

基于液质联用技术解析和降低螺旋霉素发酵杂质 LC-ESI/MS Identification and Reduction of Impurities in Spiramycin Fermentation

李友元^{1*}, 陈长华¹, 顾熠峰¹, 李晓勇²

LI You-Yuan^{1*}, CHEN Chang-Hua¹, GU Yi-Feng¹ and LI Xiao-Yong²

1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2. 河南天方药业股份有限公司, 河南 463003

1. ECUST State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Shanghai 200237, China

2. Henan topfond Pharmaceutical CO., Ltd., Henan 463003, China

摘 要 目前螺旋霉素生物合成的发酵杂质含量过高, 导致成品收率过低, 杂质含量不符合药典规定。为解决这一问题, 首先利用 LC-MS 联用技术定性分析了 4 种螺旋霉素发酵杂质的结构, 结合螺旋霉素生物合成途径分析, 它们都起因于螺旋霉素生物合成糖基化过程的紊乱。氮源尤其是铵盐对螺旋霉素生物合成糖基化过程有重要的调节作用。进一步的氮源优化使螺旋霉素发酵液中 4 种杂质含量降低 22% ~ 88%, 杂质含量全部低于欧洲药典标准。

关键词 液质联用, 螺旋霉素, 杂质, 优化

中图分类号 TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0275-04

Abstract There are several impurities in the spiramycin fermentation broth which leads to a lower yield and lower quality of the product. Four impurities in spiramycin broth have been simultaneously separated and identified by LC-ESI/MS. The generation of these impurities was attributed to the fluctuation of glucosylation in spiramycin biosynthesis. Nitrogen sources, ammonium in particular, were found to play an important role at the glucosylation. Aided with the information of LC-ESI/MS analysis and subsequent optimization of the culture medium, better culture medium of shake flask was designed, which leads to reduction of impurities by 22% ~ 88%.

Key words LC-ESI/MS, spiramycin, impurity, optimization

抗生素的生物合成属于产生菌的次级代谢, 具有生物合成途径复杂、生物合成酶的基质特异性不高及调控机制不严密等特点。在产生菌的发酵液中, 存在结构相近但生物活性相差很大的多种组分, 获得生物活性高、毒性小的有效组分, 对提高抗生素质量至关重要^[1]。另一方面, 抗生素等原料药的出口受到各国药典越来越严格的质量要求。2001 版欧洲药典规定, 螺旋霉素原料药的成品主成分不能低于 85%, 各杂质不能高于 2%。现存螺旋霉素生

产工艺中, 发酵液中的 4 种杂质在后处理中无法用常规分离手段去除, 且含量高于 2%。

电喷雾离子化 (ESI) 及其色谱-质谱联用 (LC-MS) 可有效地分析复杂混合物中的单个或多个组分^[2]。国内外亦有利用 LC-MS 联用技术分析发酵液中多组分的报道^[3,4]。本研究旨在利用 LC-MS 联用技术分析螺旋霉素发酵液中 4 种杂质的结构, 结合螺旋霉素生物合成途径分析杂质产生机理和原因, 进而指导工艺优化以降低其含量。

Received: September 2, 2004; Accepted: October 12, 2004.

* Corresponding author. Tel: 86-21-64252324; E-mail: leey@china.com.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

生二素链霉菌 (*Streptomyces spiramyceticus*) SPM1-175, 由河南天方药业有限公司提供。

1.2 液质联用仪器及条件

流动相 A 为 0.05mol/L 的乙酸铵溶液; 流动相 B 为乙腈: 甲醇 (5:1/V:V)。流动相配比见表 1, 其他条件同文献 [4]。

表 1 流动相配比梯度程序

Table 1 Composition of mobile phase

t/min	φ(solvent A)/%	φ(solvent B)/%
0	85	15
10	40	60
14	85	15

Solvent A: ammonium acetate 0.05mol/L;

Solvent B: acetonitrile:methanol (5:1/V:V).

1.3 实验方法

1.3.1 样品预处理: 取螺旋霉素罐发酵 48 h 的发酵液 30 mL 过滤, 将滤液 -20℃ 冷冻保存备用。分析时取 1 mL 滤液在 4℃ 下以 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22μm 膜过滤后置于进样瓶中待分析。

1.3.2 螺旋霉素发酵液主要杂质定性分析: 为了节约时间、提高样品回收率并保证分析的准确性, 实验采取直接进样法。取螺旋霉素罐发酵 48h 的发酵液, 经 1.3.1 所述步骤预处理后进行液质联用分析, 色谱柱后流出物依次经紫外和质谱串联检测。由总离子流提取得到质谱数据, 根据各中间代谢物的分子式进行定性分析。螺旋霉素发酵液 HPLC 图谱和总离子图分别如图 1 和图 2 所示。发酵液经提取后处理得到成品, 将成品 HPLC 图谱和图 1 比较后确定图 1 中 IM1、IM2、IM3 和 IM4 为在后处理中不能消除的杂质。

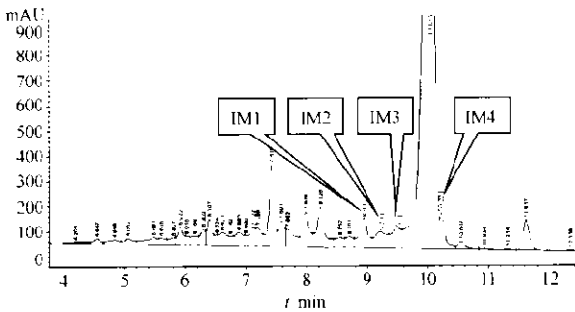


图 1 螺旋霉素发酵液 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of spiramycin broth

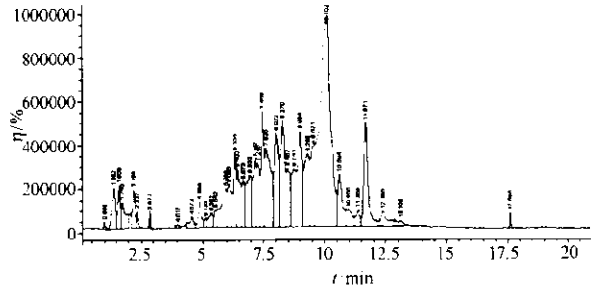


图 2 螺旋霉素发酵液液质联用总离子图

Fig. 2 MS TIC chromatogram of spiramycin broth

2 结果

2.1 螺旋霉素发酵杂质质谱图

ESI 是一种高效的“软”离子化方式, 可以得到高丰度的准分子离子峰。从质谱总离子流中提取得到 4 种杂质的质谱数据, 如图 3 所示。在质谱图中, 除了较高丰度的准分子离子峰外, 大部分都有 M + NH₄⁺ 峰存在, 这是由于流动相中含有乙酸铵而与 NH₄⁺ 形成的加合物。

2.2 螺旋霉素发酵杂质结构质谱分析

螺旋霉素基本结构式如图 4 所示。螺旋霉素生物合成途径揭示其先接一个含氮的碳霉氨糖 (Mycaminose), 然后在分子的另一端 R₂ 接上福洛氨糖 (forosaminyl), 最后在已经接上配糖体的糖胺 R₁ 位再接上一个碳霉糖 (mycarosyl)。各组成单元如图 4 所示。

如图 3, IM2 和 IM3 质谱图所示, 分子峰 m/z 为 844.1, 和螺旋霉素 I 的分子量相同, 意味此 IM3 和 IM2 的结构单元和螺旋霉素 I 的结构单元相同, 即含有碳霉氨糖、福洛氨糖和碳霉糖。但 IM3 质谱图同时含有 m/z145.2 碎片峰, 即有少量不稳定的碳霉糖在较“软”的 EMS 离子方式下裂解下来。推断在第三步糖基化时, 碳霉糖没有加在碳霉氨糖 C4' 位 R3 上, 有可能接在碳霉氨糖 C2' 位上, 造成碳霉糖基团不稳定, 从而出现 m/z145.2 的碳霉糖碎片峰。

IM2 质谱图同时含有 m/z174.1 碎片峰, 即有少量不稳定的碳霉氨糖在较“软”的 EMS 离子方式下裂解下来。推断在第三步糖基化时, 碳霉糖没有加在碳霉氨糖 C4' 位 R3 上, 有可能接在大环内酯 C3 的 R1 位上, 造成碳霉氨糖不稳定, 从而出现 m/z174.1 的碳霉氨糖碎片峰。

IM1、IM4 质谱图显示其分子峰 m/z 为 847.1, 大于螺旋霉素 I 的分子量。结合分子结构分析程序, 推断其结构单元为两个碳霉糖, 即在第二步糖基化

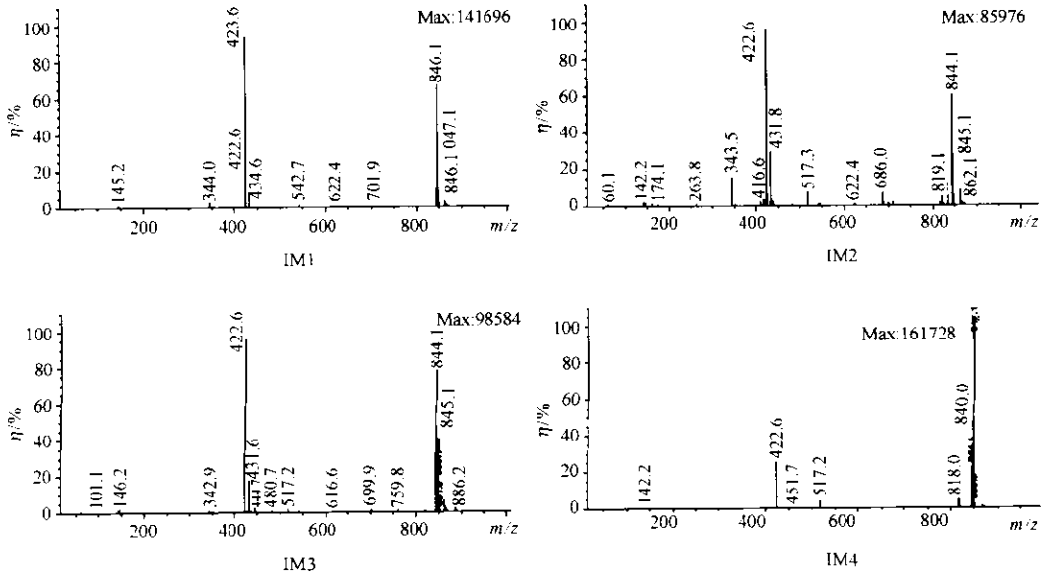


图3 螺旋霉素发酵液杂质质谱图

Fig. 3 ESI spectra of impurities in spiramycin broth

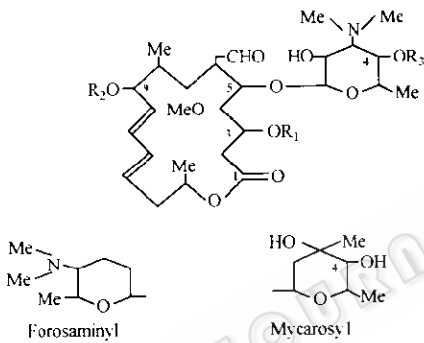


图4 螺旋霉素分子结构

Fig.4 Structures of spiramycin

时,碳霉糖代替福洛氨糖接在大环内酯的 R2 位上。在 IM1 质谱图中也可见碳霉糖的 m/z 145.2 碎片峰, 应是其接在不正确位置上导致不稳定易裂解的

表现。

2.3 螺旋霉素发酵杂质的降低

从杂质的质谱分析推断,这 4 种杂质的产生都和螺旋霉素生物合成糖基化过程有着密切关系。在螺旋霉素生物合成糖基化过程中,铵盐起到了非常重要的作用。Omura 等人^[5]从分子水平上作出解释,认为大环内酯类抗生素结构中碳霉氨糖及碳霉糖 C4 侧链都包含了氮的代谢。基于以上考虑,针对培养基中的氮源进行了优化。

初步对氮源以及无机离子分别作缺项法实验,考查各因素对杂质含量变化的影响如表 2 所示。从表 2 中数据可以初步看出,氮源和无机盐对杂质的产生有重要影响。

表 2 氮源和无机离子对螺旋霉素发酵杂质含量变化的影响

Table 2 Effects of nitrogen source and inorganic ion on the production of impurities

No.	Effectors								Impurity			
	Yeast powder	NH ₄ NO ₃	Corn liquid	Soybean powder	MgSO ₄	ZnSO ₄	NaCl	IM1	IM2	IM3	IM4	
1	0	1	1	1	1	1	1	+	/	/	+	
2	1	0	1	1	1	1	1	/	/	/	++	
3	1	1	0	1	1	1	1	/	/	/	++	
4	1	1	1	0	1	1	1	/	/	/	--	
5	1	1	1	1	0	1	1	/	/	/	++	
6	1	1	1	1	1	0	1	+	/	/	/	
7	1	1	1	1	1	1	0	+	/	/	/	

+ Higher level of the impurity; - Lower level of the impurity; / No change

进一步的氮源和无机离子正交设计实验表明:氮源中玉米浆,酵母粉和 NH_4NO_3 , 无机盐中 MgSO_4 和 ZnSO_4 对发酵杂质的产生影响较大。在固定培养基中其它成分的含量不变的基础上,又以 $L_{27}(3^{13})$ 正交表安排玉米浆,酵母粉, NH_4NO_3 , MgSO_4 和 ZnSO_4 等五因子三水平进行试验,实验结果见表 3。

表 3 正交实验结果

Table 3 Results of the orthogonal experiment

No.	Biologic potency / (u/mL)				
	potency / (u/mL)	IM1/%	IM2/%	IM3/%	IM4/%
1	6652	45.44	10.05	5.58	0.18
2	3789	25.53	1.26	0.4	0.81
3	3031	30.72	27.15	0.67	0
4	17768	5.02	0.66	0.15	0.56
5	15458	8.66	1.21	0.13	0.86
6	15579	0.81	0.34	0.14	0.23
7	18610	1	0.27	0.27	3.98
8	19789	0.23	0.18	0.23	7.52
9	25853	1.1	0.33	0.17	3.4
10	6315	41.34	6.11	5.56	1.96
11	5810	50.05	6.1	5.93	1.3
12	4294	13.83	8.43	0	0.86
13	18442	4.18	2.27	0.05	0.47
14	18526	1.39	0.55	0.19	0.46
15	20210	0.85	0.33	0.15	3.11
16	21052	0.62	0.18	0.18	1.04
17	22653	1.3	0.07	0.06	6.55
18	20178	0.76	0.36	0.12	1.85
19	6316	2.01	2.81	1.45	3.73
20	5052	14.5	12.33	0.76	2.19
21	4444	26.44	11.14	1.64	1.72
22	9905	2.69	0.38	0.06	1.45
23	23158	0.29	0.1	0.18	14.05
24	6388	2.61	0.74	0.26	5.88
25	18050	2.39	0.08	0.06	12.36
26	16476	2.41	0.05	0.08	8.28
27	20641	1.55	0.05	0.05	14.61

从表 3 中发现 16、18 组的实验结果比较理想,符合发酵液中杂质含量的要求,而其它一些培养基配方不是杂质含量超标,就是效价太低。但 16、18 组的结果中 IM4 含量相对其它杂质含量较高,为进一步降低其含量,结合此次正交实验的极差分析和效应曲线图,进一步优化了 16、18 组培养基配方:其中氮源为 3% 玉米浆、0.75% 酵母粉和 0.1% NH_4NO_3 , 无机盐为 0.075% MgSO_4 、0.2% ZnSO_4 和 0.3% NaCl 。经过培养基优化后的螺旋霉素发酵液各成分含量和对照比较见表 4。表 4 数据显示,IM1、IM2 和 IM4 含量分别下降了 88%、22% 和 65%。IM3 含量有少量增大,但含量都在药典的控制范围内,螺旋霉素最终效价也提高了 25.8%。

表 4 培养基优化前后各螺旋霉素发酵各成分组成

Table 4 Impurity and spiramycin in optimized medium

	Biologic potency / (u/mL)	IM1 /%	IM2 /%	IM3 /%	IM4 /%	Spiramycin /%
Original culture medium	20968	4.32	0.5	0.23	2.14	92.81
Optimized culture medium	26388	0.5	0.39	0.38	0.75	97.98

3 讨论

采用液质联用方法解析发酵产物中的杂质结构,以产生菌自身代谢调控及抗生素的生物合成理论为基础,有针对性的进行工艺优化以达到降低杂质含量是非常有效的,同时对多组分抗生素生物合成的调控也有着重要的指导作用。

液质联用分析表明,在螺旋霉素生物合成中,糖基化过程存在着一定程度的紊乱,从而导致杂质的产生。联系螺旋霉素生物合成中糖基的合成途径及调控机制,其结构中碳霉氨糖上的二甲胺基暗示铵盐对产量可能有一定的影响。在螺旋霉素发酵培养基初步优化中,主要调整了氮源,其中铵盐含量减少了 50%,优化结果证实了以上的推断,各杂质含量有了明显减少,同时也提高了主产物的含量,达到了优化的目的。

本论文在质谱分析杂质结构的指导下,初步对螺旋霉素发酵培养基进行了针对性优化。然而,造成螺旋霉素生物合成糖基化过程的紊乱还有其他直接或间接的影响因素。糖苷酶的活性和底物特异性起到了不可忽视的作用,这方面的影响有待深入考察,以期进一步减少甚至消除杂质的产生。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Li H (李慧), Xia HZ (夏焕章). Biological approaches of increasing productivity of the effective component of antibiotics. *Pharmaceutical Biotechnology* (药物生物技术), 2002, 9(3): 183-186
- [2] Smith RD, Loo JA, Emonds CG *et al.* New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal Chem*, 1990, 62(9): 882-899
- [3] Bradley L. Rapid analysis of antibiotic-containing mixtures from fermentation broths by using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1996, 7(12): 1227-1237
- [4] Li YY (李友元), Chen CH (陈长华), Tao P (陶萍). Qualitative analysis of metabolites in biosynthesis of spiramycin by LC-ESI-MS. *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), 2002, 21(3): 40-43
- [5] Omura S, Tanaka Y. Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. *Adv Biotechnol Proc Int Ferment Symp*, 6th, 1980, Volume 3, 1981, pp. 181-186 (English)