

6 种他汀类药物的电喷雾离子阱质谱分析

王 杨, 高丽英, 吴艳平, 孙 璐

(沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:采用电喷雾离子阱多级质谱技术对 6 种他汀类药物进行系统研究,总结了该类化合物的电喷雾质谱断裂规律。根据主要药效基团存在形式的不同,分两类解析。第一类:辛伐他汀和洛伐他汀在正离子模式下发生 β, δ -二羟基戊内酯开环断裂,生成中性丢失 H_2O 、 CO 、 CH_3COOH 的碎片离子;第二类:普伐他汀和阿托伐他汀在负离子模式下产生脱去 104 u(3-羟基-1,4-丁内酯和 H_2)和 160 u(3,5-二羟基-1,7-庚内酯)的碎片离子;氟伐他汀和瑞舒伐他汀在负离子模式下产生脱去 62 u (CO_2 和 H_2O)的碎片离子,对该二级碎片离子进行三级全扫描质谱分析,产生脱去 42 u($CH_2=C=O$)和 96 u(环己烯-3-酮)的碎片离子。这些质谱特征有助于他汀类药物的结构分析和鉴定。

关键词:他汀类药物;多级质谱分析;断裂规律

中图分类号:O 657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2010)06-0368-08

Analysis of Six Statins by Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry

WANG Yang, GAO Li-ying, WU Yan-ping, SUN Lu

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: To investigate the fragmentation mechanism of statins, six statins were studied by electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-MSⁿ). Based on the forms of the main pharmacophore, the samples were analyzed into two groups. The first group, including simvastatin and lovastatin, which were detected in positive ion mode. It is indicated that most fragments are produced after neutral loss processes such as elimination of 18 u (H_2O), 28 u (CO) and 60 u (CH_3COOH) following the ring opening of the lactone. The second group including pravastatin, atorvastatin, fluvastatin and rosuvastatin were investigated in negative ion mode. It is observed that the main fragments are derived from neutral losses of 104 u (3-hydroxy-1,4-butyrolactone and H_2) and 160 u (3,5-dihydroxy-1,7-heptalactone) of pravastatin and atorvastatin. While losses of 62 u (CO_2 and H_2O) of fluvastatin and rosuvastatin are detected. And further losses of 42 u ($CH_2=C=O$) and 96 u (cyclohexen-3-one) are observed in MS³. These characteristics can be used for future structural analysis and identification in studies of statins and analogue compounds.

Key words: statins; multi-stage mass spectrometry analysis; fragmentation rules

收稿日期:2009-12-27;修回日期:2010-02-04

作者简介:王 杨(1984~),女(满族),内蒙古人,硕士研究生,分析化学专业。E-mail: jerrismile@163.com

通信作者:孙 璐(1974~),女(汉族),辽宁人,博士,副教授,从事药物代谢和药物动力学研究。E-mail: lisunlu@126.com

他汀类降脂药为细胞内胆固醇合成限速酶,即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,是目前临床上应用最广泛的一类降脂药物,常用的有辛伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、阿托伐他汀和氟伐他汀。瑞舒伐他汀是 2002 年在欧洲获得上市批准的最新他汀类药物,临床研究表明,瑞舒伐他汀为最强效的降脂药物。他汀类药物的结构由两部分组成:一部分为脱氢萜环和芳杂环等疏水性刚性平面结构;另一部分为由乙基或乙烯基相连的 β, δ -二羟基戊酸(内酯)结构,其中 β, δ -二羟基戊酸是发挥活性的必需基团,根据存在形式分为两类,第一类为以非活性内酯环形式存在的前体药物,它们在体内代谢成相应的 β, δ -二羟基戊酸代谢物才能发挥药理活性,包括辛伐他汀和洛伐他汀;第二类为直接以具有活性的开放酸盐形式存在的药物,包括普伐他汀、阿托伐他汀、氟伐他汀和瑞舒伐他汀等^[1-4]。

电喷雾离子阱质谱法在化合物结构分析方面有着广泛的应用。已有文献[5]报道了辛伐他汀、洛伐他汀的质谱裂解行为,关于其他 4 种他

汀类药物的质谱断裂行为尚未见报道。本研究采用电喷雾离子阱质谱法对 6 种他汀类药物进行多级质谱分析,解析碎片离子结构,总结质谱断裂规律,为同类化合物的结构分析和鉴定提供理论依据。

1 试验部分

1.1 主要仪器及实验条件

Agilent 1100 SL 型液相色谱-质谱联用仪;美国 Agilent 公司产品;Mass Frontier 3.0 质谱解析软件;美国 Highchem 公司产品。

质量扫描范围: m/z 50~1 500;雾化气压力(N_2):103 kPa;干燥气(N_2)流速:5 L · min⁻¹;干燥气温度:325 °C;毛细管电压:3.5 kV;碰撞气:He;注射泵进样流速:5 μ L · min⁻¹。样品溶于甲醇(色谱纯),过 0.45 μ m 滤膜。

1.2 样品

辛伐他汀和洛伐他汀:由沈阳华泰药物研究有限公司提供;普伐他汀、阿托伐他汀、氟伐他汀和瑞舒伐他汀:购自沈阳药大药房。6 种药物的结构示于图 1。

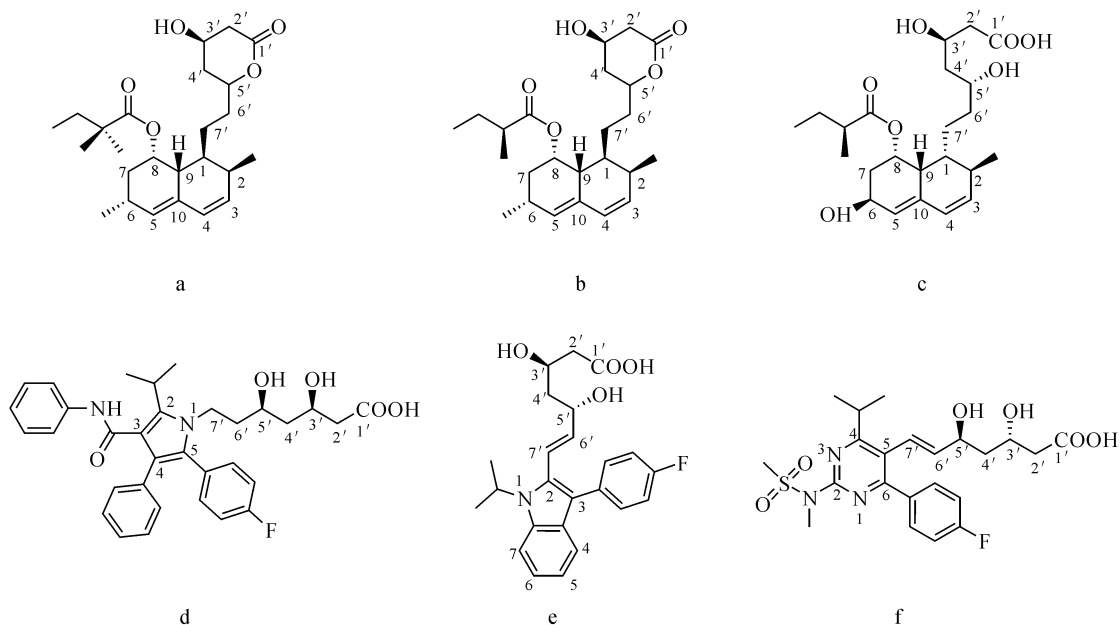


图 1 辛伐他汀(a)、洛伐他汀(b)、普伐他汀(c)、阿托伐他汀(d)、氟伐他汀(e)和瑞舒伐他汀(f)的结构式

Fig. 1 The structures of simvastatin(a), lovastatin(b), pravastatin(c), atorvastatin(d), fluvastatin(e) and rosuvastatin(f)

2 结果与讨论

采用电喷雾离子化方式对 6 种他汀类药物进行质谱分析。根据结构将其分为两类:第一类为含有 β, δ -二羟基戊内酯基团的辛伐他汀和洛伐他汀,在正离子检测方式下响应较好,而在负离子检测方式下无响应,因此选择正离子检测方式进行多级质谱分析。第二类为以开放酸盐形式存在的普伐他汀、阿托伐他汀、氟伐他汀和瑞舒伐他汀,在溶液中很容易解离为酸根离子,在负离子检测方式下灵敏度较高,得到准分子离子峰 $[M-H]^-$;在正离子检测方式下普伐他汀得到加合离子峰 $[M+Na]^+$,未检测到准分子离子峰 $[M+H]^+$,而阿托伐他汀、氟伐他汀和瑞舒伐他汀能检测到准分子离子峰 $[M+H]^+$ 和加合离子峰 $[M+Na]^+$,但它们的 $[M+H]^+$ 峰响应值仅为负离子检测方式下准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 1/10,因此选择负离子检测方式对这 4 种药物进行多级质谱分析。

2.1 第一类药物的质谱分析

辛伐他汀和洛伐他汀结构相近,差别仅在于去氢萘环上 C-8 位取代基不同,是相差 1 个亚甲基的同系物。在一级全扫描质谱中可以检测到响应较高的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 和加合离子峰 $[M+Na]^+$,且后者的响应强度大于前者,这与结构中含有的酯键官能团易与钠离子形成加合离子有关。对辛伐他汀和洛伐他汀进行一级全扫描质谱分析,检测到准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 419 和 m/z 405,对它们进行二级全扫描质谱分析,二者产生的碎片离子类型相同,分别为 m/z 303、285、267、249、243、239、225、199,且各碎片离子的丰度基本相同,说明二者裂解方式一致,示于图 2 和图 3。辛伐他汀与洛伐他汀

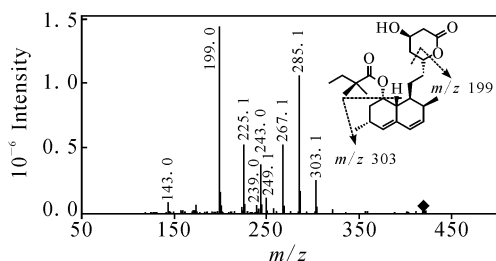


图 2 辛伐他汀 m/z 419 $[M+H]^+$ 的二级质谱图
Fig. 2 MS² spectrum of $[M+H]^+$ ion at m/z 419 of simvastatin

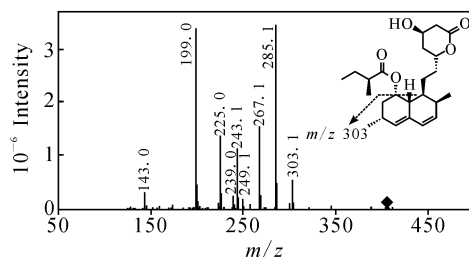


图 3 洛伐他汀 m/z 405 $[M+H]^+$ 的二级质谱图
Fig. 3 MS² spectrum of $[M+H]^+$ ion at m/z 405 of lovastatin

均生成 m/z 303 的碎片离子,说明 m/z 303 是二者结构中相同的部分,脱去的碎片应为它们结构中不同的部分。结合 Mass Frontier 3.0 软件分析,推测 m/z 303 是脱去 C-8 位取代基后生成的碎片离子,断裂方式为 C-8 位取代基的氧原子质子化后,电荷诱导 C—O 单键断裂脱去 C-8 位取代基。对辛伐他汀和洛伐他汀二级质谱中产生的碎片离子 m/z 303 进行三级全扫描质谱分析,得到的主要碎片离子有 m/z 285、267、249、243、239、225、199,与辛伐他汀和洛伐他汀的准分子离子 m/z 419 和 m/z 405 二级质谱中的碎片离子基本相同,推测二级质谱中的这些碎片离子是由 m/z 303 进一步断裂产生,示于图 4。在 m/z 303 的三级质谱中,产物离子 m/z 285 与前体离子 m/z 303 相比减少了 18 u,结合 Mass Frontier 3.0 软件分析,推测是内酯环上 3' 位羟基与 4' 位 H 脱去一分子 H_2O 形成的碎片离子。产物离子 m/z 243 与前体离子 m/z 303 相比减少了 60 u,推测为内酯环的氧原子质子化诱导 5' 位 C—O 键断裂,同时发生麦式重排,脱去一分

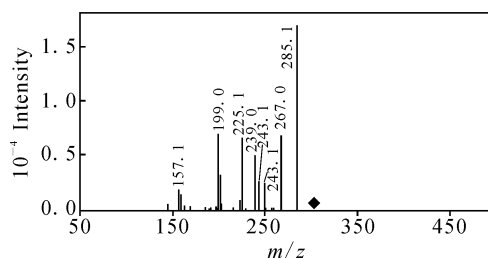


图 4 辛伐他汀和洛伐他汀二级碎片离子 m/z 303 的三级质谱图
Fig. 4 MS³ spectrum of the fragment ions at m/z 303 ion of simvastatin and lovastatin

子 CH_3COOH 而生成^[5]。对二级质谱中产生的 m/z 285 碎片离子进行三级全扫描质谱分析,得到的碎片离子主要有 m/z 267、249、239、225,推测二级质谱中的碎片离子可以由 m/z 285 进一步断裂生成,示于图 5。产物离子 m/z 267 与前体离子 m/z 285 相比减少了 18 u,推测有两种脱水方式:1)内酯环的氧原子质子化诱导酯键断裂;2)羰基氧原子质子化后与 3'位 H 脱水。由 1)能进一步推断出碎片离子 m/z 239、225,由 2)能进一步推断出碎片离子 m/z 239、249。对二级质谱中产生的碎片离子 m/z 267 进行三级全扫描质谱分析,得到的碎片离子主要有 m/z 249、239、225,且碎片离子的丰度高,示于图 6。因此推测 1)为前体离子 m/z 285 裂解生成产物离子 m/z 267 的主要途径,同时这种方式与文献^[5]中环酯的优势裂解方式一致。产物离子 m/z 249 与前体离子 m/z 267 相比减少了 18 u,推测为脱去一分子 H_2O 形成的碎片离子。产物离子 m/z 239 与前体离子 m/z 267 相比减少了 28 u,推测为脱去一分子 CO 形成的碎片离子。对二级质谱中产生的 m/z 243 碎片离子进行三级全扫描质谱分析,得到的碎片离子主要是 m/z 225 和 m/z 199,推测二级质谱中的碎片离子可以由 m/z 243 进一步断裂产生。由于 m/z 267 和 m/z 243 的三级质谱中均能产生 m/z 225,推测该碎片离子有两种结构,分别为前体离子 m/z 267 脱去 $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ 或前体离子 m/z 243 脱去一分子 H_2O 生成,示于图 7。产物离子 m/z 199 与前体离子 m/z 243 相比减少了 44 u,推测是发生烯丙基裂解脱去 CH_3CHO 形成的碎片离子^[6-7]。辛伐他汀和洛伐他汀可能的裂解途径示于图 8。

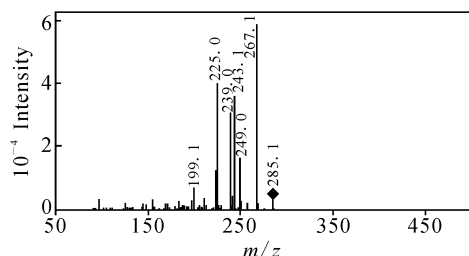


图 5 辛伐他汀和洛伐他汀二级碎片离子 m/z 285 的三级质谱图

Fig. 5 MS^3 spectrum of the fragment ions at m/z 285 of simvastatin and lovastatin

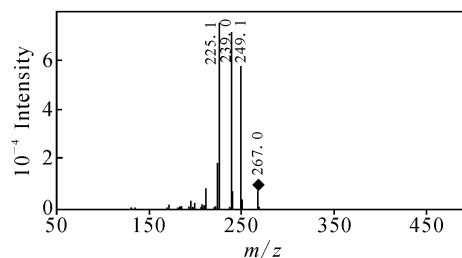


图 6 辛伐他汀和洛伐他汀二级碎片离子 m/z 267 的三级质谱图

Fig. 6 MS^3 spectrum of the fragment ions at m/z 267 of simvastatin and lovastatin

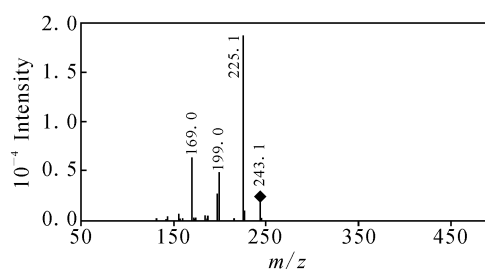


图 7 辛伐他汀和洛伐他汀二级碎片离子 m/z 243 的三级质谱图

Fig. 7 MS^3 spectrum of the fragment ions at m/z 243 of simvastatin and lovastatin

2.2 第二类药物的质谱分析

普伐他汀、阿托伐他汀、氟伐他汀和瑞舒伐他汀均具有 β, δ -二羟基戊酸结构:普伐他汀和阿托伐他汀是由乙基相连,氟伐他汀和瑞舒伐他汀是由乙烯基相连,普伐他汀、阿托伐他汀与氟伐他汀、瑞舒伐他汀的质谱断裂行为有差异。

2.2.1 普伐他汀的质谱分析 对普伐他汀在负离子模式下进行一级全扫描质谱分析,检测到准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 423。对准分子离子 m/z 423 进行二级全扫描质谱分析,得到主要的碎片离子为 m/z 321 和 m/z 303,其中产物离子 m/z 321 与前体离子 m/z 423 相比减少了 102 u,推测为脱去 C-8 位的酯基取代基形成的碎片离子,示于图 9。产物离子 m/z 303 与前体离子 m/z 423 相比减少了 120 u,推测是脱去 C-8 位的酯基取代基和一分子 H_2O 形成的碎片离子。虽然普伐他汀结构中有多个羟基,但由于 6 位 OH 和 7 位 H 脱去一分子 H_2O 后能形成一个

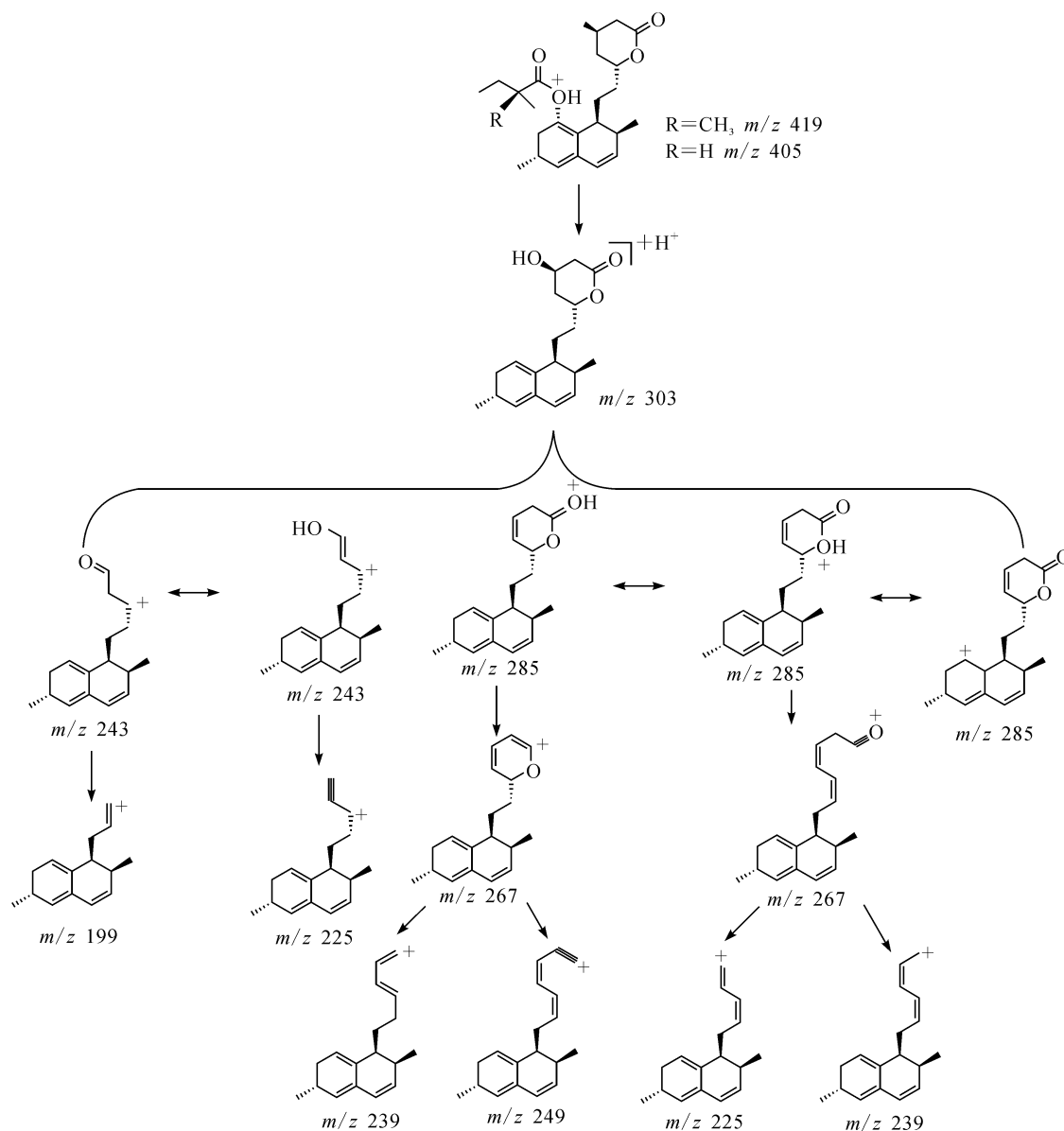
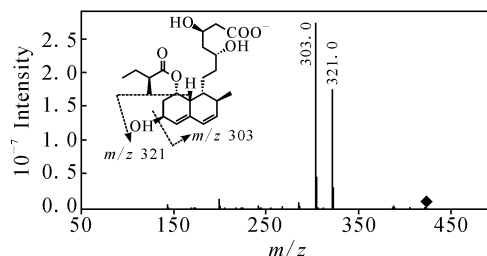
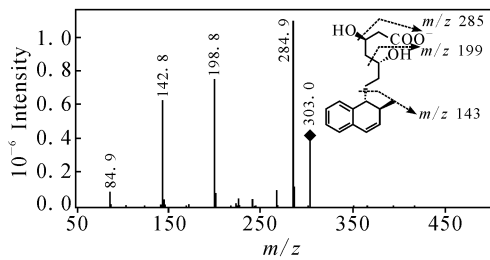


图 8 辛伐他汀和洛伐他汀可能的裂解途径

Fig. 8 The proposed fragmentation pathways of simvastatin and lovastatin

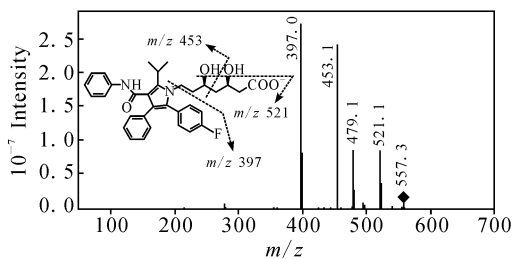
稳定的共轭体系,推测其为脱水方式。对二级质谱中产生的 m/z 303 碎片离子进行三级全扫描质谱分析,得到的主要碎片离子有 m/z 285、199、143,示于图 10。产物离子 m/z 285 与前体离子 m/z 303 相比减少了 18 u,推测是脱去一分子 H_2O 形成的碎片离子。产物离子 m/z 199 与前体离子 m/z 303 相比减少了 104 u,推测是 5' 位发生 α -羟基异裂,脱去 3-羟基-1,4-丁内酯和 H_2 生成。产物离子 m/z 143 与前体离子 m/z 303 相比减少了 160 u,推测为脱去 3,5-二羟基-1,7-庚内酯形成的碎片离子。

图 9 普伐他汀 m/z 423 $[M-H]^-$ 的二级质谱图Fig. 9 MS^2 spectrum of $[M-H]^-$ ion at m/z 423 of pravastatin

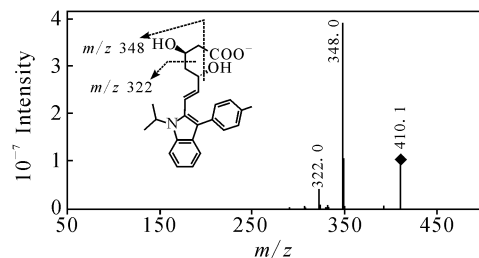
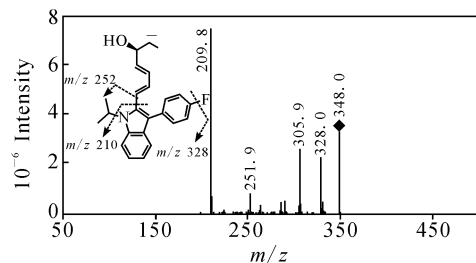
图 10 普伐他汀二级碎片离子 m/z 303 的三级质谱图Fig. 10 MS³ spectrum of the fragment ion at m/z 303 of pravastatin

2.2.2 阿托伐他汀的质谱分析 对阿托伐他汀在负离子模式下进行一级全扫描质谱分析,检测到准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 557。对准分子离子 m/z 557 进行二级全扫描质谱分析,检测到主要的碎片离子为 m/z 521、479、453、397,示于图 11。产物离子 m/z 521 与前体离子 m/z 557 相比减少了 36 u,推测为 β,δ -二羟基戊酸侧链中 2 个羟基脱水形成的碎片离子。产物离子 m/z 453 与前体离子 m/z 557 相比减少了 104 u,结合 Mass Frontier 3.0 软件分析,推测断裂方式与普伐他汀二级碎片离子 m/z 303 生成碎片离子 m/z 199 的断裂方式相同。产物离子 m/z 397 与前体离子 m/z 557 相比减少了 160 u,推测为脱去 3,5-二羟基-1,7-庚内酯形成的碎片离子,此种断裂方式与普伐他汀二级碎片离子 m/z 303 生成 m/z 143 的断裂方式相同。

2.2.3 氟伐他汀的质谱分析 对氟伐他汀在负离子模式下进行一级全扫描质谱分析,得到准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 410。对氟伐他汀准分子离子 m/z 410 进行二级全扫描质谱分析,示于图 12,得到的碎片离子为 m/z 348 和 m/z 322。产物离子 m/z 348 与前体离子 m/z 410 相

图 11 阿托伐他汀 m/z 557 $[M-H]^-$ 的二级质谱图Fig. 11 MS² spectrum of $[M-H]^-$ ion at m/z 557 of atorvastatin

比减少了 62 u,结合 Mass Frontier 3.0 软件分析,推测是脱去一分子 CO_2 ,同时 5'位羟基与 4'位 H 脱水生成。产物离子 m/z 322 与前体离子 m/z 410 相比减少了 88 u,推测是 3'位发生电荷诱导的 $\alpha-OH$ 异裂脱去一分子 CO_2 和 $CH_2=CH-OH$ 生成^[8]。对二级质谱中产生的 m/z 348 碎片离子进行三级全扫描质谱分析,得到的主要碎片离子是 m/z 328、306、252、210,示于图 13。产物离子 m/z 328 与前体离子 m/z 348 相比减少了 20 u,推测为脱去一分子 HF 形成的碎片离子。产物离子 m/z 306 与前体离子 m/z 348 相比减少了 42 u,推测断裂途径有两种: 1) 吡啶环的 N-C 单键断裂,脱去 $CH_2=CH-CH_3$; 2) 共轭烯键转移,发生烯醇式互变,电荷诱导羰基发生 α -裂解脱去 $CH_2=C=O$ ^[7]。产物离子 m/z 252 与前体离子 m/z 348 相比减少了 96 u,推测为脱去环己烯-3-酮得到的碎片离子。产物离子 m/z 210 与前体离子 m/z 348 相比减少了 138 u,推测为吡啶环 C-N 单键断裂脱去 42 u ($CH_2=CH-CH_3$),同时脱去 96 u (环己烯-3-酮)形成的碎片离子。氟伐他汀 m/z 306 和 m/z 252 可能的裂解途径示于图 14。

图 12 氟伐他汀 m/z 410 $[M-H]^-$ 的二级质谱图Fig. 12 MS² spectrum of $[M-H]^-$ ion at m/z 410 of fluvastatin图 13 氟伐他汀二级碎片离子 m/z 348 的三级质谱图Fig. 13 MS³ spectrum of the fragment ion at m/z 348 of fluvastatin

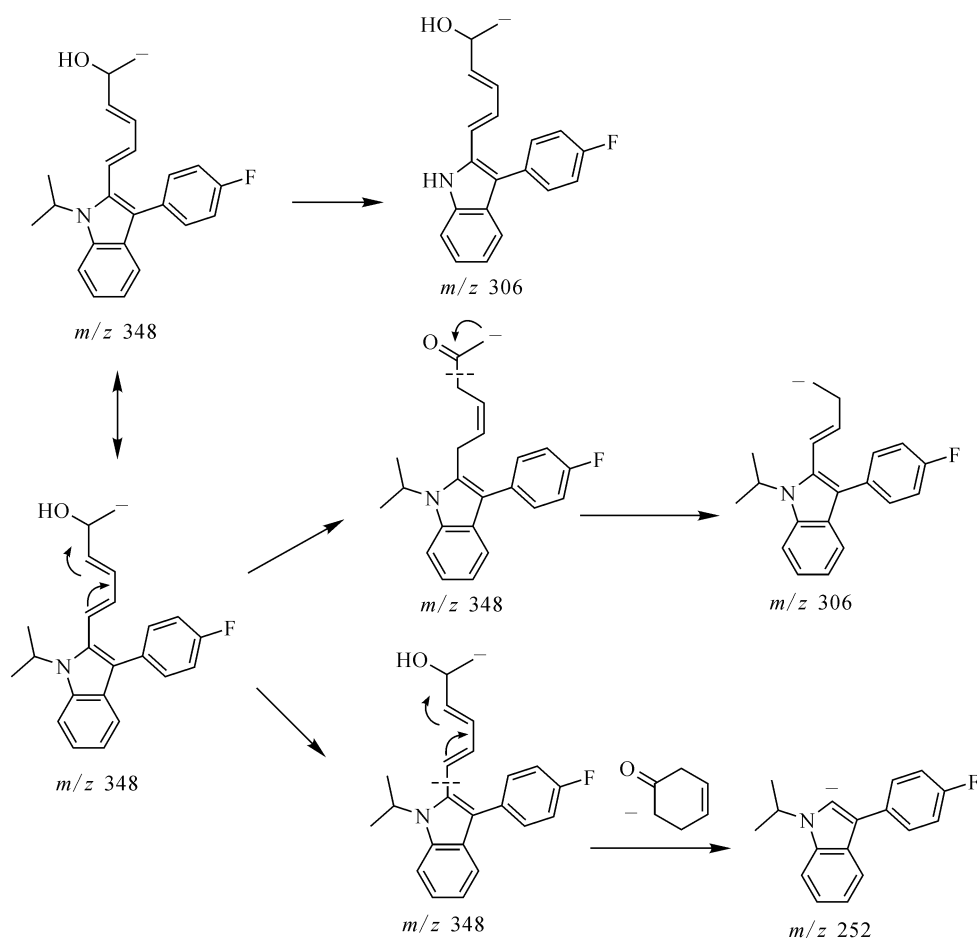


图 14 氟伐他汀 m/z 306 和 m/z 252 可能的裂解途径

Fig. 14 The proposed fragmentation pathways of m/z 306 and m/z 252 ions of fluvastatin

2.2.4 瑞舒伐他汀的质谱分析 对瑞舒伐他汀在负离子模式下进行一级全扫描质谱分析,检测到准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 480。对准分子离子 m/z 480 进行二级全扫描质谱分析,得到主要的碎片离子为 m/z 418,示于图 15。产物离子 m/z 418 与前体离子 m/z 480 相比减少了 62 u,结合 Mass Frontier 3.0 软件分析,推测为脱去一分子 CO_2 和一分子 H_2O 得到的碎片离子,此种断裂方式与氟伐他汀准分子离子 m/z 410 断裂生成二级碎片离子 m/z 348 相同。对二级质谱中产生的 m/z 418 碎片离子进行三级全扫描质谱分析,检测到主要的碎片离子为 m/z 398、376、340、322,示于图 16。其中前体离子 m/z 418 断裂生成产物离子 m/z 398、322 的方式与氟伐他汀前体离子 m/z 348 生成产物离子 m/z 328、252 相同,即分别脱去一分子 HF 和环己烯-3-酮(96 u)。产物离子 m/z 376 与前体离子

m/z 418 相比减少了 42 u,推测与氟伐他汀前体离子 m/z 348 生成产物离子 m/z 306 的断裂方式 2) 相同。产物离子 m/z 340 与前体离子 m/z 418 相比减少了 78 u,推测是甲基磺酰胺的 N-S 键断裂脱去 SO_2CH_3 生成。

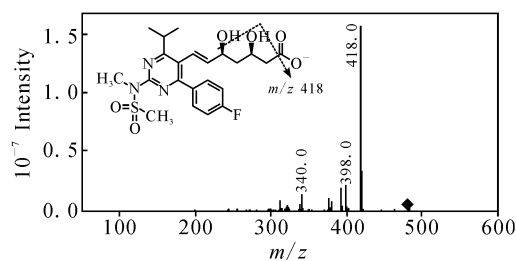


图 15 瑞舒伐他汀 m/z 480 $[M-H]^-$ 二级质谱图

Fig. 15 MS^2 spectrum of $[M-H]^-$ ion at m/z 480 of rosuvastatin

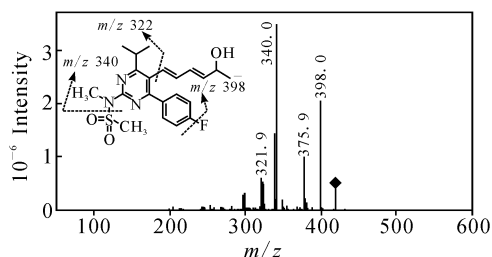


图 16 瑞舒伐他汀二级碎片离子 m/z 418 的三级质谱图

Fig. 16 MS^3 spectrum of the fragment ion at m/z 418 of rosvastatin

3 结论

对辛伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、阿托伐他汀、氟伐他汀和瑞舒伐他汀 6 种降脂药物进行电喷雾多级质谱分析,根据主要药效基团的存在形式不同分两类解析。第一类以非活性内酯环形式存在的辛伐他汀和洛伐他汀在正离子检测方式下发生电荷诱导 β, δ -二羟基戊内酯开环断裂,通过麦式重排生成中性丢失 $60 \text{ u} (\text{CH}_3\text{COOH})$ 的碎片离子;同时产生中性丢失 $18 \text{ u} (\text{H}_2\text{O})$ 、 $28 \text{ u} (\text{CO})$ 的碎片离子。第二类药物中具有由乙基连接的 β, δ -二羟基戊酸侧链的普伐他汀和阿托伐他汀在负离子检测方式下发生 α -羟基异裂,产生脱去 $104 \text{ u} (3\text{-羟基-1,4-丁内酯和 } \text{H}_2)$ 和脱去 $160 \text{ u} (3,5\text{-二羟基-1,7-庚内酯})$ 的碎片离子;具有由乙烯基连接的 β, δ -二羟基戊酸侧链的氟伐他汀和瑞舒伐他汀,生成丢失 $62 \text{ u} (\text{CO}_2 \text{ 和 } \text{H}_2\text{O})$ 的碎片离子,对该二级碎片离子进行三级全扫描质谱分析,得到通过共轭烯键转移发生酮式-烯醇式互变,电荷诱导羰基发生 α -裂解生成脱去 $42 \text{ u} (\text{CH}_2=\text{C}=\text{O})$ 的碎片离子;产生脱去

$96 \text{ u} (\text{环己烯-3-酮})$ 、 $20 \text{ u} (\text{HF})$ 的碎片离子。这些质谱特征有助于他汀类药物的结构分析和鉴定。

参考文献:

- [1] 谭志荣,张利,周宏灏. 生物样品中他汀类降脂药检测方法的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(12): 917-921.
- [2] 封宇飞,雷静,吕俊玲,等. 新型降脂药-罗伐他汀[J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 20(3): 234-236.
- [3] NIROGI R, MUDIGONDA K, KANDIKERE V. Chromatography mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 44: 379-387.
- [4] 董亚琳,董卫华. 他汀类药物的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(3): 175-178.
- [5] DONOVAN T, BRODBELT J. Characterization of the dissociation behavior of gas-phase protonated and methylated lactones [J]. American Society for Mass Spectrometry, 1992, 3: 47-59.
- [6] WANG H, WU Y, ZHAO Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Mass Spectrometry, 2001, 36: 58-70.
- [7] 黄璐璐,黄碧云,季红,等. 莫那可林 J 的电喷雾质谱裂解规律研究 ($MS^1 \sim MS^6$) [J]. 质谱学报, 2009, 30(3): 154-159.
- [8] WHEELAN P, ZIRROLI J A, MURPHY R C. Negative ion electrospray tandem mass spectrometric structural characterization of Leukotriene B4 (LTB4) and LTB4-derived metabolites [J]. American Society for Mass Spectrometry, 1996, 7: 129-139.