

# API-TOFMS 10000 鉴定药物分子结构

朱辉, 黄建鹏

(广州禾信仪器股份有限公司, 广东 广州 510530)

**摘要:** API-TOFMS 10000 是禾信自主研发的一款电喷雾高分辨飞行时间质谱仪, 适合应用于药物研发领域, 是药物结构解析的重要工具。为了考察 API-TOFMS 10000 对离子准确质量数测定准确性及其在新药研发中的应用前景, 对新药研发中涉及的 291 个天然产物及合成物进行了质谱分析。本研究以三氟乙酸钠为内标物对仪器质量轴进行校准, 将测试得到的目标离子准确质量数与理论准确质量数进行对比, 计算两者间的相对误差。实验结果显示, 248 个样品的分子量测试结果与预期一致; 通过对 202 个样品进行了高分辨质谱测试, 实验值与理论准确质量数之间的相对误差均 $\leq 5$  ppm; 其它与预期不一致的实验结果提示样品的结构解析有误, 并得到其他波谱数据验证。研究结果表明, 自主研发电喷雾高分辨飞行时间质谱仪可以提供准确的分子量和分子式等结构信息, 是新药研发中药物分子结构解析的有力工具。

**关键词:** 药物; 分子结构

飞行时间质谱仪 (Time of Flight Mass Spectrometer, TOF-MS) 具有测定质量范围宽 (理论上无质量上限)、响应速度快、分辨率高以及离子传输率高等优点<sup>[1]</sup>。电喷雾 (Electrospray ionization, ESI) 电离属软电离方式, 适用于研究热不稳定、难挥发、极性大的化合物以及蛋白质等生物大分子。两者结合即 ESI-TOF-MS 已发展成为生物制药、基因蛋白质工程和生物化学等研究领域的重要工具之一<sup>[2-8]</sup>。

近年来, 世界医药工业飞速发展, 新药的研究、开发竞争日趋激烈, 而天然产物和微生物代谢产物是极为重要的新药开发资源, 从天然产物和微生物代谢物中寻找新结构活性化合物作为先导化合物, 以此为基础开展新药的合成或半合成研究, 已成为当今化学药品投资研发的热点<sup>[9][10]</sup>。而不论是先导化合物的发现还是新药的合成, 目标化合物的结构解析都是不可或缺的工作<sup>[11][12]</sup>。由于高分辨飞行时间质谱可以通过对化合物准确质量数的测定, 计算出目标化合物的可能元素组成信息 (即分子式), 具有灵敏度高、分析速度快等优点, 目前已成为药物研发中化合物结构鉴定的重要工具<sup>[13-16]</sup>。自主研发的高分辨飞行时间质谱仪 (搭载 ESI 源) 整机由广州禾信分析仪器有限公司于 2011 年研制, 该仪器将在未来 1~2 年实现商品化生产, 该质谱仪的分辨率达到一万以上, 检出限为 2.5 pg/ $\mu$ L (利血平), 质量检测范围是

30Da~5000Da, 完全可以满足药物研发中各种不同结构及类型化合物的准确质量数的测定。

本研究采用国产高分辨质谱仪,对具有不同结构类型的 291 种新药研发中涉及的自然产物或化学合成产物进行了低分辨或高分辨的质谱测试,并在此基础上确定其可能的元素组成。对测定结果进行回访,并与其他波谱数据获得的结果相比较和相互印证,确定国产高分辨质谱仪获得结果的可靠性和在药物开发中的应用前景。

## 1 仪器和试剂

API-TOFMS 10000电喷雾高分辨飞行时间质谱仪, 配备ESI离子源: 广州禾信分析仪器有限公司产品; 注射泵: Harvard Apparatus产品; ApolloMs质谱软件: 广州禾信分析仪器有限公司产品; ChemDraw软件: 苏州苏杰思网络有限公司产品。

甲醇(色谱纯)和甲酸(色谱纯): 德国Merck公司产品; 实验用水为娃哈哈纯净水: 杭州娃哈哈集团有限公司产品, 三氟乙酸钠标准品: Sigma-Aldrich公司产品。所有样品均由中国医学科学院药物研究所各课题组提供, 分别由天然植物提取分离或化学合成得到。

## 2 实验条件

注射泵参数: 注射器内径3.26 mm, 流速15  $\mu\text{L}/\text{min}$

质谱参数: 毛细管温度150  $^{\circ}\text{C}$ , 正离子模式, 离子源电压4500 V; 负离子模式离子, 源电压-3800 V; 质量分辨率10000, 质量扫描范围  $m/z$  50~2000。高分辨质谱测试采用内标法, 以0.1%三氟醋酸钠水溶液为内标物质。

质谱测试流动相或样品溶解的溶剂如: 正离子检测模式下为甲醇: 水 = 4:1 (V/V, 含0.1%的甲酸); 负离子检测模式下为甲醇: 水=4:1 (V/V)。

## 3 数据处理

数据的采集和分析处理采用ApolloMs软件和ChemDraw软件, 利用ApolloMs工作站的质量校正功能, 用三氟乙酸钠的系列离子峰对得到的目标化合物分子离子峰进行质量校正, 测定出其准确质量数, 再根据客户推导的可能分子式用ChemDraw软件计算其理论准确质量数, 最终得到实测准确质量数与理论准确质量数之间的相对误差。

## 4 结果与讨论

本应用研究共检测各种类型的样品 291 个, 其中天然产物 87 个, 合成产物 204 个; 对其中 220 个化合物进行了高分辨质谱测试, 71 个进行了低分辨质谱测试。测试活动结束后, 对客户进行回访, 询问了与其他波谱数据获得的结果一致性和能否相互印证等信息。其中

248 个样品质谱数据与预期的结果相一致；有 43 个样品的质谱测试结果与客户预期结果不一致。与预期结果不一致的样品，客户在其他商品化的质谱仪进一步测试，只有 1 个化合物获得了目标分子离子峰，而其余 42 个样品测试结果与本机上获得的结果相一致。通过与客户沟通分析，对于测试结果与客户预期不一致的原因大致为以下三点：1.合成得到的产物并非是客户的目标化合物，所以质谱结果不是客户的预期结果，提示化学合成过程有问题；2.化合物本身结构不稳定，在测样前发生了结构变化导致质谱结果与客户的预期结果不一致，提示化合物在放置过程中发生变化；3.化合物的纯度不够，提示需要进一步的分离纯化，其中 1 个样品在客户用液相色谱质谱联用仪纯化后再次检测，得到了目标化合物的分子离子峰。

测试结果与目标化学式相一致的天然产物有 76 个，样品的结构类型包括糖苷类、生物碱类、黄酮类、苯丙酸类、苯甲酸类、木质素类、香豆素类、萜类、核苷类、肽类、烯炔类、苯酞类等；测试结果与目标化学式一致的合成产物有 172 个，样品的结构类型主要包括天然产物的衍生物，例如吴茱萸碱衍生物、盐霉素衍生物、小檗碱衍生物、石蒜碱衍生物、黄连碱衍生物等，还包括一些含有苯并咪唑、硫醚键、吡啉环等特征结构的有机化合物。另外，248 个测试结果与目标化学式一致的样品的分子量分布范围较大，主要集中在 100 到 1000 的范围内，分子量最小的样品为 145 Da 的氮杂环化合物，分子量最大的样品是 1142Da 的吡啉环特征结构化合物，样品分子量分布情况见图 1。以上结果充分说明，本质谱仪对各种不同结构类型的药物小分子化合物具有很好的鉴定能力。

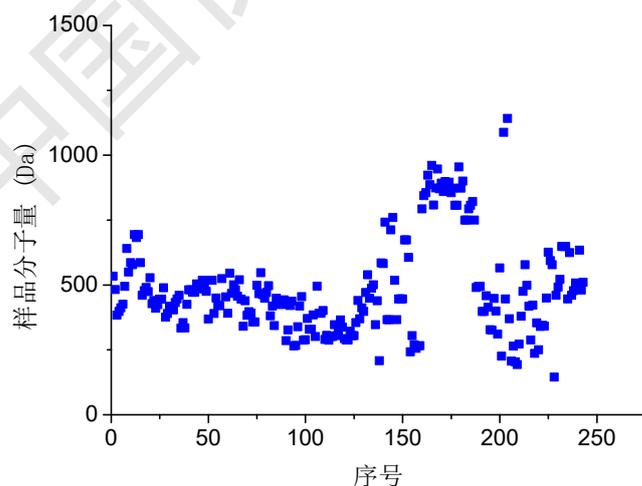


图1 样品分子量的分布图

Fig.1 The molecular weight distribution of compounds

#### 4.1 各种类型化合物的质谱解析实例分析

### 1) 黄酮类化合物

黄酮类化合物共测试25个。其中化合物IJB1702为黄酮苷类化合物，HH-4为查尔酮类化合物，对这两个化合物都进行了高分辨质谱测试，测试结果参见表1，对应的高分辨质谱图见图3。从图中可以看出，高分辨质谱图峰型良好，信噪比高。准确质量数计算结果显示，质量误差小于5 ppm。

表1 黄酮类化合物IJB1702和HH-4的高分辨质谱测试结果

Table1 The high resolution mass spectrometry of flavonoids IJB1702 and HH-4

编号	分子式	分子离子峰	理论准确质量数/Da	实测准确质量数/Da	相对误差/ppm
IJB1702	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	445.1140	445.1142	0.45
HH-4	C <sub>49</sub> H <sub>52</sub> O <sub>28</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	1111.2537	1111.2572	3.15

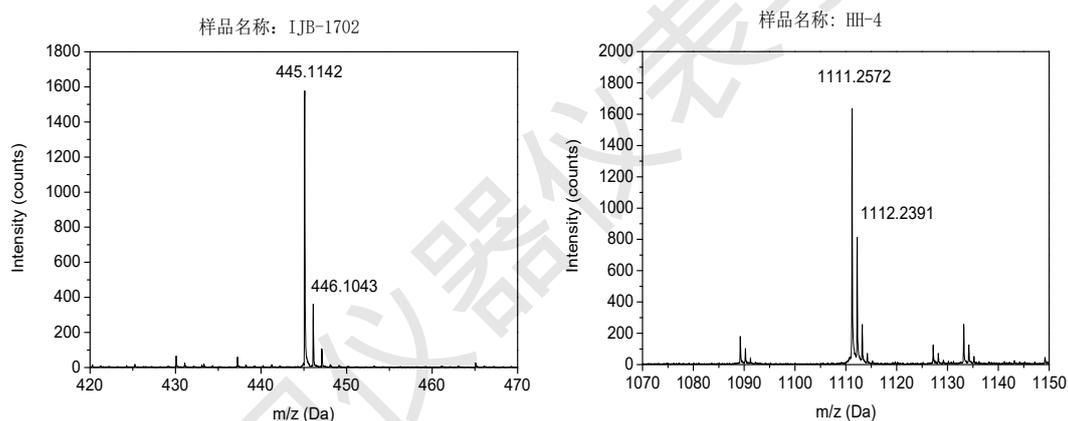


图3 黄酮类化合物IJB1702和HH-4的质谱图

Fig.3 Mass spectra for IJB1702 and HH-4 of flavonoids

化合物HBJ-21为黄酮苷类化合物，但分子量未知。对其进行了正、负离子模式的低分辨质谱测试来确定其分子量，方便进一步的化学式推导。图4为HBJ-21的质谱图。从谱图可以看出，在负离子模式下离子峰 $m/z$  625.14丰度最高，且大于它的质量数的地方无明显其他峰出现，可以初步推断 $m/z$  625.14为分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>，该化合物分子量可能为626；在正离子检测模式下，可观察到基峰离子 $m/z$  649.13，正好与626相差23个质量数，符合正离子可能为[M+Na]<sup>+</sup>分子离子峰的推断。因此通过两种离子化模式质谱分析结果可以判定该化合物的分子量为626。后经客户意见反馈，结合其他波谱数据，该化合物分子式推导为C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub>，与本实验结果完全一致。

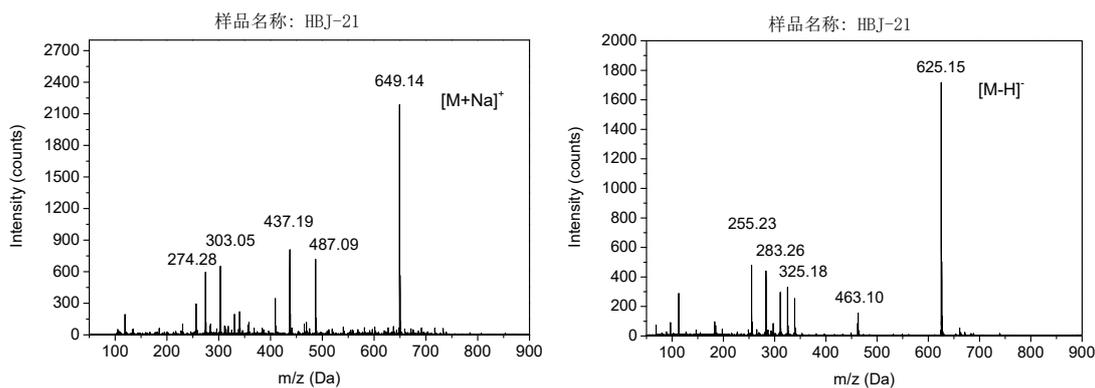


图4 黄酮类化合物HBJ-21的质谱图

Fig.4 Mass spectra for HBJ-21 of flavonoids

## 2) 生物碱类化合物

生物碱类化合物共测定109个。由于石蒜碱具有很好的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗白血病作用<sup>[17][18]</sup>，而黄连碱也有文献报道其有抑制A型单胺氧化酶、选择性抑制和双重抑制血管平滑肌细胞增殖、抑制破骨细胞分化和功能、选择性调节血管平滑肌细胞中的多药耐药蛋白质、抗真菌、胃黏膜保护、细胞毒、心肌保护等一些药理活性，近年来，以黄连碱的药理活性为基础，以改善黄连碱在成药性方面的不足为手段的黄连碱衍生物研究也成为药物研究领域的一个新热点<sup>[19][20]</sup>，吴茱萸次碱是传统中药吴茱萸中重要的生物碱成分，经药理学研究表明具有心脏保护作用、降压、舒血管作用、抗血栓形成作用、抗癌作用以及抗炎、镇痛等作用<sup>[21]</sup>。石蒜碱衍生物LY-1、LY-2，黄连碱衍生物XMA-33、XMA-64和吴茱萸次碱衍生物L-6在正离子检测模式下主要观察到[M+H]<sup>+</sup>分子离子峰，精确分子量测量结果参见表2，质谱图分别参见图5、图6和图7。

L-6化合物含有氯元素，从质谱图中可以明显看到该化合物同位素峰的丰度比与自然界的氯元素同位素丰度比（约3:1）相一致，结果见图7。该研究结果表明，国产高分辨飞行时间质谱仪能准确测定化合物的分子质量及同位素丰度的信息。

表2 生物碱类化合物的高分辨质谱测试结果

Table2 The high resolution mass spectrometry of alkaloids

样品编号	分子式	分子离子峰	理论准确质	实测准确质	相对误差
			量数/Da	量数/Da	
LY-1	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	288.1230	288.1231	0.35
LY-2	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	290.1387	290.1386	0.34

XMA-33	$C_{28}H_{22}N_2O_6 \cdot HCl$	$[M+H]^+$	483.1551	483.1553	0.41
XMA-64	$C_{27}H_{19}F_3N_2O_4 \cdot HCl$	$[M+H]^+$	493.1370	493.1379	1.83
L-6	$C_{18}H_{12}ClN_3O$	$[M+H]^+$	322.0742	322.0741	0.31

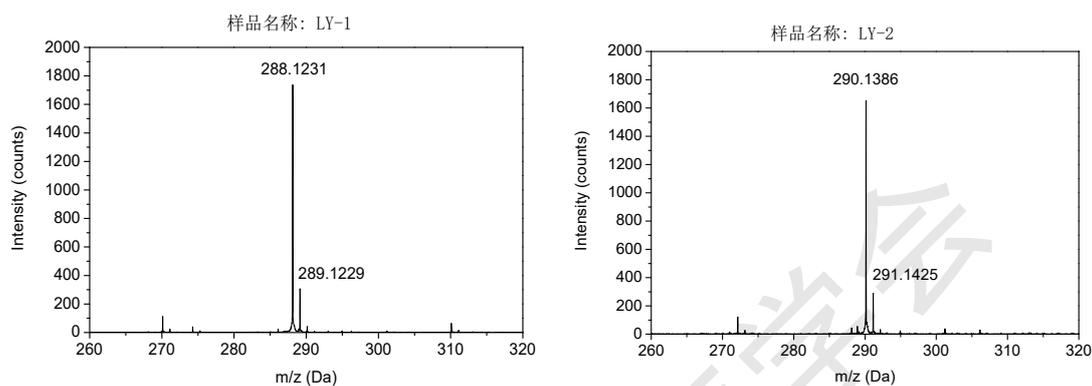


图5 生物碱类化合物LY-1和LY-2的高分辨质谱图

Fig.5 High resolution mass spectra for LY-1 and LY-2 of alkaloids

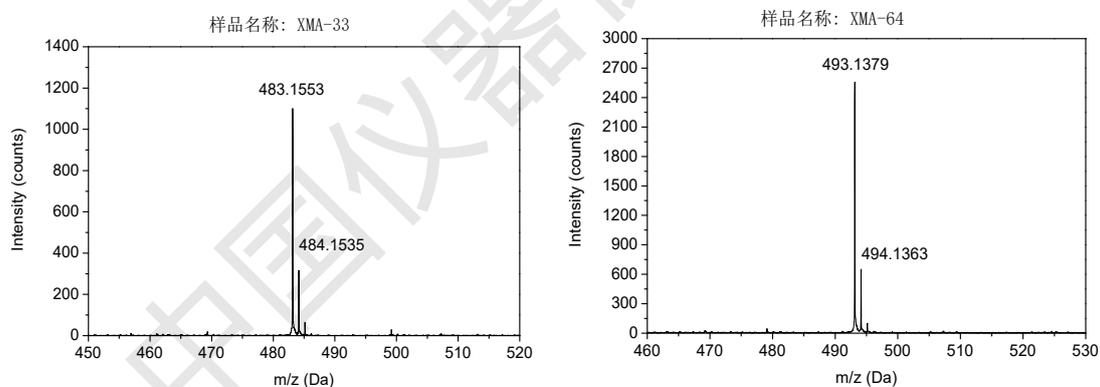


图6 生物碱类化合物XMA-33和XMA-64的高分辨质谱图

Fig.6 High resolution mass spectra for XMA-33 and XMA-64 of alkaloids

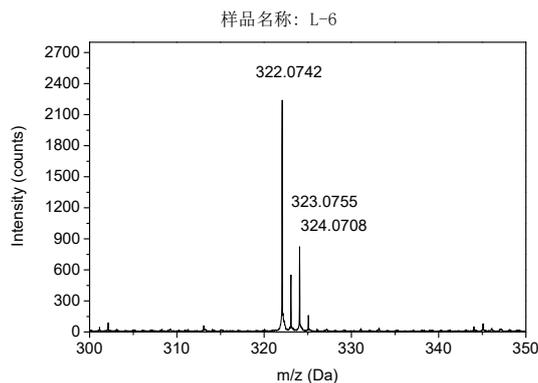


图7 生物碱类化合物L-6的高分辨质谱图

Fig.7 High resolution mass spectra for L-6 and L-7 of alkaloids

### 3) 苯丙素类化合物

苯丙素类化合物主要分为苯丙酸、香豆素、木质素三大类。本研究共对13个苯丙素类化合物进行了质谱测试，其中XK-24化学式为 $C_{17}H_{18}O_9$ ，属于苯丙酸类化合物，低分辨质谱中观察到分子离子峰为 $[M+Na]^+$ ，XK-27的化学式为 $C_{15}H_{16}O_9$ 属于香豆素类化合物，低分辨质谱中观察到分子离子峰为 $[M-H]^-$ 。XK-24和XK-27的低分辨质谱图参见图8。sjj-w76和sjj-w96则为木质素类化合物，进行了高分辨测试，精确分子量测定结果见表3，质谱图见图9。

表3 木质素类化合物sjj-w76和sjj-w96的高分辨质谱测试结果

Table3 The high resolution mass spectrometry of lignins sjj-w76 and sjj-w96

编号	分子式	分子离子峰	理论准确质量数/Da	实测准确质量数/Da	相对误差/ppm
sjj-w76	$C_{17}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	365.0878	365.0883	1.37
sjj-w96	$C_{32}H_{38}O_{20}$	$[M+Na]^+$	765.1849	765.1847	0.26

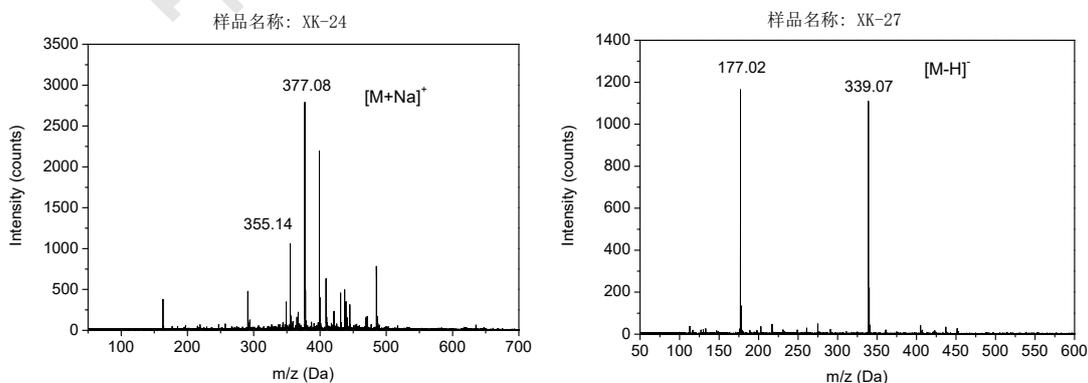


图8 苯丙素类化合物XK-24和XK-27的低分辨质谱图

Fig.8 Low resolution mass spectra for XK-24 and XK-27 of phenylpropanoids

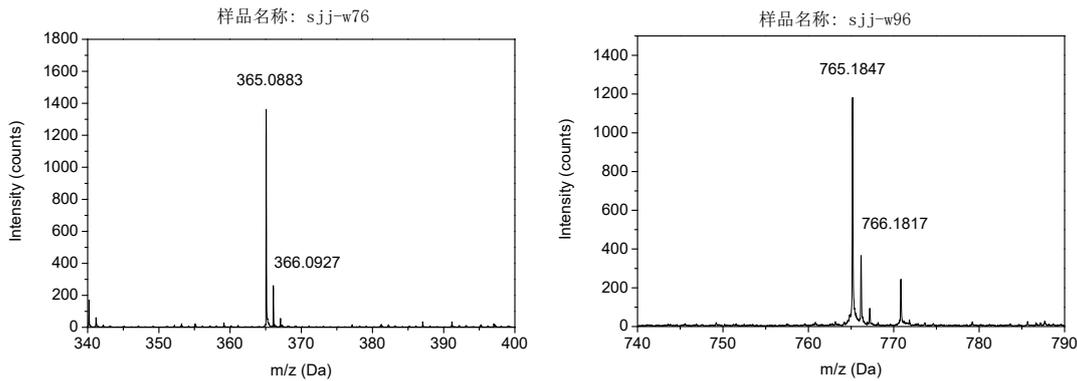


图9 木质素类化合物sjj-w76和sjj-w96的高分辨质谱图

Fig.9 High resolution mass spectra for XK-24 and XK-27 of lignins

## 4.2 高分辨质谱测试准确性

本研究工作中，对220个化合物进行了高分辨质谱测试，以考察该国产仪器对准确质量数测定的准确性。同时通过高分辨质谱分析，证明了其中202个样品的结构推导正确，该202个样品的高分辨质谱测试相对误差都5 ppm以内。此结果表明国产高分辨飞行时间质谱仪在化合物精确分子量测试中具有较高的准确度，可以很好区分不同元素组成的质量数相近的化合物。

为了确认高分辨质谱测试的准确性，本研究还将API-TOFMS 10000电喷雾高分辨飞行时间质谱仪与SCIEX公司的QSTAR Elite型Q/TOF高分辨串联质谱仪进行了对比试验，分别测试了抗癌药马来酸阿法替尼和降糖药利格列汀杂质的高分辨质谱，测试结果见图11和图12。QSTAR Elite的分辨率为1万，与API-TOFMS 10000的分辨率一致，对比两款仪器的高分辨结果，经由QSTAR Elite测试得到马来酸阿法替尼和利格列汀杂质的准确质量数与理论准确质量数间的相对误差分别为3.65ppm和1.74ppm，都在5ppm范围内，经由API-TOFMS 10000测试得到马来酸阿法替尼和利格列汀杂质的准确质量数与理论准确质量数间的相对误差分别为1.03ppm和1.56ppm，也在5ppm范围内。另外，QSTAR Elite和API-TOFMS 10000测试得到马来酸阿法替尼的准确质量数之间的相对误差为2.47ppm，利格列汀杂质的准确质量数之间的相对误差为3.13ppm，从上述相对误差值可以判断国产高分辨飞行时间质谱仪与国际同类产品对药物分子准确质量数的测试结果无显著差异，都能为药物分子结构鉴定提供可靠信息。

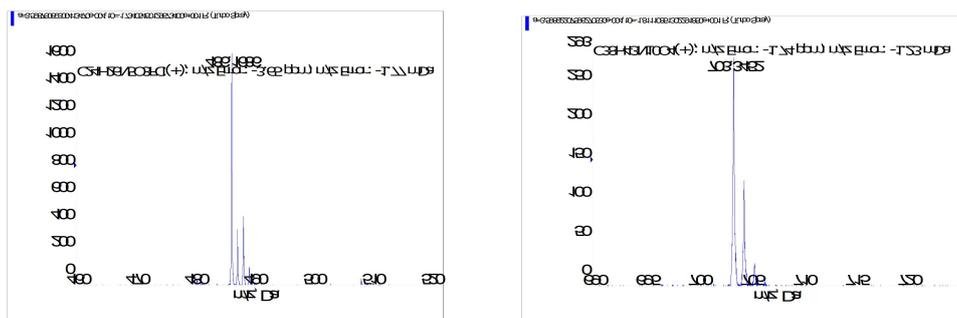


图11 马来酸阿法替尼和利格列汀杂质的QSTAR Elite高分辨质谱图

Fig.9 The QSTAR Elite high resolution mass spectra of afatinib dimaleate and linagliptin impurity

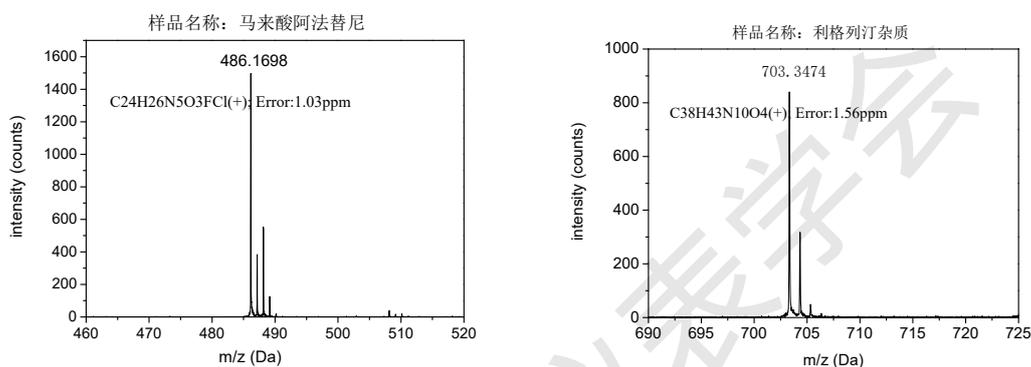


图12 马来酸阿法替尼和利格列汀杂质的API-TOFMS 10000高分辨质谱图

Fig.12 The API-TOFMS 10000 high resolution mass spectra of afatinib dimaleate and linagliptin impurity

## 5 小结

质谱测试是药物分子结构解析的重要手段之一，低分辨质谱测试可以通过正、负离子检测模式初步确定化合物的分子量信息，而高分辨质谱测试可以通过对化合物准确质量数的测定来计算出化合物的可能元素组成。本研究采用的国产高分辨飞行时间质谱仪 API-TOFMS 10000 拥有正、负离子两种检测模式，并可以对化合物进行高分辨的质谱测试。从本研究来看，该仪器适用的小分子药物结构种类也较全面。此外，国产高分辨飞行时间质谱仪具有同位素遵从性强的优点，高分辨测试结果拥有较高的准确度，所有样品测定准确质量数与理论质量数的相对误差都能控制在 5 ppm 以内。综上所述，国产高分辨飞行时间质谱仪能够提供准确的分子量及分子式信息，是一种药物分子结构解析鉴定的重要工具，将在新药研发领域具有非常好的应用前景。

## 参考文献

[1] Williamson L N, Bartlett M G. Quantitative gas chromatography/ time-of-flight mass

- spectrometry: a review[J]. *Biomedical Chromatography*, 2007, 21(7): 664-669.
- [2] 郭长娟, 黄正旭, 高伟, 等. 大气压离子源真空接口的研制及其在电喷雾电离飞行时间质谱仪上的应用[J]. *分析仪器*, 2007, (2): 17-21.
- [3] 贾韦韬, 许国宾, 姚均, 等. 高效液相色谱检测器—高分辨飞行时间质谱仪的研制[J]. *质谱学报*, 2006, 27(3): 129-134.
- [4] 莫婷, 胡帆, 朱辉, 等. 台式大气压离子源飞行时间质谱仪的研制及性能表征[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(3): 307-312.
- [5] 胡长平, 李元建. 吴茱萸碱和吴茱萸次碱的药理学研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(10): 1084-1087.
- [6] 郭长娟, 黄正旭, 陈华勇, 等. 飞行时间质谱仪国内研究状况及发展趋势[J]. *现代仪器*, 2007, 4: 23-26.
- [7] 杭纬, 杨充原, 杨成隆, 等. 瞬短脉冲辉光放电飞行时间质谱仪 [J]. *质谱学报*, 1995, 16(3): 9-14.
- [8] Guilhaus M. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry[J]. *J. Mass Spectrom*, 1995, 30(11): 1519-1532.
- [9] Wang Y. Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the postgenome era: an industrial view in drug research and development[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2008, 7(3): 395-406.
- [10] 陈彬, 孔继烈. 天然产物结构分析中质谱与核磁共振技术应用新进展[J]. *化学进展*, 2004, 16(6): 863-870.
- [11] 尚慧杰. 中药新药开发中应注意的问题研究[J]. *亚太传统医药*, 2014, 10 (2): 56-57.
- [12] Zhao Y, Kang L, Yu H, et al. Structure characterization and identification of steroidal saponins from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* by ultra performance liquid chromatography and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2013, 341: 7-17.
- [13] Hoffmann de E, Stroobant V. *Mass spectrometry principles and applications*[M]. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- [14] Liao W, Draper W M, Perera S K. Identification of unknowns in atmospheric pressure ionization mass spectrometry using a mass to structure search engine[J]. *Analytical chemistry*, 2008, 80(20): 7765-7777.
- [15] 梁乾德, 王红霞, 李卫华, 等. 直接输注电喷雾电离四极杆飞行时间质谱在十六种中药来

源化合物定性分析中的应用[J]. 质谱学报,2004 (4): 209-216.

- [16] Kebarle P, Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 1993, 65(22): 972A-986A.
- [17] 李健, 于淼, 高世勇, 等.石蒜科植物中生物碱的药理作用研究[J].哈尔滨商业大学学报 (自然科学版), 2014, 30(2) : 168-171.
- [18] Lamoral-Theys D, Andolfi A, Van Goietsenoven G, et al. Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli : an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight[J]. Journal of medicinal chemistry, 2009, 52(20): 6244-6256.
- [19] 张志辉, 邓安珺, 于金倩, 等.黄连碱药理活性研究进展[J].中国中药杂志, 2013,38(17): 2750-2754.
- [20] Zhang Z H,Zhang H J,Deng A J,et al.Synthesis and Structure– Activity Relationships of Quaternary Coptisine Derivatives as Potential Anti-ulcerative Colitis Agents[J].Journal of medicinal chemistry,2015,58(18): 7557-7571.
- [21] 胡长平, 李元建.吴茱萸碱和吴茱萸次碱的药理学研究进展[J].中国药理学通报,2003,19(10): 1084-1087.