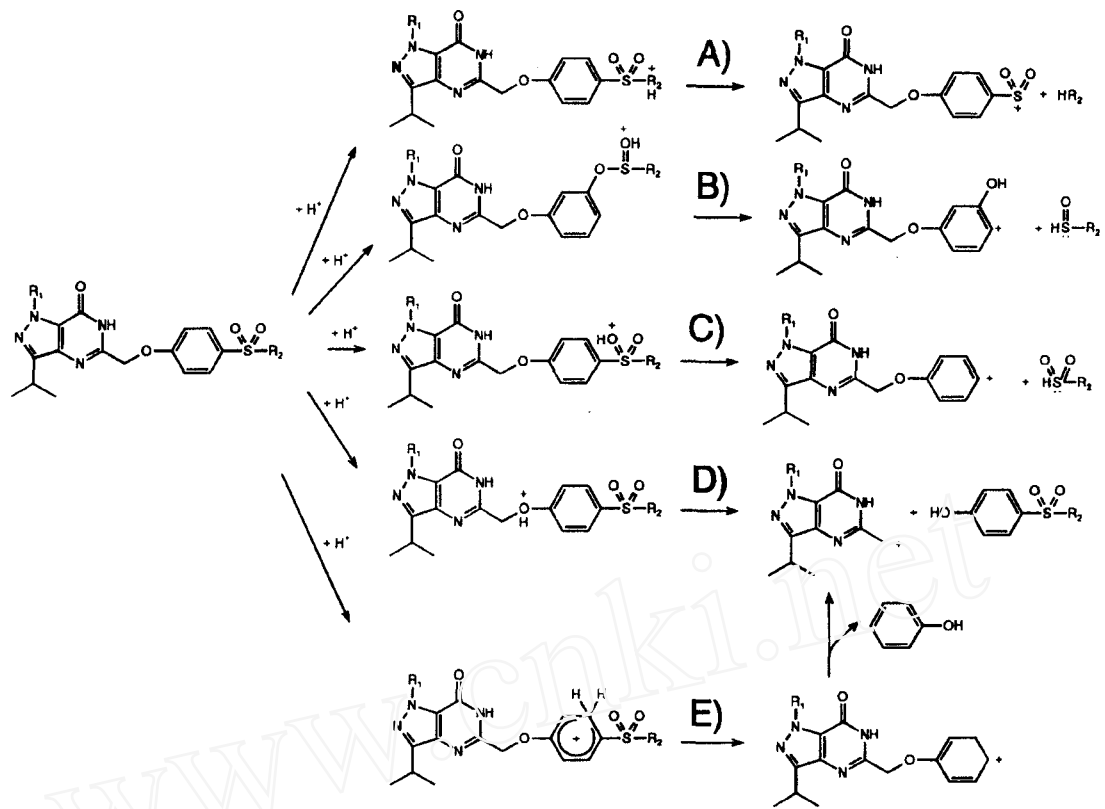


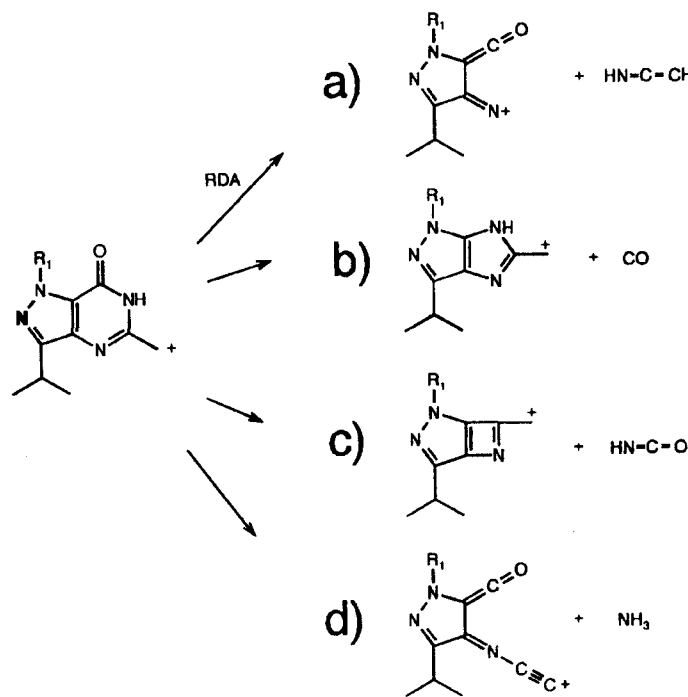
图 5 SD-1 碎片 E 的 ESI-MS³ 谱图

Fig. 5 ESI-MS³ of fragment E of SD-1



裂解途径 1 —— 碎片 A、B、C、D、E 的裂解机制及碎片 E 的 MS³ 行为解析

Scheme 1 Proposed generation of fragment A, B, C, D, E and explanation of the subsequent MS³ behavior of fragment E



裂解途径 2 碎片 D 的 MS³ 行为解析

Scheme 2 Explanation of the subsequent MS³ behavior of fragment D

参考文献:

- [1] Weinmann W, Lehmann N, Muller C, et al. Identification of Lorazepam and Sildenafil as Examples for the Application of LC/ion-spray-MS and MS-MS With Mass Spectra Library Searching in Forensic Toxicology [J]. *Foren Sci Int*, 2000, 113:339~344.
- [2] Kamel AM, Brown PR, Munson B. Effects of Mobile-phase Additives, Solution pH, Ionization Constant, and Analyte Concentration on the Sensitivities and Electrospray Ionization Mass Spectra of Nucleoside Antiviral Agents [J]. *Anal Chem*, 1999, 71:5481~5492.
- [3] Cocetta K, Ruesch V. Molecular Ion Rearrangements of Benzenesulfonylhydrazides [J]. *J Mass Spectrom.*, 1979, 14:293~298.
- [4] Martin N, Martine-Alvarez R, Seoane C, et al. An Overview of the Retro-Diels-Alder Reaction in Semiunsaturated Heterocyclic Rings: Mass Spectra of New Substituted 1, 4, 5, 6, 7, 8-hexahydroquinolines and Their Oxo-analogues 5,6,7,8-tetrahydro-4Hchromenes [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2001, 15:20~24.
- [5] Shizuko Eguchi. Hydrogen Transfer in the Retro Diels-Alder Fragmentation of Oxygen-containing Heterocyclic Compounds [J]. *J Mass Spectrom.*, 1979, 14:345~349.

Studies on the Electrospray Ion Trap Mass Spectra of Sildenafil Derivatives

XING Jie, SUN Lu, ZHONG Da-fang

(Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: To investigate the characteristics of mass spectra of four sildenafil derivatives, their fragments were analyzed using electrospray ion trap mass spectrometry in a multi-stage MS full scan mode performed on a Finnigan LCQ instrument. The mass spectrometry were operated in the positive mode. The mass spectra were obtained mainly by analyzing the fragments of the four compounds. The full scan MS² spectra of each compound gave characteristic fragment ions formed through cleavage of the S-N, S-C, C-O bond between the pyrimidine ring and the aromatic ring, the cleavage of the C-S bond after the arrangement of sulfonyl group, respectively. The base peak of the MS² spectra was formed through the C-O cleavage. The full scan MS³ spectra gave characteristic fragment ions obtained after elimination of carbon monoxide, ammonia, acidamide and undergoing the retro-Diels-Alder reaction in pyrazole-pyrimiding rings, respectively. These characteristics can be used for future structure elucidation in studies of analogues of sildenafil.

Key word: sildenafil derivative; electrospray ion trap mass spectrometry; fragmentation