

HPLC-MS 法鉴定制霉菌素和制霉菌素中成分及其潜在毒性预测

常格, 牛霞, 李桂玲*

中国医学科学院 北京协和医学院 医药生物技术研究所以制剂室, 北京 100050

摘要: 目的 采用 HPLC-MS 法鉴定制霉菌素和制霉菌素中组分, 并对其潜在毒性进行预测。方法 采用 HPLC-MS 法测定, Sepax Bio-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: [0.38% 乙酸铵溶液 - 乙腈 (71:29)] - [0.38% 乙酸铵溶液 - 乙腈 (40:60)], 梯度洗脱; 检测波长 305 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。采用电喷雾正离子化 (ESI), 扫描范围 *m/z* 100~1 700, 碎裂电压 100 V, 毛细管电压 3 500 V, 雾化气压 45 psi, 干燥气流速 10 psi, 干燥气温度 325 °C; 无二级质谱。结果 制霉菌素中主要成分为制霉菌素 A₃、多真菌素 B、制霉菌素 A₁ 和白诺菌素, 制霉菌素 A₃、多真菌素 B 分子中具有 *L*-洋地黄毒糖结构, 白诺菌素分子中具有 2,5-二酮哌嗪结构。制霉菌素以制霉菌素 A₁ 为主要成分, 制霉菌素 A₁ 分子中无洋地黄毒糖或 2,5-二酮哌嗪结构。结论 制霉菌素、制霉菌素中主要成分和含量均不相同, 制霉菌素组分中的 *L*-洋地黄毒糖结构和 2,5-二酮哌嗪结构可能分别导致心脏毒性和生殖毒性。

关键词: 制霉菌素; 制霉菌素; 制霉菌素 A₃; 制霉菌素 A₁; HPLC-MS; 心脏毒性; 生殖毒性

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)06-1234-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.06.010

Determination of components in nysfungin and nystatin by HPLC-MS and prediction of potential toxicity

CHANG Ge, NIU Xia, LI Gui-ling

Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To identify constituents in nysfungin and nystatin by HPLC-MS and prediction of their potential toxicity. **Methods** HPLC-MS method was used. The determination was carried out on Sepax Bio-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.38% ammonium acetate solution-acetonitrile (71:29) and 0.38% ammonium acetate solution-acetonitrile (40:60) with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, the injection volume was 20 μL, and the detection wavelength was 305 nm. The detector was TOF Mass Spectrometer equipped with an ESI ion source and its scanning range was between *m/z* 100 — 1 700. Fragmentation voltage was 100 V. Capillary voltage was 3 500 V with atomizing air pressure of 45 psi. The dry gas flow and dryer temperature were 10 psi and 325 °C, respectively. **Results** The main compositions of nysfungin were nystatin A₃, polyfungin B, nystatin A₁, and albonoursin. Nystatin A₃ and polyfungin B had structure of *L*-digitoxose. Albonoursin had structure of 2,5-diketopiperazine. Nystatin was mainly composed of nystatin A₁ which had no *L*-digitoxose or 2, 5-diketopiperazine structure. **Conclusion** The main compositions and contents in nysfungin and nystatin are different. The *L*-digitoxose structure and the 2,5-diketopiperazine structure in the compositions in nysfungin may lead to cardiotoxicity and reproductive toxicity, respectively.

Key words: nysfungin; nystatin; nystatin A₃; nystatin A₁; HPLC-MS; cardiotoxicity; reproductive toxicity

制霉菌素是一种共轭多烯大环内酯类抗真菌药物, 可通过菌株发酵后分离纯化获得, 临床上通常用于皮肤、口腔念珠菌感染的治疗^[1-2]。制霉菌素通常为多组分混合物, 可能包含制霉菌素 A₁、A₂、A₃ 等多种成分^[3-4], 于 1959 年由 Hazen、Brown 首

次从链霉菌中分离得到, 随后蔡润生通过从土壤中分离发酵放线菌首次成功提取国产制霉菌素。已有研究表明, 国产制霉菌素与国外制霉菌素在成分组成、生物效价方面均存在差异, 因此后来将国产制霉菌素名称改为制霉菌素以作区分^[5-6]。本研究采用

收稿日期: 2022-03-29

作者简介: 常格, 女, 药学专业硕士生。E-mail: change1710@163.com

*通信作者: 李桂玲, 女, 研究员, 硕士生导师, 从事新药制剂及新型药物载体递送系统研究。E-mail: liguilin1999@163.com

HPLC-MS 法对制霉菌素和制霉菌素进行组分分离和结构鉴定,探究组分差异的同时对组分的结构进行分析,进一步通过构效关系预测其潜在毒性。结果表明,制霉菌素、制霉菌素中组成成分及其含量均不相同。制霉菌素中主要成分为制霉菌素 A₃、多真菌素 B、制霉菌素 A₁ 和白诺菌素,制霉菌素以制霉菌素 A₁ 为主要成分。制霉菌素 A₃、多真菌素 B 分子中具有 L-洋地黄毒糖结构,白诺菌素分子中具有 2,5-二酮哌嗪结构;制霉菌素 A₁ 分子中无洋地黄毒糖或 2,5-二酮哌嗪结构。制霉菌素组分中的 L-洋地黄毒糖结构和 2,5-二酮哌嗪结构可能分别导致心脏毒性和生殖毒性^[7-8],因此应对此进行深入研究并引起临床重视,保证患者用药安全。

1 仪器与材料

Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 仪(美国安捷伦公司); Waters e2695 型高效液相色谱仪、Waters 2996 PDA 检测器、Waters Empower3 色谱工作站(美国沃特世公司); AR 1530 电子天平(美国奥豪斯公司); ES 225SM-DR 电子天平(瑞士普利赛斯公司)。

乙酸铵、盐酸(南京化学试剂股份有限公司,批号 200807495E、12072030339); 乙腈、甲醇(Honeywell 公司,批号 T40A1H、UBZG1H); 二甲基亚砜(DMSO)(国药集团化学试剂有限公司,批号 T20110520); 怡宝纯化水(华润怡宝饮料有限公司,批号 202101141858BP10K)。

制霉菌素 N1(罗马尼亚 S.C.ANTIBIOTICE S.A 公司,批号 4011080,含量 6 245 U/mg)、制霉菌素 N2(意大利 Capua BioServices S.P.A 公司,批号 C114387,含量 6 230 U/mg)、制霉菌素 N3(浙江震元制药有限公司,批号 01-060-200716,含量 6 059 U/mg)、制霉菌素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 130375-201802,含量 5 900 U/mg)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Sepax Bio-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: [0.38% 乙酸铵溶液 - 乙腈(71:29)] (A) - [0.38% 乙酸铵溶液 - 乙腈(40:60)] (B), 梯度洗脱(0~35 min 为 100% A, 35~50 min 线性转变为 100% B, 50~60 min 维持 100% B, 60~65 min 线性恢复为 100% A, 维持至 70 min); 检测波长 305 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量为 20 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾正离子化(ESI),扫描范围 m/z 100~1 700, 碎裂电压 100 V, 毛细管电压 3 500 V, 雾化气压 45 psi (1 psi=6 895 Pa), 干燥气流速 10 psi, 干燥气温度 325 °C; 无二级质谱。

2.3 溶液制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取制霉菌素对照品 20 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 DMSO 溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得质量浓度为 0.4 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取制霉菌素 N1、N2 和制霉菌素 N3 样品各 20 mg, 分别置于 3 个不同的 50 mL 量瓶中, 各加入 DMSO 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 系统适用性试验

取制霉菌素对照品 20 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加 25 mL 甲醇溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀。取该溶液 10 mL, 加入 2 mL 稀盐酸稀释, 室温放置 1 h 后, 滤过, 取 20 μL 注入色谱仪中, 记录色谱图, 见图 1。制霉菌素 A₁ 保留时间为 29.096 min, 与其在盐酸作用下分解产生的保留时间为 22.947、36.370 min 的杂质峰之间分离良好, 分离度均不小于 3.5, 符合进口标准(JX20050133)要求^[9]。

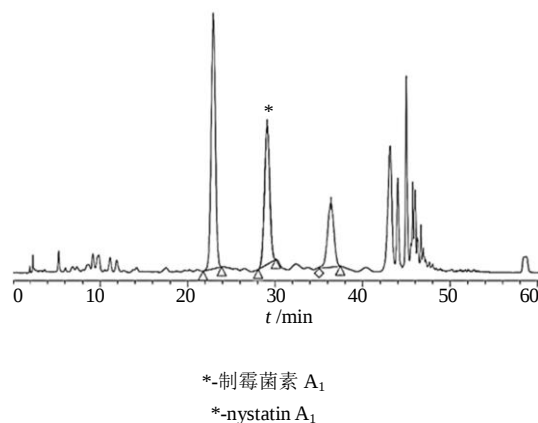


图 1 系统适用性色谱图

Fig. 1 Liquid chromatogram of system suitability

2.5 成分鉴定

取制霉菌素 N1、N2 和制霉菌素 N3 供试品溶液各 20 μL, 滤过后进行测定, 记录谱图, 结果各供试品溶液均可实现组分间的有效分离。

2.5.1 色谱图分析 将制霉菌素 N1、N2 和制霉菌素 N3 供试品溶液的高效液相色谱图进行对比, 色谱

图见图 2。可知 3 种供试品均为多组分混合物。制霉菌素 N1、N2 的色谱图大致相似，最大的主峰保留时间均在 29 min 左右 (28.898、30.367 min，制霉菌素 N1、N2 中该成分面积归一化百分比分别为 97.57%、97.59%)，次主峰保留时间均在 44 min 左右 (44.987、43.027 min)。判定制霉菌素 N1、N2 中成分相似，且最主要成分的保留时间约为 29 min。制霉菌素 N3 的高效液相色谱图显示，其组分峰保留时间分别为 21.093、28.773、42.553 min，后 2 个峰的保留时间与制霉菌素 N1、N2 相似，推测为相同成分，但其含量不同。可见，制霉菌素 N3 中主要成分与制霉菌素 N1、N2 不同。此外，制霉菌素 N3 在保留时间 21.093 min 处的色谱峰提示其中含有制霉菌素 N1、N2 中不存在的成分。

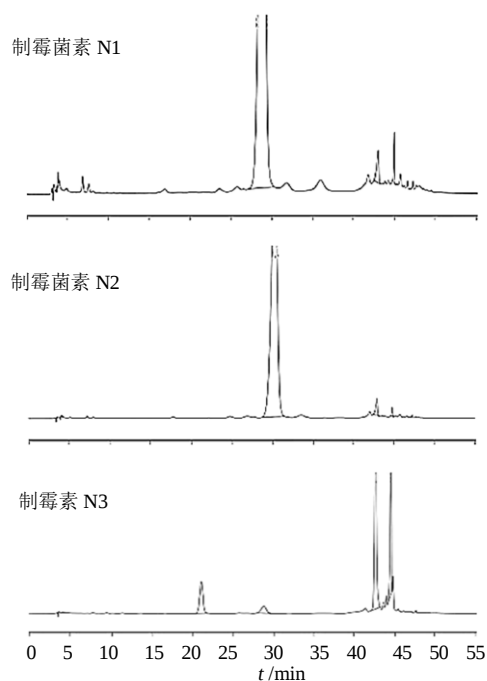


图 2 制霉菌素 N1、N2 和制霉菌素 N3 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of nystatin N1, nystatin N2, and nysfungin N3

2.5.2 质谱图分析 在上述质谱条件下，各供试品在正离子模式中质谱响应均灵敏。对其谱图进行分析比较，质谱图见图 3，结果制霉菌素 N1、N2 分子离子峰均为 m/z 926 $[M+H]^+$ ，且均为基峰，提示相对分子质量为 925 的物质为制霉菌素 N1、N2 中主要成分。制霉菌素 A₁ 分子式为 C₄₇H₇₅NO₁₇，相对分子质量为 925，可见制霉菌素 A₁ 可能为制霉菌素 N1、N2 中主要成分。

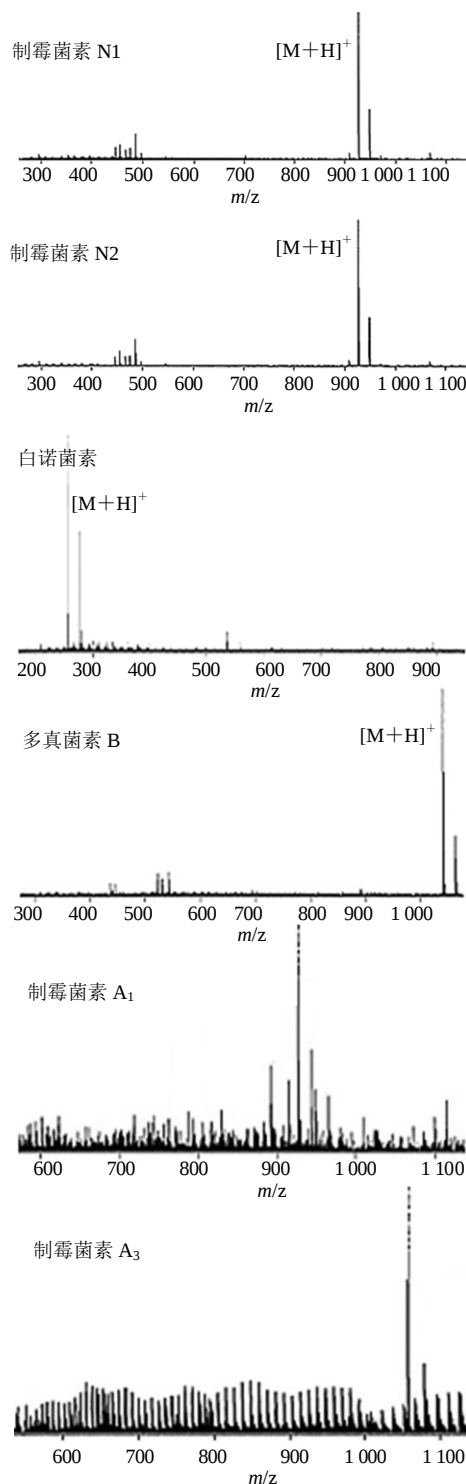


图 3 制霉菌素 N1、N2 和制霉菌素 N3 (包括白诺菌素、多真菌素 B、制霉菌素 A₁ 和制霉菌素 A₃) 的质谱图

Fig. 3 Mass spectrums of nystatin N1, nystatin N2, and nysfungin N3 (including albionoursin, polyfungin B, nystatin A₁, and nystatin A₃)

制霉菌素 N3 质谱图中分子离子峰 m/z 257 $[M+H]^+$ ，其相对分子质量为 256，分析可知其结构为

$C_{15}H_{16}N_2O_2$ ，即白诺菌素。制霉菌素 N3 质谱图中 m/z 1 040 $[M+H]^+$ ，其相对分子质量为 1 039，分析可知其为多真菌素 B。 m/z 926 提示制霉菌素 N3 中含有制霉菌素 A₁，但并非其主要成分。此外， m/z 1 056 为制霉菌素 A₃，分子式 $C_{53}H_{85}NO_{20}$ 。根据结构可知，制霉菌素 A₃ 分子中含有 L-洋地黄毒糖。制霉菌素 A₁、A₃ 的 m/z 相差 130，即相对分子质量相差

130，该差异由制霉菌素 A₃ 结构中 L-洋地黄毒糖导致。多真菌素 B 与制霉菌素 A₃ 结构极其相似，均含有 L-洋地黄毒糖，两者结构中仅存在 1 个基团差异，前者为 -H，后者为 -OH，导致相对分子质量相差 16。综上所述，与制霉菌素 N1、N2 相比，制霉菌素 N3 中组分更复杂，含制霉菌素 A₁、制霉菌素 A₃、多真菌素 B 和白诺菌素。各成分的化学结构式见图 4。

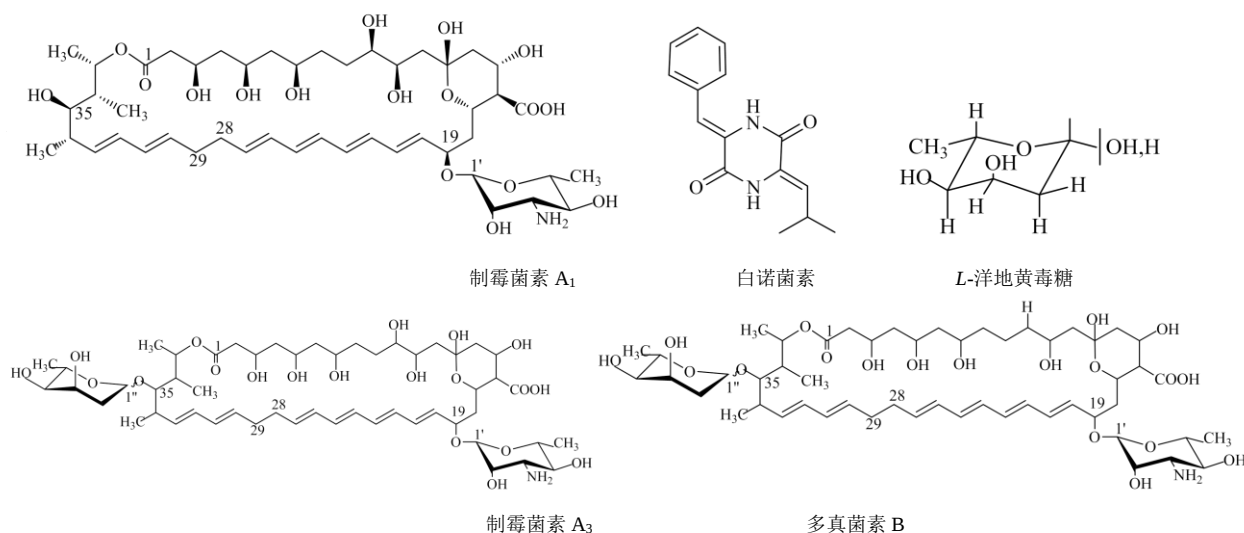


图 4 各成分的化学结构式

Fig. 4 Structural formulas of components

3 潜在毒性

不同来源的制霉菌素、制霉菌素中组分分离、结构鉴定结果可见国产制霉菌素 N3 与进口制霉菌素 N1、N2 中组成成分和含量均存在较大差异。

制霉菌素 N3 中组分较制霉菌素 N1、N2 更复杂，其中主要成分制霉菌素 A₃、多真菌素 B 分子中均含有 L-洋地黄毒糖结构。洋地黄毒糖结构为洋地黄类药物的药效基团，该类物质可通过抑制心肌细胞 Na^+, K^+ -ATP 酶增强心肌收缩力，产生正性肌力作用。此外，其负性频率和负性传导作用可减慢心率，并降低房室传导速度，已广泛应用于充血性心力衰竭的治疗^[10]。常见的洋地黄类药物有地高辛、洋地黄毒苷和去乙酰毛花苷等。尽管洋地黄类药物在心血管疾病中疗效显著，但其安全治疗窗窄，个体差异大，需要进行血药浓度监测，否则易出现洋地黄中毒的不良反应，诱发心律失常，如室性早搏、房室传导阻滞、室颤等，威胁患者生命健康^[11-15]。制霉菌素 N3 中主要成分结构中存在 L-洋地黄毒糖结构，该结构的存在使制霉菌素 N3 可能具有洋地黄相关的潜在心脏毒性，可能引发心律失常等不良反

应。但该观点仅作为推测，尚未被相关研究确证，为保证患者用药的安全性，需要对此潜在毒性的存在与否进行进一步的探索。在目前临床使用中仍应加以重视，尤其对于洋地黄中毒高风险人群，在使用含有制霉菌素 N3 的药物时应加以警惕，防患于未然，并做好及时处理心脏不良反应的准备，保证患者用药安全。制霉菌素 N1、N2 中主要成分为制霉菌素 A₁，其结构中无洋地黄毒糖结构，不具有洋地黄结构相关的心脏毒性，因此使用时发生心脏不良反应应较制霉菌素 N3 更低，更适合洋地黄中毒高风险人群。

此外，白诺菌素也是制霉菌素 N3 中组分之一，是从白色链霉菌 KO-23 中分离得到的一种具有抗菌、抗肿瘤作用的脱氢环二肽类化合物，属于 2,5-二酮哌嗪类衍生物^[16-17]。有研究表明 2,5-二酮哌嗪类衍生物对于微管蛋白的形成具有抑制作用，可影响细胞正常分裂，从而产生细胞毒性，且可能涉及慢性杀灭细胞，导致细胞增殖活跃，甚至可能与恶性肿瘤的发生具有一定关联^[18-19]。此外，已有研究使用海胆受精卵证明白诺菌素可影响受精卵原核

融合过程,抑制卵裂,产生一定的生殖毒性^[20-21]。该研究进一步表明,白诺菌素因其结构中两个氨基酸残基 α 、 β 位均存在脱氢,相比单个氨基酸残基脱氢的 2,5-二酮哌嗪类化合物具有更强细胞毒性^[22]。因此,白诺菌素可能对人胚胎细胞也具有一定影响,但尚未有研究表明其在人体是否具有毒性,其对人体的生殖毒性仍有待进一步研究验证。但在临床治疗中,对处于备孕阶段或妊娠期的患者应谨慎使用含有白诺菌素成分的药物,防止相关生殖毒性的发生,确保患者用药安全。

4 讨论

本研究通过对不同来源的制霉菌素和制霉菌素进行 HPLC-MS 法的成分分离和结构鉴定,得知其均为多组分混合物。进口制霉菌素 N1、N2 以制霉菌素 A₁ 为主要成分,而国产制霉菌素 N3 中组分更加复杂,其主要成分为制霉菌素 A₃、多真菌素 B、制霉菌素 A₁ 和白诺菌素。制霉菌素 N3 与制霉菌素 N1、N2 中主要成分和含量均不相同,这种组分差异可能与发酵菌株种类、发酵、提取条件等有关。制霉菌素 N3 中主要组分结构中包含 L-洋地黄毒糖结构,可能具有类似洋地黄类药物的心脏毒性;制霉菌素 N3 中的白诺菌素因其分子结构中的 2,5-二酮哌嗪结构,可能具有潜在生殖毒性。尽管上述假设仍需进一步研究,但在目前临床使用中仍应加以警惕,防范潜在毒性的发生,做好及时处理不良反应的准备,保证患者用药安全。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Szomek M, Reinholdt P, Petersen D, et al. Direct observation of nystatin binding to the plasma membrane of living cells [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2021, 1863(2): 183528.
- [2] 黄嵩, 邹梅娟, 朴洪宇. 制霉菌素混悬剂的制备及质量评价 [J]. *中国药理学杂志*: 网络版, 2022, 20(2): 47-55.
- [3] 马剑文, 刘玉波, 文德秀, 等. 高效液相色谱法研究国内外制霉菌素的组成 [J]. *药学学报*, 1985, 20(4): 294-300.
- [4] 凌大奎, 陈苏, 王绍文, 等. 国产制霉菌素中两个主成分的结构鉴别 [J]. *药学学报*, 1986, 21(6): 454-457.
- [5] 蔡润生, 龔炳永, 包琴珠. 制霉菌素 A-94 的研究 II. 制霉菌素 A-94 的制备和性质研究 [J]. *科学通报*, 1959, 10(24): 825-826.
- [6] Thomas A H, Newland P, Sharma N R. The heterogeneous

composition of pharmaceutical-grade nystatin [J]. *Analyst*, 1982, 107(1277): 849-854.

- [7] 成建国. 洋地黄类药物临床应用中的相关问题 [J]. *西藏医药杂志*, 2008, 29 (4): 23-26.
- [8] 李秀荣, 舒茂, 王远强, 等. 2,5-二酮哌嗪类微管蛋白抑制剂的 3D-QSAR 研究 [J]. *计算机与应用化学*, 2014, 31(1): 86-90.
- [9] 进口药品注册标准 [S]. JX20050133. 2005.
- [10] 赵国炎, 孙跃民. 强心药在心力衰竭应用中的再评价 [J]. *临床荟萃*, 2017, 32(3): 189-192.
- [11] 王宏. 地高辛血药浓度监测及影响因素分析 [J]. *临床合理用药杂志*, 2002, 15(4): 158-160.
- [12] 贾雨萌, 王相阳, 褚扬, 等. 强心苷类药物药动学研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(23): 3472-3477.
- [13] 刘德敏, 崔炜. 风雨 200 年: 洋地黄类药物在心力衰竭治疗中的地位 [J]. *临床荟萃*, 2016, 31(9): 1033-1037.
- [14] Fisch C, Knoebel S B. Digitalis cardiotoxicity [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1985, 5(5 Suppl A): 91A-98A.
- [15] Demiryürek A T, Demiryürek S. Cardiotoxicity of digitalis glycosides: roles of autonomic pathways, autacoids and ion channels [J]. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2005, 25(2): 35-52.
- [16] 黄麟, 张庆林, 吴祖泽. 白诺菌素类化合物的结构鉴定及核磁共振归属的研究 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2007, 31(6): 593-595.
- [17] Fukushima K, Yazawa K, Arai T. Biological activities of albonoursin [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1973, 26(3): 175-176.
- [18] 廖升荣, 李晋昇, 汤勇, 等. 易溶 2,5-二酮哌嗪衍生物中保护基与其抗肿瘤活性的构效关系研究 [A] // 中国化学会第十届全国天然有机化学学术会议论文集—第三分会场: 天然产物合成生物学、化学生物学及新技术 [C]. 广州: 中国化学会, 2014: 57.
- [19] 汤勇, 廖升荣, 李晋昇, 等. 含氟 2,5-二酮哌嗪衍生物的设计、合成及细胞毒活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(4): 412-421.
- [20] 唐宁, 王建业, 吕丹, 等. 授精后 24-25h 原核融合与 IVF/ICSI-ET 中胚胎早期发育和妊娠结局的相关性研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(3): 121-123.
- [21] Kanzaki H, Imura D, Nitoda T, et al. Effective production of dehydro cyclic dipeptide albonoursin exhibiting pronuclear fusion inhibitory activity. II. Biosynthetic and bioconversion studies [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2000, 53(1): 58-62.
- [22] Kanzaki H, Yanagisawa S, Nitoda T. Biosynthetic intermediates of the tetradehydro cyclic dipeptide albonoursin produced by *Streptomyces albulus* KO-23 [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2000, 53(11): 1257-1264.

[责任编辑 解学星]