

氟喹诺酮类抗生素的 表面解吸常压化学电离质谱行为研究

方小伟^{1,2}, 李 婧^{1,2}, 李 毅¹, 张兴磊^{1,2}

(1. 东华理工大学, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 江西 南昌 330013;
2. 东华理工大学分析测试研究中心, 江西 南昌 330013)

摘要:采用表面解吸常压化学电离质谱(DAPCI-MS)技术对5种氟喹诺酮类化合物进行多级串联质谱研究,获得了各化合物的多级质谱信息。通过比较各化合物质谱裂解途径的异同,发现在正离子检测模式下,氟喹诺酮类化合物在碰撞诱导解离过程中均产生中性丢失44 u(CO₂)、28 u(CO)、20 u(HF)、18 u(H₂O)的离子峰。如果结构中含有哌嗪环取代基,脱羧后可观察到哌嗪环的重排反应,生成丢失43 u(C₂H₃NH₂)和57 u(CH₃-CH₂-N=CH₂)的碎片离子,这可作为“诊断”其他氟喹诺酮类化合物和结构类似物的特征。该方法无需样品预处理,不使用有机溶剂,分析速度快,是一种无污染、无毒、原位、无损的分析方法,可为痕量药物分析提供新的思路。

关键词:氟喹诺酮类抗生素;表面解吸常压化学电离(DAPCI);质谱

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2016)04-0319-08

doi:10.7538/zpxb.youxian.2016.0032

Analysis of Fluoroquinolones by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry

FANG Xiao-wei^{1,2}, LI Jing^{1,2}, LI Yi¹, ZHANG Xing-lei^{1,2}

(1. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation,

East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China;

2. The Research Center of Analysis and Testing,

East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: Fluoroquinolones (FQs) are the third generation of quinolones (QNs), which are one of the most important breakthrough in the field of artificially synthesis of antimicrobial agents following sulfa drugs. Because of its wide antimicrobial spectrum, strong antibacterial activity, no cross resistance side effects with other antimicrobial agents, FQs are widely used in small animal and human many kinds of infectious disease-

收稿日期:2015-08-28;修回日期:2015-12-17

基金项目:国家自然科学基金项目(21305011);国家重大科学仪器设备专项(2011YQ14015008、2011YQ17006702);长江学者和创新团队发展计划项目(IRT13054)资助

作者简介:方小伟(1987—),男(汉族),江西上饶人,助教,分析化学专业。E-mail: fwx273@126.com

通信作者:张兴磊(1986—),男(汉族),山东泰安人,讲师,从事分析化学研究。E-mail: leizi8586@126.com

网络出版时间:2016-07-05;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160705.1212.012.html>

ses prevention and treatment. However, with the widespread use of antibiotics, the problems of counterfeit antibiotics emerged and proliferated gradually. Therefore, it is need to develop an analytical method with high sensitive and high speed. Mass spectrometry was the development of ambient ionization techniques, which enabled the ionization of samples in their native environment without sample pretreatment. After the emergence of the pioneered technique, desorption electrospray ionization (DESI), including more than 20 direct-ionization techniques, have been developed in the past decades. Among them, desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI) is a powerful ionization technique and has been successfully applied to detect trace surface analytes without evidently injuring the sample in food security, forensic science and environmental science. In this study, the DAPCI source coupled with the linear ion trap mass spectrometer was used to investigate the fragmentation mechanism of fluoroquinolones. Five compounds of fluoroquinolones were analyzed using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (DAPCI-MS) by collision induced dissociation in positive ion detection mode. The mass spectra and structures of the five fluoroquinolones were compared with each other, and it was observed that fluoroquinolones gave characteristic fragment ions by the neutral loss of 44 u (CO_2), 28 u (CO), 20 u (HF) and 18 u (H_2O). If compounds have piperazine substituent, piperazine-link rearrangement can be observed after decarboxylation, and characteristic fragment ions by the loss of the 43 u ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{NH}_2$) and 57 u ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{N} = \text{CH}_2$) were produced. All of them can be used as a “diagnosis” of other fluoroquinolone compounds and structure similar to the characteristics of the ions, which can open a way to fast analyze the FQ drugs.

Key words: fluoroquinolones antibiotics; surface desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI); mass spectrometry

氟喹诺酮类 (fluoroquinolones, FQs) 药物是在喹诺酮萘啶环的 6 位处引入氟原子而生成的, 属于第三代喹诺酮类 (quinolones, QNs) 药物。氟喹诺酮类药物是人类在合成抗菌药物方面最重要的突破, 因其抗菌谱广、抗菌活性强、毒副作用小、与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点, 被广泛应用于动物和人类的多种感染性疾病的预防和治疗中。根据国际上非专用药命名的原则, 对此类新药均采用“-oxacin”来命名, 而该词在我国音译为“沙星”。目前临床上常用的氟喹诺酮类药物主要有诺氟沙星 (norfloxacin)、氧氟沙星 (ofloxacin)、左氧氟沙星 (levofloxacin)、环丙沙星 (ciprofloxacin)、洛美沙星 (lomefloxacin)、氟罗沙星 (fleroxacin)、培氟沙星 (pefloxacin) 和依诺沙星 (enoxacin) 等。随着抗生素的广泛使用, 假冒抗生素的问题逐渐引起大家的关注。据世界卫生组织

2015 年在 80 个国家发起的新监测和报告项目显示, 全球各地假抗生素的问题越来越严重^[1]。

传统的抗生素分析方法主要有外观性状观察法^[2]和简单试剂识别法^[3], 这两种方法可对假冒抗生素进行简单的初步筛选。目前, 用于抗生素品质鉴定的方法主要有微生物法^[4-5]、色谱法^[6-9]、毛细管电泳法^[10-11]、核磁共振法^[12]和电化学法^[13]等, 但这些方法普遍存在操作步骤复杂、耗时较长等缺点, 对于粉状、片状药物, 由于其水溶性不强, 还需要使用大量的有机溶剂。表面解吸常压化学电离质谱 (DAPCI-MS) 是近年发展起来的一种新兴质谱技术, 具有快速、无损、灵敏度高等优点, 可在常温常压下直接对粉状药品中的痕量物质进行分析^[14-15]。

本研究拟利用实验室自制的 DAPCI 电离源, 在无需样品预处理的情况下, 对 5 种氟喹诺酮类药物进行串联质谱分析, 以获得多级

质谱指纹谱图,并分析其在 DAPCI-MS 正离子模式下的质谱裂解规律,希望为复杂样品中痕量氟喹诺酮类药物的测定提供新的思路和方法,同时也为氟喹诺酮类药物的快速结构解析、定量分析和药代动力学研究提供可靠的理论支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

LTQ-XL 型线性离子阱质谱仪:美国 Finnigan 公司产品,配有 Xcalibur 型数据处理系统;表面解吸常压化学电离源:实验室自制。

1.2 主要材料与试剂

诺氟沙星胶囊:成都天台山制药有限公司产品;氧氟沙星胶囊:上海康普药业有限公司产品;加替沙星片:四川科伦药业股份有限公司产品;氟罗沙星片:河南天方药业股份有限公司产

品;盐酸环丙沙星片:广州白云山制药有限公司产品。上述 5 种药物均购自当地药店,其基本信息列于表 1。

1.3 实验条件

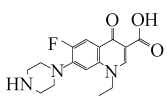
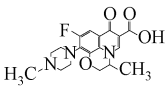
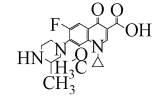
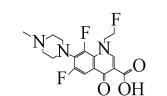
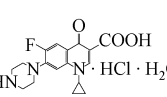
设置 LTQ-MS 为正离子检测模式,放电针电压为 3.2 kV,离子传输管温度为 275 °C,放电针尖至质谱入口毛细管的直线距离为 1.0 cm,样品距放电针尖约 1~3 mm,碰撞诱导解离(CID)时间为 100 ms,离子选择窗口为 1.0 u,碰撞能量为 13%~25%,其他参数由 LTQ-MS 系统自动优化,所得质谱数据扣除背景后导出。

1.4 实验方法

对于胶囊类药物,取其内容物,薄薄平铺一层于事先洗净的载玻片上,采用手动方式进样;对于片剂药物,去除其表面糖衣后直接放于载玻片上进样分析。

表 1 5 种氟喹诺酮类药物的基本信息

Table 1 Basic informations of 5 fluoroquinolones

药品名称	主要成分	相对分子质量	分子式	结构式
诺氟沙星胶囊	诺氟沙星	319.24	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	
氧氟沙星胶囊	氧氟沙星	361.37	$C_{18}H_2FN_3O_4$	
加替沙星片	加替沙星	375.40	$C_{19}H_{22}FN_3O_4$	
氟罗沙星片	氟罗沙星	369.34	$C_{17}H_{18}F_3N_3O_3$	
盐酸环丙沙星片	盐酸环丙沙星	415.85	$C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot HCl \cdot H_2O$	

2 结果与讨论

对诺氟沙星、氧氟沙星、加替沙星、氟罗沙星和环丙沙星 5 种氟喹诺酮类化合物进行串联质谱分析,获得的多级质谱碎片信息列于表 2。通过比较各化合物的结构信息和质谱信息,发现它们在正离子模式下均产生中性丢失 44 u

(CO_2)、28 u(CO)、20 u(HF)、18 u(H_2O)的离子峰。如果药物结构中含有哌嗪环取代基,脱羧后可观察到哌嗪环的重排反应,丢失 43 u ($C_2H_3NH_2$)、57 u ($CH_3-CH_2-N=CH_2$) 主要的特征离子。下面以诺氟沙星为例,阐明其质谱裂解途径。

表 2 5 种氟喹诺酮类化合物的 DAPCI-MSⁿ 信息 ($n=1\sim 3$)
 Table 2 DAPCI-MSⁿ informations of 5 fluoroquinolones ($n=1-3$)

前体离子 m/z	二级质谱全扫描		三级质谱全扫描	
	碎片离子 m/z (丰度/%)	损失类型	碎片离子 m/z (丰度/%)	损失类型
诺氟沙星 [M+H] ⁺ 320	302(100)	-H ₂ O	282(100)	-HF
			274(10)	-CO
	276(50)	-CO ₂	256(100)	-HF
			233(50)	-C ₂ H ₃ NH ₂
			219(10)	-CH ₃ -CH ₂ -N=CH ₂
氧氟沙星 [M+H] ⁺ 362	344(90)	-H ₂ O	324(50)	-HF
			316(100)	-CO
	318(100)	-CO ₂	298(10)	-HF
				-C ₂ H ₃ NH ₂
			261(100)	-CH ₃ -CH ₂ -N=CH ₂
加替沙星 [M+H] ⁺ 376	358(100)	-H ₂ O	338(100)	-HF
				-CO
	332(95)	-CO ₂	312(40)	-HF
			289(100)	-C ₂ H ₃ NH ₂
			274(50)	-CH ₃ -CH ₂ -N=CH ₂
氟罗沙星 [M+H] ⁺ 370	352(50)	-H ₂ O	332(100)	-HF
			324(85)	-CO
	326(100)	-CO ₂		-HF
				-C ₂ H ₃ NH ₂
			269(100)	-CH ₃ -CH ₂ -N=CH ₂
环丙沙星 [M+H] ⁺ 332	314(80)	-H ₂ O	294(100)	-HF
				-CO
	288(100)	-CO ₂	268(100)	-HF
			245(60)	-C ₂ H ₃ NH ₂
			231(20)	-CH ₃ -CH ₂ -N=CH ₂

诺氟沙星胶囊的主要成分为诺氟沙星,即 1-乙基-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-7-(1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸,相对分子质量为 319。诺氟沙星的串联多级质谱图示于图 1,推测的裂解途径示于图 2。诺氟沙星呈酸碱两性,在正离子检测模式下可质子化形成准分子离子[M+H]⁺,从图 1a 中可明显看到质子化的诺氟沙星准分子离子 m/z 320。

为了考察诺氟沙星在碰撞诱导解离中的裂

解规律,选择质子化的诺氟沙星(m/z 320)进行多级串联质谱分析。在二级质谱中,当碰撞能量为 20%时,母离子 m/z 320 主要产生 m/z 302 和 m/z 276 碎片离子,还有响应较弱的 m/z 256 和 m/z 233 碎片离子,示于图 1b。其中, m/z 302 与 m/z 320 相比减少了 18 u,推测是由于电荷诱导羧基中 C—O 单键发生断裂,中性丢失一分子 H₂O 形成的,对应图 2 中的裂解途径①。已有文献报道,在氟喹诺酮类药物

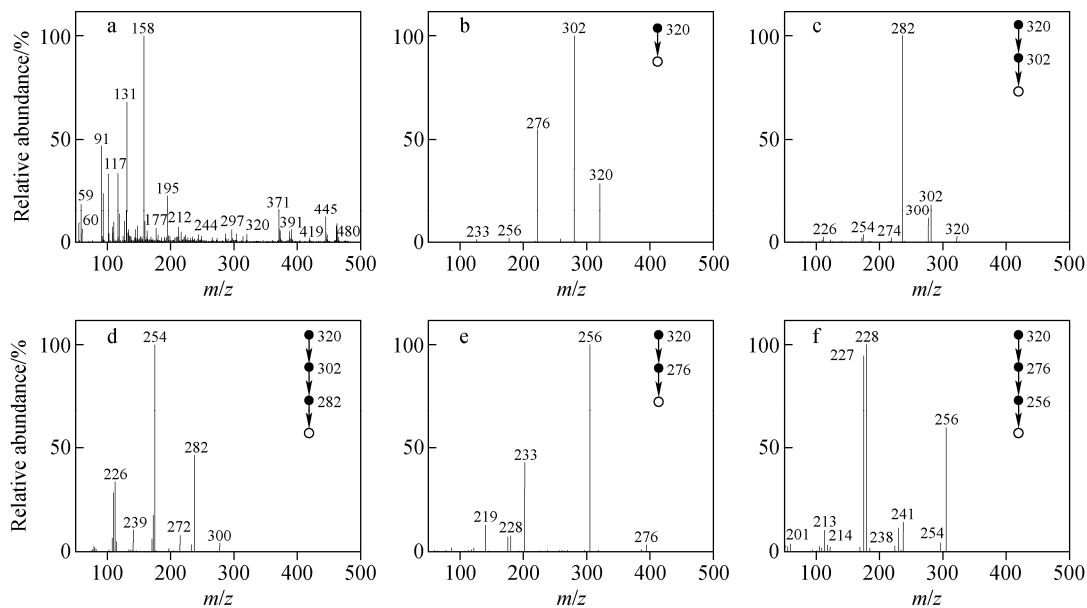
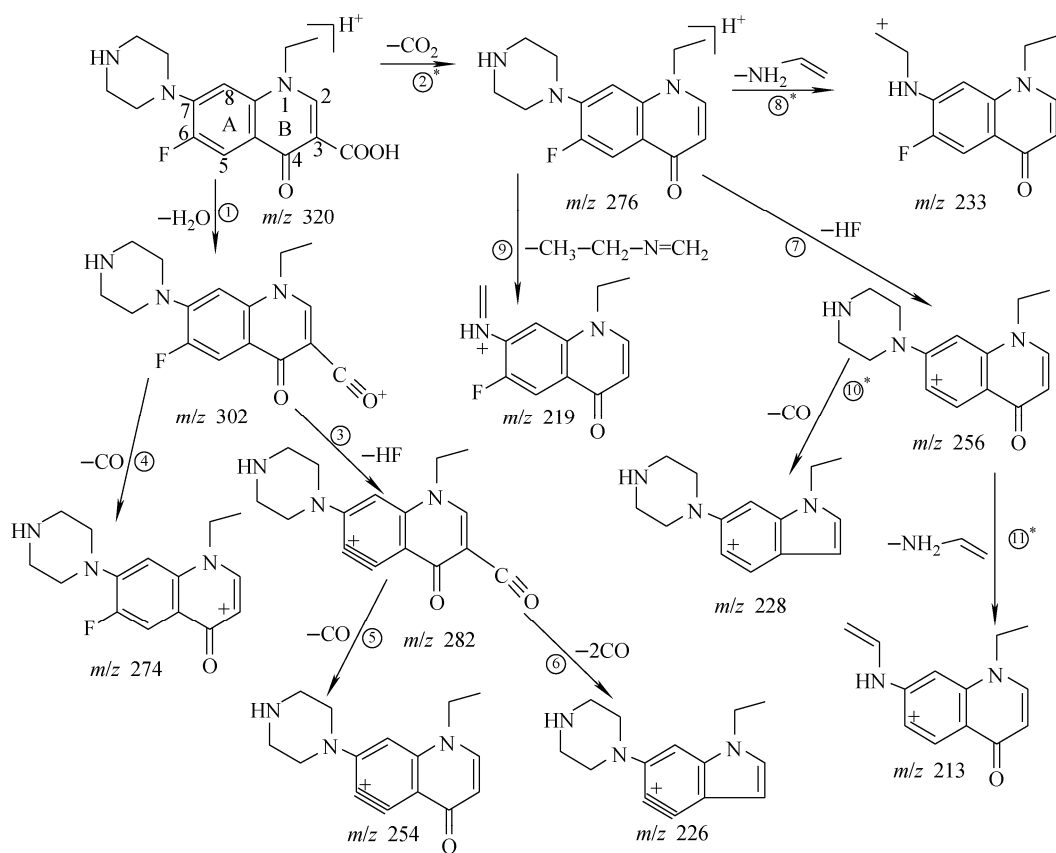


图1 诺氟沙星的串联多级质谱图 ($n=1\sim 4$)

Fig. 1 DAPCI-MSⁿ of norfloxacin ($n=1\sim 4$)



注:图中带*号的裂解途径推测存在分子内重排

图2 诺氟沙星的裂解规律

Fig. 2 Fragmentation mechanism of norfloxacin

的电喷雾串联质谱(ESI-MSⁿ)研究中发现,该类药物较易发生羧基 C—C 裂解,同时伴随羧基中 C—O 的断裂^[16-17]。而在本实验中,C—C 裂解现象并不明显,这可能是由于 DAPCI 是一个较强的电离过程,产生的离子活性更强。同样, m/z 276 与 m/z 320 相比减少了 44 u,推测为分子内重排后中性丢失一分子 CO₂ 形成的碎片离子,对应图 2 中的裂解途径②。这与文献[18]用 ESI-MSⁿ 分析所得的结果一致,并且其余几种化合物也发现了相同的裂解途径。 m/z 256 与 m/z 320 相比减少了 64 u,推测为母离子脱羧后继而又发生中性丢失一分子 HF 所致,即经过两次断裂后形成的产物,其丰度相对较低。 m/z 233 与 m/z 320 相比减少了 87 u,推测为母离子脱羧后继而又发生哌嗪环断裂重排,中性丢失一分子乙烯胺(CH₂ = CH—NH₂)而形成,也是两次断裂后形成的产物,丰度较低。

选择二级质谱中的碎片离子 m/z 302 进行 CID 实验,在三级质谱中,主要得到 m/z 282 碎片离子,以及丰度相对较小的 m/z 274、254、226 碎片离子,示于图 1c。其中, m/z 282 与 m/z 302 相比减少了 20 u,推测为中性丢失一分子 HF 而生成,对应图 2 中的裂解途径③。 m/z 274 与 m/z 302 相比减少了 28 u,推测为中性丢失一分子 CO 而生成,对应图 2 中的裂解途径④。 m/z 254 与 m/z 302 相比减少了 48 u,推测为母离子中性丢失一分子 HF 后又失去一分子 CO 所致,是经过两次断裂后生成的产物,其丰度相对较低。

进一步对 m/z 282 碎片离子进行串联质谱分析,主要得到 m/z 254 和 m/z 226 碎片离子,示于图 1d。其中, m/z 254 与 m/z 282 相比减少了 28 u,推测为中性丢失一分子 CO 而生成,对应图 2 中的裂解途径⑤。 m/z 226 与 m/z 282 相比减少了 56 u,推测为中性丢失两分子 CO 所致,对应图 2 中的裂解途径⑥。

对二级质谱分析中产生的 m/z 276 碎片离子进行三级串联质谱分析,得到 m/z 256、233、219 碎片离子,示于图 1e。其中, m/z 256 与 m/z 276 相比减少了 20 u,推测为中性丢失一分子 HF 而生成,对应图 2 中的裂解途径⑦。 m/z 233 与 m/z 276 相比减少了 43 u,推测为

哌嗪环断裂重排,失去一中性分子乙烯胺(CH₂ = CH—NH₂)而生成,对应图 2 中的裂解途径⑧。 m/z 219 与 m/z 276 相比减少了 57 u,推测为哌嗪环的另一种重排方式,丢失 CH₃—CH₂—N = CH₂ 而生成,对应图 2 中的裂解途径⑨。

进一步对 m/z 256 碎片离子进行四级质谱分析,主要得到 m/z 227、228、213 碎片离子,示于图 1f。其中, m/z 228 与 m/z 256 相比减少了 28 u,推测为 B 环发生重排,丢失一中性分子 CO 而形成,对应图 2 中的裂解途径⑩。 m/z 213 与 m/z 256 相比减少了 43 u,与图 2 中的裂解途径⑥丢失碎片的质量数相同,故推测为哌嗪环断裂重排,失去一中性分子乙烯胺(CH₂ = CH—NH₂)而生成,对应图 2 中的裂解途径⑪。 m/z 227 与 m/z 256 相比减少了 29 u,其裂解规律尚不明确。

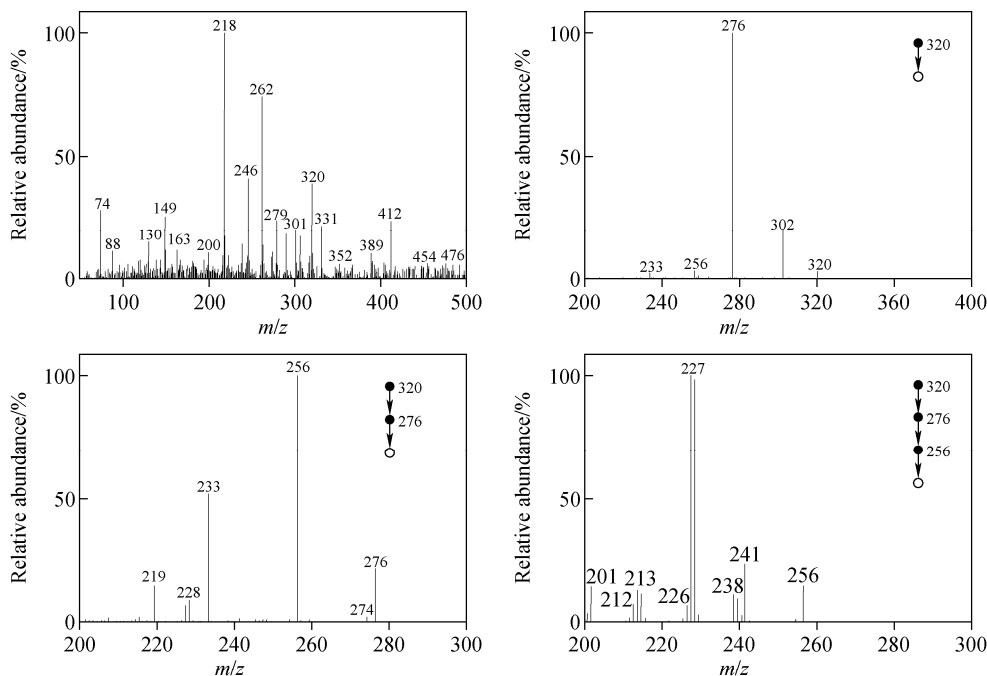
3 实际样品检测

采用 DAPCI-MS 法对可能存在抗生素污染的河水样品进行分析,可观察到[M+H]⁺ (m/z 320)准分子离子峰,其一级质谱图示于图 3a。为排除假阳性,对主要离子峰进行多级串联质谱分析,所得质谱图示于图 3b~3d。结果表明,实验所得碎片离子符合推测的诺氟沙星裂解规律,说明该方法可用于实际环境水体中诺氟沙星的快速检测。

4 结论

采用表面解吸常压化学电离质谱法分析 5 种氟喹诺酮类化合物,通过比较各化合物的结构信息和质谱信息,发现它们在正离子模式下均产生中性丢失 44 u(CO₂)、28 u(CO)、20 u(HF)、18 u(H₂O)的离子峰。如果结构中含有哌嗪环取代基,脱羧后可观察到哌嗪环的重排反应,生成丢失 43 u(C₂H₃NH₂)、57 u(CH₃—CH₂—N = CH₂)的特征碎片离子,它们可以作为“诊断”其他氟喹诺酮类化合物和结构类似物的特征。

研究表明,DAPCI-MS 法可对药物粉末直接进行质谱分析,样品无需任何预处理,每个样品在不足 1 min 内即可完成质谱分析,且不需要载气,与小型质谱仪联用可用于药品的实时



注:a. 一级质谱图;b. 二级质谱图;c. 三级质谱图;d. 四级质谱图

图3 实际河水样品的 DAPCI-MSⁿ 质谱图Fig. 3 DAPCI-MSⁿ spectra of river water sample

在线分析;该方法不使用任何有机溶剂,是一种无污染、无毒、原位、无损的分析方法,可为痕量药物分析提供新的思路。

参考文献:

- [1] <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
- [2] 邓姿源. 几种假冒抗生素类药品外观鉴别[J]. 中国临床医生, 2001, 29(9): 45.
DENG Ziyuan. Exterior of some counterfeit antibiotic drugs to identify[J]. Journal of Chinese Physician, 2001, 29(9): 45(in Chinese).
- [3] SINGH B K, PARWATE D V, SHUKLA S K. Rapid color test identification system for screening of counterfeit fluoroquinolone[J]. Journal of Chemistry, 2009, 6(2): 377-384.
- [4] 杨天赐, 彭宣宪. 微生物比浊法检定抗生素 G-418 效价[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(2): 90-92.
YANG Tianci, PENG Xuanxian. Determination of the potency of antibiotic G-418 by microbial turbidimetry[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2008, 33(2): 90-92 (in Chinese).
- [5] 何作民, 申放, 黄旺潮. 不同培养基对硫酸庆大霉素注射液含量的影响[J]. 中国药业, 2010, 19(2): 35-36.
- [6] HE Zuomin, SHEN Fang, HUANG Wangchao. Effect of different culture mediums on content assay of gentamycin sulfate injection[J]. China Pharmaceuticals, 2010, 19(2): 35-36 (in Chinese).
- [7] YUAN M R. Determination of the antibiotic oxytetracycline in commercial milk by solid-phase extraction; A high-performance liquid chromatography (HPLC) experiment for quantitative instrumental analysis[J]. Journal of Chemical Education, 2012, 89(5): 656-659.
- [8] BATT A L, KOSTICH M S, LAZORCHAK J M. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(13): 5 021-5 030.
- [9] XU P, JIANG S, TAO B, et al. Determination and study on degradation dynamics of fungicide validamycin a residue in soil using pre-column derivatization and capillary gas chromatography[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2009, 64(8): 818-822.
- [10] LIAWRUANGRATH B, LIAWRUANGRATH

- S. High performance thin layer chromatographic determination of erythromycin in pharmaceutical preparations[J]. *Chromatographia*, 2001, 54(5): 405-408.
- [10] PAJCHEL G, MICHALSKA K, GERMAN R, et al. Assay of the related compounds thiamphenicol, florphenicol, and chloramphenicol by CE[J]. *Chromatographia*, 2008, 68(7): 587-591.
- [11] MICHALSKA K, PAJCHEL G, TYSKI S. Different sample stacking strategies for the determination of ertapenem and its impurities by micellar electrokinetic chromatography in pharmaceutical formulation[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(14): 2934-2942.
- [12] 施燕红, 刘松柏, 宋国强. 利用 NMR 测定盐酸头孢吡肟中杂质的含量[J]. *波谱学杂志*, 2003, 20(3): 259-264.
SHI Yanhong, LIU Songbai, SONG Guoqiang. Measurement of the percentage of impurity in cefepime dihydrochloride by NMR[J]. *Magnetic Resonance*, 2003, 20(3): 259-264(in Chinese).
- [13] GARCÍA C D, HENRY C S. Direct determination of carbohydrates, amino acids and antibiotics by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(18): 4778-4783.
- [14] 张燕, 沈燕, 韩超, 等. 表面解吸常压化学电离质谱法直接测定宠物食品中三聚氰胺[J]. *现代科学仪器*, 2011, (5): 86-90.
ZHANG Yan, SHEN Yan, HAN Chao, et al. Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct detection melamine in pet foods[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2011, (5): 86-90(in Chinese).
- [15] ZHANG X L, JIA B, HUANG K K, et al. Tracing origins of complex pharmaceutical preparations using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(19): 8060-8070.
- [16] 彭涛. 电喷雾串联质谱裂解规律及其在残留分析中的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [17] 马彬, 孙玉明, 陈笑艳, 等. 氟喹诺酮类化合物的电喷雾离子阱质谱分析[J]. *质谱学报*, 2006, 27(3): 163-167.
MA Bin, SUN Yuming, CHEN Xiaoyan, et al. Analysis of fluoroquinolones by electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2006, 27(3): 163-167(in Chinese).
- [18] 施冰, 张志刚, 吴抒怀, 等. LC-MS/MS 测定水产品中 7 种氟喹诺酮类抗菌素残留量的方法研究[J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(增刊 1): 25-30.
SHI Bing, ZHANG Zhigang, WU Shuhuai, et al. Determination of 7 kinds of residual fluoroquinolone antibiotics in water by LC-MS/MS[J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2004, 14(Suppl 1): 25-30(in Chinese).