

## LC-MS分析乙酰吉他霉素组分及水解产物

胡 敏<sup>1,2</sup>, 胡昌勤<sup>1\*</sup>

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 湖北省药品检验所, 湖北 武汉 430064)

**摘要:** 目的 应用 LC-MS鉴定乙酰吉他霉素中组分及其水解产物。方法 以  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液-乙腈 (35:65) 为流动相, 采用 Diamonsil  $\text{C}_{18}$  柱, 单四极杆质谱检测器, 电喷雾正离子扫描, 调节锥孔电压, 对色谱峰进行质谱分析。结果 乙酰吉他霉素各组分可基本分离, 根据所得到的有关相对分子质量以及碎片峰的信息, 对乙酰吉他霉素各组分及其水解产物的结构进行了鉴别。发现国产乙酰吉他霉素的主要组分为乙酰吉他霉素  $\text{A}_4$ ,  $\text{A}_5$ ;  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_3$  和  $\text{A}_6$ ,  $\text{A}_7$ , 与日本药局方中报道的主要组分相同, 但国产乙酰吉他霉素还含有较多的乙酰吉他霉素  $\text{A}_{13}$ 。乙酰吉他霉素效价测定中的水解产物并非吉他霉素。结论 LC-MS方法快速、灵敏, 专属性强, 适用于多组分抗生素的组分分析。

**关键词:** 液相色谱-质谱法; 乙酰吉他霉素; 组分鉴定; 水解产物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2006)05-0476-05

## Identification of the components and products of hydrolysis in acetylleucomycin by LC-MS

HU Min<sup>1,2</sup>, HU Chang-qin<sup>1\*</sup>

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Hubei Province Institute of Drug Control, Wuhan 430064, China)

**Abstract:** **Aim** To identify the components of acetylleucomycin and its hydrolytic products by LC-MS. **Methods** acetylleucomycin was separated on a Diamonsil  $\text{C}_{18}$  column with  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ammonium acetate-acetonitrile (35:65) as mobile phase. The LC-MS was equipped with an electrospray ion source (ESI), which was set at the positive ion mode, and the mass spectra of each component in chromatogram were obtained with difference cone voltage. **Results** The components of acetylleucomycin and its hydrolytic products can be separated by HPLC. The components were identified according to the molecular weight and its major mass fragment ions. The major components identified in domestic acetylleucomycin were acetylleucomycin  $\text{A}_4$ ,  $\text{A}_5$ ; acetylleucomycin  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_3$ ; acetylleucomycin  $\text{A}_6$ ,  $\text{A}_7$ , and acetylleucomycin  $\text{A}_{13}$ . The hydrolytic products of acetylleucomycin were not kitasamycin, but some non-complete hydrolytic product. **Conclusion** The method is rapid, sensitive and specific. It's suitable to application in the fields of multi-components antibiotics analysis.

**Key words:** LC-MS; acetylleucomycin; component identification; product of hydrolysis

乙酰吉他霉素 (acetylleucomycin, acetylleucomycin) 是吉他霉素 (kitasamycin, leucomycin) 的乙酰化物, 目前仅在《日本药局方》<sup>[1]</sup> 及国内药品标准<sup>[2]</sup> 中被收载, 作为抗感染治疗的常用药物<sup>[3]</sup>。《日本

药局方》中规定乙酰吉他霉素的组分主要为乙酰吉他霉素  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_3$ , 乙酰吉他霉素  $\text{A}_4$ ,  $\text{A}_5$  和乙酰吉他霉素  $\text{A}_6$ ,  $\text{A}_7$ <sup>[1]</sup>。虽然药用吉他霉素均以 A 族组分为主<sup>[4,5]</sup>, 但由于菌种的差异, 国产吉他霉素与日本产品的组分不同<sup>[6]</sup>, 因此国产乙酰吉他霉素与日本产品的组分应有所差异; 实际检验中也常发现不同企业的乙酰吉他霉素产品, 效价值相差较大, 推测其原

收稿日期: 2005-08-31.

\* 通讯作者 Tel: 86-10-67095308, Fax: 86-10-65115140, E-mail: hucq@nicpbp.org.cn

因可能与乙酰吉他霉素的组分分布有关,但尚未见对国产乙酰吉他霉素组分分析的详细报道。此外,各国药品质量标准均采用吉他霉素标准品测定乙酰吉他霉素水解产物的效价,并用此表征乙酰吉他霉素的效价<sup>[1,2]</sup>。依据抗生素微生物检定法的基本原理,只有当乙酰吉他霉素的水解产物为吉他霉素时,此测定方法才有效,但尚未见对乙酰吉他霉素水解产物的研究报道。因此对国产乙酰吉他霉素的组分及其水解产物的分析是制定合理质量标准的关键。

目前对乙酰吉他霉素组分的分析多采用 HPLC 法<sup>[2]</sup>。但文献<sup>[2]</sup>报道的乙酰吉他霉素 HPLC 分析方法,不仅诸组分的分离效果较差,且各组分的定位不明确。本文根据十六元环大环内酯类抗生素的质谱裂解规律<sup>[7]</sup>,利用 LC-MS 首先对乙酰吉他霉素诸组分的 HPLC 色谱峰进行鉴别,进而对不同企业的产品进行了分析。为建立乙酰吉他霉素组分控制标准提供了可靠的依据。

## 材料与amp;方法

**仪器与试药** 液相色谱-质谱联用仪(The mo Finnigan公司 Surveyor LC液相色谱泵、Surveyor自动进样器、Surveyor紫外二极管阵列检测器、Surveyor MSQ单四极杆质谱检测器、Xcaliber 1.3 色谱工作站)。

乙酰吉他霉素标准品、吉他霉素标准品均来自中国药品生物制品检定所;乙酰吉他霉素原料分别为国营云南永安制药厂、浙江瑞帮药业有限公司、河南平原制药厂、重庆大新药业股份有限公司和河南省百泉制药有限公司产品。

甲醇、乙腈为色谱纯试剂(美国 Fisher公司),其他试剂为国产分析纯。

**样品溶液的配制** 取乙酰吉他霉素标准品或原料适量,加流动相溶解并稀释配制浓度为  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的样品溶液,即得常规 HPLC 分析溶液。

取乙酰吉他霉素标准品或原料、吉他霉素标准品适量,置 10 mL 量瓶中,加乙腈-水(50:50)溶解,并稀释配制为浓度为  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的样品溶液,即得 LC-MS 分析溶液。

取乙酰吉他霉素标准品约 20 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇 5 mL 溶解后,用水稀释至刻度,置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  放置 24 h,即得乙酰吉他霉素水解液,用于常规 HPLC 分析溶液;此溶液稀释 10 倍后用于 LC-MS 分析。

**LC-MS 实验条件** HPLC 色谱条件:采用

Diamonsil  $\text{C}_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm ID, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱;柱温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;检测波长设定为 230 nm;流速为  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样 20  $\mu\text{L}$ 。流动相为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵溶液-乙腈(35:65)。LC-MS 质谱条件:柱后分流 50%;ESI 正离子检测;加热管温度  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ ;喷雾针电压 5.0 kV;锥孔电压为 80 V 时,  $m/z$  扫描范围为 500 ~ 1 500;锥孔电压为 180 V 时,  $m/z$  扫描范围为 150 ~ 1 000。

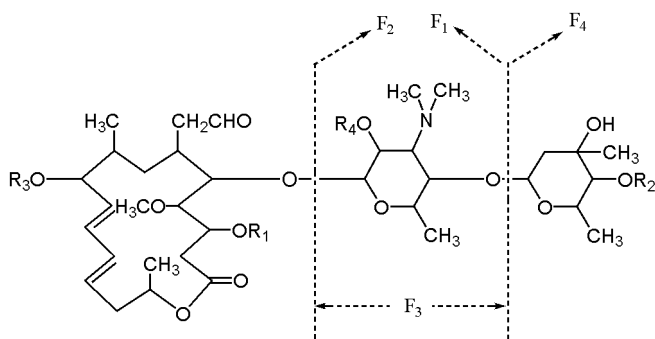
## 结果和讨论

### 1 国产乙酰吉他霉素的组分分析

在所建立的色谱条件下,乙酰吉他霉素(结构见图 1)的各组分可基本分离(图 2)。吉他霉素中含有约 11 个组分,乙酰吉他霉素为其乙酰化的半合成产物,所含组分更为复杂。在对来自不同企业的乙酰吉他霉素进行分析中发现其所含组分远不止文献<sup>[1]</sup>报道的 3 个组分,且不同企业产品中所含的组分种类及其相对含量也有较大的差别。由于无法获得乙酰吉他霉素 3 个主要组分的对照品,仅依据 HPLC 方法无法确定国产乙酰吉他霉素在色谱图上的归属。

采用 LC-MS 的方法,以两个企业的产品为例(重庆大新药业股份有限公司和国营云南永安制药厂),对乙酰吉他霉素所含组分结构进行了分析。锥孔电压为 80 V 时,分别提取质谱总离子流图中各色谱峰的全扫描质谱图,得到有关相对分子质量的信息; $m/z$  898(乙酰吉他霉素  $\text{A}_4$ ,  $\text{A}_5$ ),  $m/z$  912(乙酰吉他霉素  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_3$ )和  $m/z$  884(乙酰吉他霉素  $\text{A}_6$ ,  $\text{A}_7$ )的组分均有检出;锥孔电压为 180 V 时,所得到的碎片峰及其归属见表 1。乙酰吉他霉素和吉他霉素各组分的结构特点均含有 1 个 16 元大环内酯母核,且内酯环 5 位羟基连接 D-碳霉氨基糖,此糖基 4 位羟基与 L-型碳霉糖相连。乙酰吉他霉素为吉他霉素的 3, 9, 3', 4' 位羟基的乙酰化产物。根据文献<sup>[4]</sup>,乙酰吉他霉素组分的质谱裂解规律应如图 1 所示,据此对色谱图上的各组分进行了归属。

由测定结果可见,在样品中含量较大的组分为乙酰吉他霉素  $\text{A}_4$ ,  $\text{A}_5$  组分,这与在吉他霉素组分分析中吉他霉素  $\text{A}_4$  和  $\text{A}_5$  组分含量最高的结果相吻合的<sup>[5]</sup>。另外在样品中还检出准分子离子峰为 926 的组分,为《日本药局方》中未报道的组分,推测为乙酰吉他霉素  $\text{A}_{13}$  组分,此结果与在吉他霉素组分分析中发现国产吉他霉素的  $\text{A}_{13}$  组分含量较日本产品的  $\text{A}_{13}$  组分含量高的结果相符合<sup>[6]</sup>。



Component	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	M <sub>r</sub>
Leucomycin A <sub>1</sub>	H	COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	785
Leucomycin A <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	827
Leucomycin A <sub>4</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	813
Leucomycin A <sub>5</sub>	H	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	771
Leucomycin A <sub>6</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	799
Leucomycin A <sub>7</sub>	H	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	757
Leucomycin A <sub>13</sub>	H	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	799
Acetylleucomycin A <sub>1</sub> , A <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	911
Acetylleucomycin A <sub>4</sub> , A <sub>5</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	897
Acetylleucomycin A <sub>6</sub> , A <sub>7</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	883
Acetylleucomycin A <sub>13</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	925
Hydro-acetylleucomycin A <sub>1</sub> , A <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	H	869
Hydro-acetylleucomycin A <sub>4</sub> , A <sub>5</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	H	855
Hydro-acetylleucomycin A <sub>13</sub>	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	H	883

Figure 1 Structures of components of acetylleucomycin and related components

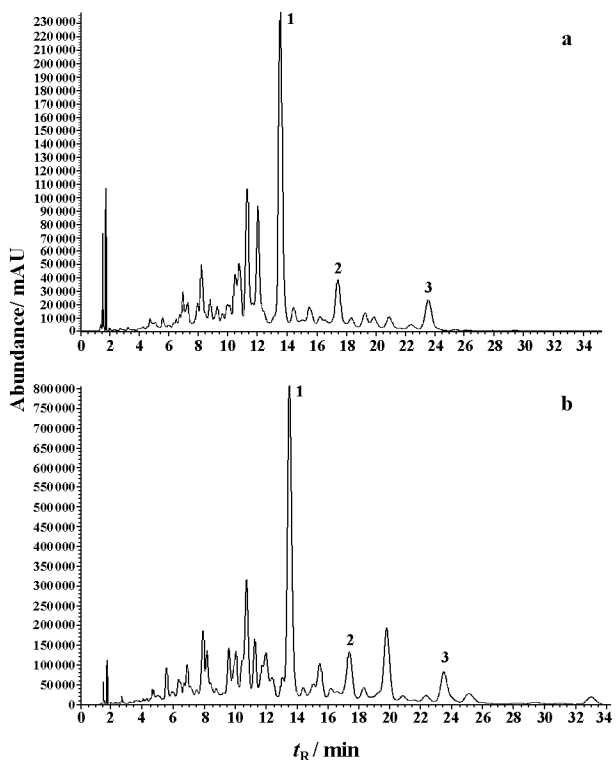


Figure 2 LC-MS Chromatograms of acetylleucomycin from different manufactures. a: Chongqing Daxin; b: Yunnan Yong'an. 1: Acetylleucomycin A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>; 2: Acetylleucomycin A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>; 3: Acetylleucomycin A<sub>13</sub>

Table 1 Major mass fragment ions of components in acetylleucomycin

t <sub>R</sub> /m in	Component	[M + H] <sup>+</sup>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>
17.4	Acetylleucomycin A <sub>1</sub> , A <sub>3</sub>	912	684	444	216	229
13.5	Acetylleucomycin A <sub>4</sub> , A <sub>5</sub>	898	684	430	216	215
23.5	Acetylleucomycin A <sub>13</sub>	926	684	458	216	243
12.4	Hydro-acetylleucomycin A <sub>1</sub> , A <sub>3</sub>	870	642	388	174	215
10.0	Hydro-acetylleucomycin A <sub>4</sub> , A <sub>5</sub>	856	642	402	174	229
16.3	Hydro-acetylleucomycin A <sub>13</sub>	884	642	458	174	243

提取 m/z 884 的离子流图时发现,样品中存在同为 m/z 884 的 3 个同分异构体。由于该色谱峰处有杂质峰干扰,采用单极质谱无法获得其碎片峰信息,从而无法确定乙酰吉他霉素 A<sub>6</sub>, A<sub>7</sub> 组分的在色谱图上的归属。

根据 16 元环大环内酯抗生素组分在反相色谱中的色谱保留规律<sup>[7]</sup>, R<sub>2</sub> 取代基的碳链越长,出峰越晚,因此乙酰吉他霉素各组分的出峰顺序应为乙酰吉他霉素 A<sub>6</sub>, A<sub>7</sub>、乙酰吉它霉素 A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>、乙酰吉它霉素 A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>、乙酰吉他霉素 A<sub>13</sub>。这一结果与 LC-MS 组分鉴定的结果相符,进一步对推测结果进行了验证。

目前国内乙酰吉他霉素转正质量标准中,根据

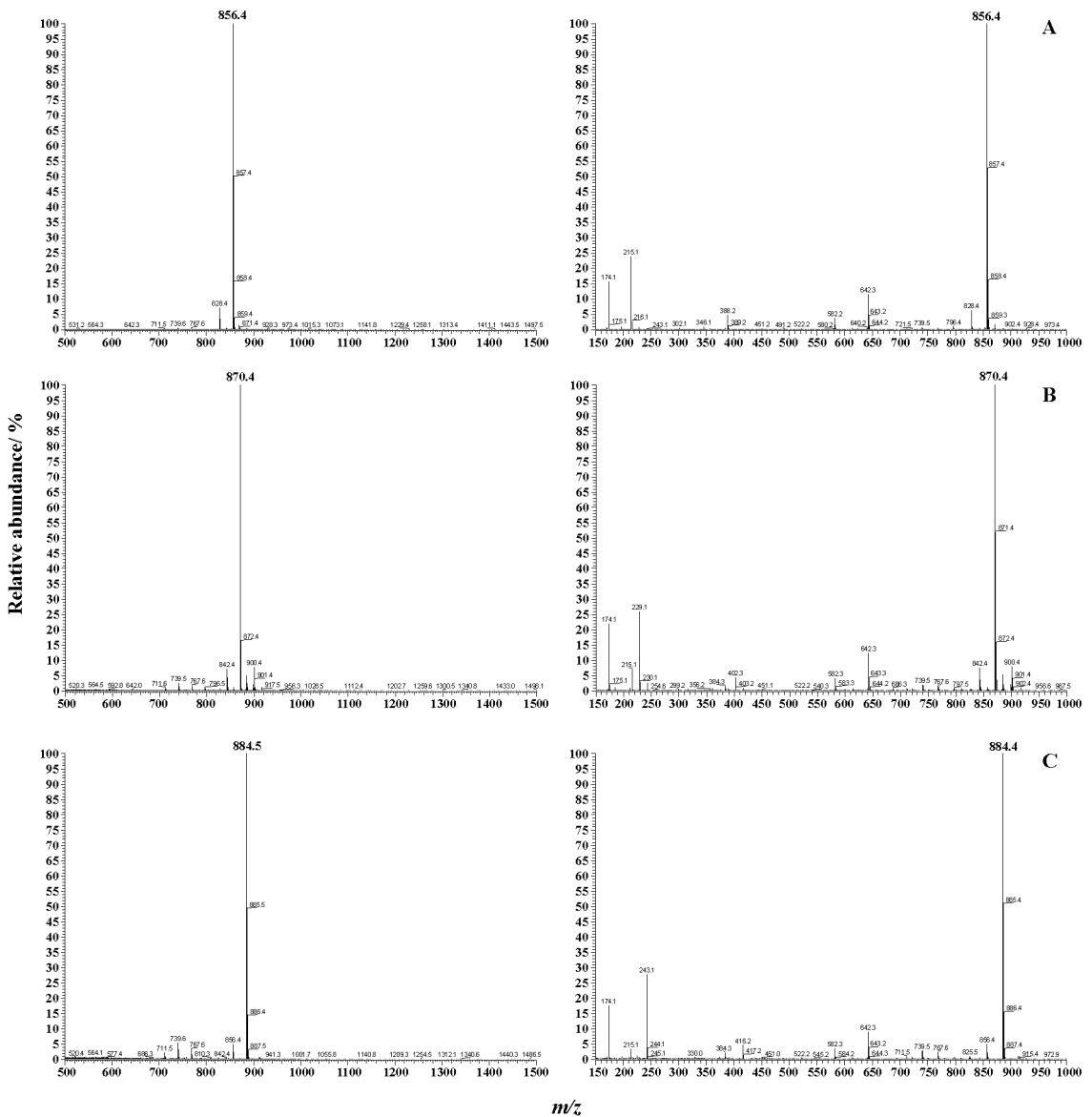
上述结果,已定义国产乙酰吉他霉素含有乙酰吉他霉素  $A_6$ 、 $A_7$ 、乙酰吉他霉素  $A_4$ 、 $A_5$ 、乙酰吉他霉素  $A_1$ 、 $A_3$ 和乙酰吉他霉素  $A_{13}$ 等 4 个主组分,其中乙酰吉他霉素  $A_{13}$ 首次作为主组分在质量标准中规定。为更好控制产品质量,转正质量标准中还采用 HPLC法对产品中的主组分进行了控制。

## 2 乙酰吉他霉素水解产物的结构鉴定

采用 LC-MS的方法对水解后的乙酰吉他霉素进行了分析,发现在相同的色谱条件下各相应的组分色谱峰保留时间减少了约 3 min,但与相同条件下吉他霉素色谱图中各组分的保留时间相比仍有较大

差别,可见水解后并非产生吉他霉素。在锥孔电压为 80 V时,提取总离子流图中各组分的全扫描质谱图(图 3),发现各组分的准分子离子峰的质荷比均减少了 42,即脱掉了 1 个乙酰基。根据在锥孔电压为 180 V时产生的碎片峰信息推测,脱去的是碳霉胺基糖上的乙酰基,大环内酯母核上 9 位上的乙酰基仍然存在,各碎片峰的归属见表 1,其结构见图 1。

在《日本药局方》和国内产品质量标准中均采用将样品溶解,置 37 °C放置 24 h后,再用吉他霉素标准品测定其效价的方法确定乙酰吉他霉素的效价。上述试验结果可见,乙酰吉他霉素水解后产物



**Figure 3** Spectra of compounds in acetylleucomycin after hydrolysis at cone voltage 80 V ( left) and 180 V ( right). A: Hydro-acetylleucomycin in  $A_4$ ,  $A_5$ ; B: Hydro-acetylleucomycin in  $A_1$ ,  $A_3$ ; C: Hydro-acetylleucomycin in  $A_{13}$

与吉他霉素和乙酰吉他霉素的组分均不相同。而采用抗生素微生物检定法时,要求标准品和样品必须同质。可见原效价测定方法并不合理。为了保证标准品与样品的同质性,国内转正质量标准中已改用同时水解乙酰吉他霉素标准品和供试品的方法测定其效价。

## 结论

在多组分抗生素质量分析中,多采用传统的微生物法测得混合物的抗菌活性来对其质量进行控制。菌种的差异、发酵条件以及酰化反应均会造成产品的差别。研究表明,多组分抗生素中各组分的抗菌活性和毒性有很大的差别。为保证药物的疗效和用药安全,有必要对各组分的含量进行控制。

多组分抗生素中含有多个组分,且含有相同的母核,仅是取代基有所不同,具有相同的质谱裂解规律,利用 LC-MS<sup>[8]</sup>所得到的有关相对分子质量以及碎片峰的信息,并结合其紫外光谱及色谱保留行为,可以快速、灵敏地对组分结构进行鉴定,适合由于多组分抗生素的组分分析。但对于样品中所存在的同分异构体及母核未知的化合物存在一定的局限性。

## References

- [ 1 ] Society of Japanese Pharmacopoeia. Japanese Pharmacopoeia [ S ]. 14th ed. Tokyo: Yakuji Nippo, Ltd, 2001: 223 - 223.
- [ 2 ] Ministry of Health People's Republic of China. Drug Specification (中华人民共和国卫生部标准 (试行)). WS-185(X-162)-97 [ S ], 1997.
- [ 3 ] Zhang ZP. The development of study on macrolide antibiotics [ J ]. World Notes Antibiot (国外医药抗生素分册), 1997, 18: 81 - 91.
- [ 4 ] Wang YJ, Wang LQ, Min CJ. High performance liquid chromatographic assay of leucomycin [ J ]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 1990, 7: 79 - 82.
- [ 5 ] State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [ S ]. 2005 ed. Part II. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 177 - 177.
- [ 6 ] Yang Q, Ma SH, Hu M, et al. Determination of active ingredients of kitasamycin by HPLC [ J ]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2006, 34: 95 - 99.
- [ 7 ] Hu M, Hu CQ. Identification of the components of 16-membered macrolide antibiotics by LC/MS [ J ]. Anal Chim Acta, 2005, 535: 89 - 99.
- [ 8 ] Niessen WM. Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry [ J ]. J Chromatogr A, 1998, 812: 53 - 75.