

## 乳酸左氧氟沙星的飞行时间质谱裂解规律研究

李前荣, 尹 浩

(中国科学技术大学结构分析重点实验室, 安徽 合肥 230026)

**摘要:** 采用不同电子能量的 EI 和不同反应气压力的 CI 电离方式, 研究了乳酸左氧氟沙星(LL)的半水合物飞行时间质谱(TOFMS)的裂解规律。结果表明: 乳酸左氧氟沙星难以产生喹诺酮特有的裂解产物; 当电离能量为 25 eV 时, 所得 EI 谱的碎片离子丰度明显大于 70 eV 所得离子的丰度; 当反应气由正常压力  $1 \times 10^{-2}$  Pa 降低到  $1 \times 10^{-3}$  Pa 时, CI 谱中碎片离子丰度由极小变大, 其强度与 EI(70 eV) 所得离子丰度相当。

**关键词:** 质谱学; 裂解规律研究; 飞行时间质谱(TOFMS); 乳酸左氧氟沙星; 左氧氟沙星

**中图分类号:** O 657. 63; R 718. 19    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-2997(2003)04-486-05

乳酸左氧氟沙星(Levofloxacin lactate, LL)是氧氟沙星(Oxofloxacin, OFX)的 S 型左旋立体异构体的乳酸盐, 是新一代喹诺酮类广谱抗菌药物<sup>[1]</sup>。主要作用于细菌的脱氧核糖核酸(DNA)拓朴异构酶 II, 抑制细菌 DNA 的复制和转换, 达到抗菌作用<sup>[2]</sup>。对多种革兰氏阳性菌和阴性菌都有较强的抗菌活性, 已广泛用于呼吸系统和泌尿系统疾病。近来还出现有关 LL 用于治疗伤寒、眼部等炎症的报道<sup>[3, 4]</sup>, 并有很好的疗效。本工作拟应用飞行时间质谱(TOFMS)的高灵敏度分辨, 能自动给出分子和离子的元素组成以简化解谱过程等特点<sup>[5]</sup>, 对 LL 进行不同电子能量和反应气压力的 EMS 和 CMS 的测定和分析, 给出该化合物分子的质谱裂解途径, 分析不同条件下碎片离子的特征。

### 1 实验部分

#### 1.1 主要仪器和测试条件

GCT 飞行时间质谱仪: 英国 Micromass 公司产品。电离方式: EI(70 eV / 25 eV) 和 CI(甲烷气,  $1.0 \times 10^{-2}$  Pa /  $1.0 \times 10^{-3}$  Pa); 离子源温度

200 ; 分辨率 8 000 FWHM。EI 收集电流 100  $\mu\text{A}$ 。进样杆温度 30 保持 0.5 min, 再以每分钟升温 50 的速率升至 400 保持 2 min。用全氟三丁基胺作内标在  $m/z$  263.9870 处对 EI 作单点锁定矫正精确质量, 用三(三氟甲基)三嗪在  $m/z$  286.0027 (284.9949 的  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) 处对 CI 作单点锁定矫正精确质量。

#### 1.2 样品和测试方法

所测样品为白色针状结晶, 经核磁共振、红外光谱、元素分析确认其成分和结构(示于图 1)为左氧氟沙星乳酸盐的半水合物。将样品配成浓度为 5% 的甲醇溶液, 取该溶液 0.5  $\mu\text{L}$  (EI) 或 2  $\mu\text{L}$  (CI) 直接进样。样品中各组分精确质量的测量和元素组成的确定使用 MassLynx 中 OpenLynx 软件自动进行。

### 2 结果与讨论

无论是 EI 还是 CI, 在乳酸左氧氟沙星的半水合物的质谱图中都只出现左氧氟沙星的分子离子峰。以下分析内容均为左氧氟沙星(LVFX)

收稿日期: 2003-04-04; 修回日期: 2003-09-02

作者简介: 李前荣(1949~), 男(汉族), 上海市人, 副研究员, 有机化学专业, 从事有机物的合成和化学分析研究

E-mail: lqrsc@ustc.edu.cn

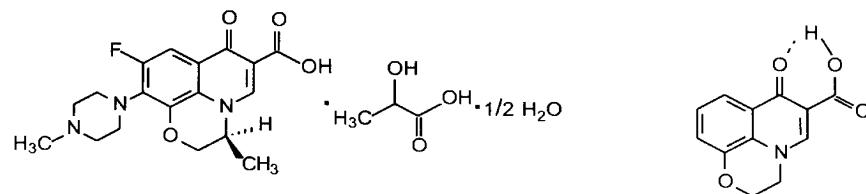


图1 左氧氟沙星乳酸盐的半水合物的结构

Fig. 1 Geometric structure of levofloxacin lactate semihydrate

的TOFMS。表1和表2分别列出了左氧氟沙星的EI和CI在不同电子能量和反应气压力下的质谱数据。从表中数据可见,各离子的实测质量与其理论值相比,绝大多数离子质量的相对误差

在 $5 \times 10^{-6}$ 量级以下(数据未列出),少数在 $1.0 \times 10^{-5}$ 量级左右(低质量的 $m/z$  71除外),这样的精确质量所对应的分子离子和碎片离子元素组成具有很高的可信度。

表1 左氧氟沙星的EI质谱数据

Table 1 Mass spectrum data of MS-EI for levofloxacin (LVFX)

离子 (Ion)	分子式 (Formula)	计算质量 (Calculated mass)	EI (70 eV)			EI (25 eV)		
			实测质量 (Measured mass)	误差/mDa	丰度/%	实测质量 (Measured mass)	误差/mDa	丰度/%
M	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> F	361.1438	361.1436	-0.2	100.0	361.1434	-0.4	100.0
A	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	317.1540	317.1536	-0.4	12.1	317.1517	-2.3	76.4
B	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	246.0805	246.0830	2.5	8.8	246.0806	0.1	26.1
C	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N	71.0735	71.0755	2.0	8.5	71.0745	1.0	25.7
D	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	231.0570	231.0582	1.2	4.9	231.0581	1.1	19.6
E	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	204.0461	204.0502	4.1	1.0	-	-	-
F	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	316.1461	316.1478	1.7	3.0	316.1428	-3.3	14.8
G	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	302.1305	-	-	-	302.1308	0.3	5.6
H	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	300.1148	-	-	-	300.1121	-2.7	4.3
I <sup>*</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	289.1590	289.1266	-32.4	1.1	289.1248	-34.2	3.7

\*此离子的数据相对误差在 $1 \times 10^{-4}$ 量级以上,不能用来确认其元素组成。

表2 左氧氟沙星的CI质谱数据

Table 2 Data of MS-CI for levofloxacin (LVFX)

离子 (Ion)	分子式 (Formula)	计算质量 (Calculated mass)	CI(CH <sub>4</sub> : 1.0 × 10 <sup>-2</sup> Pa)			CI(CH <sub>4</sub> : 1.0 × 10 <sup>-3</sup> Pa)		
			实测质量 (Measured mass)	误差/mDa	丰度/%	实测质量 (Measured mass)	误差/mDa	丰度/%
M + H	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> F	362.1516	362.1506	-1.0	100.0	362.1537	2.1	33.9
M	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> F	361.1438	361.1449	1.1	22.9	361.1431	-0.7	100.0
M-OH	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> F	344.1410	344.1450	4.0	21.2	344.1445	3.5	25.1
A	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	317.1540	317.1534	-0.6	3.3	317.1543	0.3	10.6
B	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	246.0805	246.0777	-2.8	1.4	246.0824	1.9	8.9
C	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N	71.0735	71.0747	1.2	0.6	71.0748	1.3	3.5
D	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	231.0570	231.0533	-3.7	0.4	231.0550	-2.0	3.6
F	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> F	316.1461	-	-	-	316.1505	4.4	2.4

## 2.1 EI 的质谱裂解途径

左氧氟沙星的分子离子  $M^+$  ( $m/z$  361, 100%), 在两种电离条件(70 eV / 25 eV)下均形成基峰。 $M^+$  通过失去  $CO_2$  得到较强的奇电子阳离子 A,  $m/z$  317 (12 1% / 76 4%)。上述两种离子的结构都相当稳定, 是由于其环状结构和共轭大  $\pi$  键所决定的。阳离子 A 的下一步裂解是哌嗪环的破裂, 得到奇电子离子 B,  $m/z$  246 (8 8% / 26 1%), 或 C,  $m/z$  71 (8 5% / 25 7%), 这两种离子的丰度大小几乎相同。由此可以推测: 在该分裂之前, 离子 A 的电荷定位在哌嗪环中的两个氮原子上的几率是均等的。碎片离子 B 进一步失去甲基得到丰度较小而结构较为稳定的  $m/z$  231 (4 9% / 19 6%) 离子 D。该离子在 70 eV 条件下勉强可以失去 HCN 产生丰度极小的  $m/z$  204 (1 1% / 0%) 离子 E, 而在 25 eV 条件下不出现此离子。另外, 离子 A 还可以失去哌嗪环的手性碳上的氢游离基, 形成共轭体系更大的正离子 F,  $m/z$  316 (3% / 15%)。以上裂解碎片离子 (A、B、C、D、F) 在电子能量为 70 eV 和 25 eV 情况下均能出现, 且后者比前者所得离子丰度明显增大(列于表 1 和示于图 2)。进一步分析, 在电子能量为 25 eV 时还出现了由离子 A 丢失自由基  $\cdot CH_3$  产生离子 G; 由离子 F 失去  $CH_4$  分子得离子 H。这些分裂在 70 eV 时看不见。在一般的喹诺酮及其衍生物质谱中, 都会出现明显的缩环反应(失去  $CO$ ), 和失去喹诺酮环上的 HCN

eV 条件下勉强可以失去 HCN 产生丰度极小的  $m/z$  204 (1 1% / 0%) 离子 E, 而在 25 eV 条件下不出现此离子。另外, 离子 A 还可以失去哌嗪环的手性碳上的氢游离基, 形成共轭体系更大的正离子 F,  $m/z$  316 (3% / 15%)。以上裂解碎片离子 (A、B、C、D、F) 在电子能量为 70 eV 和 25 eV 情况下均能出现, 且后者比前者所得离子丰度明显增大(列于表 1 和示于图 2)。进一步分析, 在电子能量为 25 eV 时还出现了由离子 A 丢失自由基  $\cdot CH_3$  产生离子 G; 由离子 F 失去  $CH_4$  分子得离子 H。这些分裂在 70 eV 时看不见。在一般的喹诺酮及其衍生物质谱中, 都会出现明显的缩环反应(失去  $CO$ ), 和失去喹诺酮环上的 HCN

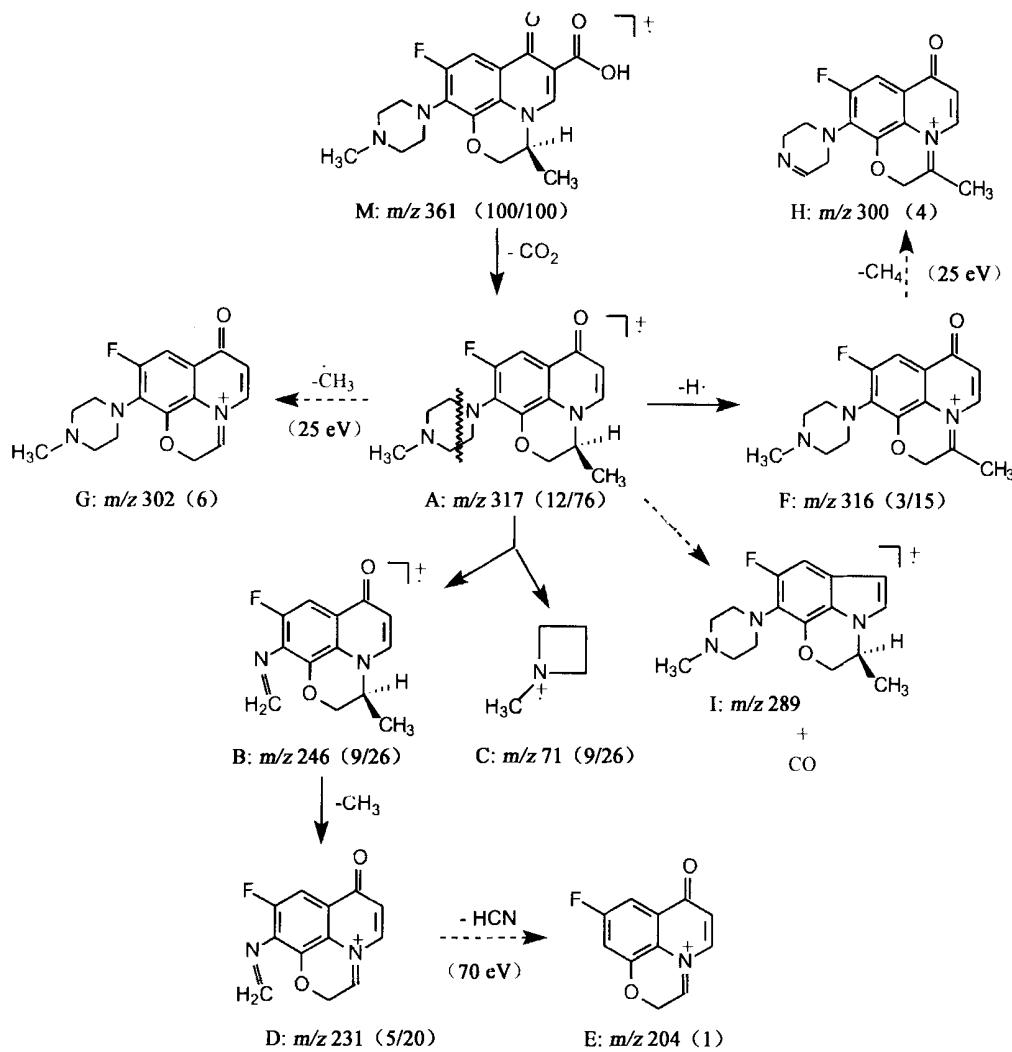


图 2 左氧氟沙星的裂解途径  
(括号内的两个数字分别为 70 eV 和 25 eV 电离能量所测得的离子丰度)

Fig. 2 Fragmentation pathway of levofloxacin

(The two data within parentheses are ion abundances measured under 70 eV and 25 eV, respectively)

的碎片离子<sup>[6,7]</sup>, 但LVFX 的飞行时间质谱难以生成以上离子(虽然出现了碎片离子 I, 70 eV 为  $m/z$  289.126.6, 25 eV 为  $m/z$  289.124.8, 但与理论计算值  $m/z$  289.159.0 的相对误差在  $1.0 \times 10^{-4}$  量级以上, 不能确认为 A 丢失 CO 的裂解过程)。由此可见, 由于恶嗪环参与了喹啉环的稠合作用, 使分子构成碳环和杂环多边稠合的结构。因此 LVFX 分子结构中的喹诺酮环比一般的喹诺酮化合物更加稳定。另外双键上的羧基存在, 不但使共轭体系加大, 而且可能使稠环增多(示于图 1B), 进一步稳定了 LVFX 的分子结构, 使它的分子离子成为基峰。

## 2.2 CI 的质谱裂解特征

在正常反应气(甲烷)压力( $1.0 \times 10^{-2}$  Pa)下, 准分子  $[M + H]^+$  离子的丰度为 100% (基峰), 碎片离子 A、B、C、D、G 的丰度极小, 甚至不出现。当反应气压力降低到  $1.0 \times 10^{-3}$  Pa 时, 准分子  $[M + H]^+$  离子的丰度降低到 34%, 而碎片离子 A、B、C、D、G 的丰度增大, 其强度与正常 EI(70 eV)条件下的相近。这说明反应气压力过小时, 为 CI 与 EI 混合模式。此外, 两种 CI 情况下除了都出现分子离子外, 同时还出现了  $[M - OH]^-$  离子。它们的丰度都不算小(21% /25%), 而后者  $[M - OH]^-$  在 EI 谱中不出现。

## 3 结 论

(1) TOFMS 只出现左氧氟沙星(LVFX,  $C_{18}H_{20}N_3O_4F$ )的分子离子。左氧氟沙星的分子离子非常稳定, 在 EI 及正常反应气压力的 CI 条件下  $[M + H]^+$  的丰度均为 100% (基峰)。

(2) 左氧氟沙星分子难以产生喹诺酮特有的裂解, 如失去 CO、HCN 等。苯环上的氟原子不

会脱落。对于 EI 在电离能量为 25 eV 条件下的所有碎片离子的丰度均大于 70 eV 所得到的丰度。

(3) 在 CI 谱中, 左氧氟沙星的准分子离子  $[M + H]^+$ , 反应气(甲烷)处于正常压力( $1.0 \times 10^{-2}$  Pa 附近)时, 丰度为 100%, 压力减小至  $1.0 \times 10^{-3}$  Pa 时丰度明显减小至 34%。对于碎片离子, 反应气压力处于正常范围时, 丰度极小甚至不出现, 压力减小时丰度变大。CI 谱易出现左氧氟沙星分子的  $[M - OH]^-$  离子。

## 参 考 文 献:

- [1] Mori K, Chikako M, Takasuna K, et al Mechanism of Histamine Release Induced by Levofloxacin, a Fluoroquinolone Antibacterial Agent [J]. European J Pharm, 2000, 394: 51~ 55.
- [2] 杜平华, 朱世真, 陈涛. 乳酸左氧氟沙星体外抗菌作用的研究[J]. 药物分析杂志, 2001, 5: 333~ 335.
- [3] 张友山, 金立军, 袁承泰, 等. 乳酸左氧氟沙星治疗伤寒的临床观察[J]. 中国医师杂志, 2002, 4(9): 1038~ 1039.
- [4] 蔡鸿生, 罗顺德, 刘强, 等. 乳酸左氧氟沙星滴眼药在兔眼中的药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(7): 391~ 393.
- [5] Watt AP, Pike A, Morrison D. Determination of the Collisionally Activated Dissociation of a Substituted Indole by Orthogonal Acceleration Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. Am Sci Mass Spect, 2001, 12: 1145~ 1152.
- [6] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 317~ 321.
- [7] 俞振培, 赵亚军, 贺晓然, 等. 喹诺酮衍生物质谱碎裂规律的研究[J]. 质谱学报, 1996, 1: 21~ 26.

## Study on Fragmentation Regularity of Levofloxacin Lactate by Time-of-Flight Mass Spectrometry

L IQ ian-rong, Y N Hao

*(Structure Research Laboratory, University of Science & Technology of China, Hefei 230026, China)*

**Abstract** Time-of-Flight Mass Spectrometry (TOFMS), with different electron energy for EI and different gas pressure for CI, of half aquo complex of levofloxacin lactate (LL) were studied. There was no molecular ion of LL as well as its half aquo complex in both EMS and CMS, but molecular ions with abundance of 100% of levofloxacin (LVFX) in both EI and CI  $[M + H]^+$  mass spectra were appeared. A prominent fragmentation route of LVFX was an elimination of CO<sub>2</sub> from molecular ion at  $m/z$  361, forming cation A at  $m/z$  317, followed by the cleavage of piperazine ring creating cation B at  $m/z$  246 and C at  $m/z$  71. Further fragmentation pathway was the formation of cation D at  $m/z$  231 from B. All the abundances of fragment measured under 25 eV in EI were greater than those under 70 eV. For CMS with normal gas pressure (0.01 Pa), the abundance of  $[M + H]^+$  ion appears as 100%, whereas all of abundances of fragment ions were very small. When the gas pressure were reduced to  $1 \times 10^{-3}$  Pa, the abundance of  $[M + H]^+$  ion were reduced to 34%, whereas all of abundances of fragment ions in CMS were increased as large as those from the normal EMS.

**Key words:** mass spectrometry; study on fragmentation regularity; time-of-flight mass spectrometry (TOFMS); levofloxacin lactate; levofloxacin

(上接第 500 页)

## Progress in Identification of Protein Phosphorylation by Mass Spectrometry

HUANG Zhen-yu<sup>1</sup>, YU Yan-ling<sup>1,2</sup>, FANG Cai-yun<sup>1</sup>, YANG Peng-yuan<sup>1</sup>

*(1. Chemistry Department, Fudan University, Shanghai 200433, China;*

*2. Pharmaceutical College, Secondary Military Medical University, Shanghai 200433, China)*

**Abstract** Protein phosphorylation is a key event in signal transduction. To understand signaling processes, we must first acquire an inventory of phosphoproteins and their phosphorylation sites under different conditions. Because phosphorylation is a dynamic process, elucidation of signaling networks also requires quantitation of these phosphorylation events. In this article, we outline several methods for enrichment of phosphorylated proteins and peptides and discuss various options for their identification and quantification with special emphasis on mass spectrometry-based techniques.

**Key words:** mass spectrometry; proteomics; review; phosphorylated protein; pep tide