

利用超高效液相色谱 – 高分辨四极杆飞行时间质谱鉴别预混剂中黄霉素

吴家鑫¹, 刘 敏², 尚 飞³, 齐 鹏¹, 张国栋¹, 梁景乐⁴

(1. 中牧实业股份有限公司, 农业部兽用生物制品与化学药品重点实验室, 北京市兽用多肽疫苗设计与制备工程技术研究中心, 北京 100095;

2. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029;

3. 北京化工大学分析测试中心, 北京 100029; 4. 中牧实业股份有限公司, 北京 100070)

[收稿日期] 2016-02-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 05-0024-05 [中图分类号] R917

[摘 要] 利用超高效液相色谱 – 高分辨四极杆飞行时间质谱对预混剂中的黄霉素 5 种组分进行鉴别分析。采用 C18 色谱柱分离, 以乙腈 – 0.1% 甲酸水溶液 (含 2 mmol/L 乙酸铵) 为流动相梯度洗脱, 流速 0.4 mL/min, 柱温 40 ℃; 质谱条件为电喷雾离子源, 检测方式为负离子全扫描模式, 通过保留时间、精确分子量和二级质谱特征碎片完成对黄霉素的 5 种组分的鉴别。与高效液相色谱方法比较, 本方法具有判断准确、检测快速的特点, 具有很好的应用价值。

[关键词] 鉴别; 黄霉素; 超高效液相色谱; 高分辨四极杆飞行时间质谱

Identification of Flavomycin in Premix by Ultra – Performance Liquid Chromatography – Tandem High Resolution Quadrupole Time – of – Flight Mass Spectrometry

WU Jia – xin¹, LIU Min², SHANG Fei³, QI Peng¹, ZHANG Guo – dong¹, LIANG Jing – le⁴

(1. Key Laboratory of Biological Products and Chemical Drugs for Animals, Ministry of Agriculture, Beijing Engineering Research Center of Design and Development of Synthetic Peptide Vaccines for Animals, China Animal Husbandry Industry Co Ltd, Beijing 100095, China;

2. Beijing Key Laboratory of Bioprocess, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

3. Analysis and Testing Center, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

4. China Animal Husbandry Industry Co Ltd, Beijing 100070, China)

Abstract: Using ultra – performance liquid chromatography – tandem high resolution quadrupole time – of – flight mass spectrometry, the discriminant analysis of 5 components of flavomycin in premix was conducted. Based on C18 chromatogram column separation, the acetonitrile – 0.1% formic acid aqueous solution (including 2 mmol/L ammonium acetate) was employed as the mobile phase at flow rate of 0.4 mL/min for gradient elution at column temperature of 40 ℃; Mass spectrometry conditions were electrospray ionization (ESI) operated in negative ion full scan mode. The identification of 5 components of flavomycin were implemented based on retention time, exact molecular weight, and secondary mass spectral characteristic fragments. Compared with high

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2011AA10A214)

作者简介: 吴家鑫, 高级工程师, 从事兽药研发工作。E – mail: icebergwujiaxin@163.com

performance liquid chromatography, this method is of better application value for its advantages of accurate judgement and rapid detection.

Key words: indentification; flavomycin; ultra – performance liquid chromatography; high resolution quadrupole time – of – flight mass spectrometry

黄霉素 (flavomycin), 又名斑伯霉素 (banbermycin)、默诺霉素 (moenomycin), 属于磷酸多糖类抗生素^[1], 含有 A、A₁₂、C₁、C₃、C₄ 五种活性成分(结构式如图 1 所示)^[2-4], 其中 A 组分含量超过 50%, 5 个成分

抗菌活性类似^[5-7]。黄霉素主要对革兰氏阳性菌具有抑制作用, 其作用机理是干扰细胞壁构成物质肽聚糖的生物合成^[8-10]。黄霉素可以有效提高动物的饲料转化率, 通常作为一种动物生长促进剂使用^[11-13]。

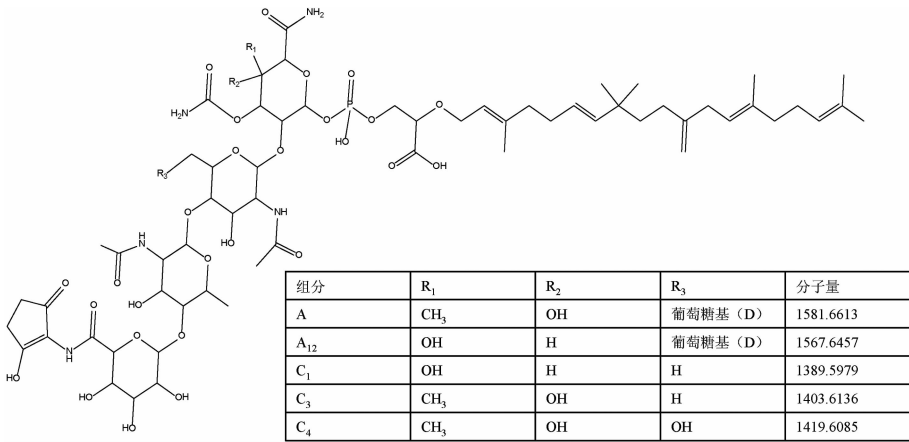


图 1 黄霉素 5 种成分结构式

目前国内多使用高效液相色谱法对预混剂中黄霉素的不同组分进行鉴别研究^[1], 也有文献报道使用离子对试剂分析鉴别黄霉素^[14]。虽然上述方法可以简单快速的鉴别黄霉素的不同成分, 但是这些方法仅仅依靠不同组分极性的差异来进行区分, 证据较为匮乏。超高效液相色谱 – 高分辨四极杆飞行时间质谱法在定性鉴别检测领域的应用越来越广泛。本文通过超高效液相色谱 – 高分辨四极杆飞行时间质谱分析鉴别预混剂中黄霉素的不同组分, 对黄霉素不同组分的精确分子量与特征碎片进行定性分析, 从而建立了一种更有效的定性鉴别黄霉素不同组分的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 Agilent 7890B 超高效液相色谱仪, 配备二元梯度泵, 真空在线脱气机, 自动进样器, Agilent 6540Q – TOF 质谱仪; 仪器控制、数据采集软件及数据分析软件采用 Agilent 公司的 Mass

Hunter 系统。
黄霉素标准品, 中国兽医药品监察所 (1395 黄霉素单位/mg); 黄霉素预混剂 (含量 4%), 中牧实业股份有限公司; 甲酸, Fisher 公司, 色谱纯; 乙腈, Fisher 公司, 质谱纯。

1.2 方法

1.2.1 超高效液相色谱 – 高分辨四极杆飞行时间质谱检测方法 超高效液相色谱条件: Agilent Extend – C18 色谱柱 (50 × 2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 40 ℃。流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液 (含 2 mmol/L 乙酸铵), B 相为乙腈; 流速 0.4 mL/min。进样体积为 3 μL; 梯度洗脱程序: 0.00 → 7.00 min, 90% → 10% A; 7.00 → 7.10 min, 10% → 90% A; 7.10 → 10.00 min, 90% → 90% A。

质谱条件: 电喷雾负离子源 (ESI –), 电压 3500 V, 干燥气温度 300 ℃, 锥孔电压 65 V, 鞘气温度 350 ℃, 干燥气和鞘气流量分别为 8、11

L/min,雾化气压力 35 psi,全扫描模式(100~3000 amu)。

1.2.2 高效液相色谱检测方法 YMC-Pack C-18 色谱柱(250×4.6 mm,5 μm);流动相:0.2% 甲酸铵溶液(用 10% 磷酸溶液调节 pH 至 4.9)-乙腈(55:45);流速为 0.5 mL/min,检测波长为 258 nm。

1.3 溶液配制 取适量黄霉素对照品,利用 50% 甲醇溶液溶解并定容至适当的浓度。

1.4 样品处理 取黄霉素预混剂适量,加入 50% 甲醇溶液适量,混匀,置超声浴中超声 15 min,放冷至室温,用 50% 甲醇溶液稀释至适当浓度,摇匀,过滤。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法鉴别黄霉素不同组分

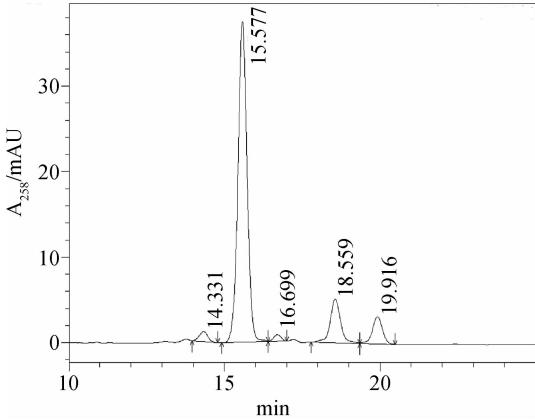


图2 黄霉素标准品的高效液相色谱谱图

使用《兽药国家标准》(化学药品、中药卷)第一册中规定的高效液相色谱方法对黄霉素标准品进行检测,黄霉素不同组分的检测结果如图 2 所示。根据不同组分的极性差异,其保留时间从左到右依次为 14.331、15.577、16.699、18.559、19.916 min,对应《兽药国家标准》(化学药品、中药卷)第一册中黄霉素预混剂检查要求中的组分 1、黄霉素 A、组分 2、组分 3、组分 4。上述方法虽然可以鉴别黄霉素的不同组分,但是依据仅为极性差异,缺少足够的说服力。目前国外相关文献已经明确提出了黄霉素五种组分的具体成分及其分子结构^[15],而高效液相色谱法缺少相应的技术手段对黄霉素五种组分进行深入研究。

2.2 超高效液相色谱-高分辨四极杆飞行时间质谱鉴别黄霉素不同组分 按照 1.3 项所示方法对黄霉素标准品溶液进行检测,黄霉素的质谱扫描检测结果如图 3 和表 1 所示。根据图 3 和表 1 中的数据可以看出,超高效液相色谱-高分辨四极杆飞行时间质谱通过黄霉素不同组分的极性差异、精确分子量差异以及二级质谱中特征碎片三种技术手段实现不同组分有效鉴别,较之高效液相色谱法具有更好确定性。

表1 黄霉素标准品检测结果

组分	保留时间 /min	[M-H] ⁻ (m/z)	碰撞能 /eV	二级质谱特征 碎片(m/z)
A	5.526	1580.6541	40	1152.3227, 1109.3163
A ₁₂	5.460	1566.6384	40	1138.3053, 1095.2931
C ₁	5.775	1388.5859	40	960.2616, 917.2532
C ₃	5.925	1402.6023	40	974.2763, 931.2685
C ₄	6.005	1418.5965	40	990.2697, 947.2645

由于两种鉴别方法使用的色谱柱极性类似、流动相也类似,因此黄霉素不同组分在色谱柱上的保留时间先后顺序不会发生变化,通过其对应顺序可以判断《兽药国家标准》(化学药品、中药卷)第一册中不同组分的具体成分:组分 1 为黄霉素 A₁₂,组分 2 为黄霉素 C₁,组分 3 为黄霉素 C₃,组分 4 为黄霉素 C₄。利用超高效液相色谱-高分辨四极杆飞行时间质谱确定黄霉素不同组分的具体成分后,可以有效指导黄霉素的质量管理;结合代谢工程与基因工程技术也可以有效优化黄霉素的发酵生产过程。

2.3 实际样品检测 使用超高效液相色谱-高分辨四极杆飞行时间质谱对黄霉素预混剂进行鉴别检测,结果如表 2 所示,黄霉素不同组分的保留时间、精确分子量、二级质谱特征碎片与标准品基本一致,说明该方法可以应用于黄霉素的鉴别分析。

表2 黄霉素样品检测结果

组分	保留时间 /min	[M-H] ⁻ (m/z)	二级质谱特征 碎片(m/z)
A	5.446	1580.6540	1152.3217, 1109.3158
A ₁₂	5.362	1566.6387	1138.3063, 1095.2983
C ₁	5.672	1388.5861	960.2611, 917.2527
C ₃	5.823	1402.6021	974.2773, 931.2683
C ₄	5.898	1418.5966	990.2687, 947.2648

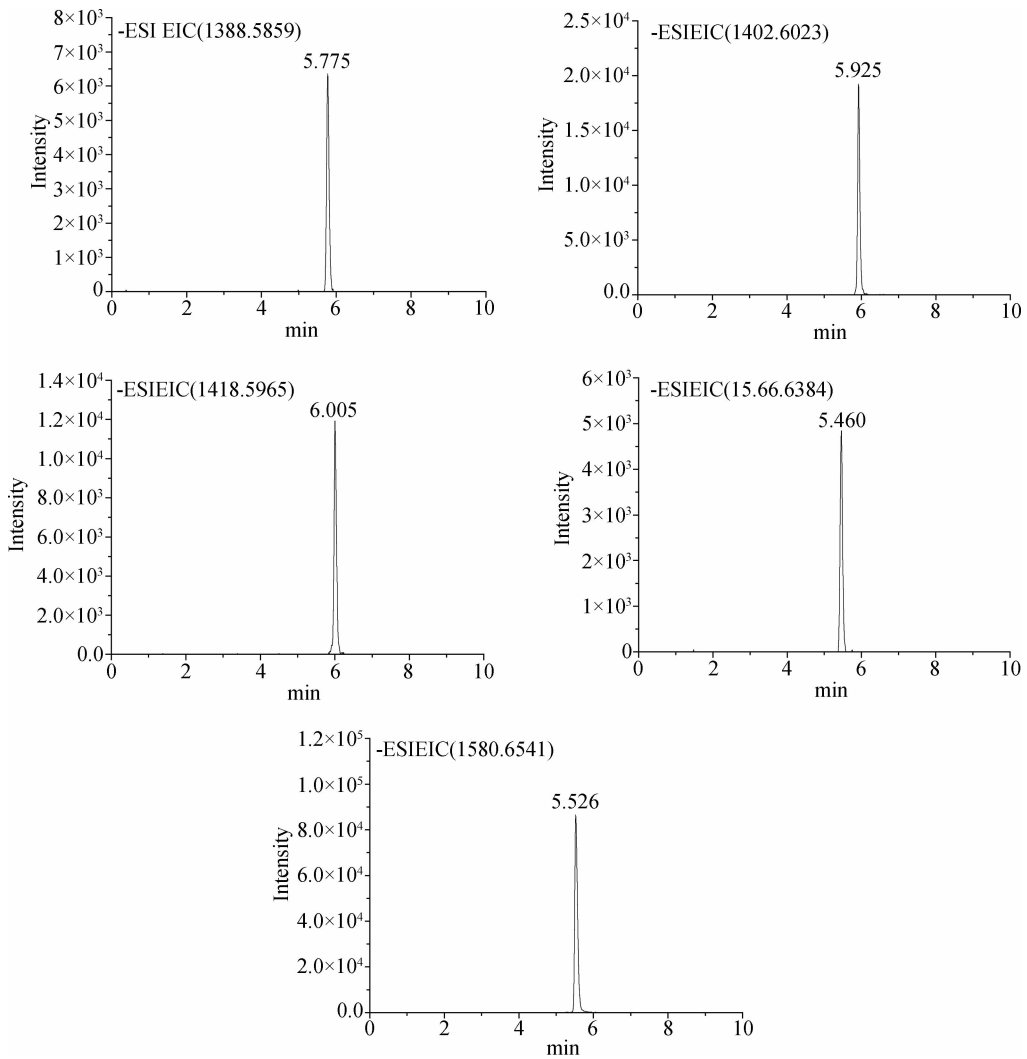


图3 黄霉素标准品一级质谱提取离子流图

3 讨论与小结

与传统液相色谱技术相比,超高效液相色谱(UPLC)技术可以有效提高液相色谱的分析速度、分离效率、样品通量和灵敏度^[16]。高分辨四级杆飞行时间质谱在相关软件的支持下,可以提供母离子与碎片离子的精确质量数,准确推算可能的分子式,从而进一步对化合物的结构和裂解规律加以确证^[17-18]。国外利用液相色谱串联质谱法对黄霉素多组分进行鉴别研究已有文献报道,但是国内利用液相色谱串联质谱法对黄霉素的研究主要集中于黄霉素A组分的定量检测,对于黄霉素多组分的鉴别研究却鲜有报道。本研究采用超高效液相色谱-高分辨四级杆飞行时间质谱对预混剂中黄霉素进行分析,通过保留时间、精确分子量和二级质谱特征碎片对黄霉素的5种组分进行鉴别;并同时确

定了五种组分的具体成分,完善了《兽药国家标准》关于高效液相色谱法鉴别黄霉素的相关内容。该方法的建立有利于黄霉素产品的质量控制与黄霉素发酵生产的优化,因此具有良好的使用价值。

参考文献:

[1] 吴家鑫,张国栋,刘晓洁,等. 聚类分析在黄霉素发酵过程中的应用[J]. 微生物学通报, 2012, 39(6): 865-871.

[2] Kurz M, Guba W, Vertesy L. Three-dimensional structure of moenomycin A - a potent inhibitor of penicillin-binding protein 1b[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 252(3): 500-507.

[3] Welzel P, Wietfeld B, Kunisch F, et al. Moenomycin A: further structural studies and preparation of simple derivatives[J]. Tetrahedron, 1983, 39(9): 1583-1591.

[4] Fehlhaber H W, Girg M, Seibert G, et al. Moenomycin A: A structural revision and new structure-activity reactions[J]. Tet-

- rahedron, 1990, 46(5): 1557 – 1568.
- [5] Donnerstag A, Marzian S, Mueller D, *et al.* A structurally and biogenetically interesting moenomycin antibiotic [J]. Tetrahedron, 1995, 51(7): 1931 – 1940.
- [6] Scherkenbeck J, Hiltmann A, Hobert K, *et al.* Structures of some moenomycin antibiotics – inhibitors of peptidoglycan biosynthesis [J]. Tetrahedron, 1993, 49(15): 3091 – 3100.
- [7] Hessler – Klintz M, Hobert K, Biallass A, *et al.* The first moenomycin antibiotic without the methyl – branched uronic acid constituent – unexpected structure activity relations [J]. Tetrahedron, 1993, 49(35): 7667 – 7678.
- [8] 吴家鑫, 刘晓洁, 齐 鹏, 等. 基于主元分析 – 模糊 C 均值聚类优化黄霉素发酵过程 [J]. 化学工程, 2013, 41(10): 5 – 8.
- [9] 吴家鑫, 张国栋, 齐 鹏, 等. 黄霉素发酵过程的灰色关联度分析及其灰色预测模型 [J]. 化工进展, 2013, 32(6): 1382 – 1384.
- [10] 吴家鑫, 张国栋, 齐 鹏, 等. 黄霉素工业化发酵过程中灰色预测模型的应用 [J]. 化工进展, 2013, 32(12): 2957 – 2960.
- [11] 杨秀玉, 吴好庭, 张秀英. 高效液相色谱法检查不同厂家黄霉素中黄霉素 A 的相对量 [J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(12): 22 – 24.
- [12] 陈永辉, 刘 波, 曾兆国, 等. 黄霉素产生菌在发酵过程中菌丝体内外效价的变化研究 [J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(5): 27 – 30.
- [13] 李金强, 沙美兰, 李晓玉, 等. 液相色谱串联质谱法测定饲料中黄霉素 A 的含量 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 47(9): 22 – 25.
- [14] 曾兆国, 刘 波, 陈永辉, 等. 离子对高效液相色谱法鉴别黄霉素方法的研究 [J]. 饲料工业, 2008, 29(8): 46 – 47.
- [15] Zehl M, Pittenauer E, Rizzi A, *et al.* Characterization of Moenomycin Antibiotic Complex by Multistage MALDI – ITRTOF – MS and ESI – IT – MS [J]. Journal of American Society and Mass Spectrometry, 2006, 17(8): 1081 – 1090.
- [16] Li L, Luo G A, Liang Q L, *et al.* Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q – TOF – MS [J]. Journal Pharmaceutical and Biomedical analysis, 2010, 52(1): 66 – 72.
- [17] 孟 哲, 石志红, 吕运开, 等. 超高效液相色谱 – 高分辨四级杆飞行时间质谱法快速筛查乳制品中磺胺类与氟喹诺酮类药物 [J]. 分析化学, 2014, 42(10): 1493 – 1500.
- [18] 叶海英, 郑水庆, 梁 晨, 等. LTQ – Orbitrap 组合式高分辨质谱法快速筛查毛发中 7 种毒品及代谢物 [J]. 分析化学, 2012, 40(11): 1674 – 1679.

(编 辑:侯向辉)