

液质联用分析甲锭前体甲基化产物

符迈进, 徐 霞, 艾秀珍, 朱京科*

(浙江大学材料与化工学院化工系, 浙江 杭州 310027)

摘 要: 利用反相高效液相色谱-质谱联用方法分析了甲锭前体甲基化产物。以甲醇:水=75:25 为流动相, 流量为 0.15 mL/min, 在 Hypersil ODS(21×100 mm, 3 μm), 检测波长 254 nm 的色谱条件下分离甲基化目标产物与杂质。采用质谱对甲基化反应液的主要组分进行鉴定, 确定了甲基化的主要产物。通过 HPLC 检测的方法对反应中反应产物的检测, 研究表明在反应温度为 160 ℃, 反应时间为 4 h, 甲锭前体与硫酸二甲酯摩尔比为 1:5 的条件下, 甲锭前体的收率为 96.1%, 目标产物的纯度可达到 92.3%。

关键词: 液质联用; 甲锭; 甲基化反应

中图分类号: O 657.6 **文献标识码:** A

文章编号: 0367-6358(2007)05-272-03

Analysis of Methidium's Precursor Methylates by HPLC-MS

FU Mai-jin, XU Xia, AI Xiu-zhen, ZHU Jing-ke*

(College of Materials Science and Chemical Engineering Zhejiang University, Zhejiang Hangzhou 310027, China)

Abstract: The analysis of methidium's precursor methylates was carried out by reversed phase liquid chromatography with UV and MS detectors. On a Hypersil ODS column, separation was achieved in a methanol:water=75:25 solvent system. The seven peaks were separated, and four peaks were identified by electrospray mass spectrometry. By studying the reaction, the optimal reaction conditions are reaction temperature with 160 ℃, reaction time with 4 h and the ratio of methidium's precursor and DMS with 1 to 5. Under such conditions, the product with purity of 92.3% could be obtained.

Key words: HPLC-MS; methidium; methylation

2, 7-二氨基-9-羧苯基-10-甲基菲啶(methidium, 简称甲锭)是一种 DNA 嵌入剂, 其结构式见图 1。甲锭与丙二胺和 EDTA 反应可制备甲锭衍生物(MPE)^[1]。MPE 具有强的亲和力, 能与 Ni、Mg、Fe 等螯合物形成 MPE·Ni(II)、MPE·Mg(II) 和 MPE·Fe(II), 螯合物能够与 DNA 结合, 促使 DNA 的断裂^[2]。因此, 甲锭及其衍生物 MPE 在确定药物的作用位点、染色体结构和药物药理等多个方面, 以及在 DNA 重组中都有广泛应用^[2-6]。甲锭可由 2-氨基联苯经硝化、酰化、环化、甲基化和还原等反应而合成^[1]。

其中甲基化反应的条件较为苛刻, 易产生副产物。

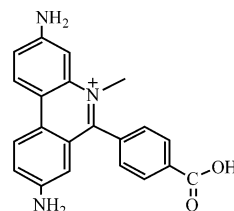


图 1 甲锭结构式

如能够了解甲基化反应产物的组成, 则对甲基化反应条件的优化和产物提纯具有重要的指导意义。本文应用液质联用方法分离分析甲锭合成中甲

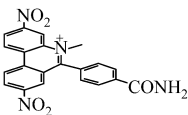
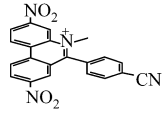
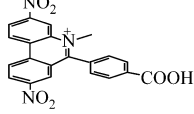
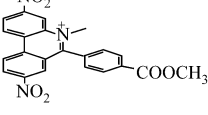
收稿日期: 2006-08-25; 修回日期: 2007-03-10

作者简介: 符迈进(1983~), 男, 湖南益阳人, 硕士生, 主要从事有机合成和仪器分析, Tel: 0571-87933034, E-mail: fm531@163.com

* 联系人: Tel: 0571-87951977, E-mail: jingkezhu@zju.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 主要色谱峰对应离子峰的质荷比

产物 序号	保留时间 / min	分子离子峰 的质荷比	化合物鉴定
峰 B	2.531	—	原料
峰 D	4.040	403.1	
峰 E	6.088	385.3	
峰 F	8.200	404.0	
峰 G	10.974	418.1	

由各峰的离子质量并结合保留时间和甲基化反应特点可推断反应液中主要组分的结构,推断结果列于表 1 中的最后一列。

色谱图中保留时间为 2.531 min 的色谱峰与原料的色谱峰保留时间一致,可推断为原料峰。保留时间为 6.088 min 处的色谱峰 E,其对应的分子离子峰的质荷比为 385.3,与甲基化反应目标产物的离子质量一致,推断为甲基化正常产物峰。保留时间为 4.040 min 和 8.200 min 的色谱峰 D 和色谱峰 F 对应的离子质荷比分别为 403.1 和 404.0。由于反应液中可能含有微量的水,目标产物中的腈基发生水解反应生成相应的酰胺或羧酸($m/z = 403$ 和 404),所以推断该二峰分别是目标物的水解产物酰胺和羧酸。对于保留时间为 10.974 min 的色谱峰 G,其离子质量为 418.1,符合目标产物的羧酸甲酯,推断该峰为目标产物的羧酸甲酯化产物。

2.2 实验条件的优化

通过 HPLC 方法对该甲基化反应的实时检测,可以优化该甲基化反应的反应条件。本实验在不同的反应温度、反应时间和原料摩尔比条件下,以目标组分收率和纯度作为评定指标,对该甲基化反应进行了研究,其研究结果如表 2 所示。

由表 2 可知,甲锭前体甲基化反应的收率和目标产物的纯度与该反应的反应温度、反应时间和原料摩尔比相关。反应温度过高,甲基化反应中硫酸二甲酯会因达到分解温度而分解,反应时间过长也会造成副产物的增多,目标产物的纯度降低。通过优化实验条件,本实验选用的适宜的反应条件为反

应温度为 160 ℃,反应时间为 4 h,甲锭前体与硫酸二甲酯摩尔比为 1:5。

表 2 反应温度、反应时间和原料比对甲基化反应的影响

实验 编号	反应 温度/℃	反应 时间/h	原料摩尔比 (甲锭前体 硫酸二甲酯)	收率/%	纯度/%
1	190	1	1:5	12.6	91.7
2	180	1	1:4	74.6	90.6
3	175	2	1:3	83.2	82.6
4	170	3	1:4	89.9	94.6
5	160	4	1:4	91.5	90.8
6	160	4	1:5	96.1	92.3
7	150	8	1:6	86.3	93.1

3 结论

本文建立了甲锭前体甲基化产物的 HPLC-MS 检测方法。采用反相色谱系统可以较好地分离甲锭前体甲基化反应物中的主要成份。通过质谱分析获得各峰的离子质量(m/z)信息,结合保留时间,可得出 9-对苯腈基-2,7-二硝基菲啶在反应条件下,不仅可以进行甲基化反应,还可以在甲基化过程中使产物进行一步的氧化,形成酰胺、羧酸和羧酸甲酯等。通过高效液相色谱对反应的实时检测,优化了该甲基化反应的反应条件。研究表明,在反应温度为 160 ℃、反应时间为 4 h、甲锭前体与硫酸二甲酯摩尔比为 1:5 的条件下,目标产物的纯度可达到 92.3%,甲锭前体的收率为 96.1%。

参考文献:

[1] Konakahara T, Wurdeman R L, Gold B. Synthesis of an *N*-methyl-*N*-nitrosoarealinkedtoamethidi-umchloride analogue and its reactions with ^{32}P End Labeled DNA [J]. Biochemistry, 1988, 27: 8606-8613.

[2] Hertzberg R P, Dervan P B. Cleavage of DNA with methidiumpropyl EDTA⁺ iron (II): reaction conditions and product analyse [J]. Biochemistry, 1984, 23: 3934-3945.

[3] Hertzberg R P, Dervan P B. Cleavage of double helical DNA by (methidiumpropyl EDTA) iron(II) [J]. J Am Chem Soc, 1982, 104: 313-315.

[4] Ward B, Skorobogaty A, Dabrowiak J C. DNA cleavage specificity of a group of cationic metalloporphyrins [J]. Biochemistry, 1986, 25: 6875-6883.

[5] Urbach A R, Love J J, Ross S A. Structure of a β -alanine linked polyamide bound to a full helical turn of purine tract DNA in the T-1 motif [J]. J Mol Biol, 2002, 320: 55-71.

[6] Astrand C, Klenka T, Wrange O. Trichostatin A reduces hormone induced transcription of the MMTV promoter and has pleiotropic effects on its chromatinstructure [J]. Eur J Biochem, 2004, 271: 1153-1162.