

液质联用定性分析枯草杆菌肽 发酵液中主要成分

No.LCMS-010

摘要：使用岛津超快速液相色谱UFLCXR和新一代单四级杆质谱LCMS-2020，15分钟内分离并鉴定了枯草杆菌肽发酵液中7种主要成分，其中2种美国药典未收录。主成分bacitracin A出峰时间较药典方法提高了4倍之多，且分离度未下降。

关键词：LC-MS 液质联用 bacitracin 枯草杆菌肽 yeast cream 发酵液

生物制药是一项系统的工程，其产物除药物成分外往往会含有多种杂质。杂质成分复杂，分析时间长且基质干扰大，因此在使用传统的紫外检测器分析生物药品中某些成分时遇到挑战，而液质联用的方法可以很好地进行定性分析。枯草菌素（Bacitracin）是1945年Johnson等由枯草菌群中的一种*Bacillus Subtilis* var. Tracy株分离而得的一种多肽类抗生素。它对革兰阴性菌具杀菌作用，还可与敏感细菌的细胞膜结合，损伤细胞膜，致使各种离子、氨基酸等重要物质流失。枯草菌素在临床上常制成软膏治疗眼睛、皮肤黏膜等处细菌性感染，在畜禽临床上可做为饲料添加剂，促进动物生长，提高饲料转化效率，也可以制成针剂治疗牛羊等的乳腺炎。据报道枯草菌素至少含有九种组成成分，如Bacitracin A、Bacitracin B、Bacitracin C、Bacitracin F等等。其中Bacitracin A含量最高，且为主要抗菌有效成分。本文使用岛津超快速液相色谱UFLCXR和新一代单四级杆质谱LCMS-2020液质联用的方法定性分析了杆菌肽发酵液中7种主成分，其中2种美国药典未收录。

■ 仪器配置

LC-20ADXR × 2(流动相输液泵)，DGU-20A3(在线脱气机)，SIL-20ACXR(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，SPD-M20A(二极管阵列检测器)，LCMS-2020(单四级杆质谱仪)，LCMSsolution V5.1(色谱工作站)。

■ 分析方法和结果

1. Bacitracin A及Bacitracin B1, B2和B3结构

Bacitracin A英文名称：

(4R)-4-[(2S)-2-((2-[(1S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-5-yl)formamido)-4-methylpentanamido]-4-[[[(1S)-1-[[[(3S,6R,9S,12R,15S,18R,21S)-18-(3-aminopropyl)-12-benzyl-15-(butan-2-yl)-3-(carbamoylmethyl)-6-(carboxymethyl)-9-(1H-imidazol-5-ylmethyl)-2,5,8,11,14,17,20-heptaoxo-1,4,7,10,13,16,19-heptaazacyclopentacosan-21-yl]carbamoyl]-2-methylbutyl]carbamoyl]butanoic acid

CAS NO: 1405-87-4

分子式: C₆₆H₁₀₃N₁₇O₁₆S

结构式:

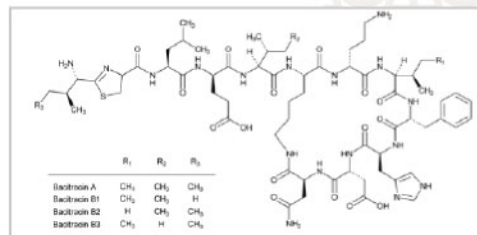


图1 Bacitracin A及Bacitracin B1, B2和B3结构式

■ 色谱条件

Shim-pack XR-ODS, 2.0mm i.d. × 75mm L(配SSI 35-0149在线过滤组件); 以10 mM甲酸铵为流动相A, 以13: 2的甲醇: 乙腈为流动相B, 按60%B等度洗脱。流动相流速为0.4 mL/min。柱温为40°C。进样体积2μL。

■ 质谱条件

以LCMS-2020为检测器, 按下表参数进行检测。质谱扫描范围m/z1000-1500。

表1 质谱采集参数

ESI Mode	+	DL Temperature	200°C
Event Time	0.1 S	Heat Block Temperature	450°C
Detector Voltage	-1.10 kV	Nebulizing Gas Flow	1.5 L/min
Interface Voltage	4.5 kV	Drying Gas Flow	10 L/min

■ 样品制备

bacitracin杆菌肽发酵液过0.22 μm滤膜后进样分析。

■ 结果图谱

在波长300 nm下的PDA提取色谱图中找到已知杂质bacitracin F, 出峰时间为11.14 min, 根据美国药典记载其他主要成分相对Bacitracin A的保留时间, 即可在254 nm下的PDA提取色谱图中判断Bacitracin杂质的大致出峰位置。

表2 美国药典中其他主要成分相对Bacitracin A的保留时间

名称	相对保留时间
Bacitracin C1	0.5
Bacitracin C2	0.6
Bacitracin C3	0.6
Bacitracin B1	0.7
Bacitracin B2	0.7
Bacitracin B3	0.8
Bacitracin A	1.0
Bacitracin F	2.4

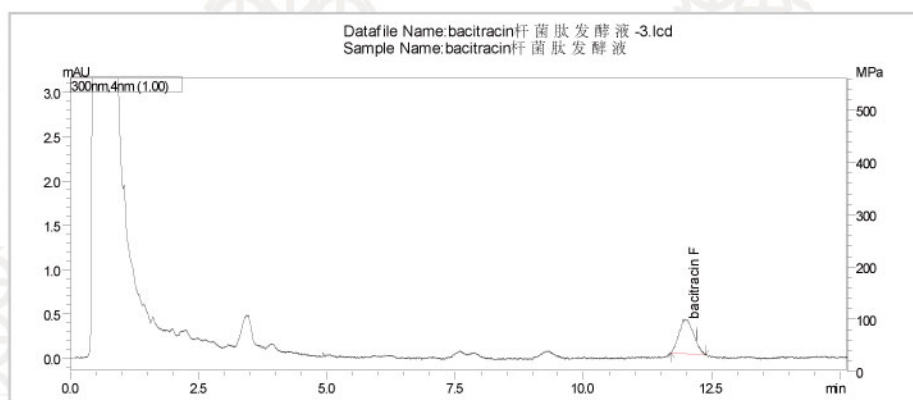


图2 枯草杆菌肽发酵液300 nm下色谱图

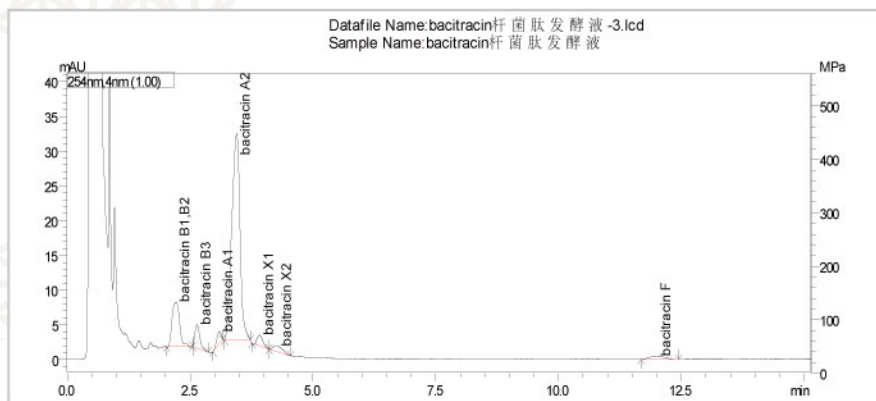


图3 枯草杆菌肽发酵液254 nm下色谱图

参考PDA的出峰时间在质量数色谱图4中标出各杆菌肽出峰位置，并显示各组分基峰的提取离子流图。

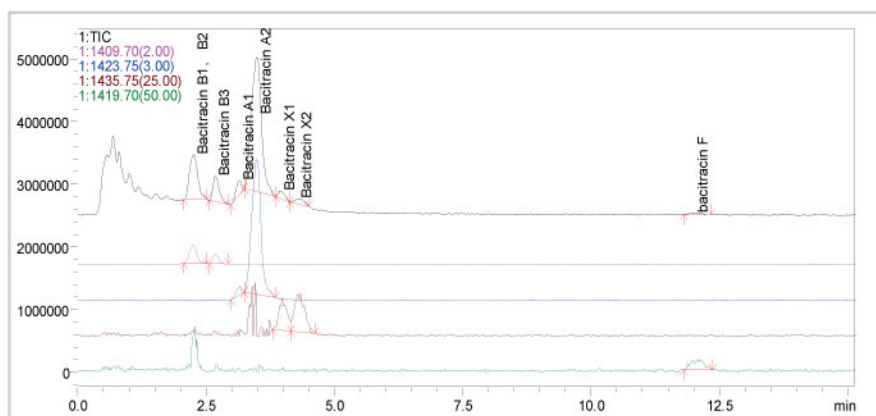


图4 枯草杆菌肽发酵液质量数色谱图

■ bacitracin A及bacitracin B的定性分析结果

bacitracin A的质谱图放大后如下:

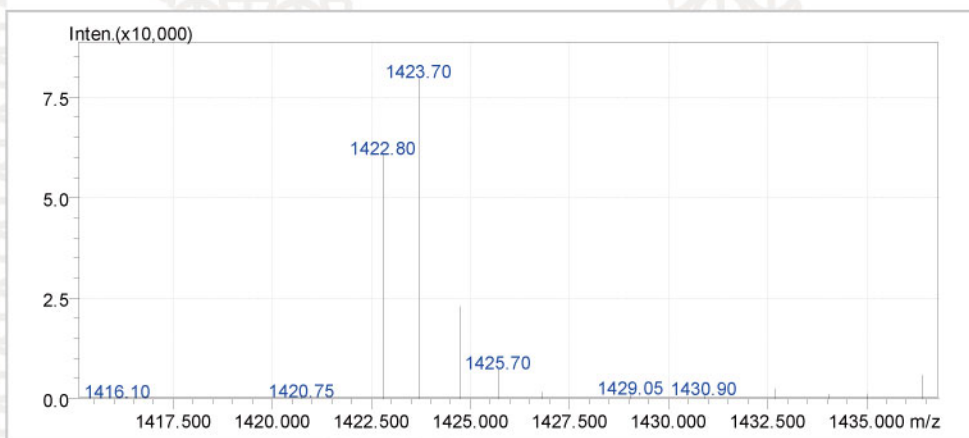


图5 bacitracin A的质谱图

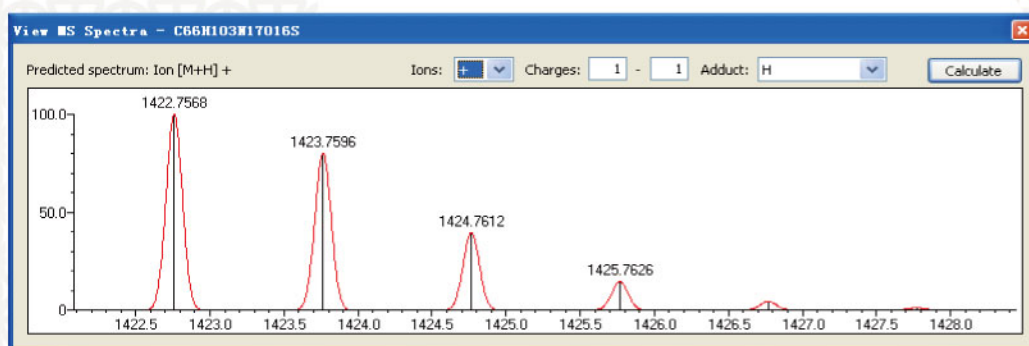


图6 bacitracin A的理论质谱图

bacitracin A的分子式为 $C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$ ，使用岛津accurate mass calculator软件计算得到其单同位素精确分子量为1421.7489， $[M+H]^+$ 的精确分子量为1422.7568，测量值为1422.80，在仪器的误差范围内。同位素丰度比100:80:40:14，测量值与理论值接近。bacitracin A的光谱图如下，最佳吸收波长251 nm。

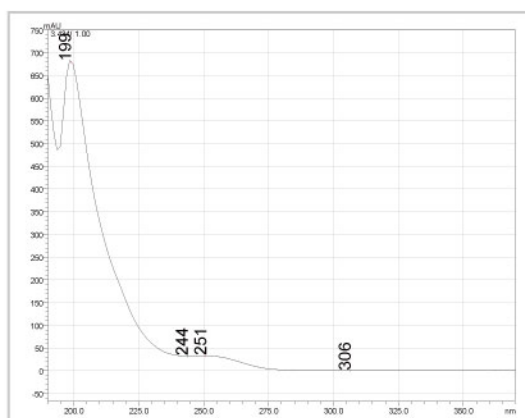


图7 bacitracin A的光谱图

bacitracin B的质谱图放大后如图8。其中 m/z 1408.75为bacitracin B的单同位素峰，同位素丰度比确认无误。bacitracin B的单同位素峰与bacitracin A (1422.80) 质核比相差14.05，从杆菌肽的结构式信息不难判断，这正是相差了一个亚甲基(精确分子量14.0157)。

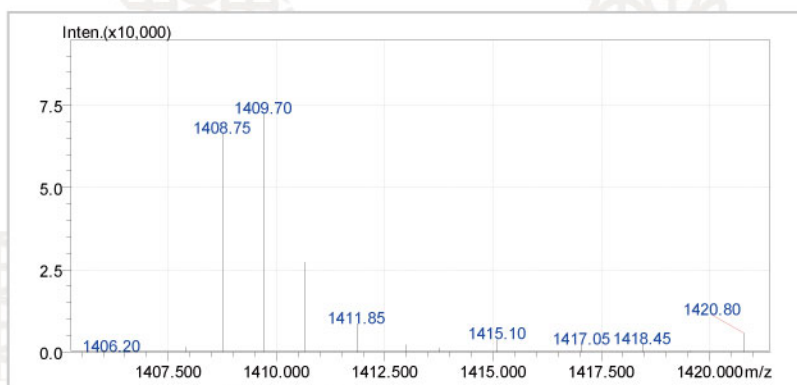


图8 bacitracin B的质谱图

未知组分bacitracin X1、X2的定性分析结果

未知组分bacitracin X1的质谱图如下：

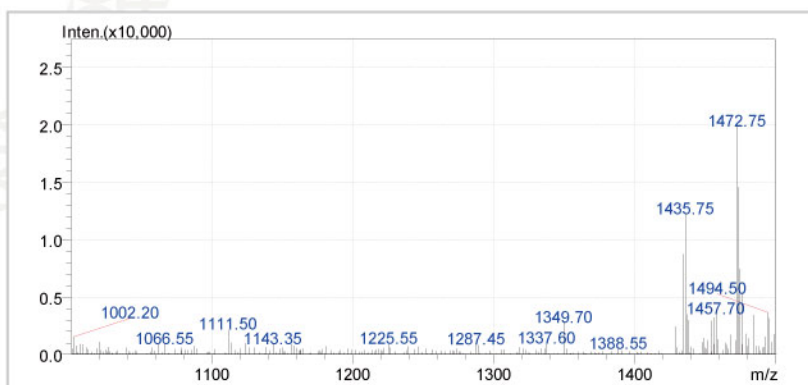


图9 bacitracin X1的质谱图

bacitracin X1的光谱图如下，最大吸收峰为251 nm，与其他杆菌肽光谱图类似；

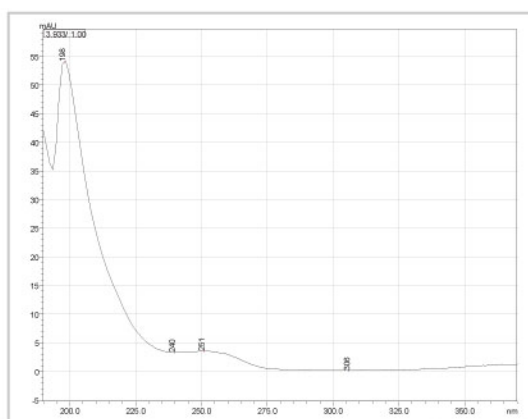


图10 bacitracin X1的光谱图

未知组分bacitracin X2的质谱图如下：

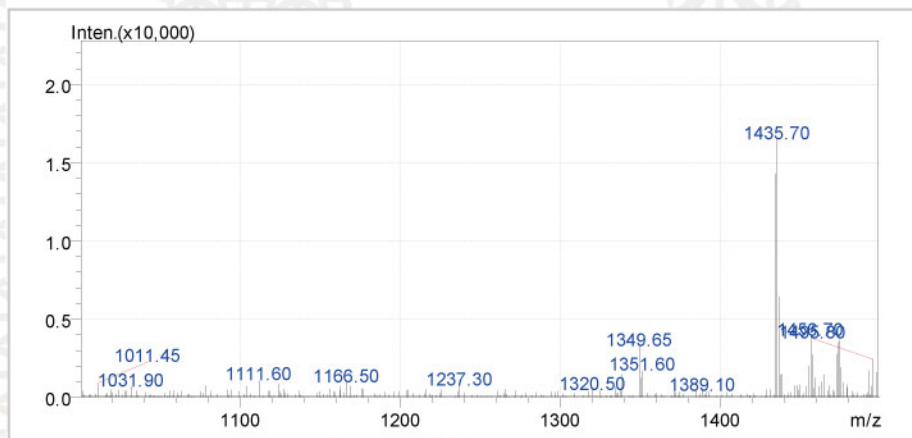


图11 bacitracin X1的质谱图

bacitracin X2的光谱图如下，最大吸收峰为251 nm，与其他杆菌肽光谱图类似；

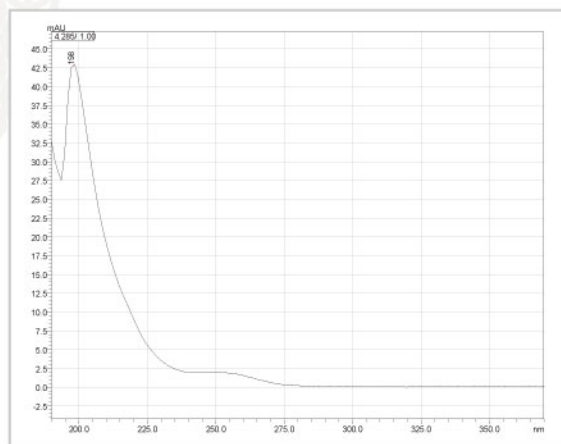


图12 bacitracin X1的光谱图

表3 杆菌肽发酵液主要成分分析结果 (TIC)

名称	保留时间 (min)	Area	Area%	理论塔板数	分离度
Bacitracin B1, B2	2.26	7897450	17.50	826	--
Bacitracin B3	2.68	3300331	7.31	1868	1.49
Bacitracin A1	3.14	1725745	3.82	3705	2.06
Bacitracin A2	3.49	29716319	65.86	1315	1.15
Bacitracin X1	3.95	996005	2.20	3954	1.44
Bacitracin X2	4.28	1088565	2.41	2602	1.13
Bacitracin F	12.00	393112	0.87	11353	19.64

结论

使用岛津UFLCXR和LCMS-2020液质联用系统，可以对枯草杆菌肽发酵液中七种主成分进行准确快速的定性分析。色谱图峰形与欧洲药典类似，相对保留时间比值接近。其中Bacitracin A出峰时间为3.49 min，相比欧洲药典报道的14.4min，缩短了四倍之多，而分离度并未下降，表明Shim-pack ODS-XR柱效优越。另外，岛津UFLC系统配合使用Shim-pack ODS-XR快速柱，不仅分离鉴定了药典报道的几种主成分，还发现了未知成分BacitracinX1和X2，并得到其质谱图、光谱图等定性数据。岛津的超快速液质联用系统具有分析速度快，柱效高、灵敏度高的优点，是药典方法开发和验证的得力工具。