

克拉霉素及其杂质 KL 和 KO 的 电喷雾串联质谱分析

蒋可志¹, 金 勇², 王兆刚², 付君平², 秦欣荣², 侯仲轲², 潘远江¹

(1. 浙江大学化学系, 浙江 杭州 310007; 2. 浙江国邦药业有限公司, 浙江 绍兴 312369)

摘要:作为微生物次级代谢产物衍生物,克拉霉素产品存在大量杂质,需要对部分微量杂质进行进一步的结构分析。本研究采用电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)技术与量化计算相结合,系统地研究了克拉霉素 **K** 及其杂质 **KL** 和 **KO** 的质谱碎裂规律。发现其质子化离子在串联质谱中主要发生一系列涉及侧链基团的碎裂反应,在高质量区存在丢失 CH_4O 、 $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$ 和 $(\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3 + \text{CH}_4\text{O})$,在低质量区存在丢失大环内酯单元产生特征离子 m/z 158.1(**5a-P**)和 m/z 316.2(**3a-1P**),或发生脱氧氨基糖苷的开环产生特征离子 m/z 116.1(**5c-P**)。本研究通过总结克拉霉素及其杂质的质谱碎裂规律,为克拉霉素其他杂质及其代谢产物的结构分析提供参考。

关键词:克拉霉素;电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS);质谱碎裂反应;量化计算

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2021)01-0008-08

doi:10.7538/zpxb.2020.0006

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis of Clarithromycin and Its Impurities KL and KO Using ESI-MS/MS

JIANG Ke-zhi¹, JIN Yong², WANG Zhao-gang², FU Jun-ping²,
QIN Xin-rong², HOU Zhong-ke², PAN Yuan-jiang¹

(1. Chemistry Department, Zhejiang University, Hangzhou 310007, China;

2. Zhejiang Guobang Pharmaceutical Co. LTD, Shaoxing 312369, China)

Abstract: Clarithromycin has significant antibacterial effect against Gram positive bacteria, and has been widely used as an important clinical antibiotic at present. As a derivative of microbial secondary metabolites, however, clarithromycin products have a large number of impurities, and some trace impurities also need further structural analysis. In this study, the mass spectrometric fragmentation reactions of clarithromycin **K** and its impurities of **KL** and **KO** were systematically studied by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and quantum calculation. Quantum calculation showed that the amino N atom of deoxyaminoglycosides (the No. 5 side chain unit) is

收稿日期:2020-01-17;修回日期:2020-04-05

作者简介:蒋可志(1980—),男(汉族),浙江永嘉人,副研究员,从事有机质谱研究。E-mail: jiangkezhi@hznu.edu.cn

通信作者:侯仲轲(1967—),男(汉族),湖南长沙人,研究员,从事生物制药工程研究。E-mail: houzk2008@hotmail.com

潘远江(1966—),男(汉族),湖南张家界人,教授,从事有机质谱研究。E-mail: panyuanjiang@zju.edu.cn

the most preferred protonation site in the structure of clarithromycin. Upon collisional activation, the protonated molecules undergo a series of proton migration and fragmentation reactions on side chain groups as the followings: 1) The ionizing proton transfers to the O5a atom in the No. 5 side chain group and triggers the loss of macrolides to form an oxonium ion of the dehydrated deoxyaminoglycoside (**K5a-P**, m/z 158.1). 2) The ionizing proton transfers to the O5b atom in the No. 5 side chain group, which triggers the ring-opening reaction of the deoxyaminoglycosides group to give a characteristic fragment ion of *N*-(3-hydroxybutylidene)-*N*-methylmethanaminium (**K5c-P**, m/z 116.1). 3) Migration of the ionizing proton to the O6 atom results in the loss of methanol. 4) Migration of the ionizing proton to the O3a atom results in the formation of **K3a**, which undergoes migration of the pyranose unit due to the nucleophilic attack of the O5d atom of the No. 5 side chain unit, and the subsequent loss of macrolides to form an oxonium ion at m/z 316.2 (**K3a-1P**). 5) **K3a** can also undergo nucleophilic reaction due to the nucleophilic attack of the O3c atom of the *para* hydroxyl, and subsequent fragmentation to produce the characteristic ion **K3a-2P** by losing $C_8H_{12}O_3$, and further cleavage to give the characteristic ion **K3a-2P-P** via the loss of methanol. The impurities of **KL** and **KO** have high similarity to clarithromycin in structure, which only differ in the No. 9 side chain unit. As expected, they have very similar tandem mass spectra, in which there are several characteristic neutral losses of CH_4O , $C_8H_{12}O_3$ and $(C_8H_{12}O_3 + CH_4O)$ in the high mass region, and abundant characteristic fragment ions at m/z 316, m/z 158 and m/z 116 in the low mass region. This work summarizes the MS fragmentation law of clarithromycin and its analogue, provides a reference for the structure derivation of the other impurities of clarithromycin and its metabolites.

Key words: clarithromycin; electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS); MS fragmentation; quantum calculation

克拉霉素又称 6-*O*-甲基红霉素 A, 学名为 5-(4-(二二甲胺四氢-3-羟基-6-甲基-2-吡喃氧基)-6-甲氧基-11,12,13-三羟基-2,4,6,8,10,12-六甲基-9-氧代-3-(四氢-5-羟基-4-甲氧基-4,6-二甲基-2-吡喃氧基)十五烷酸- μ -内酯, 属于 14 元环大环内酯类抗生素^[1-2]。克拉霉素适用于鼻咽感染、下呼吸道感染、皮肤软组织感染、急性中耳炎、肺炎、尿道炎及宫颈炎等感染症状的治疗, 对链球菌属、肺炎球菌、葡萄球菌等革兰阳性菌的抗菌作用略优于红霉素, 对诱导产生的红霉素耐药菌株也具有一定的抗菌活性^[3-5]。

克拉霉素属于微生物类次级代谢产物衍生物, 其存在大量杂质, 即使是全球最大的大环内酯类原料药生产商(浙江国邦药业有限公司)所生产的克拉霉素药品也存在需进一步分析个别微量杂质结构。电喷雾串联质谱技术具有快速、灵敏以及直接分析混合物等

优点, 在杂质结构分析中受到重视^[6-8]。

本工作拟对克拉霉素及其杂质 **KL** 和 **KO** 进行电喷雾串联质谱研究, 总结质谱碎裂规律, 以期为相关的杂质结构推导提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪: 美国 Agilent 公司产品; micro TOF-QII 电喷雾四极杆-飞行时间质谱仪: 德国 Bruker 公司产品。

1.2 样品和试剂

克拉霉素(**K**)及其杂质 **KL**、**KO**: 浙江国邦药业有限公司产品, 化学结构示于图 1。甲醇、甲酸: 色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司产品; 水为去离子水, 电阻率大于 $18.2 M\Omega \cdot cm$; 用于准确质量校正的 PEG1000 溶液由本实验室制备。

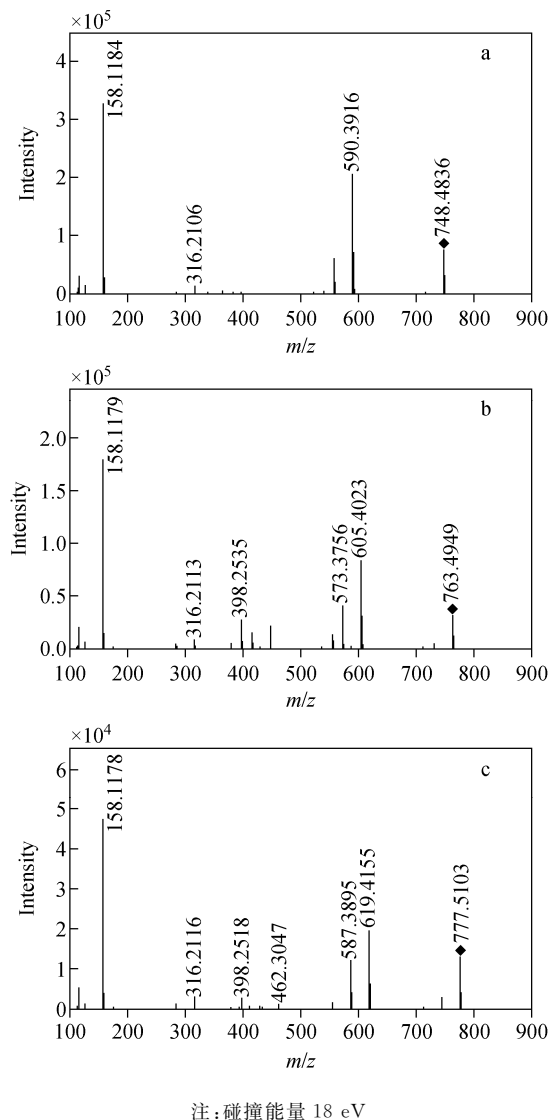


图3 克拉霉素(a)及其杂质 KL(b)、

KO(c)的[M+H]⁺离子高分辨串联质谱图

Fig. 3 Accurate MS/MS spectra of clarithromycin (a) and its impurities KL (b) and KO (c)

性位点间迁移,当带电质子迁移到解离质子化位点时,会诱导相应的碎裂反应^[10-12]。克拉霉素结构中存在许多碱性位点,包括氨基 N、羰基 O、醚键 O 和羟基 O。其中,氨基 N 和羰基 O 的气相碱度明显大于醚键 O 和羟基 O,量化计算结果示于图 4。克拉霉素氨基 N 质子化所形成的离子 **K5c** 的自由能比酮羰基 O 质子化离子 **K1** 和酯羰基 O 质子化离子 **K9** 的自由能分别低 41.8、51.6 kJ/mol,表明克拉霉素的最优质子化位点在氨基 N 上。因此,克拉霉素经 ESI 电离后,带电质子主要结合在氨基 N 上,

形成质子化离子 **K5c**。经碰撞活化后,克拉霉素质子化离子中带电质子开始从氨基 N 向各解离质子化位点迁移,并引发相应碎裂。

开环碎裂至少涉及 2 个化学键的断裂,克拉霉素的大环内脂骨架上只有 1 个解离质子化位点(O 原子),故其不容易发生骨架开环碎裂。质谱碎裂优先发生在侧链上,如大环骨架的 6、5、3 号位上的醚键 O。

由于带电质子主要结合在大环骨架 5 号位吡喃环的氨基 N 上,故先从 5 号位侧链基团碎裂入手研究克拉霉素质子化离子 **K5c** 的碎裂规律。克拉霉素骨架上 5 号位侧链脱氧氨基糖苷基团的质谱断裂存在 2 种途径,示于图 5。在 path-1 中,**K5c** 克服 93.9 kJ/mol 的能垒使其带电质子从氨基 N 迁移到 5a 位 O 原子上,形成异构离子 **K5a**,同时自由能增加 82.2 kJ/mol。**K5a** 只需跨越 6 kJ/mol 的能垒就可以发生 i-断裂,并通过丢失大环内酯单元产生含吡喃环结构的碎片离子 **K5a-P**(m/z 158.1)。在 path-2 中,**K5c** 需克服 106.6 kJ/mol 的能垒使带电质子迁移到 5b 位 O 原子上,形成异构离子 **K5b**,同时自由能增加 94.6 kJ/mol。**K5b** 继续克服 17.2 kJ/mol 的能垒发生电荷诱导的 C—O 键断裂,从而产生异构离子 **K5b2**。**K5b2** 继续克服 54.9 kJ/mol 的能垒发生 i-断裂,引发脱氧氨基糖苷单元开环反应,产生亚胺结构碎片离子 **K5b-P**(m/z 116.1),克拉霉素大环 5 号侧链质谱碎裂的反应势能面示于图 6。Path-1 碎裂途径的累积能垒为 93.9 kJ/mol,远小于 path-2 的 159.8 kJ/mol,表明 path-1 碎裂途径更易发生,即碎片离子 **K5a-P** 丰度为 100%,而 **K5b-P** 丰度仅为 9.6%,与表 1 的实验结果相符合。

克拉霉素及其杂质大环 6 号侧链发生的质谱碎裂途径示于图 7。当带电质子迁移到 6a 位的 O 原子上,形成异构离子 **K6a**。**K6a** 发生电荷诱导的丢失甲醇反应,产生碎片离子 m/z 716.5,其途径为:1) 直接丢失形成碎片离子 **K6a-P1**;2) 邻基参与反应,即 5 号位上吡喃环的邻位羟基亲核进攻 6 号位 C 发生闭环反应并丢失甲醇分子,产生碎片离子 **K6a-P2**。在 **K6a-P1** 离子结构中,正电荷定域在 6 号 C 上,而在 **K6a-P2** 离子结构中,正电荷以带电质子的形式迁移到碱性位点上,其自由能比 **K6a-P1**

表 1 克拉霉素及其杂质的高分辨串联质谱图中碎片离子信息

Table 1 Accurate MS/MS data of clarithromycin and its impurities KL and KO

化合物 Compound	离子 Fragment ion (<i>m/z</i>)	元素组成 Elementary composition	理论质荷比 Theoretical (<i>m/z</i>)	相对误差 Relative error/ 10^{-6}	归属* Assignment	相对丰度 Relative intensity/%
K	748.4836	C ₃₈ H ₇₀ NO ₁₃	748.4842	-0.7	[K+H] ⁺	22.9
	716.4567	C ₃₇ H ₆₆ NO ₁₂	716.4567	-1.7	K6a-P	0.8
	590.3916	C ₃₀ H ₅₆ NO ₁₀	590.3899	-2.9	K3a-2P	63.3
	558.3634	C ₂₉ H ₅₂ NO ₉	558.3637	0.5	K3a-2P-P	18.9
	540.3524	C ₂₉ H ₅₀ NO ₈	540.3531	-1.2	K3a-2P-P2	1.2
	316.2106	C ₁₆ H ₃₀ NO ₅	316.2118	-3.9	K3a-1P	4.2
	158.1184	C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	-5.5	K5a-P	100
	116.1067	C ₆ H ₁₄ NO	116.1070	-2.9	K5c-P	9.6
KL	763.4949	C ₃₈ H ₇₁ N ₂ O ₁₃	763.4951	-0.3	[KL+H] ⁺	17.0
	731.4688	C ₃₇ H ₆₇ N ₂ O ₁₂	731.4689	0.0	KL6a-P	2.6
	605.4023	C ₃₀ H ₅₇ N ₂ O ₁₀	605.4008	-2.6	KL3a-2P	46.8
	573.3756	C ₂₉ H ₅₃ N ₂ O ₉	573.3746	1.8	KL3a-2P-P	22.5
	555.3642	C ₂₉ H ₅₁ N ₂ O ₈	555.3640	3.6		7.0
	448.2904	C ₂₂ H ₄₂ NO ₈	448.2905	-0.3		12.5
	416.2644	C ₂₁ H ₃₈ NO ₇	416.2643	-0.3		9.8
	398.2535	C ₂₁ H ₃₆ NO ₆	398.2537	0.5		14.0
	380.2441	C ₂₁ H ₃₄ NO ₅	380.2431	-2.4		2.9
	316.2113	C ₁₆ H ₃₀ NO ₅	316.2118	1.8	KL3a-1P	4.4
	158.1179	C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	2.5	KL5a-P	100
	116.1069	C ₆ H ₁₄ NO	116.1070	1.2	KL5c-P	10.8
KO	777.5103	C ₃₉ H ₇₃ N ₂ O ₁₃	777.5107	-0.6	[KO+H] ⁺	26.8
	745.4828	C ₃₈ H ₆₉ N ₂ O ₁₂	745.4845	-2.2	KO6a-P	6.3
	619.4155	C ₃₁ H ₅₉ N ₂ O ₁₀	619.4164	-1.5	KO3a-2P	41.0
	587.3895	C ₃₀ H ₅₅ N ₂ O ₉	587.3902	1.3	KO3a-2P-P	25.5
	555.3628	C ₂₉ H ₅₁ N ₂ O ₈	555.3640	-2.1		3.6
	462.3035	C ₂₃ H ₄₄ NO ₈	462.3061	-5.7		1.4
	412.2673	C ₂₂ H ₃₈ NO ₆	412.2694	4.9		1.2
	398.2518	C ₂₁ H ₃₆ NO ₆	398.2537	-4.8		5.3
	316.2116	C ₁₆ H ₃₀ NO ₅	316.2118	0.7	KO3a-1P	6.5
	158.1178	C ₈ H ₁₆ NO ₂	158.1176	-1.2	KO5a-P	100
	116.1069	C ₆ H ₁₄ NO	116.1070	-0.5	KO5c-P	11.6

注：* 碎片离子相应的结构式列于图 4~8 中

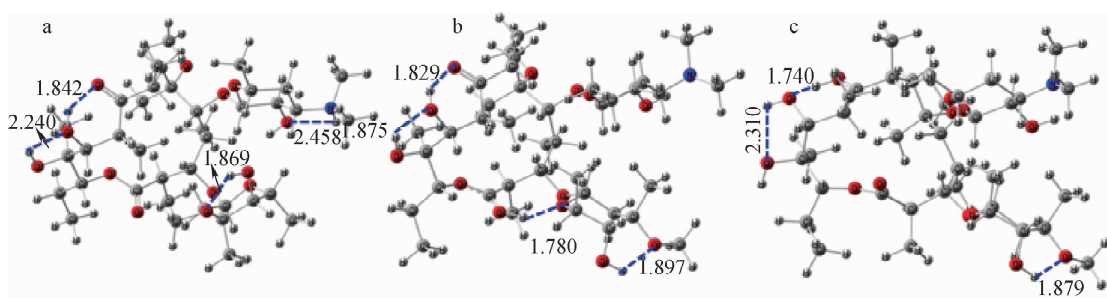


图 4 克拉霉素氨基 N(a)和酮羰基 O(b)、酯羰基 O(c)质子化离子的优化结构

Fig. 4 Optimized structures of the *N*-protonated and the carbonyl *O*-protonated clarithromycin

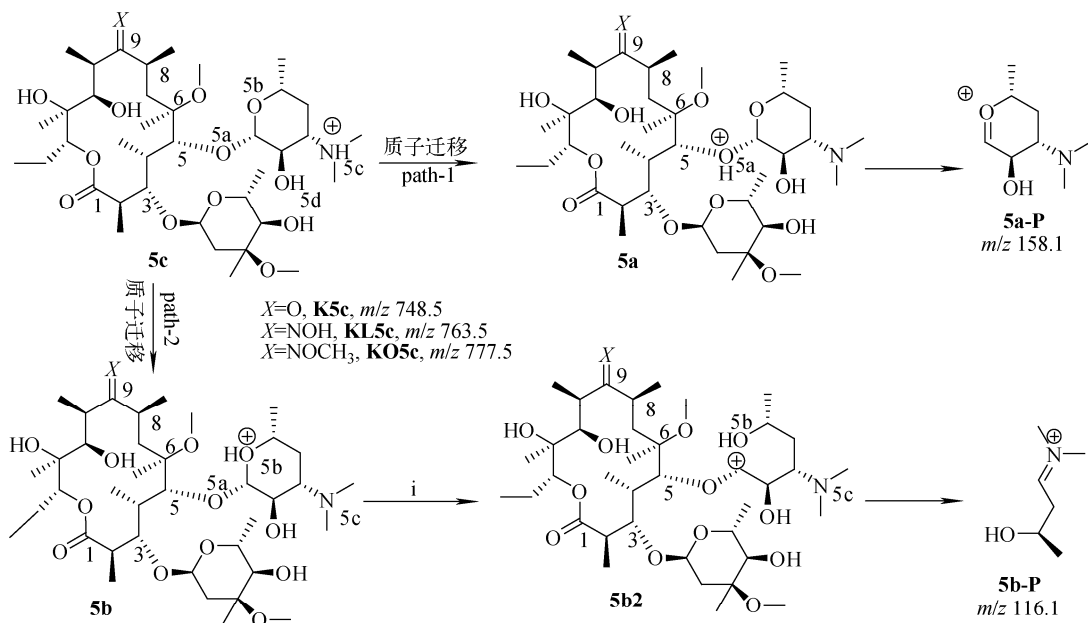


图5 克拉霉素及其杂质大环5号侧链发生的质谱碎裂途径

Fig. 5 Fragmentation pathways of protonated K, KL and KO at the No. 5 side chain group

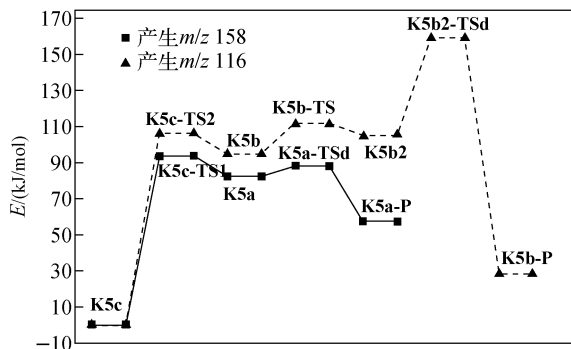


图6 克拉霉素大环5号侧链质谱碎裂的反应势能面

Fig. 6 Potential energy surface
for fragmentation of protonated clarithromycin
at the No. 5 side chain group

低 70.6 kJ/mol, 即碎片离子 m/z 716.5 主要以 **K6a-P2** 结构存在。由此可见, 5 号位吡喃环上的邻位羟基对克拉霉素的质谱碎裂反应影响较大。

克拉霉素及其杂质大环发生在 3 号侧链上的质谱碎裂途径示于图 8。当带电子迁移到 3a 位 O 原子上, 形成异构离子 **K3a**, 存在 2 种碎裂途径: 1) 5 号位侧链糖基上的羟基 O_{5d} 原子亲核进攻 **K3a** 的 3 号位侧链糖基 C_{3b} 原子, 并发生 $O_{3a}-C_{3b}$ 键断裂, 从而实现了 3 号位侧链上糖基基团的迁移, 形成异构体 **K3a2**, **K3a2** 上的带电子迁移到 O_{5a} 原子后发生 i -断裂, 通过丢失大环内酯单元产生碎片离子 **K3a-1P**

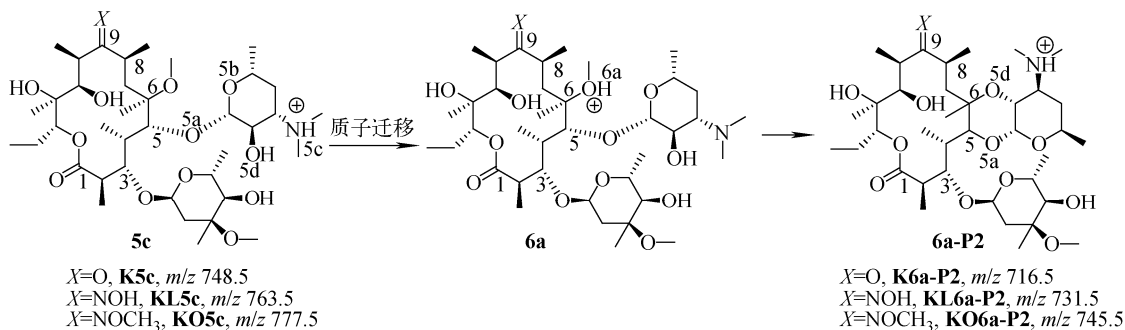


图7 克拉霉素及其杂质大环6号侧链发生的质谱碎裂途径

Fig. 7 Fragmentation pathways of protonated K, KL and KO at the No. 6 side chain group

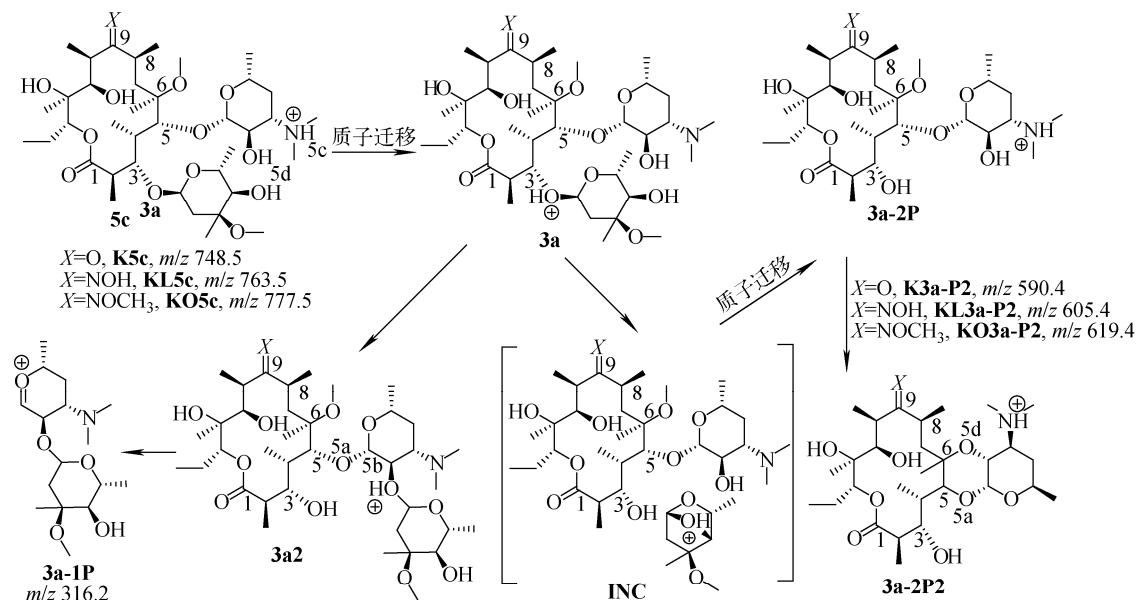


图8 克拉霉素及其杂质大环3号侧链发生的质谱碎裂途径

Fig. 8 Fragmentation pathways of protonated K, KL and KO at the No. 3 side chain group

(m/z 316.2); 2) 3号位侧链糖基上的对位羟基 O_{3c} 原子亲核进攻 C_{3b} 原子, 发生 $O_{3a}-C_{3b}$ 键断裂, 产生离子-中性复合物 **K-INC**, 其是由丢失3号侧链糖基的克拉霉素(**K3a-2P**)与带双环结构的脱水吡喃糖类质子化离子(**3P**)两部分组成。**K3a-2P** 结构中含有叔胺 N, 其质子亲和势高于 **3P**, 所以在 **K-INC** 分离之前, **3P** 的带电质子迁移到 **K3a-2P** 的叔胺 N 上, 然后产生碎片离子 **K3a-2P** (m/z 590.4)。**K3a-2P** 与 **K5c** 结构相似, 也能发生丢失甲醇的碎裂反应, 产生碎片离子 **K3a-2P-P** (m/z 558.4)。

2.2 克拉霉素杂质 KL 和 KO 的质谱碎裂反应

杂质 **KL** 和 **KO** 是克拉霉素分别与羟胺或甲氧基胺缩合反应产生的, 二者与克拉霉素具有非常相似的碎裂途径: 在高质量区存在相同的特征中性丢失, 如丢失 CH_4O (32 u)、 $C_8H_{12}O_3$ (158 u)、 $(C_8H_{12}O_3 + CH_4O)$ (190 u); 在低质量区存在相同的碎片离子, 如 m/z 316.2、158.1、116.1 等。

此外, 由于杂质 **KL** 和 **KO** 大环结构中脞基上的 O 是一个碱性位点, 可以促进带电质子在离子结构中的迁移, 并引发相应的碎裂反应, 所以会产生更多的碎片离子。比如, 杂质 **KL** 质子化离子在丢失3号侧链基团 (**KL3a-2P**) 后, 还会继续丢失5号侧链基团产生碎片

离子 m/z 448.3 (12.5%); 杂质 **KO** 质子化离子会连续丢失3号和5号侧链基团, 产生碎片离子 m/z 462.3 (1.4%)。

3 结论

本研究将串联质谱技术和量化计算相结合, 系统地研究了克拉霉素及其杂质 **KL** 和 **KO** 的质谱碎裂规律。量化计算结果表明, 克拉霉素结构中的最优质子化位点为5号侧链单元氨基 N 原子, 其质子化离子经碰撞活化后发生一系列质子迁移和侧链基团的碎裂反应: 1) 带电质子分别迁移到5号侧链基团 O_{5a} 和 O_{5b} 上, 引发丢失大环内酯单元或脱氧氨基糖苷开环反应, 产生特征离子 **5a-P** (m/z 158.1) 和 **5c-P** (m/z 116.1); 2) 带电质子迁移到6号侧链基团 O_6 , 并引发丢失甲醇, 产生碎片离子 **6a-P**; 3) 带电质子迁移到3号侧链基团 O_{3a} , 引发由5号侧链单元 O_{5d} 亲核取代而导致吡喃糖单元迁移, 并丢失大环内酯单元产生特征离子 **3a-1P** (m/z 316.2), 也可发生由对位羟基 O_{3c} 亲核取代引发的吡喃糖单元丢失碎裂, 产生特征离子 **3a-2P**, 并继续丢失甲醇分子产生特征离子 **3a-2P-P**。本研究可为相关大环内酯类抗生素的杂质结构推导提供参考。

参考文献:

- [1] 尤启东. 药物化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2007.
- [2] SILVER L L, BOSTIAN K A. Discovery and development of new antibiotics; the problem of antibiotic resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(3): 377-383.
- [3] 孙淑娟. 大环内酯类抗生素的临床应用进展[J]. *中国执业药师*, 2011, 8(6): 19-21, 38. SUN Shujuan. The progress of clinical application of macrolides[J]. *China Licensed Pharmacist*, 2011, 8(6): 19-21, 38(in Chinese).
- [4] MARTINEZ J A, HORCAJADA J P, ALMELA M, MARCO F. Addition of a macrolide to a β -lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia [J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 36(4): 389-395.
- [5] SEEMUNGAL T A, WILKINSON T M, HURST J R, PERERA W. Long-term erythromycin therapy is associated with decreased chronic obstructive pulmonary disease exacerbations [J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 2008, 178(11): 1 139-1 147.
- [6] KIND T, HIROSHI TSUGAWA H, CAJKA T, MA Y, LAI Z, MEHTA S S, WOHLGEMUTH G, BARUPAL D K, SHOWALTER M R, ARITA M, FIEHN O. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search [J]. *Mass Spec Rev*, 2017, 37: 513-532.
- [7] 郭天洋, 李杨, 董益阳, 白桦, 马强. 基于特征性子离子和中性丢失快速筛查和识别食品中唑类和有机磷类农药[J]. *质谱学报*, 2019, 40(1): 13-20. GUO Tianyang, LI Yang, DONG Yiyang, BAI Hua, MA Qiang. Rapid screening and identification of Azole and organophosphorous pesticides in food based on characteristic product ions and neutral losses[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2019, 40(1): 13-20 (in Chinese).
- [8] 刘丹, 李亮, 刘彩, 陈笑艳, 钟大放. 甲磺酸多黏菌素 E₂ 组分的色谱分离及质谱裂解规律研究 [J]. *质谱学报*, 2018, 39(6): 653-662. LIU Dan, LI Liang, LIU Cai, CHEN Xiaoyan, ZHONG Dafang. Chromatographic separation and fragmentation mechanism in electrospray ionization mass spectrometry for colistin B methanesulfonate[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2018, 39(6): 653-662 (in Chinese).
- [9] FRISCH M J, TRUCKS G W, SCHLEGEL H B, SCUSERIA G E, ROBB M A, CHEESEMAN J R, MONTGOMERY J A, VREVEN T, KUDIN K N, BURANT J C. Gaussian 03[M]. Gaussian Inc, Pittsburgh, PA, 2003.
- [10] DONGRÉ A R, JONES J L, SOMOGYI Á, WYSOCKI V H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency; evidence for the mobile proton model[J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(35): 8 365-8 374.
- [11] RODRIQUEZ C F, CUNJE A, SHOEIB T, CHU I K, HOPKINSON A C, SIU K W M. Proton migration and tautomerism in protonated triglycine[J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123 (13): 3 006-3 012.
- [12] HU N, TU Y P, LIU Y, JIANG K, PAN Y. Dissociative protonation and proton transfers: fragmentation of α , β -unsaturated aromatic ketones in mass spectrometry[J]. *J Org Chem*, 2010, 73: 3 369-3 376.