

红霉素类抗生素电喷雾/飞行时间 质谱源内 CID 研究^{*}

胡守刚 郭寅龙 吕 龙

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

摘要 本文采用电喷雾/飞行时间质谱法,对 5 个红霉素类抗生素进行了源内 CID 研究,并以 PEG400 及各样品质子化分子离子(MH^+)做为内标物,对碎片离子进行了准确质量测定,确认了这些碎片离子,并总结了此类化合物的裂解规律。样品分子含有去氧氨基糖(desosamine)或红霉糖(cladinose)两个糖基片段,其中去氧氨基糖易于形成带电离子。另外考察了喷管电压(Nozzle Potential)、溶剂条件等对红霉素类抗生素电喷雾源内 CID 质谱的影响。

关键词: 电喷雾 源内 CID 红霉素类抗生素 PEG 内标法 准确质量

电喷雾离子化(Electrospray Ionization,ESI)是近年新出现的一种质谱离子化技术,在较低的喷管电压(Nozzle Potential)条件下,由于它提供给样品分子的能量较少,通常只产生样品分子加合离子,如 MH^+ 、 MNa^+ 、或 MK^+ 等,是目前最软的离子化方式。在较高的喷管电压条件下,样品分子获得的动能增加,在离子加速区域中,真空度相对较低,通常为 10^{-1} Pa,离子与中性分子碰撞,产生碎片离子,从而实现样品分子的源内 CID,可以同时提供样品的分子量信息和结构信息。红霉素类抗生素是临床上广泛使用的一种弱碱性大环内酯类抗生素,通过可逆性与核糖体作用抑制敏感菌的蛋白质合成,从而达到抗菌作用,对各种致病菌均有抗菌活力^[1]。其结构是由红霉内酯(Erythronolide)通过氧原子与去氧氨基糖(Desosamine)和红霉糖(Cladinose)相连而成的碱性甙^[2]。此类化合物在通常的电子轰击离子化(EI)质谱中,容易失去中性分子,如 H_2O ,或断裂得到小质量碎片,一般难以提供分子量信息^[3]。采用自身化学电离/四极质谱法成功地得到了红霉素类抗生素丰度较高的质子化分子离子及丰富的碎片离子^[4],但是此方法不能进行准确质量测定。对于源内 CID 产生的碎片离子进行准确质量测定的方法,目前仅有采用超高分辨傅里叶变换质谱法(FT-MS)^[5],而 FIMS 仪器昂贵且不普及。本文采用电喷雾/飞行时间质谱法,在较高的喷管电压条件下,对 5 个红霉素类抗生素进行了源内 CID 研究,并以 PEG400 及样品分子加合离子 MH^+ 为内标物,成功地实现了对碎片离子的准确质量测定,并对其进行了确认归属,总

2001 - 02 - 08 收

*2000 年度上海市自然科学基金资助课题

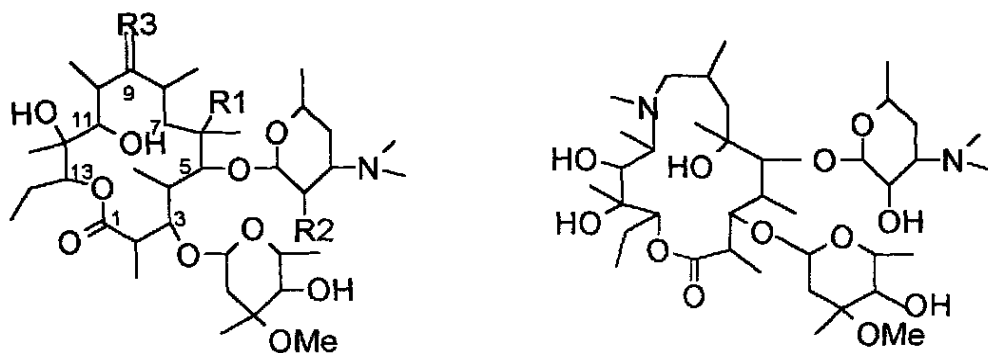
第一作者简介:胡守刚,男,硕士生,中科院上海有机所,电话:021 - 64163300 - 1116

总结了红霉素类抗生素的电喷雾源内CID质谱裂解规律。由于红霉素类抗生素为碱性化合物,在酸性介质中溶解性较好,且与 H^+ 结合能力较强,对电喷雾离子化(ESD)/飞行时间质谱(TOF-MS)灵敏度较高,通常情况下,会以加合离子 MH^+ 的形式出现,因此实验适于在酸性条件下进行。考察了喷管电压和溶剂条件等对红霉素类抗生素的电喷雾源内CID质谱的影响,实验发现,喷管电压过高可使样品分子与溶剂中的 CH_3OH 发生甲基化作用,同时样品分子加合离子 MNa^+ 、 MK^+ 相对于 MH^+ 的丰度呈现增大的趋势,选择适宜的喷管电压范围有利于实验进行。

1 实验部分

1.1 仪器及样品

美国PE PerSeptive公司MARINER电喷雾飞行时间质谱仪,微喷雾离子源:甲醇、乙氰(色谱用),聚乙二醇400(Polyethylene Glycol 400,PEG400)、乙酸为分析纯试剂,去离子纯蒸馏水。红霉素类抗生素结构如下:



A $R_1 = OH$ $R_2 = OH$ $R_3 = O$

红霉素

E 阿奇红霉素

B $R_1 = OCH_3$ $R_2 = OH$ $R_3 = O$

甲基红霉素

C $R_1 = OH$ $R_2 = OCO(CH_2)_2COOC_2H_5$ $R_3 = O$

琥乙红霉素

D $R_1 = OH$ $R_2 = OH$ $R_3 = NOCH_2O(CH_2)_2OCH_3$

罗红霉素

1.2 标准溶液的配制

a) 取 PEG400 适量,用甲醇配制成 $100\text{pmol}/\mu\text{L}$ PEG400 标准溶液, b) 分别取样品适量,用 $CH_3OH:H_2O$ (体积比 7:3,含 1% CH_3COOH) 配制成 $10\text{pmol}/\mu\text{L}$ 样品溶液。c) 分别取样品适量,用 $CH_3CN:H_2O$ (体积比 7:3) 配制成 $10\text{pmol}/\mu\text{L}$ 样品溶液。

1.3 质谱测定

1.3.1 实验条件

质谱条件:雾化气流速(Nebulizer gas flow)为 $3.0\text{L}/\text{min}$ (纯氮),气帘气流速(Curtain gas flow)为 $1.0\text{L}/\text{min}$ (纯氮)。喷嘴电压(Spray Tip Potential)为 3804V ,喷管温度(Nozzle Tempera-

ture) 为 140。分辨率大于 5000fwhm, 正离子模式采集质谱数据, 采集质量范围为 130-1000amu。

1.3.2 分别取样品溶液(b)、(c) 200 μ L, 采用直接进样方式, 喷管电压 (Nozzle Potential) 以 20 伏增加速度从 100V 增加到 400 伏, 注射器泵流速为 5 μ L/min. 将样品送入离子源, 记录质谱图(见图 1—a, b)。

1.3.3 分别取样品溶液(b) 200 μ L, 加入 PEG400 标准溶液 20 μ L, 采用直接进样方式, 喷管电压 (Nozzle Potential) 在 180V 至 220 伏范围内, 注射器泵流速为 5 μ L/min. 将样品送入离子源, 记录质谱图(见图 2)。

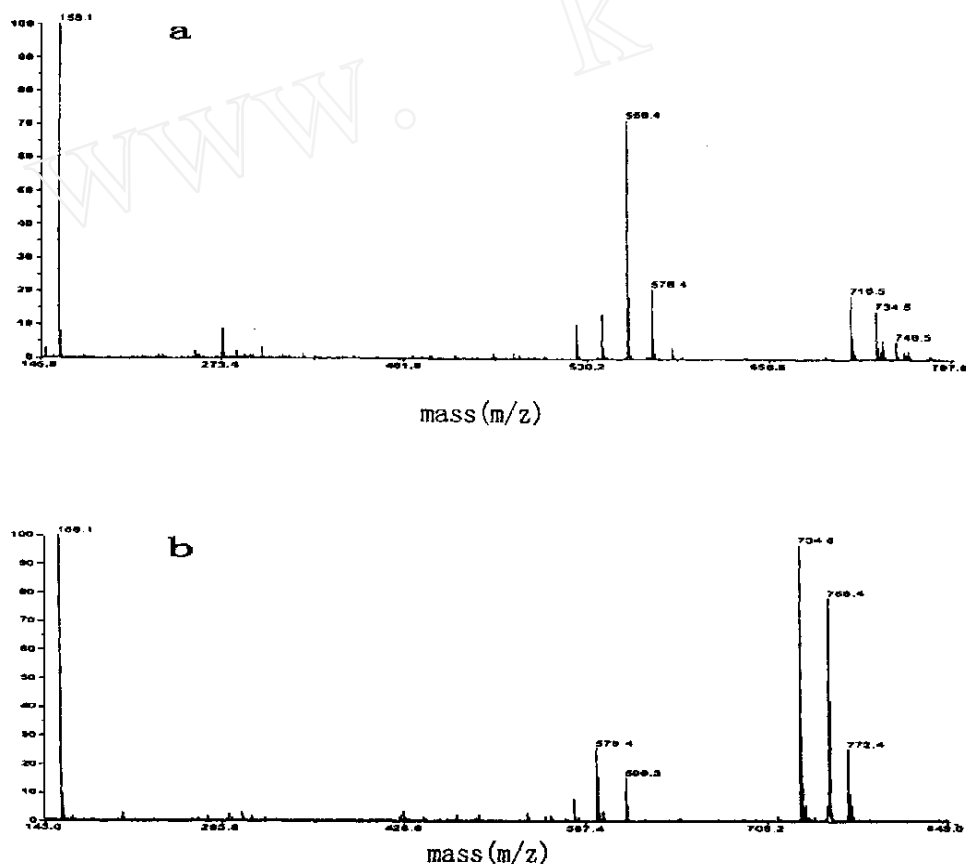


Fig. 1 Ion source CID spectra of Erythromycin

Solvents: a: CH₃OH: H₂O (7:3 in volume, including 1% CH₃COOH)

b: CH₃CN: H₂O (7:3 in volume)

2 结果与讨论

2.1 红霉素类抗生素的源内 CID 电喷雾/飞行时间质谱图

2.1.1 在较低的喷管电压条件下, 由于获得能量较少, 所有红霉素类抗生素样品仅得到分子加合离子(MH⁺、MNa⁺ 或 MK⁺), 而没有出现其碎片离子, 因此难以得到样品分子的

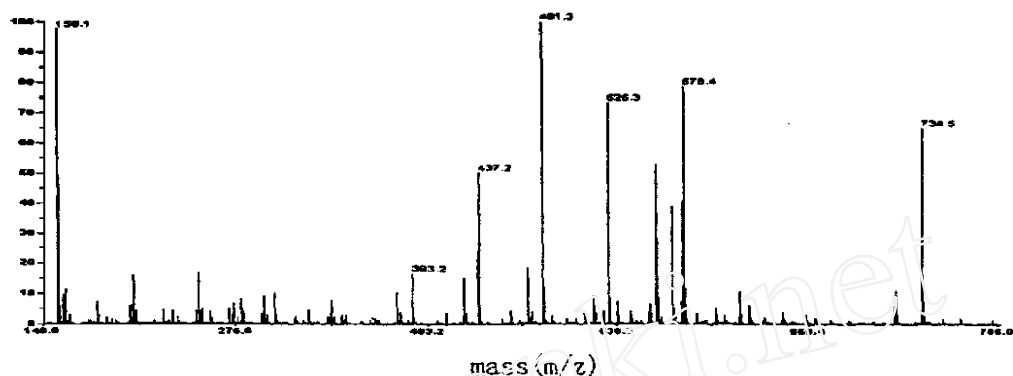


Fig. 2 Determination of the accurate mass of the fragment ions using PEG400 and Erythromycin protonated molecular ion(MH^+) as internal reference

结构信息。在较高的喷管电压条件下,样品分子获得较多的动能,与中性分子发生碰撞,产生碎片离子,从而实现样品分子的源内 CID,得到较多的样品结构信息。

2.1.2 喷管电压以 20 伏的增加速度从 100 伏增加到 400 伏,对各样品进行了考察。实验发现,在喷管电压起始增加阶段,有碎片离子出现,并且随着喷管电压的增加,其相对于样品加合离子的丰度呈现增大的趋势。当喷管电压增加到一定的范围时,碎片离子的相对丰度达到最大,随着喷管电压的再增加,碎片离子的相对丰度反而下降,其原因可能是随着获得动能的增加,在喷管和锥孔之间样品分子加合离子(MH^+)形成快速离子流,导致离子流所经区域中性分子分布稀少,反而不利于二者发生碰撞产生碎片离子。因此较好的实现样品分子的源内 CID,得到较多的结构信息,应选择适合的喷管电压范围。

2.1.3 以红霉素为例,考察(b)、(c)两种溶剂体系对样品分子源内 CID 的影响。实验发现,在 $CH_3OH:H_2O$ (体积比 7:3,含 1% CH_3COOH) 溶剂条件下,样品分子加合离子(MH^+)与其碎片离子($MH^+ - H_2O$)都分别出现了甲基化的离子,原因可能是在较大的喷管电压条件下,样品分子中的一个羟基和溶剂中的 CH_3OH 发生缩合失水反应,分别生成($MH^+ + CH_3OH - H_2O$)和($MH^+ CH_3OH - 2H_2O$)。在 $CH_3CN:H_2O$ (体积比 7:3)溶剂条件下,样品分子出现了三种加合离子形式(MH^+ 、 MNa^+ 或 MK^+),并且随着喷管电压的增加, MNa^+ 和 MK^+ 相对 MH^+ 的丰度出现增大的趋势。因此实验中喷管电压不宜过高。由于红霉素类抗生素为碱性化合物,在酸性介质中溶解性较好,同时又可抑制 MNa^+ 或 MK^+ 的出现,增加样品分子离子峰的灵敏度,因此实验适宜于在酸性条件中进行。

2.2 PEG400 内标法测定碎片离子的准确质量

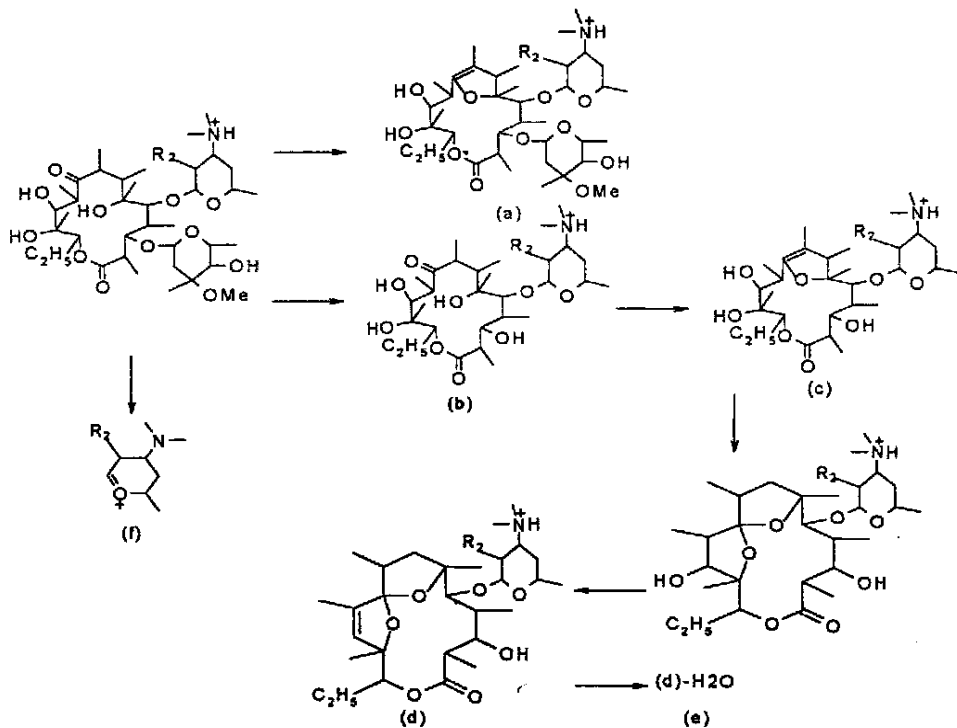
实验发现,在红霉素类抗生素样品发生源内 CID 的喷管电压条件下,聚乙二醇 400 仅出现丰度很小的碎片离子,并不影响利用它做内标对碎片离子的准确质量测定。采用聚乙二醇 400 及各样品质子化分子离子(MH^+)做为内标物,对各样品碎片离子进行准确质量测定(见表 1)。

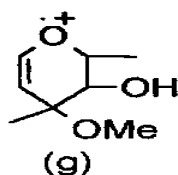
Table 1 Mass spectrum Main data of Erythromycin analogue antibiotic

离子	m/z (relative abundance)				
	A (amu)	B (amu)	C (amu)	D (amu)	E (amu)
MH ⁺	734.46686 (78.2)	748.48417 (24.2)	862.51363 (75.0)	837.53036 (60.1)	749.51580 (88.2)
a	716.45683 (12.7)	590.38994 (14.1)	844.51156 (11.6)	679.43387 (100)	591.41629 (100)
b	576.37101 (43.9)	-	704.43437 (0.9)	-	573.41426 (32.1)
c	558.36096 (35.2)	-	576.38424 (0.6)	-	-
d	540.35419 (2.4)	-	686.42545 (0.9)	-	-
e	522.34101 (2.3)	-	558.36974 (0.8)	-	-
f	158.11754 (30.5)	158.11747 (40.4)	286.16286 (100)	158.11822 (30.8)	158.11459 (65.6)
			158.12023 (8.0)		

2.3 质谱数据分析

2.3.1 红霉素类抗生素在低温和 PH7 时最稳定,在酸或碱中水解:C₆ 的羟基与 C₉ 上的羰基形成半缩酮的羟基,再与 C₈ 上氢消去一分子水,形成脱水物。脱水物 C₁₂ 上的羟基与 C₈ ~ C₉ 双键加成,得螺旋缩酮,其 C₁₁ 羟基与 C₁₀ 上的氢再消去一分子水^[6]。由此推测,在电喷雾源内 CID 中出现的离子可能由下列途径生成:





2.3.2 由于去氧氨基糖中的氮原子更易携带正电荷,去氧氨基糖甙键的裂解比红霉素糖甙键的裂解更为容易,由此质荷比为 158amu 的碎片离子应该是由去氧氨基糖产生的,这从碎片离子准确质量测定实验中得到证实。由去氧氨基糖产生离子 (f) 的理论质量为 158.11756amu,由红霉素糖产生的离子 (g) 的理论质量为 158.09375amu,各样品所测结果与它们的相对误差分别在 10ppm 和 100ppm 数量级上,可以判断质荷比为 158amu 的碎片离子是 (f),而不是由红霉素糖产生的离子 (g)。琥乙红霉素中一个酯基取代去氧氨基糖中的一个羟基,因此碎片离子 (f) 质荷比为 286amu,另外产生的质荷比为 158amu 的碎片离子,由准确质量测定结果可判断,是去氧氨基糖进一步脱去酯基中的羰基部分而产生的。阿奇霉素结构中没有 C₉ 羰基,但其质谱离子解离方式应与其它四种样品相似,不再做进一步讨论。

参 考 文 献

- 1 Lancini G, Parenti F, Gallo G, "Antibiotics-A Multidisciplinary Approach", translated by Wand Yr-Guang, Renmin Weisheng Press, Beijing, 1998, P 8
- 2 AN Deng-Kui, *et al*, "Pharmaceutical Analysis", Jinan Press, Jinan, 1992, P. 273
- 3 Cong Puzhu, "Application of Mass Spectrometry in Natural Organic Chemistry", Scientific Press, Beijing, 1987, P926
- 4 Hu Shougang, Guo Yinlong, Lü Long, Youji Huaxue 2000
- 5 Wu Huaqin, *et al*, Rapid Commun. Mass Spectrom, 2000, 14(1), 26-32
- 6 An Dengkui, *et al*, "Pharmaceutical Analysis", Jinan Press, Jinan, 1992, P. 1662

The In-Source CID Study of Erythromycin Analogue Antibiotic in Electrospray Ionization/ Time-of-flight Mass Spectrometry

Hu Shougang ,Guo Ynlong ,L ÜLong

(Shanghai Institute of Organic Chemistry ,Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200032 ,China)

Received 2001 - 02 - 08

Abstract

In-source CID of electrospray ionization (ESI) / time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) was applied to five erythromycin analogue antibiotics. Using polyethylene glycol (PEG) and the protonated molecular ion (MH^+) as internal reference compounds, the accurate mass of the fragment ions were determined, The fragment ions were elucidated, and their fragmentation patterns were discussed. Erythromycin analogue antibiotics containing structure segments, Desosamine or Cladinose, have more powerful ability to form adduct ions with H^+ in acid condition. Desosamine can easily form positive ions. The effects of Nozzle Potential and solvents on erythromycin analogue antibiotics of in-source CID of electrospray ionization (ESI) were studied. In company with Nozzle Potential rising, the relative abundance of the fragment ions to the protonated molecular ion (MH^+) first increases, but after Nozzle Potential reaches to a certain value, it begins to decrease. The higher nozzle potential becomes, the more easily the protonated molecular ion (MH^+) methylates with CH_3OH in solvents to form ($MH^+ + CH_3OH - H_2O$). And increasing nozzle potential can make the relative abundance of MNa^+ 、 MK^+ rise. Suitable nozzle potential and acid condition were recommended.

Key Words : electrospray ionization (ESI) , in-source CID , erythromycin analogue antibiotic , PEG internal reference method , accurate mass