

## 分离纯化与化学合成

文章编号: 1001-8689(2018)01-0059-05

## 多黏菌素E类似物的纯化和结构鉴定

吴勇 周梦漪 薛春佳 冯军\*

(中国医药工业研究总院上海多米瑞生物技术有限公司, 上海 201203)

**摘要:** **目的** 对硫酸多黏菌素中的低含量成分进行纯化和鉴定。**方法** 利用两次反相色谱纯化制备得到单组份, 并通过Na-(2,4-二硝基-5-氟苯基)-L-丙氨酸酰胺(Na-(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide, FDAA)试剂衍生法研究组分的组成氨基酸及其构型。基于二级质谱和氨基酸组成的结果对化合物进行了结构鉴定。**结果** 多黏菌素E2的氨基酸组成、分子量与文献报道一致; 杂质3和杂质9结构中含有L-Leu残基和羟基化的脂肪酸链; 杂质6含有L-Val残基。**结论** 杂质3、杂质6和杂质9分别为3-OH-E2、Val-E2和3-OH-E1。

**关键词:** 多黏菌素E; 纯化; 结构鉴定**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A

## Purification and structure elucidation of colistin E analogues

Wu Yong, Zhou Meng-yi, Xue Chun-jia and Feng Jun

(Shanghai Domiry Bio-tech Co., Ltd, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203)

**Abstract Objective** The purification and identification of minor components in colistin E. **Methods** Each single component was purified by using reverse-phase chromatography twice, and derivatization using the reagent FDAA was performed to analyze the amino acid composition and the stereochemistry of each component. Structural identification was based on the secondary mass spectrometry and amino acid composition. **Results** The amino acid composition and molecular weight of colistin E2 were consistent with those published reports. Both impurities 3 and 9 contained L-Leu residues and hydroxylated fatty acid chains. The impurity 6 contained an L-Val residue. **Conclusion** Impurity 3, impurity 6, and impurity 9 were 3-OH-E2, Val-E2, and 3-OH-E1, respectively.

**Key words** Colistin E; Purification; Structure elucidation

多黏菌素E(colistin E)是一类由多黏芽孢杆菌黏菌素亚种(*Bacillus polymyxa* subsp. *colistinus*)代谢产生的碱性多肽类抗生素, 具有较强的抗革兰阴性菌活性<sup>[1]</sup>。这类化合物结构中均含有一个环状七肽和连接有脂肪酸链的3肽侧链。不同多黏菌素E的结构差异为X位氨基酸和(或)脂肪酸链类型的不同。近期欧洲药典关于硫酸多黏菌素E的讨论稿公布了10种组分<sup>[2]</sup>, 具体结

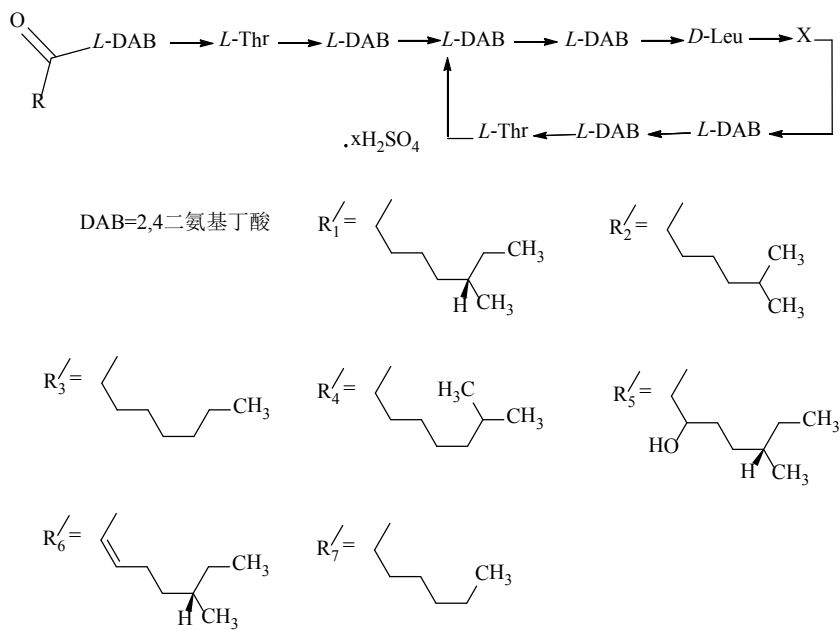
构见图1。临床使用的多黏菌素E有两种形式, 一种是口服或局部使用的硫酸多黏菌素E; 另一种是供注射用的多黏菌素E甲磺酸钠(colistimethate sodium, CMS), 是由多黏菌素E经过甲磺酸化修饰合成。

本研究从商业化的硫酸多黏菌素E中纯化出了3个组分, 并通过氨基酸组成分析和二级质谱技术对其进行了结构鉴定。

收稿日期: 2017-07-11

作者简介: 吴勇, 男, 生于1982年, 助理研究员, 从事微生物药物与蛋白药物研究, E-mail: mycine@163.com

\*通讯作者, E-mail: fengj31@aliyun.com



多黏菌素	X	R	分子式	分子量
E1	<i>L</i> -Leu	R <sub>1</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1169
E2	<i>L</i> -Leu	R <sub>2</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1155
E3	<i>L</i> -Leu	R <sub>3</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1155
E4	<i>L</i> -Leu	R <sub>7</sub>	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1141
E1-I	<i>L</i> -Ile	R <sub>1</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1169
E1-Nva	<i>L</i> -Nva	R <sub>1</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1155
E1-7MOA	<i>L</i> -Leu	R <sub>4</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1169
E6	<i>L</i> -Leu	R <sub>5</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub>	1185
E2-I	<i>L</i> -Ile	R <sub>2</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1155
2,3-脱氢E1	<i>L</i> -Leu	R <sub>6</sub>	C <sub>53</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	1167

图1 多黏菌素E结构  
Fig. 1 Structures of colistin E

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

硫酸多黏菌素E原料购于绿康生化股份有限公司。Amberchrom™ XT30树脂购于陶氏化学公司。85%磷酸、无水乙醇、无水硫酸钠购于国药集团化学试剂公司。色谱级乙腈、*L*-或*D*-型氨基酸对照品购于Sigma-Aldrich公司。SunFire Prep OBD C<sub>18</sub>制备柱(19mm×150mm, 10μm)购于美国Waters公司。

1.2 仪器

Alliance e2695-2489高效液相色谱仪、600E-2487制备液相色谱仪、Q-TOF micro YA019质谱仪(美国Waters公司)。

1.3 方法

1.3.1 HPLC分析方法

参照EP9.0中方法分析多黏菌素E的纯度。色谱柱Shodex C<sub>18</sub> (4.6mm×250mm, 5μm); 流动相, 硫酸钠溶液(取无水硫酸钠4.46g, 加水900mL溶解, 用磷酸调节pH值至2.4, 加水稀释至1000mL, 摇匀): 乙腈(81:19, *V/V*); 流速: 1mL/min; 检测波长: 215nm; 柱温: 40℃。

1.3.2 多黏菌素E类似物纯化

将XT30树脂装柱(3.8cm×26cm)后连接于制备液相色谱仪。取3g硫酸多黏菌素E溶于少量水中, 上样用依次5倍柱体积(CV)的6%乙醇溶液(硫酸调节pH至2.4), 洗脱弱保留组分; 12%乙醇溶液(硫酸调节pH至2.4)洗脱10CV; 20%乙醇溶液(硫酸调节pH至2.4)洗脱10CV。215nm波长监测洗脱过程, 10mL每管收集洗脱峰。采用“1.2.1”项下的HPLC方法分析收集液中

组分的纯度，将纯度高于95%的E2和E1分别合并。

将6%乙醇溶液洗脱得到的收集液合并，其中主要含有在HPLC上保留弱于E2的组分。合并液于50℃下减压蒸馏浓缩，然后上样于SunFire Prep OBD C<sub>18</sub>制备柱进行二次纯化。依次用硫酸钠溶液(同“1.2.1”项)：乙腈以95:5比率洗脱5CV；以87:13(V/V)比率洗脱20CV。10mL每管收集洗脱峰。采用“1.2.1”项下HPLC方法分析收集液中组分的纯度，将纯度高于95%的各组分分别合并。

对纯化得到的多黏菌素E2、E1及3个杂质分别进行脱盐处理。具体方法为：分别将合并液于50℃下减压蒸馏浓缩，浓缩液上样于SunFire Prep OBD C<sub>18</sub>制备柱后用5%乙腈溶液洗脱5CV，用30%乙腈洗脱2CV并收集洗脱峰。收集液经过减压蒸馏除去乙腈后进行冷冻干燥。

### 1.3.3 组成氨基酸及其构型分析

取多黏菌素E2、杂质3、杂质6和杂质9各2mg，分别用2mL 6mol/L盐酸溶解后于135℃下水解5h，然后减压干燥至全干。参照Marfey法<sup>[3]</sup>采用Nα-(2,4-二硝基-5-氟苯基)-L-丙氨酰胺(Nα-(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide, FDAA)试剂对水解产物中的氨基酸进行衍生反应，衍生产物的HPLC分析方法为：色谱柱，Shodex C<sub>18</sub> (4.6mm×250mm, 5μm)；流动相A，0.01mol/L甲酸铵(pH5.2)：乙腈：甲醇=94:5:1(V/V/V)；流动相B，0.01mol/L甲酸铵(pH5.2)：乙腈：甲醇=39:60:1(V/V/V)；检测波长：340nm；流速：1mL/min；柱温：40℃。通过与L-或D-型氨基酸对照品的衍生产物的HPLC结果进行比较，确定各样品中氨基酸组成以及其构型。

### 1.3.4 质谱分析

电喷雾电离源(ESI)正离子检测方式；离子源温度80℃；毛细管电压3.0kV；样品均用水溶解成0.5mg/mL后进行质谱分析。

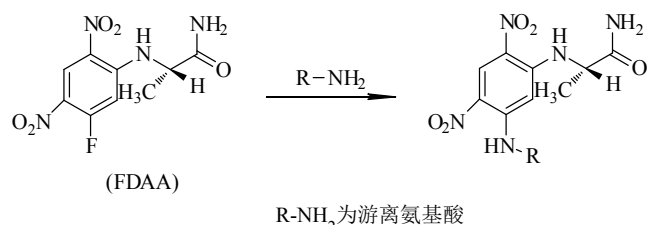


图2 FDAA与游离氨基酸的反应

Fig. 2 Reaction of FDAA to free amino acids

## 2 结果

### 2.1 分离纯化

硫酸多黏菌素E原料中主要组分为E2和E1，经过XT30柱纯化，制备得到433mg纯度为96%的多黏菌素E2，182mg纯度为97%的多黏菌素E1。对硫酸多黏菌素E原料的HPLC分析表明，原料中存在着多个保留弱于E2的组分。这些含量很低的组分在XT30柱层析时被初步纯化和富集，随后经过高柱效的反相制备柱进行进一步纯化，最终得到15mg杂质3，21mg杂质6，11mg杂质9，其纯度均大于95%。

### 2.2 组成氨基酸及构型分析

FDAA其与氨基酸的氨基的反应式如图2所示。不同构型的氨基酸经FDAA衍生后在C<sub>18</sub>色谱柱上的保留时间不同，通常L-型氨基酸的保留时间小于相对应的D-型氨基酸的保留时间。

以L-Dab、L-Thr、L-Leu、D-Leu、L-Val和L-Nva 6种氨基酸为对照，其FDAA衍生物在HPLC分析时具有良好的分离度。由于L-Dab具有两个游离氨基，会产生两个单修饰产物和一个双修饰产物。试验结果如图3，结果显示多黏菌素E2、杂质3和杂质9均含有L-Dab、L-Thr、D-Leu和L-Leu，表明杂质3和杂质9的肽链部分的结构与多黏菌素E2是相同的，它们之间可能含有不同的脂肪链。杂质6含有L-Dab、L-Thr、D-Leu和L-Val，表明在其肽链结构中以L-Val替代了多黏菌素E2中的L-Leu。

### 2.3 质谱分析结果

把得到的较高纯度各未知杂质、单组份多黏菌素E1和多黏菌素E2分别进行质谱及二级质谱分析，分析结果见表1。

质谱结果显示，杂质3的分子量为1171，在其二级质谱数据中出现了243.26的离子峰。杂质6的分子量为1141，在其二级质谱数据中出现一系列比E1和E2少14的离子峰。杂质9的分子量为1185，在其二级质谱数据中出现了257.15的离子峰。

### 2.4 综合解析

杂质3的分子量为1171，较多黏菌素E2的分子量多16。基于其组成氨基酸与多黏菌素E2相同，因此二者结构差异在于脂肪酸链上，推测是发生了羟基化。有文献报道硫酸多黏菌素B6含有3位羟基化的脂

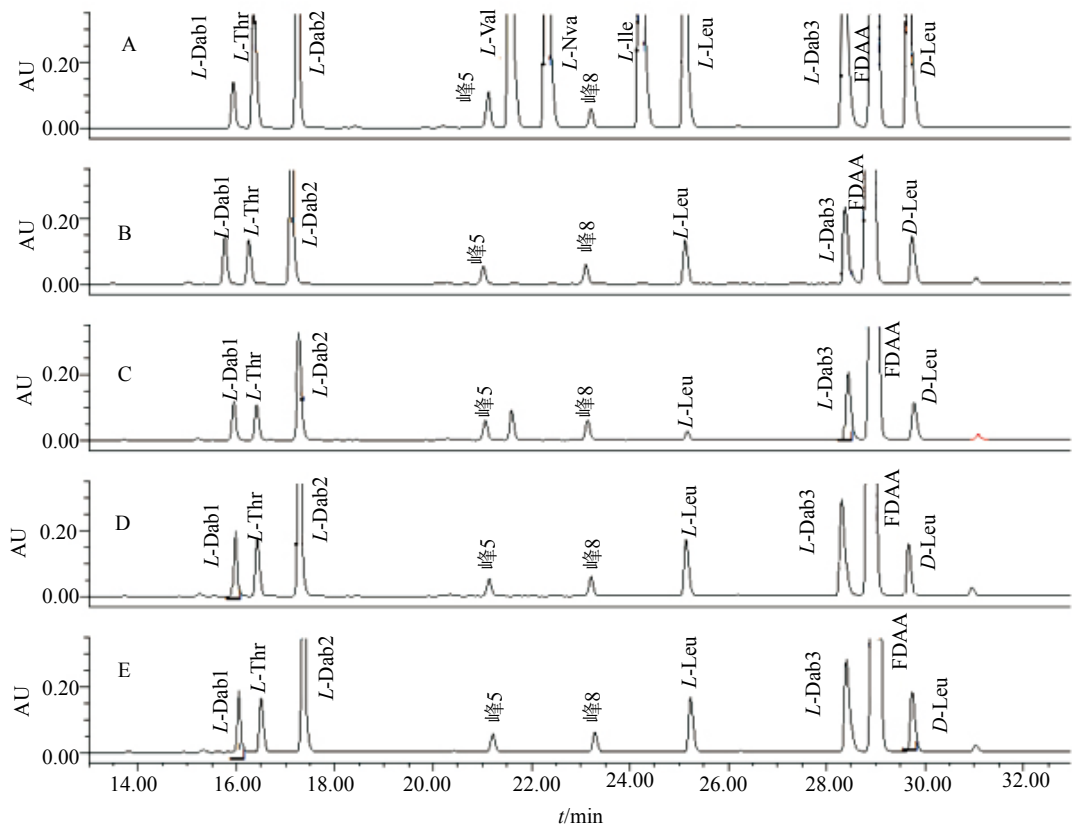


图3 FDAA衍生产物色谱图  
Fig. 3 HPLC chromatograms of FDAA derivatives

表1 多黏菌素E1、E2、杂质3、杂质6和杂质9的质谱及二级质谱分析结果

样品名	分子离子峰	特征片段离子峰	备注
E <sub>1</sub>	1169.67	201.15、202.13、214.17、227.19、241.20、302.20、327.25、427.32、528.35、 610.41、628.44、710.50、728.51、911.62、1151.67	
E <sub>2</sub>	1155.76	201.13、202.11、214.15、227.18、302.17、327.23、427.28、528.33、610.38、 628.39、710.45、728.41、911.47、1137.69	
杂质3	1172.06	201.21、202.19、214.22、227.26、243.26、302.29、327.35、427.43、528.54、 610.61、628.59、710.74、728.68、911.92、1154.08	与E1和E2相比出现了243.26 离子峰
杂质6	1142.04	201.21、202.19、213.23、227.25、302.29、313.33、413.43、514.50、596.61、 614.60、696.67、714.69、897.89、1124.06	出现一系列比E1和E2少14的 离子峰
杂质9	1185.62	201.12、202.10、214.12、227.14、257.15、302.15、327.19、427.25、528.27、 610.31、710.37、728.41、911.50、1167.61	与E1和E2相比出现了257.15 离子峰

肪酸链<sup>[4]</sup>，硫酸多黏菌素E欧洲药典讨论稿中公布的多黏菌素E6也含有3位羟基化的脂肪酸链。综合这些信息，推测杂质3为3-OH-E2。

质谱分析表明杂质6的分子量为1171，比多黏菌素E2少14。氨基酸组成分析表明杂质6结构中含有L-Val，不含L-Leu。由于L-Val的分子量正好较L-Leu少14，故杂质6与多黏菌素E2的结构差异在于L-Val

替代了L-Leu，同时也证明了二者结构中具有相同的脂肪酸链。二级质谱分析过程中，杂质6的肽链部分裂解产生一系列含有L-Val的碎片离子峰，其质量数相比于多黏菌素E2裂解产生的含有L-Leu的碎片离子峰均少14。基于这些分析，故推测杂质6为Val-E2。

杂质9的分子量为1185，较多黏菌素E1的分子量多16，其组成氨基酸与多黏菌素E2(和E1)相同，故

推测杂质9为3-OH-E1, 即欧洲药典讨论稿中的多黏菌素E6。

### 3 讨论

2017年2月, WHO发布了一份对人类威胁最大的12种耐药性细菌清单, 排在前两位的是耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌。随着耐药问题的日益严峻, 多黏菌素E类药物成为临床上治疗严重革兰阴性耐药菌感染的最后一道防线<sup>[5-6]</sup>。目前采用发酵法商业化生产的硫酸多黏菌素E均为混合物, 组分复杂, 不同组分间在生物活性和毒性方面均可能存在差异。因此, 无论是作为药物直接用于临床治疗, 还是作为起始原料用于合成多黏菌素E甲磺酸钠, 都需要对其进行深入的质量研究, 以保障药物的安全性。本文重点研究了硫酸多黏菌素E原料中的低含量组分, 并首次报道了其中含有3-OH-E2组分。硫酸多黏菌素E欧洲药典讨论稿中公布的E4组分分子量为1141, 其与E1的相对保留时间为0.28。本研究

中将具有相同相对保留时间的峰6进行分离纯化和结构分析, 根据本实验数据最终推测其结构为Val-E2。

### 参考文献

- [1] Benedict R G, Langlykke A F. Antibiotic activity of bacillus polymyxa[J]. *J Bacteriol*, 1947, 54(1): 24-25.
- [2] European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. Pharmeuropa 28.4[S/OL]. 2016, 10: 61-66. <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaArchives>.
- [3] Marfey P. Determination of d-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *carlsberg res commun* 49:591[J]. *Carlsb Resh Communicat*, 1984, 49(6): 591-596.
- [4] Orwa J A, Govaerts C, Busson R, *et al*. Isolation and structural characterization of polymyxin B components[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 912(2): 369-373.
- [5] 陈佳容, 邵雷, 张骏梁, 等. 鲍曼不动杆菌对多黏菌素产生耐药的多样性[J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(12): 881-887.
- [6] Biswas S, Brunel J M, Dubus J C, *et al*. Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century[J]. *Expert Rev Infect Ther*, 2012, 10(8): 917-934.