

伊维菌素在电喷雾质谱中的行为 及其机理的研究^{*}

吴增茹 朱丽荔 骆宏鹏 徐筱杰

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

[摘要]用电喷雾飞行时间质谱(ESI-TOF-MS)研究了伊维菌素在 ESI 正、负离子检测方式下的加合和碎裂行为。正离子检测方式下的最佳有机溶剂浓度为 50 % 甲醇。在 nozzle 电压为 120V 时, $[M + NH_4]^+$ 响应最强, 而 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 响应在 300V 达最大值。伊维菌素在 ESI-MS 中, 得不到 $[M + H]^+$ 峰。负离子的最佳有机溶剂浓度为 90 % 甲醇, 低 nozzle 电压时加合离子的强度很高, 主要形成 $[M + Cl]^-$ 、 $[M + HCOO]^-$ 、 $[M + CH_3COO]^-$ 和 $[M + C_3H_5O_3]^-$, 加大 nozzle 电压, 碎裂峰强度增加, 主要是失掉一个氢, 以及在此基础上再失掉一个或两个水分子、糖基, 及反 Diels-Alder 碎片的峰。当 nozzle 电压为 200V 时, $[M - H]^-$ 峰达最大值。

关键词:伊维菌素 电喷雾 质谱

电喷雾质谱(ESI-MS)是近年来发展并完善起来的一种分析手段。除了具有质谱法的高特异性和灵敏度外, 它还具有离子化条件温和、适用范围宽、谱图简单、可与高效液相色谱联用等优点。它不但在化合物结构确定方面起着重要作用, 而且在复杂基质中的微量分析中具有强大优势。在 ESI 源中化合物离子化行为不同于传统的电子轰击(EI)源, 离子的碎裂相对简单, 但容易出现复杂的加合离子, 研究这些碎裂和加合离子对研究化合物结构和性质以及优化 ESI 条件有重要意义^[1]。正交加速技术的出现成功地实现了 ESI 与飞行时间质谱(TOF-MS)的联用。TOF-MS 能够提供各种离子的高分辨数据, 使得研究离子化行为相对容易, 证据充分^[2]。

伊维菌素(Ivermectin)(Figure 1)是一种重要的抗寄生虫药物^[3]。它的活性极强, 抗虫谱广, 在农业生产中起着重要的作用。伊维菌素在食品中的残留有严格的限量。被广泛采用的分析方法为液相色谱荧光衍生化法, 该方法分离、净化和衍生化等步骤非常复杂^[4,5], 人们一直期望用质谱法来完成这一工作。最早用质谱法确定动物组织中的伊维菌素是将牛肝提取物直接导入化学电离源, 用串联质谱检测^[6]。随着液相色谱质谱联用

2000 - 12 - 13 收

^{*}国家自然科学基金项目 29573095 资助

第一作者简介:吴增茹,女,30岁,博士生

(LC/MS)技术的发展,Heller^[7]等将化学电离负离子检测方式用来分析牛奶和牛肝中伊维菌素。随后 Turnipseed^[8]等用该方法确定了多种组织中的伊维菌素。电喷雾质谱用于伊维菌素的分析尚无报道,本研究系统探讨伊维菌素在电喷雾质谱中加合和碎裂行为,并对机理进行初步讨论。

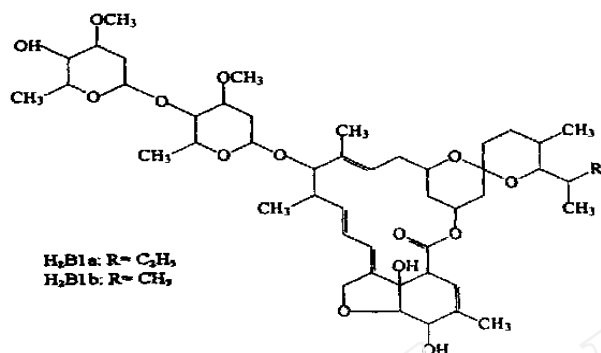


Figure 1 The structure of ivermectin

1 实验部分

1.1 仪器及实验条件

Mariner 型 ESI-TOF 质谱仪 (Applied Biosystems, USA), 采用注射泵连续进样方式, 流速为 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 气帘流速 3 ml/min , 雾化气流速 0.3 ml/min , 喷雾电压为 4500V, Nozzle 和四级杆温度均为 140 $^{\circ}\text{C}$, 检测器电压为 2250V, Nozzle 电压与谱图直接相关, 其它条件与标样调机最佳条件一致, 质谱采集速度为 3s/spectrum, 总离子流图平稳后采集 20 个谱, 谱图处理取 20 个谱的平均值; HP 1100 型高效液相色谱仪 (Agilent USA) 手动进样器 20 μl 进样管, 四元梯度泵, 流速 1 ml/min , 在线脱气, 可变波长检测器, 检测波长为 245nm, 液相色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C8 4.6 $\times$ 15cm (Hewlett-Packard, USA); 其它仪器有 MVS-1 型旋涡混合器 (北京北德科学器材有限公司, 中国), RE-52A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂, 中国)。

1.2 试剂及样品处理

甲醇为 HPLC 级, (Fisher scientific, USA); 水为二次水经 Milli Q 纯水系统纯化 (Millipore, Bedford, MA, USA); 正离子标准品为 Bradykinin acetate salt、Neurotensin acetate salt、Angiotensin I acetate salt 和 Apomyoglobin 的等比混合物 (Sigma, USA); 负离子标准品为 Oligop (dT) 6 ammonium salt (midland certified, USA); 氯化钠和醋酸铵为 p. a. 级 (Acros Organic, USA); 伊维菌素由中国农业大学动物医学院李俊琐教授惠赠, 用甲醇配成储备液含 $\text{H}_2\text{B1a}$ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $\text{H}_2\text{B1b}$ 2.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 实验中只考虑不同条件对 $\text{H}_2\text{B1a}$ 的影响。用前将储备液用液相色谱脱盐, 在 10% 甲醇水条件下, 分 10 次将 200 μl 伊维菌素储备液注入, 继续用 10% 甲醇水洗 30 分钟, 改用 95% 甲醇水洗脱, 收集色谱峰, 在旋转蒸发器上 40 $^{\circ}\text{C}$ 蒸干, 按要求配成不同溶液, 总量按 20 μg 计算。

2 结果与讨论

2.1 ESI 正离子检测方式形成加合离子的行为和机理

2.1.1 质谱峰的认定及溶剂条件的优化

伊维菌素 H_2B_{1a} 单同位素的理论分子量为 874.5078, 在以下讨论各种条件时, 在质谱图上除了低质量数的溶剂背景峰 (< 300) 外, 只出现 3 组峰 (Figure 2), 它们单同位素的整数质量为 892, 897, 913。其中 892 的峰在加高 nozzle 电压时会消失。根据 897 与 874 差 23 个质量数, 以及 913 与 874 差 39 个质量数, 可以初步判断它们为伊维菌素加 Na^+ 峰, 和加 K^+ 峰。用 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 峰作为内标, 重新校订标尺, 得出 892 峰的精确质量为 892.5409。计算分子组成为 $C_{48}H_{78}NO_{14}$, $[M + NH_4]^+$ 的理论质量为 892.5417, 误差为 0.9ppm。同位素组成符合率为 98.2%。因此 892 峰被认为是 $[M + NH_4]^+$ 。

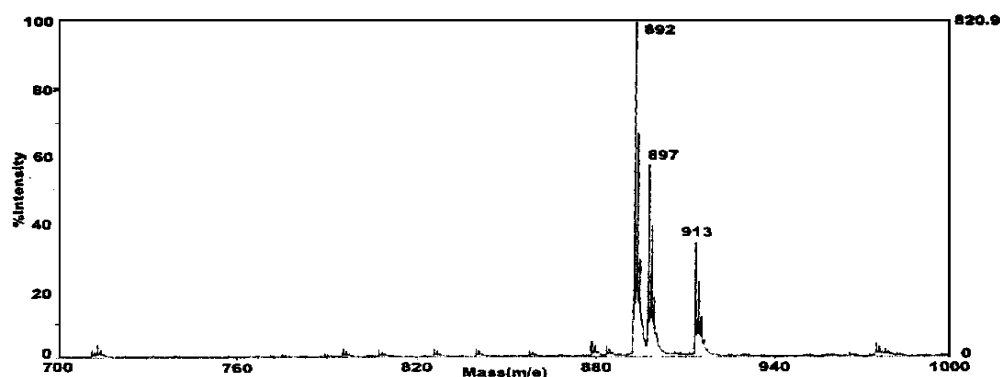


Figure 2 The positive ion spectrum of ivermectin (Nozzle potential 120V)

为了优化伊维菌素的质谱行为, 研究中采用了不同的溶剂条件。选择了甲醇、乙腈、水和乙酸的不同配比来溶解伊维菌素, 结果表明溶剂中有机溶剂及酸的不同含量对各种正离子和总离子流有很大影响, 当溶剂选用甲醇: 水为 1:1 (v/v) 时, 灵敏度达到最大值, 故在以下研究中, 配制的伊维菌素溶液, 均含 50% 的甲醇。伊维菌素的最终浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 。

2.1.2 NH_4Ac 浓度对正离子质谱图的影响

为了进一步证实 892 峰是 $M + NH_4^+$, 在 nozzle 电压为 120V 时, 测定 $10\mu\text{g/ml}$ 伊维菌素不同溶剂中 NH_4Ac 对 892 峰强度的影响。甲醇的浓度为 50%, 另外 50% 的溶剂分别为水或不同浓度的醋酸铵溶液。结果列于 Table 1。

Table 1 The effects of different NH_4Ac concentration to the intensity of positive ions *

NH_4Ac concentration(%)	peak intensity(area)		
	$[\text{M} + \text{NH}_4]^+$	$[\text{M} + \text{Na}]^+$	$[\text{M} + \text{K}]^+$
0	2990	602	357
0.05	11083	421	195
0.10	10543	544	205
0.20	9246	526	270
1.00	4202	174	42

* Experimental conditions :Nozzle potential(120V) ,Solvent (methanol : NH_4Ac solution = 1 1)

由 Table 1 可见 ,加大 NH_4^+ 离子浓度有利于形成 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$,同时对 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 峰有一定的抑制作用 ,因而进一步证实 892 峰为 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 。当 NH_4^+ 离子浓度进一步增大时 ,反而不利于提高灵敏度 ,说明溶液中自由离子浓度过高 ,不利于化合物离子化。为了提高 892 峰的灵敏度认为 NH_4Ac 浓度的最佳浓度为 0.05 %。

2.1.3 nozzle 电压对各种离子质谱图的影响

实验发现 ,nozzle 电压对各种离子质谱图有很大的影响。用 0.05 % NH_4Ac 水溶液与甲醇 1 1 作为溶剂 ,测定 $10\mu\text{g/ml}$ 的伊维菌素在不同 nozzle 电压下的质谱 ,将各种单同位素离子的峰面积对 nozzle 电压作图 ,见 Figure 3。

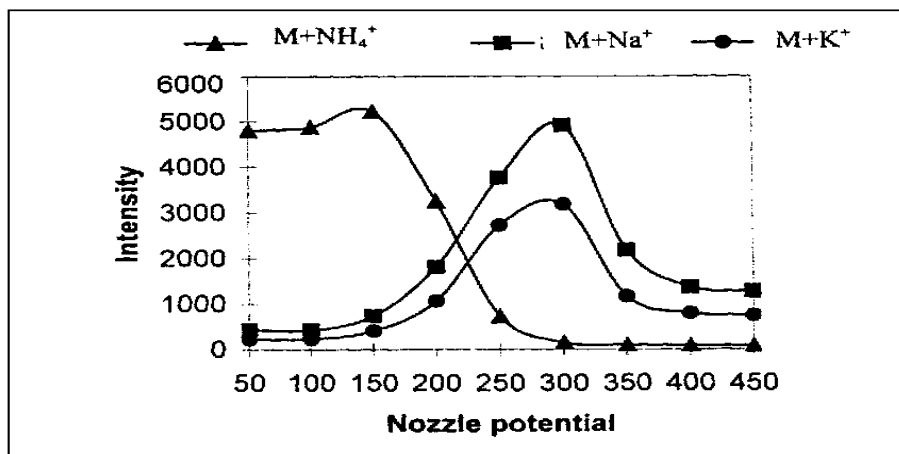


Figure 3 The effects of nozzle potential to the intensity of different adducting ions

由 Figure 3 可见 ,在低 nozzle 电压时 ,溶剂中离子的浓度对形成加合离子的形式起着决定性的作用 ,当加大 nozzle 电压时 ,则由亲和能力决定形成什么样的离子。 Na^+ 和 K^+ 与

伊维菌素形成和合离子的能力强于 NH_4^+ 离子。实验中发现,加大 nozzle 电压还可以使背景降低,简化图谱,过高的 nozzle 电压会使离子碎裂,灵敏度降低。在正离子模式,只观察到离子的响应降低,并未观察到明显的碎片离子。

值得一提的是,如果溶剂中不添加 NH_4Ac , $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 的强度随 nozzle 电压的变化趋势与加 NH_4Ac 是一致的,这说明虽然 Table 1 中所列数据显示,加大 NH_4^+ 离子浓度会在一定范围内降低 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 的强度,但改变 nozzle 电压,对 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 的强度起着决定性的作用。

2.1.4 酸对质谱的影响

一个有趣的现象为在改变各种离子化条件过程中终未观察到 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰,伊维菌素表现出对 Na^+ , K^+ 和 NH_4^+ 的亲合力远大于 H^+ ,为了强化 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰,研究中加入不同浓度的 HAc ,结果列于 Table 2。

Table 2 The effects of different HAc concentration to the intensity of positive ions^{*}

HAc concentration(%)	peak intensity(area)			
	$[\text{M} + \text{H}]^+$	$[\text{M} + \text{NH}_4]^+$	$[\text{M} + \text{Na}]^+$	$[\text{M} + \text{K}]^+$
0	0	6939	766	332
0.10	0	7134	1185	521
1.00	0	5964	617	356

* Experimental conditions :Nozzle potential(120V) ,Solvent (methanol : HAc solution = 1 :1)

由 Table 2 可见,加大溶液中 H^+ 的浓度并不能促使出现 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰,并且高浓度的酸会抑制离子化,在 ESI 过程中化合物与游离离子的亲和行为与液相中是有差别的。类似的现象也出现在基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)中,熊少祥等^[9]在杯芳烃化合物的 MALDI-TOF 结构表征研究中,也报道了一些化合物的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰强度很小或没有,而 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 峰响应很高,这种现象主要发生在不含氨基或酰氨基的化合物中。

2.2 ESI 负离子检测方式形成加合离子的行为和机理

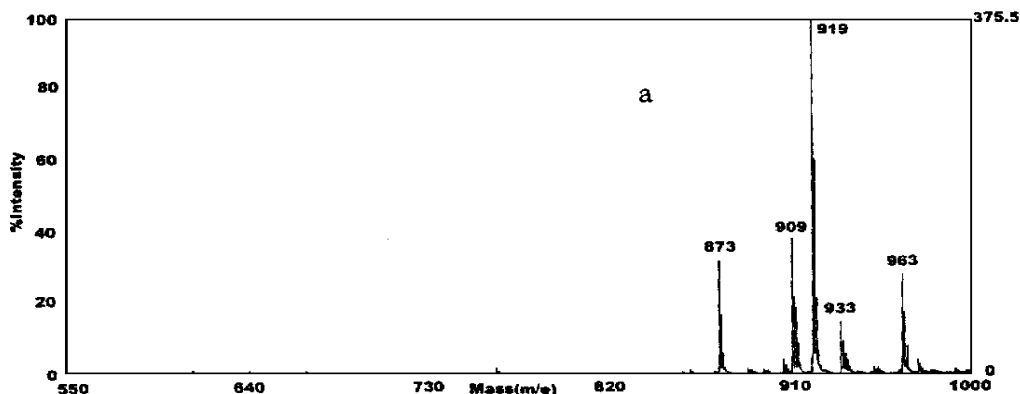
2.2.1 负离子形式质谱峰的认定及溶剂条件的优化

伊维菌素 H_2B_{1a} 负离子的加合和碎裂行为比较复杂,出现了多种加合和碎裂离子。用负离子标准品 Oligo p (dT) 6 校正仪器标尺,单同位素质量为 873 峰的精确质量为 873.5362,伊维菌素 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 的理论质量 873.4995,误差 42ppm,在外标法允许范围之内,认为单同位素为 873 的峰为 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 峰。将 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 峰校成理论质量,单同位素质量为 909 的质量为 909.4841,根据 873 与 909 整数质量差 36,以及 909 峰的同位素分布初步判断,909 峰为 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 峰,计算 909 峰的元素组成为 $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{14}\text{Cl}$,理论质量为 909.4762,误差为 8.76ppm,同位素匹配率为 99.6%。用 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 和 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 的理论质量重新校订标尺,对相应的 963,933,919,855,837,763,761 和 567 峰取精确质量,进行元素组成分析,确定它们分别为 $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3]^-$, $[\text{M} + \text{CH}_3\text{COO}]^-$, $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$, $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$, $[\text{M} - 2\text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$, $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2]^-$, $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2]^-$ 和 $[\text{M} - \text{sugar moieties}]^-$,数据列于 Table 3,(谱图示于 Figure 4-c),谱图中 887 的峰为 $[\text{H}_2\text{B}_{1b} + \text{Cl}]^-$ 峰。

Table 3 The mass and elemental composition of ESI negative ions of ivermectin

Experimental mass	Elemental Composition	Theoretical mass	Error (ppm)	Isotope Match score (%)	Possible Ion form
567.3026	$C_{34}H_{34}O_7$	567.3316	29.0	98.0	[M-sugar moieties] ⁻
761.4262	$C_{42}H_{65}O_{12}$	761.4471	- 27.0	32.9	[M - $C_6H_9O_2$] ⁻
763.4526	$C_{42}H_{67}O_{12}$	763.4627	- 13.2	99.8	[M - $C_6H_7O_2$] ⁻
837.4862	$C_{48}H_{69}O_{12}$	837.4784	9.4	76.7	[M - $2H_2O - H$] ⁻
855.4978	$C_{48}H_{71}O_{13}$	855.4889	10.3	92.3	[M - $H_2O - H$] ⁻
873.4995	$C_{48}H_{74}O_{14}$			99.9	[M - H] ⁻
909.4762	$C_{48}H_{74}O_{14}Cl$			99.6	[M + Cl] ⁻
919.5047	$C_{49}H_{75}O_{16}$	919.5050	- 0.32	97.3	[M + HCOO] ⁻
933.5117	$C_{50}H_{77}O_{16}$	933.9206	- 9.54	97.1	[M + CH_3COO] ⁻
963.5309	$C_{51}H_{79}O_{17}$	963.5312	- 0.23	99.7	[M + $C_3H_5O_3$] ⁻

单同位素整数质量为 963 的峰,通过精确质量计算,为在分子上加合了一个元素组成为 $C_3H_5O_3$ 的带负电的基因,估计可能的存在形式为脱氢的甘油醛,有待进一步的证据证实。单同位素整数质量为 761 的峰,其同位素分布符合率偏低,是由于 763 的峰的影响, $M+2$ 峰的强度偏差较大。ESI 负离子化方式,碎片图谱与文献报道^[7] APCI 碎裂方式一致。文献中认为 763 碎片是反 Diels-Alder 反应产物,本实验的高分辨数据,进一步证实了这一解释的可靠性,由 763 碎片进一步失去两个 H 后形成 761 碎片。虽然 ESI 是“软电离”方式,不易产生碎片,但实验中还是出现了一定强度的碎片峰。为了减小歧意,对于未知样品建议采用 HPLC 进样方式,可以判断不同峰来自不同物质,或是同一物质的加合或碎片离子。



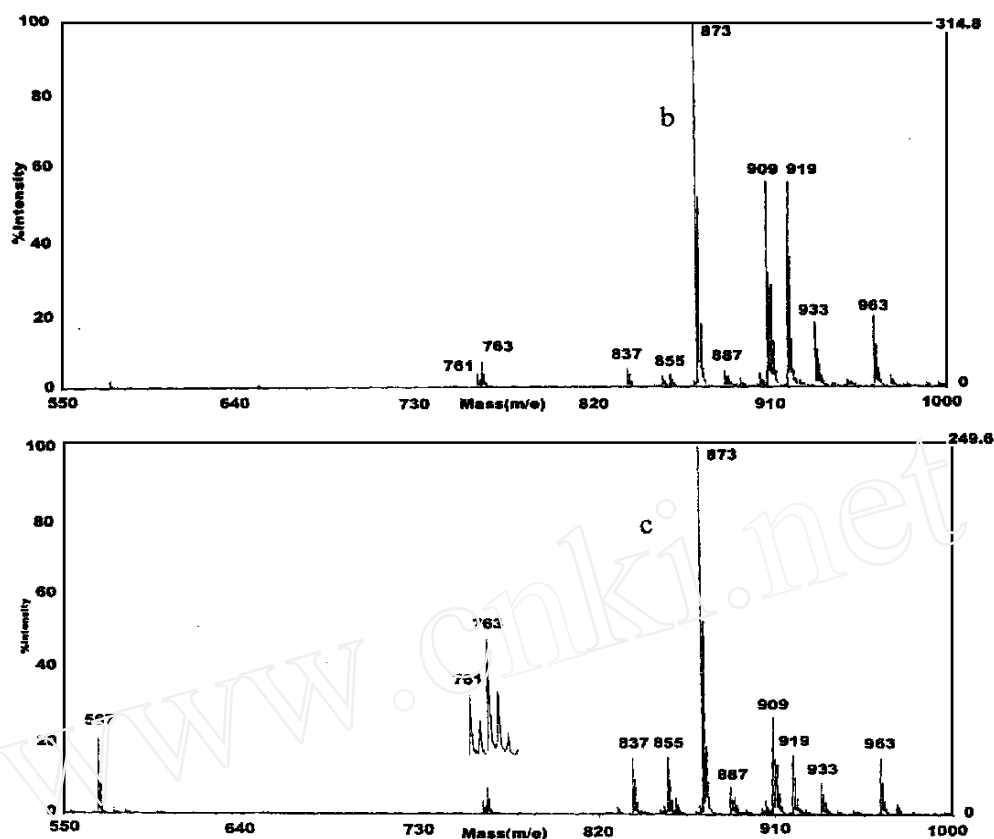


Figure 4 The negative ion spectrum of ivermectin(a. nozzle potential 100V ,b. nozzle potential 200V ,c. nozzle potential 300V)

同 ESI 正离子一样,溶剂中有机溶剂的不同含量对各种负离子和总离子流有很大影响,实验结果显示当甲醇的含量在 90 %左右时,灵敏度达到最大值,在研究其它条件时,配制的伊维菌素溶液,均含 90 %的甲醇。伊维菌素的最终浓度为 10 μ g/ml。

2.2.2 nozzle 电压对各种离子质谱图的影响

由 Figure 4 可见 nozzle 电压对伊维菌素负离子的质谱有很大影响,当 nozzle 电压较低时,在高质量范围出现较复杂的加合离子峰,而且背景较高,加大 nozzle 电压,加合离子强度显著降低,而较低质量数相应的碎片离子强度增加。在定性研究中,可以通过适当加大 nozzle 电压,来简化图谱,消除干扰信息。由于加合离子与溶液中离子的微量变化相关,不利于进行定量,而进行 HPLC 进样,或经简单的脱盐纯化后,受微量残留离子影响小,适于作为定量标准。

3 小结

伊维菌素在电喷雾离子化方式中表现出复杂的行为,归纳如下:正离子的最佳有机溶

剂浓度为 50 % 甲醇,在 nozzle 电压为 120V 时, $[M + NH_4]^+$ 响应最强,当 nozzle 电压升高时, $[M + NH_4]^+$ 响应减弱, $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 响应增强,300V 达最大值,然后降低。在 ESI 中,伊维菌素与 H^+ 的亲合力很弱,加大 H^+ 浓度,仍得不到 $[M + H]^+$ 峰。负离子的最佳有机溶剂浓度为 90 % 甲醇,低 nozzle 电压时加合离子的强度很高,主要形成 $[M + Cl]^-$, $[M + HCOO]^-$, $[M + CH_3COO]^-$ 和 $[M + C_5H_5O_3]^-$,加大 nozzle 电压,加合离子强度降低,碎片峰强度增加,主要有失掉一个氢,在失掉一个氢的基础上再失掉一个或两个水分子以及失掉糖基,还有反 Diels-Alder 反应产物。当 nozzle 电压为 200V 时, $[M - H]^-$ 峰达最大值。

用反相液相色谱的方法不能完全脱除各种阳离子,造成各种加合离子的出现。实验中,我们试图通过加入 NH_4Ac 调节溶液中离子浓度和组成,抑制 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 峰,从而用稳定的 $[M + NH_4]^+$ 峰对伊维菌素定量。虽然标样本身在大浓度范围内表现出良好的线性,但按文献^[10]的方法制备伊维菌素的亲和色谱柱,制备样品时,无论是用大量 20 % 甲醇水溶液的冲洗,还是将磷酸缓冲溶液(PBS)改为醋酸铵溶液,最后的质谱图上 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 峰都明显高于标样。对于生物提取物,很难控制最后样品中残余的 Na^+ 和 K^+ 量,而且加大 NH_4^+ 浓度也不能消除 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 峰,因此单独用 $[M + NH_4]^+$ 定量,测定生物样品中的伊维菌素不能得到可靠结果。如果加大 nozzle 电压,用 $[M + Na]^+$ 定量,将标样稀释制备标准曲线时发现,由于稀释作用 Na^+ 浓度降低,在低浓度范围,响应过低。曾试图添加低浓度的 $NaCl$,维持溶液中 Na^+ 浓度,但由于 $NaCl$ 的挥发性低,离子流图不稳定,证明也不适于定量。由于加合离子与溶液中离子的微量变化相关,不利于进行定量,而碎裂方式受微量残留离子影响小,经 HPLC 进样,或经简单的脱盐纯化后,适于作为定量标准。

参 考 文 献

- 1 Burlingame A L, Carr S A. Mass Spectrometry in the Biological Sciences, Totowa N J: Humana Press, 1996, 546-553
- 2 Dawson J H J, Guilhaus M. Rapid Commun. Mass Spectrom, 1989, 3(5): 155-159
- 3 Campbell W C, Fisher M H, Stapley E O, Albers-Schoenberg G, Jacob T A, Science, 1983, 221(4613): 823-8
- 4 De Montigny P, Shim J S K, Pivnincny J V, James V J. Pharm. Biomed. Anal, 1990, 8(6): 507-11
- 5 Degroot J M, Wyhowski de Bukansk B, Srebrnik S J. Liq. Chromatogr, 1994, 17(6): 1419-26
- 6 Tway P C, Downing G V, Slayback J R B, Rahn G S, Isensee R K. Biomed. Mass Spectrom, 1984, 11(4): 172-6
- 7 Heller D N, Schenck F J. Biol. Mass Spectrom, 1993, 22(3) 184-93
- 8 Turnipseed S B, Roybal J E, Rupp H S, Gonzales S A, Pfenning A P, Hurlbut J A. Rapid Commun. Mass Spectrom, 1999, 13: 493-499
- 9 熊少祥, 辛斌, 王光辉, 刘国诠. 高等学校化学学报, 2000, 21(4): 522-26
- 10 Li J S, Li X W, Hu H B. J Chromatogr B, 1997, 696: 166-71

Studies on the Behavior and Mechanisms of Ivermectin in Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Wu Zengru ,Zhu Lili ,Luo Hongpeng ,Xu Xiaojie

(College of Chemistry and Molecular Engineering ,Peking university ,Beijing 100871 ,China)

Received 2000 - 12 - 13

Abstract

The adduct and fragmental behavior of ivermectin was studied in both positive and negative ion detection mode by using electrospray ionization time of flight mass spectrometry. The optimal organic solvent content for positive ion was 50 : 50 methanol/water. The maximal intensity of $[M + NH_4]^+$ was achieved when nozzle potential was 120V ,while the peaks of $[M + Na]^+$ and $[M + K]^+$ were highest at 300V. No peak of $[M + H]^+$ was observed in the positive ion detection mode of ivermectin. In negative ion detection mode ,90 : 10 methanol/water was the proper solvent. At lower nozzle potential ,the high intensity of adduct ions were formed ,which are $[M + Cl]^-$, $[M + HCOO]^-$, $[M + CH_3COO]^-$ and $[M + C_3H_5O_3]^-$. With the increasing nozzle potential ,the intensity of fragmental ions were increased ,which corresponded to the loss of H ,the lose of one or two H_2O ,sugar moieties of Diels-Alder fragment ions from $[M - H]^-$. When nozzle potential was 200V ,the highest intensity of $[M - H]^-$ was achieved.

Key Words :ivermectin ,ESI ,MS