

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201706001



苯胺基喹唑啉类酪氨酸激酶抑制剂的电喷雾质谱裂解规律

王立强¹, 王凤玲¹, 周玥莹¹, 李赞², 高源², 吴振², 方美娟²

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361000)

摘要: 研究吉非替尼、厄洛替尼和艾克替尼 3 种苯胺基喹唑啉类酪氨酸激酶抑制剂, 在电喷雾质谱正离子模式下的裂解规律. 通过电喷雾质谱产生各化合物稳定的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 进而对 $[M+H]^+$ 离子进行高能诱导裂解和碰撞诱导裂解, 获得相应化合物的质谱图. 结果表明: 在电喷雾电离 (ESI) 多级质谱中, 3 种药物的裂解主要发生在喹唑啉环 C_4 , C_6 和 C_7 位取代基上, 并伴随分子内重排和 H^+ 的迁移重排; 在二级质谱图中, 吉非替尼的高丰度特征离子质荷比 (m/z) 为 128.1, 厄洛替尼的 m/z 值为 278.1 和 336.1, 艾克替尼的 m/z 值为 278.1, 304.1.

关键词: 苯胺基喹唑啉; 酪氨酸激酶抑制剂; 电喷雾电离质谱; 裂解规律

中图分类号: R 917

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2018)03-0420-09

Fragmentation Pathways of Tyrosine Kinase Inhibitors With Anilinoquinazoline Moiety by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

WANG Liqiang¹, WANG Fengling¹, ZHOU Yueying¹,
LI Zhan², GAO Yuan², WU Zhen², FANG Meijuan²

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361000, China)

Abstract: The fragmentation pathways of three tyrosine kinase inhibitors with anilinoquinazoline moiety including gefitinib, erlotinib and icotinib were analyzed by electrospray ionization tandem mass spectrometry in positive ion mode. The $[M+H]^+$ ions peaks were generated by electrospray ionization tandem mass spectrometry, and the subsequent product ions of $[M+H]^+$ ions information were obtained by using the higher energy collision induced dissociation and the collision induced dissociation. The results indicate that the fragmentation behavior mainly results from the cleavage of the C_4 , C_6 and C_7 substituent of the quinazoline ring, with intramolecular rearrangement and migration rearrangement of H^+ , and the high-abundance characteristic ions for gefitinib is $m/z=128.1$, for erlotinib are $m/z=278.1$ and $m/z=336.1$, and for icotinib are $m/z=278.1$ and $m/z=304.1$ in the secondary mass spectrum.

Keywords: anilinoquinazoline; tyrosine kinase inhibitor; electrospray ionization mass spectrometry; fragmentation pathway

收稿日期: 2017-06-09

通信作者: 王立强 (1970-), 男, 教授, 博士, 主要从事药剂学和新药开发的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302652); 福建省自然科学基金资助项目 (2015J01342)

近年来,针对肿瘤特定分子靶点的靶向抗癌药物在疗效上具有很大的突破,如吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)和埃克替尼(icotinib)等表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂(TKI)是非小细胞肺癌临床治疗的常用靶向药物.它们可以通过模拟腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的腺嘌呤环,与ATP竞争EGFR胞内区激酶催化位点,阻断酪氨酸激酶活性,抑制肿瘤的增殖^[1-2].作为质谱裂解模式之一,高能诱导裂解技术(HCD)是先通过离子阱对选择的离子进行捕获,然后,在特有的HCD裂解池中进行高能裂解,最后可与Orbitrap质量分析器结合得到高分辨的质谱数据^[3].另外,HCD作为一项新型的质谱裂解技术,与碰撞诱导解离技术(CID)相比,它能够有效地改善CID裂解中的低质量碎片丢失效应,得到更为丰富的碎片离子信息.迄今为止,Lankheet等^[4],Couchman等^[5]已经报道了几种TKIs的主要特征离子,并考察了其在体内的定量分析和代谢途径,但TKIs的质谱裂解机制,特别是高能裂解机制鲜有报道.本文主要利用高分辨率质谱仪研究以唑啉为母核的吉非替尼、厄洛替尼和埃克替尼在HCD裂解中的二级碎片离子,根据原化合物结构及碎片离子和丢失中性分子的精确质量推测碎片离子的化学结构.另外,利用低分辨率多级串联质谱仪得到各化合物二级质谱中的主要特征碎片离子在CID裂解中的三级碎片离子信息,确认碎片离子的结构,进而探讨这3种TKIs药物可能的裂解途径.

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Q Exactive™组合型四极杆Orbitrap质谱,配有电喷雾离子源(ESI)及Xcalibur 2.2数据处理系统仪(美国Thermo公司);AmaZon SL质谱仪,配有电喷雾离子源及Esquire 5.2数据处理系统(美国Bruker公司).

1.2 主要材料与试剂

吉非替尼(批号:S102504)、厄洛替尼(批号:S778601)、埃克替尼(批号:S292202),均为分析纯,美国Selleck Chemicals公司产品;甲醇:色谱纯,美国Sigma-Aldrich公司产品.

1.3 实验条件

1.3.1 样品制备 取吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼分别用甲醇配成 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液和 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的待测液.

1.3.2 质谱条件 Q-Exactive MSⁿ:电喷雾电离离子源,正离子模式,喷雾电压为3.8 kV,离子源温度为320℃,裂解碰撞气为氮气,相对碰撞能量为10%~20%. AmaZon SL MSⁿ:电喷雾电离离子源,正离子模式,毛细管温度为200℃,裂解碰撞气为氮气,雾化气为氮气,CID相对碰撞能量为10%~20%.

2 结果与讨论

2.1 ESI-MS 质谱结果

在ESI软电离源电离的正离子检测模式下,吉非替尼、厄洛替尼和埃克替尼的一级全扫描质谱均以 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 准分子离子峰为基峰,质荷比(m/z)分别为447.158 7,394.175 5,392.159 7,并且具有很强的响应值.这说明在正离子模式下,该类化合物易与质子结合形成加和峰.

2.2 ESI-MSⁿ 质谱结果

为研究此类药物分子结构与裂解途径之间的关系,吉非替尼、厄洛替尼和埃克替尼均以准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 为前体离子做电喷雾电离多级串联质谱(ESI-MSⁿ)分析.首先,各药物经过Thermo高分辨质谱仪HCD裂解后产生丰富的二级碎片离子,如表1所示.依据表1原化合物结构和碎片离子的精确质量,推测碎片离子的元素组成和可能的化学结构.

2.2.1 吉非替尼 ESI-MSⁿ 质谱数据分析及可能的裂解途径 在Q Exactive™质谱仪中,吉非替尼以准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ (质荷比 $m/z=447.158\ 7$)为前体离子进行ESI二级串联质谱分析,产生的主要碎片离子,如表1所示.图1,2分别为高能诱导解离(HCD)二级质谱图及对应的裂解途径.

Lankheet等^[4]报道了吉非替尼的准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ ($m/z=447.2$)在ESI质谱中的裂解发生在

喹唑啉母环上,产生喹唑啉环特征碎片离子($m/z=128.1$),如图 3 所示.

表 1 ESI 正离子模式下,苯胺基喹唑啉类酪氨酸激酶抑制剂准分子离子 $[M+H]^+$ 的高能诱导裂解碎片离子

Tab. 1 Mass fragment ions obtained from $[M+H]^+$ of tyrosine kinase inhibitors with anilinoquinazoline moiety using higher energy collision induced dissociation in ESI positive ion mode

化合物	离子	元素组成	m/z		误差/ $\times 10^{-4} \%$	碎片离子来源	相对丰度
			理论值	实测值			
吉非替尼	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{25}ClFN_4O_3^+$	447.159 4	447.158 7	-1.57	$[M+H]^+$	19.75
	P ₁	$C_{21}H_{21}ClFN_4O_2^+$	415.133 2	415.133 3	0.24	$[M+H]^+-CH_3OH$	0.32
	P ₂	$C_{18}H_{16}ClFN_3O_2^+$	360.091 0	360.090 4	-1.67	$[M+H]^+-C_4H_9NO$	1.04
	P ₃	$C_{15}H_{12}ClFN_3O_2^+$	320.059 7	320.059 1	-1.87	$[M+H]^+-C_7H_{13}NO$	0.49
	P ₄	$C_{13}H_{10}N_3O^+$	224.081 8	224.081 5	-1.34	$[M+H]^+-C_7H_{13}NO-H_2O-FC\equiv CCl$	0.04
	P ₅	$C_{10}H_9N_2O_2^+$	189.065 9	189.065 5	-2.12	$[M+H]^+-C_4H_9NO-CH\equiv CH-C_6H_5ClFN$	0.06
	P ₆	$C_7H_{14}NO^+$	128.107 0	128.106 9	-0.78	$[M+H]^+-C_{15}H_{11}ClFN_3O_2$	100.00
	P ₇	$C_5H_{10}NO^+$	100.075 7	100.076 0	3.00	$[M+H]^+-C_{15}H_{11}ClFN_3O_2-CH_2=CH_2$	5.16
厄洛替尼	P ₈	$C_4H_8N^+$	70.065 1	70.065 8	9.99	$[M+H]^+-C_{15}H_{11}ClFN_3O_2-CH_2=CH_2-HCHO$	0.11
	$[M+H]^+$	$C_{22}H_24N_3O_4^+$	394.176 1	394.175 5	1.52	$[M+H]^+$	12.41
	P ₁	$C_{20}H_{20}N_3O_3^+$	350.149 9	350.149 3	-1.71	$[M+H]^+-C_2H_4O$	0.59
	P ₂	$C_{19}H_{18}N_3O_3^+$	336.134 3	336.133 6	-2.08	$[M+H]^+-C_3H_6O$	46.54
	P ₃	$C_{18}H_{14}N_3O_2^+$	304.108 1	304.107 4	-2.30	$[M+H]^+-C_3H_6O_2-CH_3OH$	11.30
	P ₄	$C_{16}H_{12}N_3O_2^+$	278.092 4	278.091 8	-2.16	$[M+H]^+-C_3H_6O_2-CH_3OH-CH\equiv CH$	100.00
	P ₅	$C_{15}H_{12}N_3O^+$	250.097 5	250.097 1	-1.60	$[M+H]^+-C_3H_6O_2-CH_3OH-CH\equiv CH-CO$	5.19
	P ₆	$C_8H_5N_2O_2^+$	161.034 6	161.034 3	-1.86	$[M+H]^+-2C_3H_6O-C_8H_7N$	0.10
埃克替尼	P ₇	$C_8H_8N^+$	118.065 1	118.065 3	1.69	$[M+H]^+-C_{14}H_{16}N_2O_4$	0.18
	P ₈	$C_3H_7O^+$	59.049 1	59.049 9	13.55	$[M+H]^+-C_{19}H_{17}N_3O_3$	2.60
	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{22}N_3O_4^+$	392.160 5	392.159 7	-2.04	$[M+H]^+$	7.84
	P ₁	$C_{20}H_{18}N_3O_3^+$	348.134 3	348.133 7	-1.72	$[M+H]^+-C_2H_4O$	2.99
	P ₂	$C_{19}H_{16}N_3O_2^+$	318.123 7	318.122 9	-2.51	$[M+H]^+-C_3H_6O_2$	9.89
	P ₃	$C_{18}H_{14}N_3O_2^+$	304.108 1	304.107 4	-2.30	$[M+H]^+-2C_2H_4O$	100.00
	P ₄	$C_{17}H_{12}N_3O_2^+$	290.092 4	290.091 9	-1.72	$[M+H]^+-C_5H_{10}O_2$	2.81
	P ₅	$C_{16}H_{12}N_3O_2^+$	278.092 4	278.091 9	-1.80	$[M+H]^+-2C_2H_4O-CH\equiv CH$	60.38
	P ₆	$C_{16}H_{10}N_3O_2^+$	276.076 8	276.076 4	-1.45	$[M+H]^+-2C_2H_4O-CH\equiv CH-H_2$	5.94
	P ₇	$C_{16}H_{10}N_3O^+$	260.081 8	260.081 4	-1.54	$[M+H]^+-2C_2H_4O-CH\equiv CH-H_2O$	3.43
	P ₈	$C_{15}H_{12}N_3O^+$	250.097 5	250.097 0	-2.00	$[M+H]^+-2C_2H_4O-CH\equiv CH-CO$	2.50
	P ₉	$C_{15}H_{10}N_3O^+$	248.081 8	248.081 5	-1.21	$[M+H]^+-2C_2H_4O-CH\equiv CH-HCHO$	7.18
	P ₁₀	$C_{12}H_{11}N_2O_3^+$	231.076 4	231.078 8	10.39	$[M+H]^+-C_2H_4O-C_8H_7N$	3.54
	P ₁₁	$C_{14}H_{10}N_3^+$	220.086 9	220.086 7	-0.91	$[M+H]^+-2C_2H_4O-CH\equiv CH-C_2H_2O_2$	4.06
	P ₁₂	$C_{10}H_7N_2O_2^+$	187.050 2	187.050 0	-1.07	$[M+H]^+-2C_2H_4O-C_8H_7N$	1.28
	P ₁₃	$C_9H_8NO_2^+$	162.054 5	162.054 8	1.85	$[M+H]^+-2C_2H_4O-C_9H_6N_2$	1.35
	P ₁₄	$C_8H_8N^+$	118.065 1	118.065 2	0.85	$[M+H]^+-2C_2H_4O-C_{10}H_6N_2O_2$	1.93

检测到相对丰度最高的特征碎片离子是 P₆($m/z=128.106\ 9$),与文献[4]报道的喹唑啉环特征离

子 $[C_8H_4N_2]^+ \cdot$ (精确相对分子质量为 128.036 9) 误差值为 $546.72 \times 10^{-4} \%$, 误差远远大于标准要求的 $5 \times 10^{-4} \%$, 故确定实验中检测到该碎片离子的结构与该文献报道的不同. 考虑离子的精确质量, 推测检测到的吉非替尼特征离子 P_6 ($m/z=128.106\ 9$) 是由苯胺喹唑啉母环 C_6 位上丙氧基的 C_1-O 键发生断裂产生的离子 $[C_7H_{14}NO]^+$ (精确相对分子质量为 128.107 0), 并得到碎片离子 P_3 ($m/z=320.059\ 1$, $[C_{15}H_{12}ClFN_3O_2]^+$). 因此, 所推测的碎片离子 P_6 ($m/z=128.106\ 9$) 的结构与文献[5]归属的吉非替尼 $m/z=128.20$ 特征碎片离子结构相同(图 3); 文献[6-7]的研究也都曾检测到吉非替尼裂解产生碎片离子($m/z=100.1, 128.1$), 但是均未对其结构进行归属.

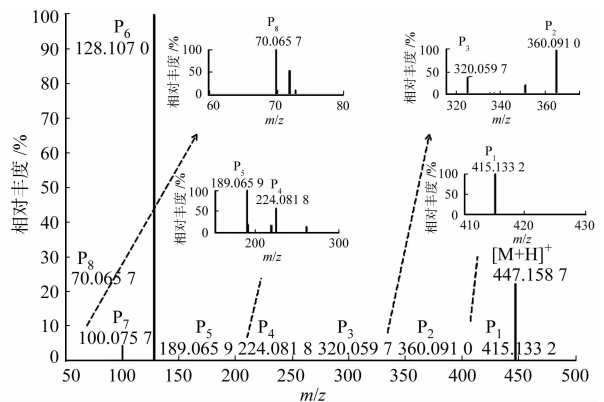


图 1 正离子模式下吉非替尼准分子离子 $[M+H]^+$ 的高能诱导裂解二级质谱图
Fig. 1 HCD-MS² spectra of $[M+H]^+$ of gefitinib in ESI positive ion mode

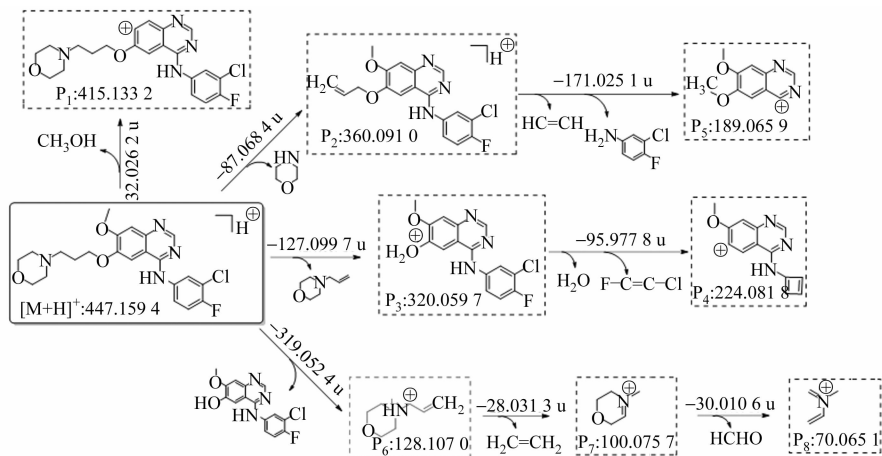


图 2 ESI 正离子模式下吉非替尼可能的裂解途径
Fig. 2 Proposed fragmentation pathway of gefitinib in ESI positive ion mode

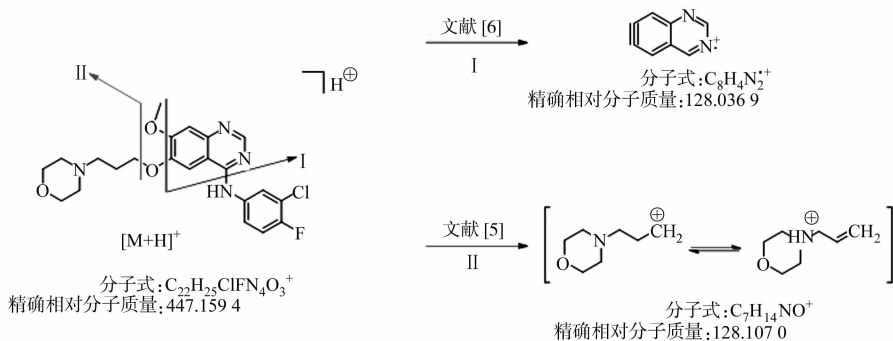


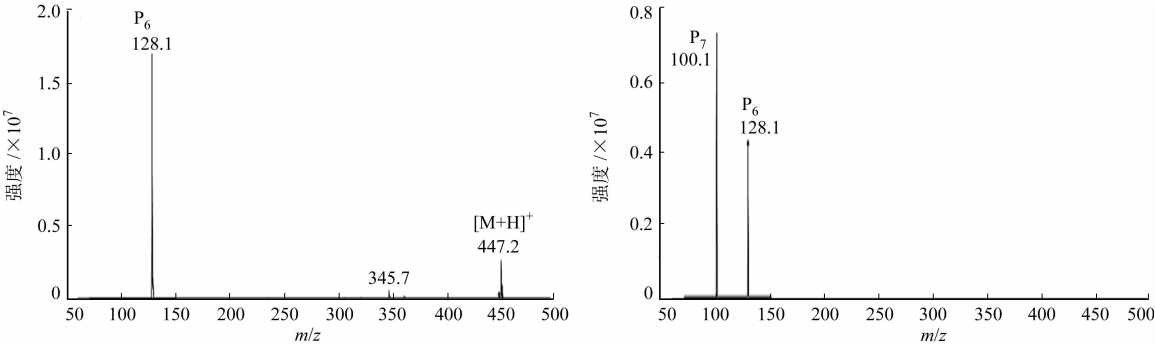
图 3 文献报道的吉非替尼特征离子($m/z=128$)结构
Fig. 3 Structures of ion of gefitinib in references ($m/z=128$)

根据得到的质谱图中低丰度的碎片离子信息, 推测特征离子 P_6 会脱去一分子乙烯 C_2H_4 形成离子 P_7 ($m/z=100.076\ 0$), 进一步发生 RDA 裂解脱去一分子甲醛得到离子 P_8 ($m/z=70.065\ 8$); 离子 P_3 ($m/z=320.059\ 1$) 在其苯胺喹唑啉母环 C_6 和 C_4 位同时分别脱去一分子 H_2O 和一分子 1-氯-2-氟乙炔 (C_2FCl), 形成碎片离子 P_4 ($m/z=224.081\ 5$). 另外, 根据其他低丰度碎片离子的精确质量推测吉非替尼还存在以下裂解途径: 1) 准分子离子 $[M+H]^+$ 在苯胺喹唑啉母环 C_7 位脱掉一分子甲醇 CH_3OH 形成碎片离子 P_1 ($m/z=415.133$); 2) $[M+H]^+$ 脱掉苯胺喹唑啉母环 C_6 位取代基上的一分子吗啉 (C_4H_9NO) 形成碎片离子 P_2 ($m/z=360.090\ 4$), 该离子继续发生裂解, 脱去 C_6 位取代基上的一分子乙

炔(C_2H_2)和苯胺唑啉母环 C_4 位的 3-氯-4-氟苯胺(C_6H_5ClFN),形成碎片离子 $P_5(m/z=189.065\ 5)$, 具体裂解机制如图 2 所示.

在低分辨的 Bruker 质谱仪中,吉非替尼的准分子离子峰 $[M+H]^+(m/z=447.2)$ 经过 CID 二级裂解后,同样得到高丰度的碎片离子 $P_6(m/z=128.1)$,如图 4(a)所示. 为了进一步确认其结构,以 $P_6(m/z=128.1)$ 为前体离子,进行 ESI 三级串联质谱分析,最终得到子离子 $P_7(m/z=100.1)$,如图 4(b)所示. $P_7(m/z=100.1)$ 比 $P_6(m/z=128.1)$ 少了 28 u,可推测其是由 $P_6[C_7H_{14}NO]^+$ 发生碳碳键断裂脱去一分子乙烯 C_2H_4 形成的碎片离子 $P_7[C_5H_{10}NO]^+$. 综上,吉非替尼在 ESI 质谱中裂解得到的高丰度特征碎片离子 $P_6(m/z=128.106\ 9)$ 是苯胺唑啉母环 C_6 位丙氧基发生了 C_1-O 键断裂形成的 N-烯丙基吗啉加氢离子^[5],而非文献[4]中报道的唑啉环离子.

ESI 正离子模式下,吉非替尼的碰撞诱导裂解多级质谱图,如图 4 所示.



(a) 准分子离子 $[M+H]^+(m/z=447.2)$ 的二级质谱图 (b) 碎片离子 $P_6(m/z=128.1)$ 的三级质谱图

图 4 ESI 正离子模式下吉非替尼的碰撞诱导裂解多级质谱图

Fig. 4 CID-MSⁿ spectra of gefitinib in ESI positive ion mode

2.2.2 厄洛替尼 ESI-MSⁿ 质谱数据分析及可能的裂解途径 在 Q ExactiveTM 质谱仪中,厄洛替尼以准分子离子峰 $[M+H]^+(m/z=394.175\ 5)$ 为前体离子进行 HCD 分析,产生的主要碎片离子如表 1 所示,其 HCD 二级质谱图如图 5 所示,其可能的质谱裂解途径分别如图 6,7 所示.

厄洛替尼的 HCD 二级质谱图中,丰度最高的特征碎片离子为 $P_4(m/z=278.091\ 8)$,与 Lankheet 等^[4]报道的 $m/z=278.0$ 碎片离子 $[C_{14}H_{18}N_2O_4]^+$ (相对分子质量为 278.126 7)误差值为 $-125.48 \times 10^{-4} \%$,误差远大于标准要求的 $5 \times 10^{-4} \%$,故确定实验检测到的该碎片离子结构与 Lankheet 等^[4]报道的不同;但该离子和 Svedberg 等^[8]报道的厄洛替尼 $m/z=278$ 的碎片离子 $[C_{16}H_{12}N_3O_2]^+$ (相对分子质量为 278.092 4)的误差很小,误差值为 $-2.16 \times 10^{-4} \%$,故实验检测到的该碎片离子的结构可能与 Svedberg 等^[8]报道的相同,如图 8 所示.

根据 HCD 二级质谱图中另外 2 个丰度较高的离子 $P_2(m/z=336.133\ 6)$ 和 $P_3(m/z=304.107\ 4)$,推测厄洛替尼准分子离子 $[M+H]^+$ 的苯胺唑啉母环 C_6 或 C_7 位侧链甲氧乙氧基的 $C-O$ 键先发生断裂,丢失一分子甲基乙烯基醚 C_3H_6O ,并伴随质子的迁移生成碎片离子 $P_2(m/z=336.133\ 6)$,可同时得到碎片离子 $P_8(m/z=59.049\ 9)$. 其中, $P_2[C_{19}H_{18}N_3O_3]^+$ 与 Svedberg 等^[8]和 Li 等^[9]归属的 $m/z=336$ 结构相同. 碎片离子 $P_2[C_{19}H_{18}N_3O_3]^+$ 中,母环的另一个侧链(C_6 或 C_7 位)继续发生 $C-O$ 键断裂脱去一分子甲醇 CH_3OH 后,发生分子内重排,形成碎片离子 $P_3(m/z=304.107\ 4)$. 丰度最高的特征离子 $P_4(m/z=278.091\ 8)$ 与 P_3 相差 26.015 7 u,可能是源于 $P_3(m/z=304.107\ 4)$ 脱去一分子乙炔

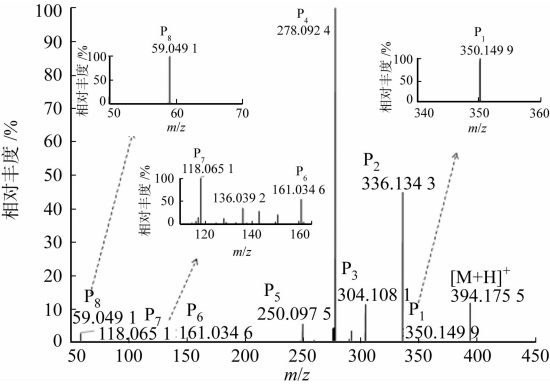


图 5 正离子模式下厄洛替尼准分子离子 $[M+H]^+$ 的高能诱导裂解二级质谱图

Fig. 5 HCD-MS² spectra of $[M+H]^+$ of erlotinib in ESI positive ion mode

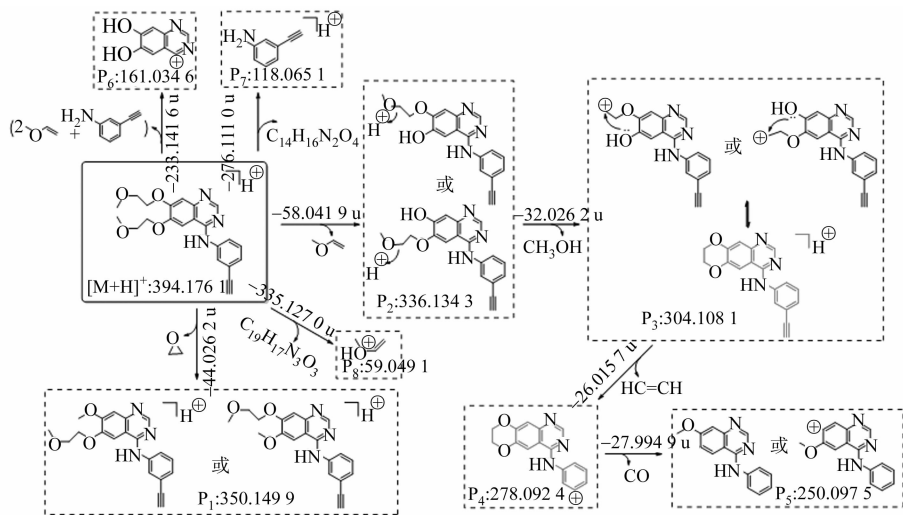
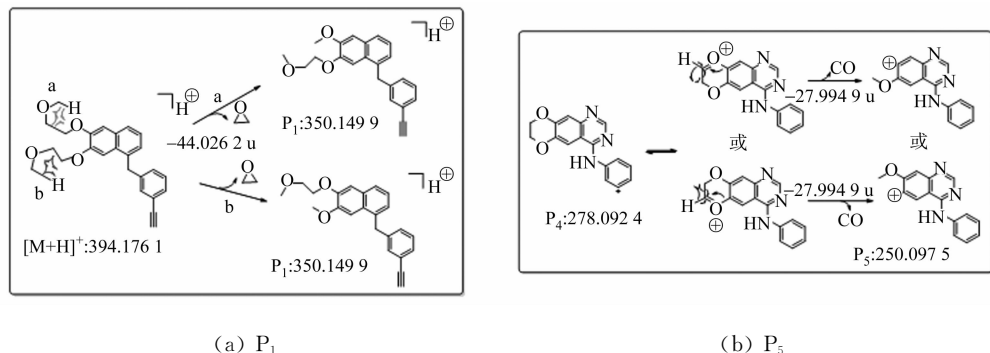


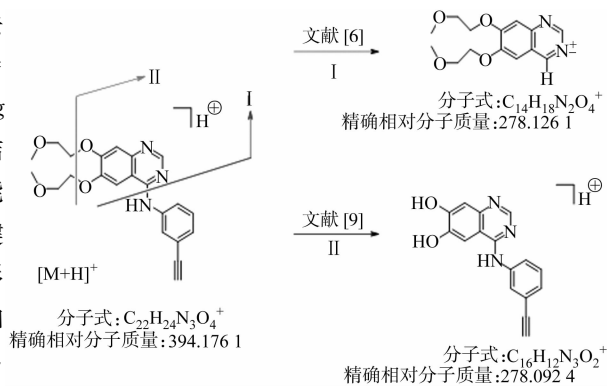
图 6 ESI 正离子模式下厄洛替尼可能的裂解途径

Fig. 6 Proposed fragmentation pathway of erlotinib in ESI positive ion mode

图 7 ESI 正离子模式下厄洛替尼碎片离子 P_1 和 P_5 形成的可能途径Fig. 7 Possible formed pathway for product ions P_1 and P_5 of erlotinib in ESI positive ion mode

C_2H_2 ; 特征离子 P_4 ($m/z=278.0918$) 可进一步脱去一分子 CO (图 7(b)), 形成的碎片离子 P_5 ($m/z=250.0975$)。因此, P_4 ($m/z=278.0918$) 与 Svedberg 等对厄洛替尼二级碎片离子 $m/z=278.0$ 推测的结构也不同。另外, 碎片离子 P_1 ($m/z=350.1493$) 可能源于厄洛替尼 $[M+H]^+$ 的 C_6 或 C_7 侧链中化学键的均裂和 H 迁移, 丢失一分子环氧乙烷 (C_2H_4O) 形成碎片离子 $[C_{20}H_{20}N_3O_3]^+$, 其形成的可能途径, 如图 7(a) 所示。碎片离子 P_6 ($m/z=161.0343$) 和 P_7 ($m/z=118.0653$) 源于厄洛替尼喹唑啉环 C_6 , C_7 和 C_4 侧链的 C-O 键和 C-N 键处的断裂。

为了进一步验证厄洛替尼特征离子 P_4 ($m/z=278.0918$) 的结构和推测的裂解途径。在低分辨的 Bruker 质谱仪中, 对厄洛替尼的准分子离子 $[M+H]^+$ ($m/z=394.2$) 进行低分辨 CID 二级质谱分析, 得到的 CID 的二级质谱图, 如图 9(a) 所示。由图 9(a) 可得: P_2 ($m/z=336.1$), P_3 ($m/z=304.1$), P_4 ($m/z=278.1$) 和 P_5 ($m/z=250.1$) 等碎片离子。图 9(b), (c) 分别为 P_2 ($m/z=336.1$), P_4 ($m/z=278.1$) 的三级质谱图。由图 9(b) 可得: P_3 ($m/z=304.1$), P_4 ($m/z=278.1$) 和 P_5 ($m/z=250.1$); 由图 9(c) 可得: P_5 ($m/z=250.1$)。这些结果进一步印证厄洛替尼在 HCD 中的裂解途径及特征碎片离子 P_4 ($m/z=278.0918$) 的结构。其中, P_4 ($m/z=278.0918$) 的结构与

图 8 厄洛替尼特征离子 ($m/z=278$) 的文献报道结构Fig. 8 Structures of ion of erlotinib in references ($m/z=278$)

http://www.hdxh.hqu.edu.cn

Lankheet 等^[4]和 Svedberg 等^[8]报道的都不同。

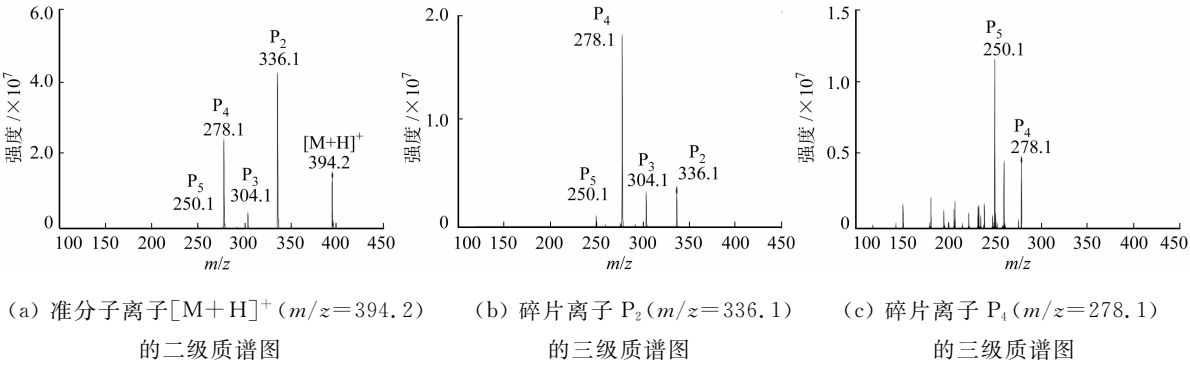


图 9 ESI 正离子模式下厄洛替尼的碰撞诱导裂解多级质谱图

Fig. 9 CID-MSⁿ spectra of erlotinib in ESI positive ion mode

2.2.3 埃克替尼 ESI-MSⁿ 质谱数据分析及可能的裂解途径 在 Q ExactiveTM 质谱仪中,埃克替尼以准分子离子峰 $[M+H]^+$ ($m/z=392.1597$) 为前体离子进行 HCD 分析,产生的主要碎片离子已列于表 1,其 HCD 二级质谱图如图 10 所示。

在 HCD 二级质谱图中,丰度比较高的离子 P_2 ($m/z=318.1229$), P_3 ($m/z=304.1074$) 和丰度较低的 P_1 ($m/z=348.1337$), P_4 ($m/z=290.0919$), P_{10} ($m/z=231.0764$) 等碎片离子,均源于喹唑啉 C_6, C_7 位的氧杂环的断裂,可能裂解途径如图 11~13 所示。

由图 11 可知:埃克替尼的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 分别丢失一分子环氧乙烷和二分子环氧乙烷产生碎片离子 P_1, P_3 ; P_1 离子喹唑啉母环 C_4 位的 C—

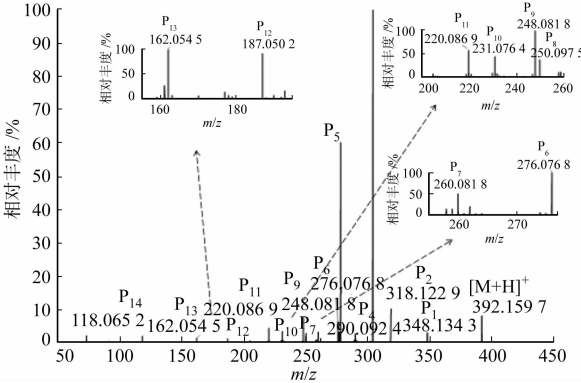


图 10 正离子模式下埃克替尼准分子离子 $[M+H]^+$ 的高能诱导裂解二级质谱图
Fig. 10 HCD-MS² spectra of $[M+H]^+$ of icotinib in ESI positive ion mode

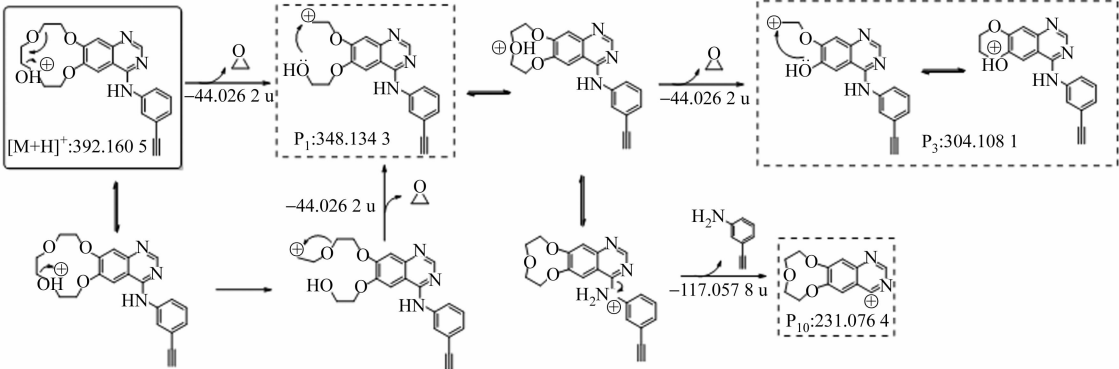


图 11 ESI 正离子模式下埃克替尼可能的裂解途径 I

Fig. 11 Proposed fragmentation pathway I of icotinib in ESI positive ion mode

N 键继续发生断裂丢失一分子的 3-氯-4-氟苯胺(C_6H_5ClFN)产生碎片离子 P_{10} 。其中, P_1 和 P_3 与 Guan 等^[10]研究埃克替尼在小鼠体内代谢物所推测的结构相同。由图 12 可知:埃克替尼喹唑啉母环 C_6, C_7 间的侧链上可能同时发生了 C—C 和 C—O 键的断裂,分别丢失一分子的 1,3-二氧戊环($C_3H_6O_2$)和一分子的(2-甲氧基)乙基乙烯基醚($C_5H_{10}O_2$),产生碎片离子 P_2, P_4 。由图 13 可知:丰度最高的特征离子 P_5 ($m/z=278.0919$)可能源于离子 P_3 ($m/z=304.1074$)脱去一分子乙炔(C_2H_2),且其与厄洛替尼在 HCD 二级质谱图中的特征碎片离子 $m/z=278.0918$ 结构相同。离子 P_5 ($m/z=278.0919$)可脱去 2 个质子形成离子 P_6 ($m/z=276.0768$),也可发生质子迁移重排后,脱去一分子甲醛 $HCHO$ 形成碎片离子 P_9 ($m/z=248.0815$),或脱去一分子 CO 时形成碎片离子 P_8 ($m/z=250.0975$),或脱去一分子水则形

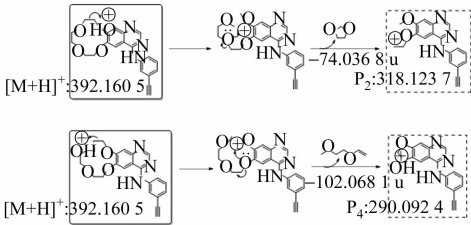


图 12 ESI 正离子模式下埃克替尼可能的裂解途径 II

Fig. 12 Proposed fragmentation pathway II of icoitinib in ESI positive ion mode

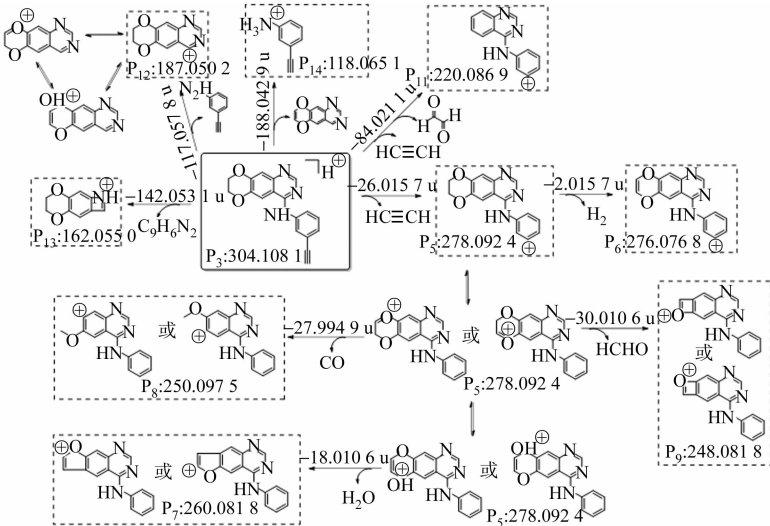


图 13 ESI 正离子模式下埃克替尼可能的裂解途径 III

Fig. 13 Proposed fragmentation pathway III of icoitinib in ESI positive ion mode

成碎片离子 P_7 ($m/z=260.0818$). 此外, 离子 P_3 ($m/z=304.1074$) 脱去 C_4 侧链的一分子乙炔和喹唑啉 C_6, C_7 间的一分子乙二醛后, 可产生碎片离子 P_{11} ($m/z=220.0869$); 而离子 P_3 的喹唑啉 C_4 位的 C-N 键断裂后可产生碎片离子 P_{12} ($m/z=187.0502$) 和 P_{14} ($m/z=118.0654$).

在低分辨的 Bruker 质谱仪中, 埃克替尼经过 CID 二级裂解后产生碎片离子 P_1 ($m/z=348.1$), P_3 ($m/z=304.1$) 和 P_5 ($m/z=278.1$), 如图 14(a) 所示. 对碎片离子 P_1 ($m/z=348.1$), P_3 ($m/z=304.1$) 进行 CID 三级裂解, 形成碎片离子 P_3 ($m/z=304.1$), P_5 ($m/z=278.1$), 以及 P_5 ($m/z=278.1$), P_9 ($m/z=247.8$), P_{11} ($m/z=220.1$), P_{12} ($m/z=187.0$) 和 P_{13} ($m/z=162.1$), 分别如图 14(b), (c) 所示. 埃克替尼 CID 三级裂解得到的碎片离子信息进一步确认了其在 HCD 质谱中的碎片离子结构及裂解途径.

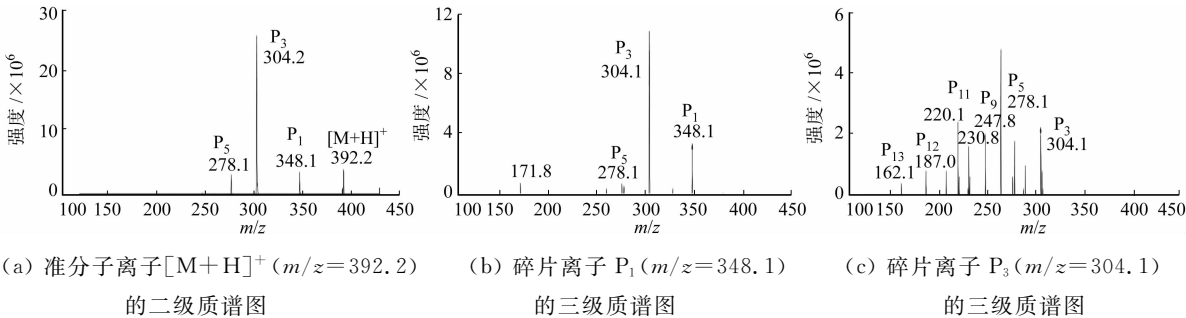


图 14 ESI 正离子模式下埃克替尼的碰撞诱导裂解多级质谱图

Fig. 14 CID-MSⁿ spectrum of icoitinib in ESI positive ion mode

3 结论

通过电喷雾多级串联质谱技术对 3 种以喹唑啉为母核的 TKIs 类药物的质谱特征进行研究, 探讨各自的主要特征碎片离子结构和相应的裂解途径. 3 种 TKIs 药物在一级 ESI 质谱中主要以 $[M+H]^+$

准分子离子形式存在,对其进行 HCD 和 CID 的二级裂解,发现其裂解主要发生在喹唑啉 C₄, C₆ 和 C₇ 位的侧链上,并伴随分子内重排和质子的迁移重排. 吉非替尼的特征碎片离子为 $[C_7H_{14}NO]^+$ ($m/z=128.1$),其源于喹唑啉 C₆ 位丙氧基 C₁-O 键断裂^[6],而非 Lankheet 等^[4]报道的离子 $[C_8H_4N_2]^+$. 厄洛替尼的特征离子是 m/z 为 278.1, 336.1. 其中,文献[4,8]对于 $m/z=278$ 结构的归属存在差异,根据高分辨 HCD 二级碎片离子的精确分子质量和低分辨 CID 三级裂解形成的碎片离子 $m/z=250.1$. 进一步确认其结构为 $[C_{16}H_{12}N_3O_2]^+$,其结构与两篇文献报道的结构都不同. 埃克替尼的特征离子是 m/z 为 278.1, 304.1, 这些碎片离子也均源于喹唑啉 C₄, C₆ 和 C₇ 位侧链相关化学键的断裂. 由于厄洛替尼和埃克替尼仅在喹唑啉 C₆ 和 C₇ 位取代基间存在微小差异,因此在 ESI 多级质谱结中产生结构相同的 $m/z=278.1$ 特征碎片离子 $[C_{16}H_{12}N_3O_2]^+$.

比较这 3 种 TKIs 类药物在两种不同裂解模式质谱仪中的检测结果,发现 HCD 裂解能够能得到更为丰富的碎片离子信息,有效改善药物在 CID 裂解中产生的低质量碎片丢失效应. Thermo 高分辨率质谱仪能够获得更为精确的相对分子质量, Bruker 质谱仪可得到碎片离子的多级质谱裂解信息,可为推测药物的裂解机制提供详细的实验数据. 文中推测的苯胺基喹唑啉类 TKIs 药物的裂解途径,有助于此类药物的结构解析,并对应用质谱技术快速鉴定这 3 种药物的类似物及其代谢物提供理论依据.

参考文献:

- [1] ZHANG Jianming, YANG P L, GRAY N S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(1): 28-39. DOI:10. 1038/nrc2559.
- [2] ZHANG Yi, FICARRO S B, LI Shaojuan, *et al.* Optimized orbitrap HCD for quantitative analysis of phosphopeptides [J]. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20(8): 1425-1534. DOI:10. 1016/j. jasm. 2009. 03. 019.
- [3] SEGU Z M, MECHREF Y. Characterizing protein glycosylation sites through higher-energy C-trap dissociation[J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2010, 24(9): 1217-1225. DOI:10. 1002/rcm. 4485.
- [4] LANKHEET N A, HILLEBRAND M J, ROSING H, *et al.* Method development and validation for the quantification of dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib and sunitinib in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. *Biomedical Chromatography*, 2013, 27(4): 466-476. DOI:10. 1002/bmc. 2814.
- [5] WANG L Z, LIM M Y, CHIN T M, *et al.* Rapid determination of gefitinib and its main metabolite, O-desmethyl gefitinib in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, 879(22): 2155-2161. DOI:10. 1016/j. jchromb. 2011. 05. 056.
- [6] COUCHMAN L, BIRCH M, IRELAND R, *et al.* An automated method for the measurement of a range of tyrosine kinase inhibitors in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(6): 1685-1695. DOI:10. 1007/s00216-012-5970-2.
- [7] HOMEYWELL R, YARZADAH K, GIOVANNETTI, *et al.* Simple and selective method for the determination of various tyrosine kinase inhibitors used in the clinical setting by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010, 878(15/16): 1059-1068. DOI:10. 1016/j. jchromb. 2010. 03. 010.
- [8] SVEDBERG A, GREEN H, VIKSTROM A. A validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantification of erlotinib, OSI-420 and didesmethyl erlotinib and semi-quantification of erlotinib metabolites in human plasma[J]. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 107: 186-195.
- [9] LI Jing, ZHAO Ming, HE Ping, *et al.* Differential metabolism of gefitinib and erlotinib by human cytochrome P450 enzymes[J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(12): 3731-3737. DOI:10. 1158/1078-0432. CCR-07-0088.
- [10] GUAN Zhongmin, CHEN Xiaoyan, WANG Yinxiang, *et al.* Metabolite identification of a new antitumor agent icotinib in rats using liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2008, 22(14): 2176-2184. DOI:10. 1002/rcm. 3599.