

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.07

超高效液相色谱 - 二极管阵列 - 串联四极杆静电轨道阱质谱法对杆菌肽组分的分析

严凤, 吴剑平, 王博, 张婧, 曹莹*

(上海市动物疫病预防控制中心, 上海 201103)

[收稿日期] 2021-06-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0046-12 [中图分类号] S859.83

[摘要] 开发建立了超高效液相色谱 - 二极管阵列 - 串联四级杆静电场轨道阱高分辨质谱联用分析杆菌肽组分的方法。采用 (Phenomenex C₁₈ 100 mm × 3.0 mm, 2.6 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸溶液 - 0.1% 甲酸甲醇乙腈 (75 + 25) 溶液为流动相, 0.3 mL/min 线性梯度洗脱分离, 紫外吸收波长为 254 nm。采集杆菌肽各组分质谱母离子及其对应子离子, 并进行解析, 推测组分的结构。在所建立的条件下, 检测出 9 个组分, 杆菌肽各组分之间分离良好。利用紫外与质谱归一化法测定含量, 两种结果相对偏差在 0.01% ~ 3.53% 之间。建立的超高效液相色谱 - 二极管阵列 - 串联四级杆静电场轨道阱高分辨质谱法能有效分析多肽类药物杆菌肽各组成成分, 为杆菌肽的质量控制和工艺优化提供了参考。

[关键词] 杆菌肽组分; 多肽类药物; 超高效液相色谱 - 紫外 - 串联四级杆静电场轨道阱高分辨质谱

Analysis of Bacitracin Components by Ultra High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector Coupled with Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry

YAN Feng, WU Jian - ping, WANG Bo, ZHANG Jing, CAO Ying*

(Shanghai Control of Animal Disease Center, Shanghai 201103; 2. Thermofisher Scientific (China), 201206)

Corresponding author: CAO Ying, E-mail: 15601606964@163.com

Abstract: An ultra high performance liquid chromatography diode array detector (DAD) coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry method was developed for bacitracin components analysis. The UHPLC separation was carried out on a Phenomenon C₁₈ (100 mm × 3.0 mm, 2.6 μm) by gradient elution with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid meoh acetonitrile (75 + 25) solution at a flow rate of 0.3 mL/min. The. detection wavelength was set at 254 nm. The analysis for bacitracin components

作者简介: 严凤, 高级畜牧师, 从事畜牧投入品及畜产品中兽药残留分析工作。

通讯作者: 曹莹。E-mail: 15601606964@163.com

were performed with the parent ions and the daughter ions, then estimated their structures. Good resolution of bacitracin components were achieved. Nine bacitracin components were separated and detected. The relative deviation of normalization method by DAD and mass spectrometry was between 0.01% and 3.53%. The established method was effective for the separation and identification of peptide drugs such as bacitracin components and the results were useful for its quality control and process optimization.

Key words: bacitracin components; peptide drugs; ultra high performance liquid chromatography diode array detector (DAD) coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry

杆菌肽 (bacitracin) 是由枯草杆菌和地衣芽孢杆菌产生的一系列抗菌肽的混合物, 是一种非核糖体肽, 由氨基酸和特殊的或修饰过的氨基酸通过“硫模板多聚酶机制 (thiotemplatemuhienzymemechanism)”的多功能酶复合系统合成的一类肽类次级代谢产物^[1]。杆菌肽具有特殊的抑菌机制, 会干扰细菌细胞壁的合成, 同时在肽聚糖的合成中抑制磷脂受体的再生^[2], 使得其具有抗菌谱广、不易产生耐药性等特性。杆菌肽还是一个重要的饲料添加剂, 5 ~ 100 mg/kg 浓度可促进家禽和牲畜对食物的利用以增重, 是目前国内外广泛用于饲料中的一种具有促生长作用的理想抗生素^[3], 但随着养殖业减抗, 禁抗的全面推进, 从 2020 年 7 月起, 杆菌肽已经禁止用于饲料添加剂。杆菌肽主要由 12 个氨基酸组成^[4]至少有 7 种同系物, 包括杆菌肽 A、B (B1、B2、B3)、C (C1、C2、C3)、E、F 等, 其中杆菌肽 A 为主要活性组分^[5-6]。杆菌肽 A 在碱性条件下可自发氧化, 形成没有抗菌活性的杆菌肽 F 组分^[7]。《中国药典》(2015 版)^[8]中杆菌肽含量的测定方法为微生物检定法, 药典法测定的是杆菌肽中的总活性成分, 未对各成分含量进行分别测定。由于杆菌肽组分多, 对其分离具有较大的难度, 国外药典^[9-11]多采用高效液相色谱分析杆菌肽的组分及有关物质。由于是发酵产品, 杆菌肽成分组成相似且非常复杂, 其组分分析是质量评价和质量控制的核心内容, 而复杂的多组分体系使得分析方法的开发十分困难。超高效液相色谱 - 二极管阵列 - 串联四级杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱, 分离效率高, 分辨率高, 灵敏度高, 可同时精确地采集母离子质荷比和碎片离子质量数, 能够显著提高复杂体系中化学

成分的快速分析鉴定能力。高分辨质谱技术因其特有的优势在药物分析研究中发挥日益重要的作用, 在药物质量研究领域得到越来越多的应用^[12-13]。本文建立超高效液相色谱 - 二极管阵列 - 串联四级杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱分析杆菌肽中的组分, 发挥高分辨质谱的优势准确地测得杆菌肽各组分精确质荷比, 计算出各组分的元素组成, 并能区分复杂背景中质量数接近的杂质及共流出组分, 结合二极管阵列检测器可以不经复杂的分离和纯化步骤即可获得样品的色谱和质谱信息, 是一种可以针对目标或非目标多组分药物研究的有力工具, 为其质量控制和工艺优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 Dionex Ultimate 3000 diode array detector (DAD) - Q Exactive, Xcalibur 2.2 数据处理系统 (美国 Thermo Scientific 公司), Mass Frontier 软件 (美国 Thermo Scientific 公司)

杆菌肽标准对照品, Dr. Ehrenstorfer GmbH, 批号: 991436, 含量 81.9%; 杆菌肽供试品, 批号 1 - SAM - 144 - 1。乙腈、甲酸 (色谱纯), 水为超纯水 (Milli - Q 仪制备)。

1.2 溶液配制 精密称取杆菌肽标准对照品及供试品 10 mg, 分别于 50 mL 棕色容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。

1.3 方法

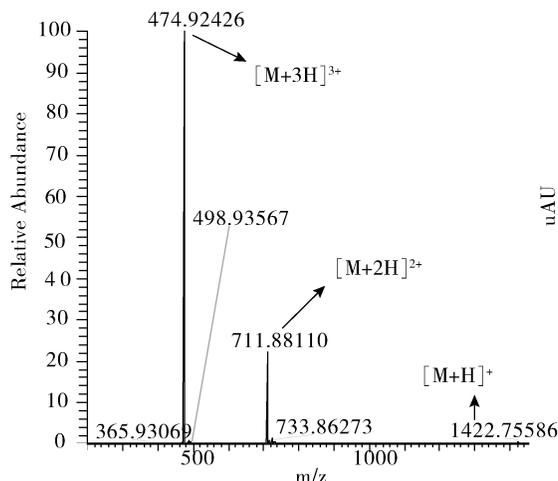
1.3.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex C₁₈ 100 mm × 2.1 mm, 粒径 2.6 μm 流动相: 0.1% 甲酸溶液 (A) - 0.1% 甲酸甲醇乙腈 (75 + 25) 溶液 (B); 流速 0.3 mL/min, 采用梯度洗脱程序 (表 1); 柱温 30 °C, 进样量 10 μL; 紫外吸收波长 254 nm。

表 1 梯度洗脱程序

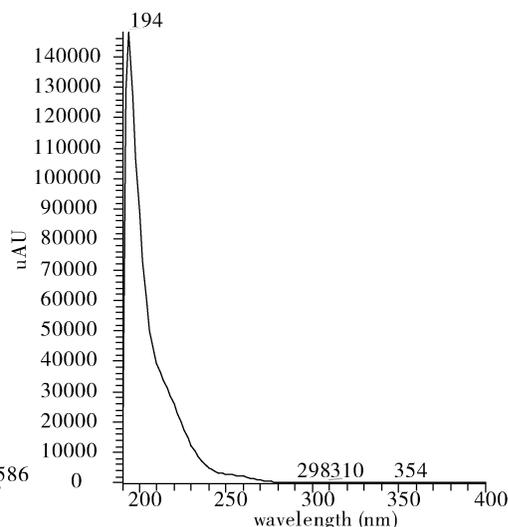
Tab 1 Gradient elution

时间/min	A/%	B/%
0	66	34
15	66	34
30	50	50
32	50	50
33	66	34

1.3.2 质谱条件 离子源为 HESI 源,雾化气 40 arb;辅助气 10 arb;喷雾电压 3500V(+)/3000V(-);离子传输毛细管温度 320 ℃;辅助气温度 350 ℃;扫描模式:正离子模式 Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70000, dd-MS²分辨率 17500,扫描范围 m/z 150~1450。MS/MS 模式时,归一化阶梯



(1)



(2)

图 1 杆菌肽 A 质谱图(1)和紫外吸收光谱图(2)

Fig 1 Bacitracin A Mass spectrum(1) and UV spectrum(2)

2.1.2 杆菌肽 B 杆菌肽 B 分子式 $C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$ 比杆菌肽 A 少一个 CH_2 ,母离子精确质量 $[M+H]^+$ 为 1408.667。杆菌肽 B 有 3 个同分异构体,分别为 B1(保留时间 12.47 min)、B2(保留时间 14.29 min)和 B3(保留时间 19.44 min)。杆菌肽 B 在质谱中 $[M+2H]^{2+}$ 704.87392 和 $[M+3H]^{3+}$ 470.25171 的加和离子峰响应更强,见图 2。主要碎片离子有 110.07112、199.08996、227.08487、356.12747、869.46821、852.43626。

碰撞能量:20%、40%和 60%。

2 结果与分析

2.1 定性结果

2.1.1 杆菌肽 A 杆菌肽 A 分子式 $C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$,保留时间 20.71 min。杆菌肽是一种多肽类抗生素,多肽类药物在质谱中会带有多个电荷,杆菌肽 A 在质谱中除了有 $[M+H]^+$ 1422.75622 峰外,同时还有 $[M+2H]^{2+}$ 711.88175 和 $[M+3H]^{3+}$ 474.92359 的加和离子峰,而且 $[M+2H]^{2+}$ $[M+3H]^{3+}$ 在质谱中的响应值均优于 $[M+H]^+$,见图 1。杆菌肽 A 的主要碎片离子有 110.07112、199.08996、227.08487、356.12747、869.46281、982.54688。

2.1.3 杆菌肽 C 杆菌肽 C 分子式 $C_{64}H_{99}N_{17}O_{16}S$,比杆菌肽 A 少两个 CH_2 ,母离子精确质量 $[M+H]^+$ 为 1394.72492、 $[M+2H]^{2+}$ 697.86610 和 $[M+3H]^{3+}$ 465.57982,其中 $[M+3H]^{3+}$ 在质谱中的响应最强,见图 3。杆菌肽 C 也存在 C1、C2 和 C3 三个同分异构体,保留时间分别为 6.91 min、10.11 min 和 11.68 min,见图 3。主要碎片离子有 110.07112、199.08996、227.08487、356.12747、400.16155、838.42061。

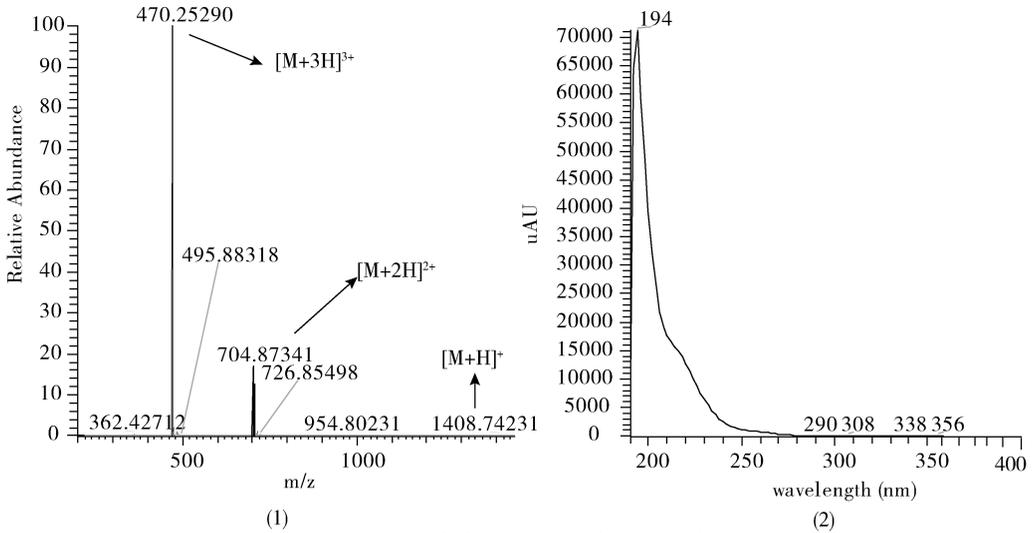


图 2 杆菌肽 B 质谱图 (1) 和紫外吸收光谱图 (2)

Fig 2 Bacitracin B Mass spectrum(1) and UV spectrum(2)

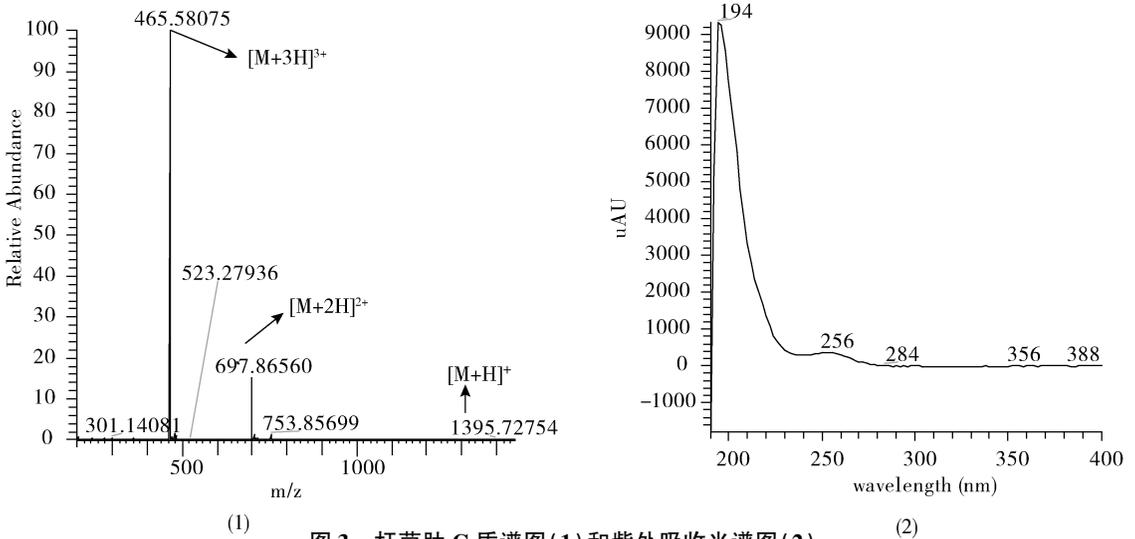


图 3 杆菌肽 C 质谱图 (1) 和紫外吸收光谱图 (2)

Fig 3 Bacitracin C Mass spectrum(1) and UV spectrum(2)

2.1.4 杆菌肽 E 杆菌肽 E 分子式 $C_{63}H_{97}N_{17}O_{16}S$, 比杆菌肽 A 少三个 CH_2 , 母离子精确质量 $[M+H]^+$ 为 1380.70927, $[M+2H]^{2+}$ 690.85827 和 $[M+3H]^{3+}$ 460.90794, 其中 $[M+3H]^{3+}$ 在质谱中的响应最强, 由于含量较低, 实际在样品中主要是二价和三价质谱峰, 见图 4。主要碎片离子有 199.08996、110.07112、227.08487。

2.1.5 杆菌肽 F 杆菌肽 F 分子式 $C_{66}H_{98}N_{16}O_{17}S$, 杆菌肽 A 在碱性条件下可发生降解, N-端噻唑结构氧化成噻唑酮结构, 形成没有抗菌活性, 但是具有肾毒性的杆菌肽 F^[14]。杆菌肽 F 母离子精确质

量 $[M+H]^+$ 为 1419.90893, $[M+2H]^{2+}$ 710.35810 和 $[M+3H]^{3+}$ 473.90783, 其中 $[M+2H]^{2+}$ 在质谱中的响应最强, 见图 5。主要碎片离子有 110.07112、214.05190、281.13183。

2.1.6 定性结果汇总 采用本方法共测到 9 个杆菌肽组分, 其中含有多个同分异构体, 杆菌肽不同结构间的差异主要是 N-端噻唑结构部分 R 位点的不同, 以及 X 和 Y 位置上接的是 L-异亮氨酸还是 L-缬氨酸的差异^[14], 结构通式见图 6。各组分结构组成不同在色谱保留行为上也有一定的差异, 见图 7, 同时结合高分辨质谱测得不同的母离子精确质量, 可对各组分进行准确定性(表 2)。

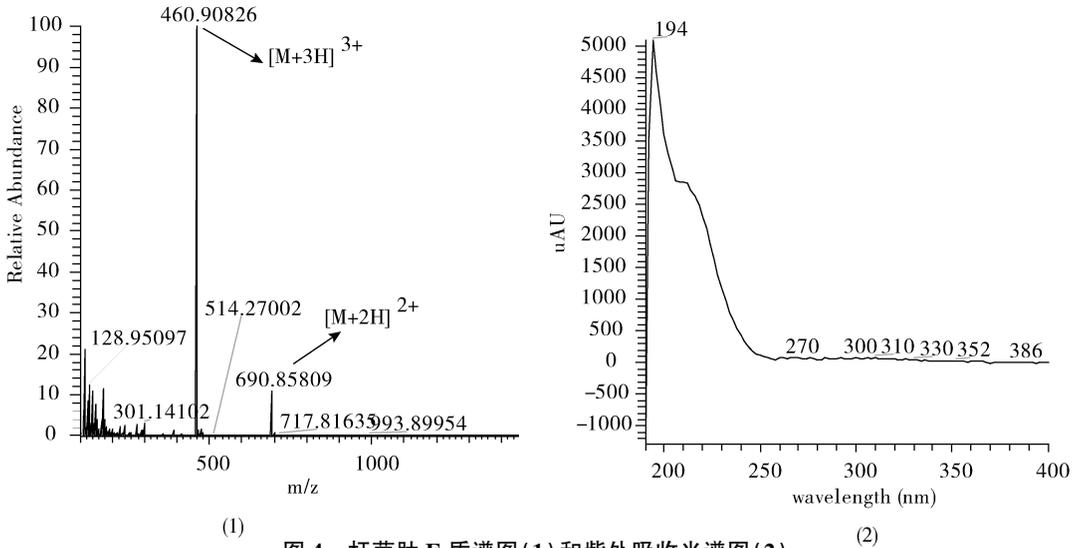


图 4 杆菌肽 E 质谱图 (1) 和紫外吸收光谱图 (2)

Fig 4 Bacitracin E Mass spectrum (1) and UV spectrum (2)

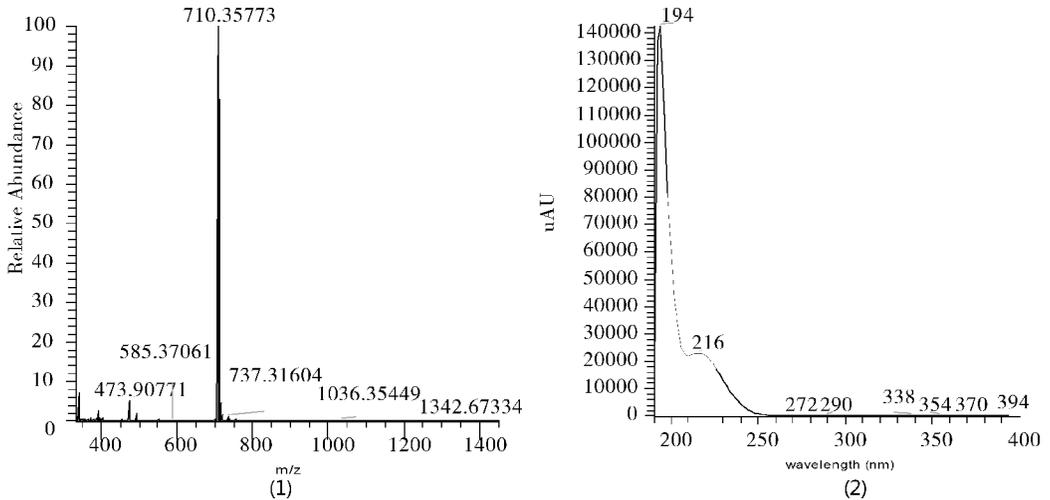


图 5 杆菌肽 F 质谱图 (1) 和紫外吸收光谱图 (2)

Fig 5 Bacitracin F Mass spectrum (1) and UV spectrum (2)

表 2 杆菌肽各组分信息及一级精确质量

Tab 2 The characteristics of bacitracin components and parent ions

药物	分子式	X	Y	R	$[M+3H]^{3+}$ 实测值 m/z	$[M+3H]^{3+}$ 理论值 m/z	偏差 ppm	$[M+2H]^{2+}$ 实测值 m/z	$[M+2H]^{2+}$ 理论值 m/z	偏差 ppm	保留时间 /min
杆菌肽 A	$C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$	L-Ile	L-Ile	CH ₃	474.92432	474.92359	1.5	711.88177	711.88175	0.03	20.71
杆菌肽 B1	$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$	L-Ile	L-Ile	H	470.25220	470.25171	1.0	704.87408	704.87392	0.2	12.47
杆菌肽 B2	$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$	L-Val	L-Ile	CH ₃	470.25201	470.25171	0.6	704.87402	704.87392	0.1	14.29
杆菌肽 B3	$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$	L-Ile	L-Val	CH ₃	470.25201	470.25171	0.6	704.87390	704.87392	0.03	19.44
杆菌肽 C1	$C_{64}H_{99}N_{17}O_{16}S$	L-Val	L-Ile	H	465.58005	465.57982	0.5	697.86621	697.86610	0.2	6.91
杆菌肽 C2	$C_{64}H_{99}N_{17}O_{16}S$	L-Ile	L-Val	H	465.58002	465.57982	0.4	697.86639	697.86610	0.4	10.11
杆菌肽 C3	$C_{64}H_{99}N_{17}O_{16}S$	L-Val	L-Val	CH ₃	465.58014	465.57982	0.7	697.86633	697.86610	0.3	11.68
杆菌肽 E	$C_{63}H_{97}N_{17}O_{16}S$	L-Val	L-Val	H	460.90778	460.90794	0.3	690.85828	690.85827	0.01	5.61
杆菌肽 F	$C_{66}H_{98}N_{16}O_{17}S$	L-Ile	L-Ile	CH ₃	473.90765	473.90783	0.4	710.35822	710.35810	0.2	31.81

2.2 定量结果 按照兽药质量标准汇编(2013年)^[15]中杆菌肽预混剂的组分用液相色谱法测定规定杆菌肽 A 不小于 35%, 杆菌肽(A + B1 + B2 + B3) 不小于 70.0%, 杆菌肽(C1 + C2 + C3) 不大于 20.0%, 杆菌肽 F 不大于 13%。本方法通过紫外串联质谱检测器进行同时测定, 通过紫

外归一化法计算各组分均符合兽药质量标准的相关规定。本方法以 $[M + 3H]^{3+}$ 测定各组分分子离子的峰面积, 尝试采用各组分的分子离子峰面积与所有组分峰面积总和的占比进行质谱归一化计算, 结果表明与紫外归一化法测定结果较一致, 测定结果见表 3。

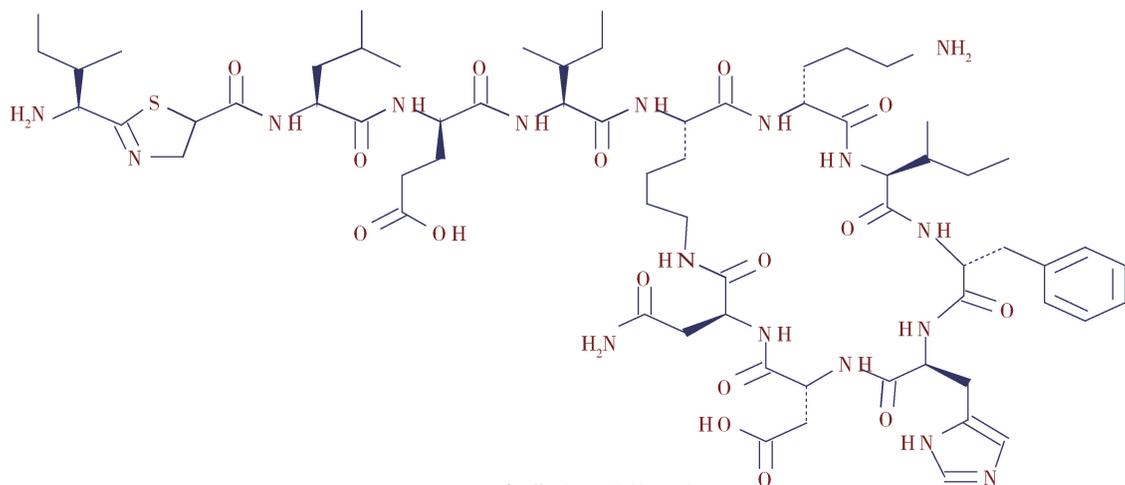
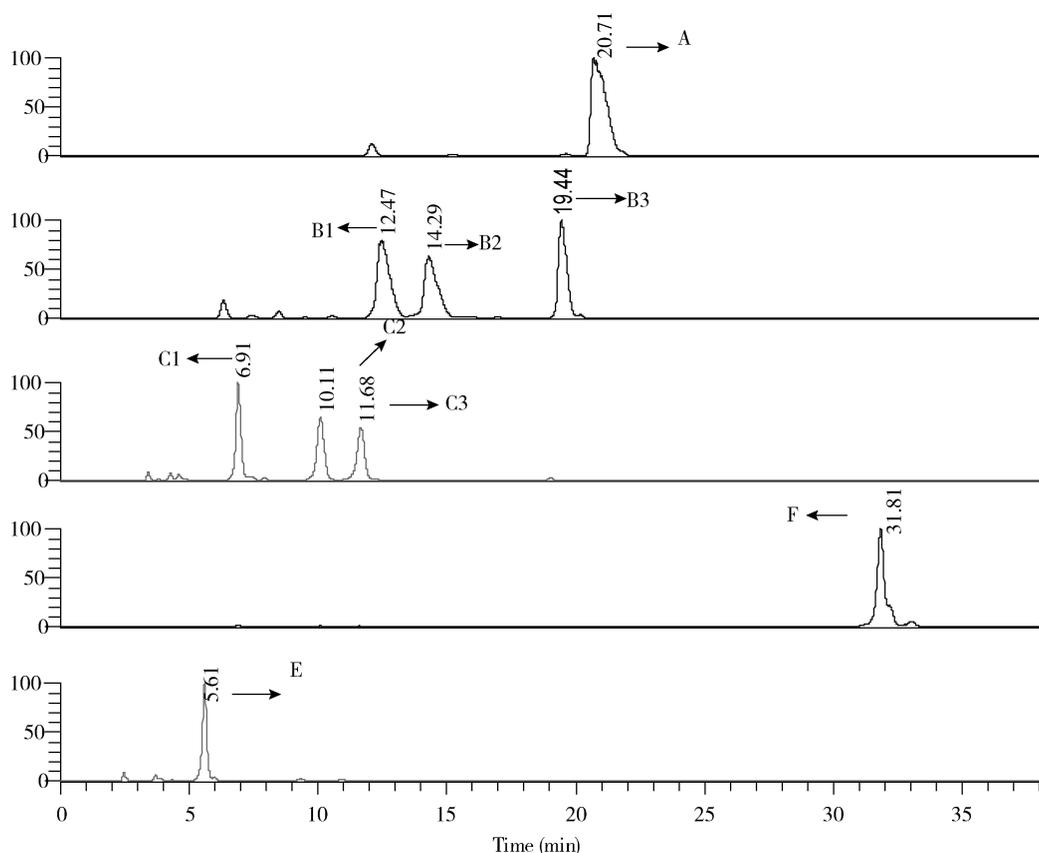


图 6 杆菌肽 A 结构通式

Fig 6 General structure of bacitracin



(1)

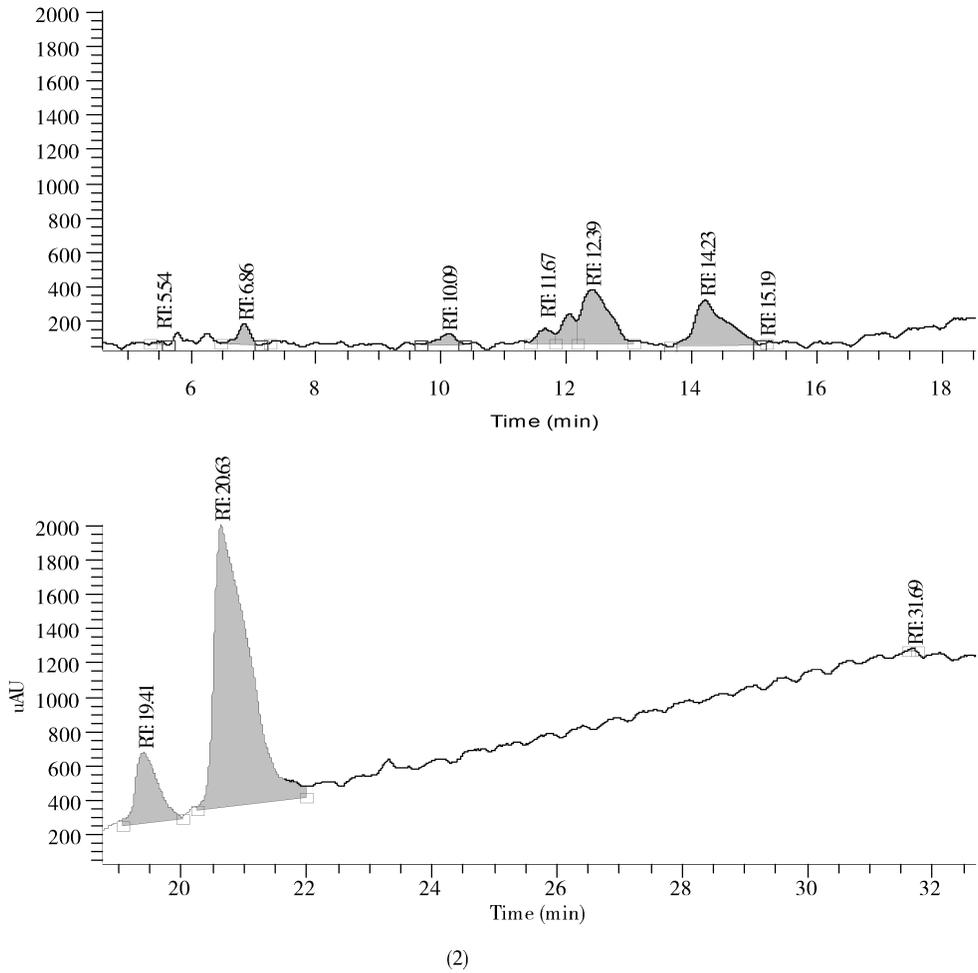


图 7 杆菌肽各组分分子离子色谱峰(1)和紫外色谱峰(2)

Fig 7 Bacitracin components extracted ion chromatogram(1) and UV spectrum(2)

表 3 杆菌肽各组分质谱归一化与紫外归一化测定结果

Tab 3 The results of normalization method by

DAD and mass spectrometry

杆菌肽组分	质谱峰面积	紫外峰面积	质谱归一化法/%	紫外归一化法/%
A	37524469722	63605	58.23	61.74
B1	7589916698	9635		
B2	6279851571	9556	30.91	28.80
B3	6050192083	10482		
A + B	57444430074	93278	89.14	90.54
C1	1227333686	1751		
C2	1156884108	1549	5.28	5.28
C3	1022080276	1013		
C	3400090586	5437		
E	192943507	/	0.30	0.21
F	486106	/	/	/
组分总和	64444248343	103028	/	/

3 讨论

3.1 流动相的选择 本方法比较了 50 mM 乙酸铵溶液 - 乙腈、含 0.1% 甲酸的水溶液 - 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液和含 0.1% 甲酸的水溶液 - 含 0.1% 甲酸的甲醇 - 乙腈 (75: 25) 溶液三种流动相体系, 发现在含有甲酸的流动相条件下, 杆菌肽及其相关物质的分离度更好, 杆菌肽 B 在乙腈 - 乙酸铵体系中分离率不高, 见图 8, 因此, 方法最终选用含 0.1% 甲酸的水溶液 - 含 0.1% 甲酸的甲醇 - 乙腈 (75: 25) 溶液的流动相体系。

3.2 多价态的选择 杆菌肽是一种多肽类抗生素, 多肽类药物在质谱中会带有多个电荷, 多价态加和离子峰的存在是多肽类物质在质谱中呈现的一大特征。杆菌肽各组分在质谱中除了有 $[M + H]^+$ 峰, 同时还有 $[M + 2H]^{2+}$ 和 $[M + 3H]^{3+}$ 的加和离子峰, 而且 $[M +$

$H]^+$ 峰的质谱响应往往是最底的。杆菌肽 A、B、C、E 组分在质谱中以 $[M + 3H]^3+$ 分子离子峰响应最强, 而杆菌肽 F 则以 $[M + 2H]^2+$ 分子离子峰响应最强。因为带多个电荷, 因此多价态加和离子峰的同位素峰也有一定的特征性。通常情况下, 目标化合物在质谱中带 1 个电荷, $[M + H]^+$ 就是质量数/电荷数即 m/z ,

杆菌肽会出现带 2 个电荷数, 因此会出现 $(m + 2)/2$ 即 $[M + 2H]^2+$ 的质荷比。同样, 带 3 个电荷的质荷比数 $[M + 3H]^3+$ 就是 $(m + 3)/3$ 。同位素峰的质荷比也是同样的计算方法, 因此, 带 2 个电荷的同位素峰之间的质荷比相差约 0.5 Da, 带 3 个电荷的同位素峰之间的质荷比相差约 0.33 Da。

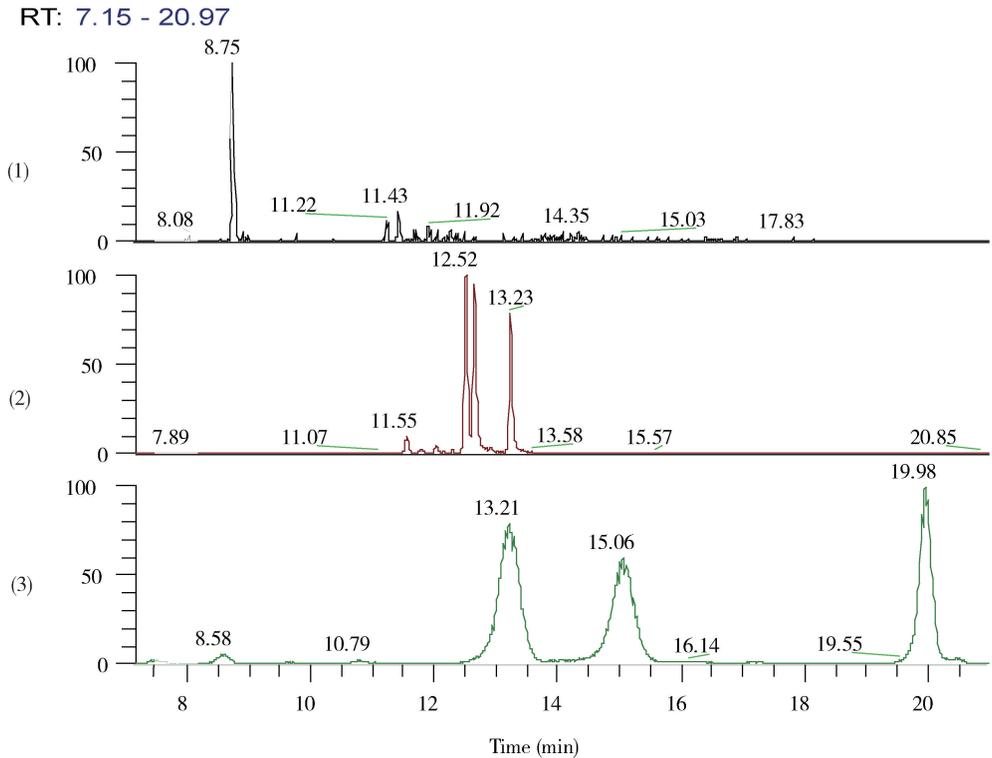


图 8 杆菌肽 B 在两种相体系中的分离效果 (1): 乙腈 - 乙酸铵流动相体系; (2): 乙腈 - 甲酸流动相体系; (3): 甲醇乙腈 - 甲酸流动相体系)

Fig 8 The separate effect of bacitracin B by two kinds of mobile phase (1): Acn - Ammonium acetate; (2): Acn - Formic acid; (3): MeOH - Acn - Formic acid)

3.3 杆菌肽 B 杆菌肽 C 的结构验证 杆菌肽组分 B 和 C 均存在同分异构体, 对于 B1、B2、B3 和 C1、C2、C3 的定位参考了张含智等^[2]的报道, 本方法结合碎片分析对各同分异构体可进一步定性确证。杆菌肽的结构通式见图 6, 不同的杆菌肽组分在 X 及 Y 位点的氨基酸有所不同。经质谱碎裂在 Y 位点的氨基酸肽键断裂产生氨基酸环的碎片, 根据氨基酸环 X 位点的不同, 氨基酸区分出含 L - Ile 的碎片 869.46821 和 852.43626 为 B1、B3 和 C2, X 位点上接 L - Val 的碎片 855.44716 和 838.42061 为 C1、C2 和 B2。

杆菌肽结构中从左至右第一、第二个氨基酸分别为 L - Leu 和 L - Glu, 这两个氨基酸之间的肽键断裂之后产生的碎片 1111.58947 和 1097.57382, L - Glu 与 Y 位点氨基酸之间的肽键断裂进一步产生碎片 982.54688 和 968.53123 均是带有 Y 位点的特征碎片, 可用于区分 B1 和 B2、B3。同理杆菌肽 C 在这两个肽键处断裂之后产生 1097.57382、1083.55817 和 968.53123、954.51558 的碎片, 可以区分出 C3 和 C1、C2。通过这些实际产生的特征碎片结合碎裂机理确证了 B 和 C 的同分异构体。各同分异构体的特征性碎片见表 4, 结构式见图 9、图 10、图 11。

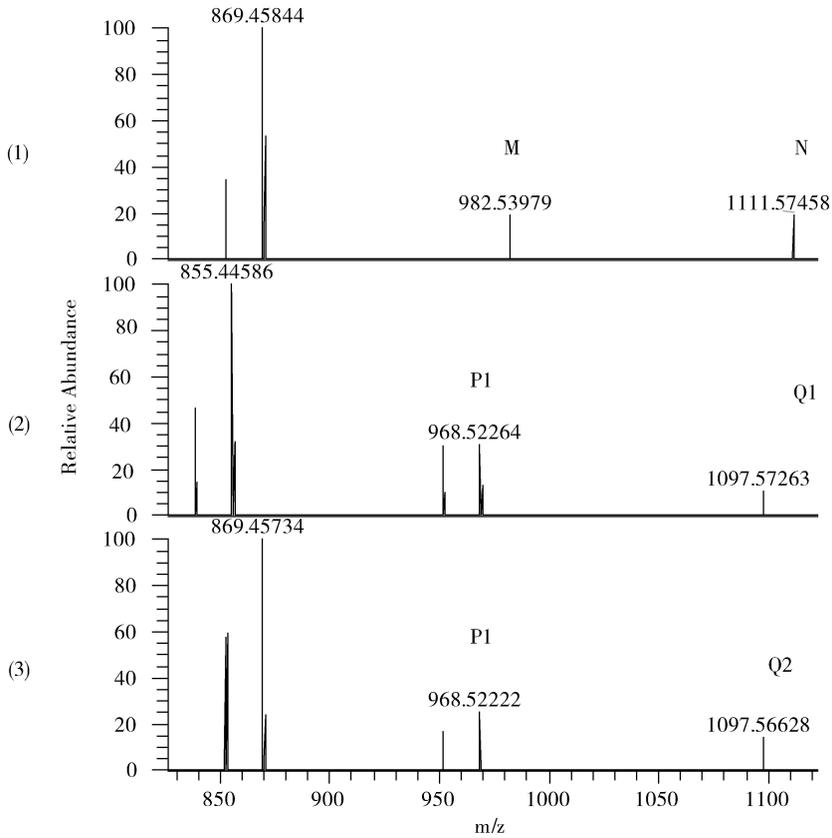


图 9 杆菌肽 B1、B2、B3 的特征碎片信息

(1) 杆菌肽 B1 特征碎片图; (2) 杆菌肽 B2 特征碎片图; (3) 杆菌肽 B3 特征碎片图;

Fig 9 The daughter ions of bacitracin B1、B2 and B3

(1) Bacitracin B1 Mass spectrum; (2) Bacitracin B2 Mass spectrum; (3) Bacitracin B3 Mass spectrum

表 4 杆菌肽 B 和 C 的同分异构体产生的特征性碎片

Tab 4 Daughter ions produced by isomers of bacitracin

B and C

Bacitracin components	Daughter ions									
	K	L	M	N	P1	P2	Q1	Q2	G	H
B1	√	-	√	√	-	-	-	-	-	-
B2	-	√	-	-	√	-	√	-	-	-
B3	√	-	-	-	-	√	-	√	-	-
C1	-	√	-	-	√	-	√	-	-	-
C2	√	-	-	-	-	√	-	√	-	-
C3	-	√	-	-	-	-	-	-	√	√

3.4 杆菌肽各组分在质谱中的响应 本方法采用二极管阵列检测器串联质谱检测器的形式对杆菌肽各组分在质谱中的响应与紫外响应作了对比,通过紫外归一化计算和质谱峰面积归一化计算发现,两

种计算结果偏差在 0.01% ~ 3.53% 之间,表明杆菌肽在二极管阵列检测器中的响应与在质谱检测器中的响应成正比,且在质谱中的检测灵敏度更好,杂质 E 和 F 在紫外中几乎无响应,但在质谱中的响应仍然明显。《欧洲药典》9.0 版^[9]、《英国药典》2017 年版^[10]及《美国药典》40 版^[11]中规定的主要成分为杆菌肽 A,有效活性成分为杆菌肽 A、B1、B2、B3,杆菌肽各组分在质谱中响应强度与活性程度成正比。

本研究表明,同时串联使用超高效液相色谱、二极管阵列检测器与高分辨质谱检测器对复杂组分原料药分析具有十分重要的意义,可同时提供光谱与质谱的定性定量数据,可在一定程度上减少传统原料组分分析工作中所必须的分离纯化工作,并能在已知化合物组分结构的前提下完成对各组

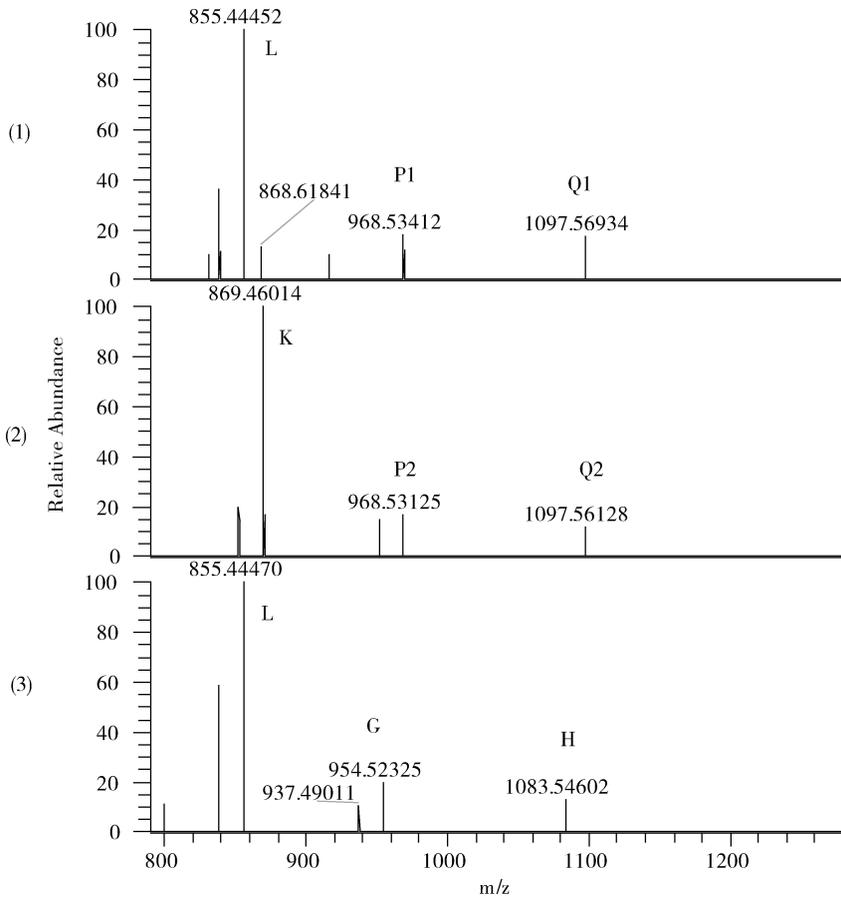
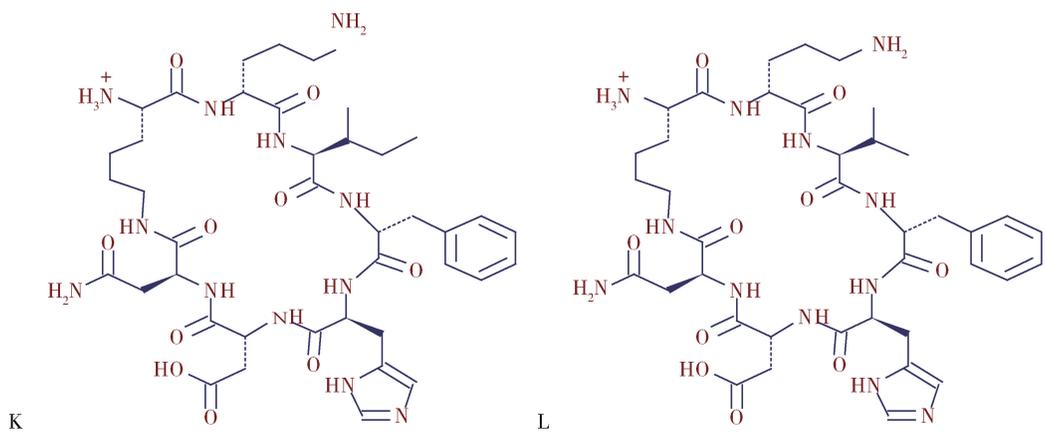


图 10 杆菌肽 C1、C2、C3 的特征碎片信息

(1) 杆菌肽 C1 特征碎片图; (2) 杆菌肽 C2 特征碎片图; (3) 杆菌肽 C3 特征碎片图;

Fig 10 The daughter ions of bacitracin C1、C2 and C3

(1) Bacitracin C1 Mass spectrum; (2) Bacitracin C2 Mass spectrum; (3) Bacitracin C3 Mass spectrum



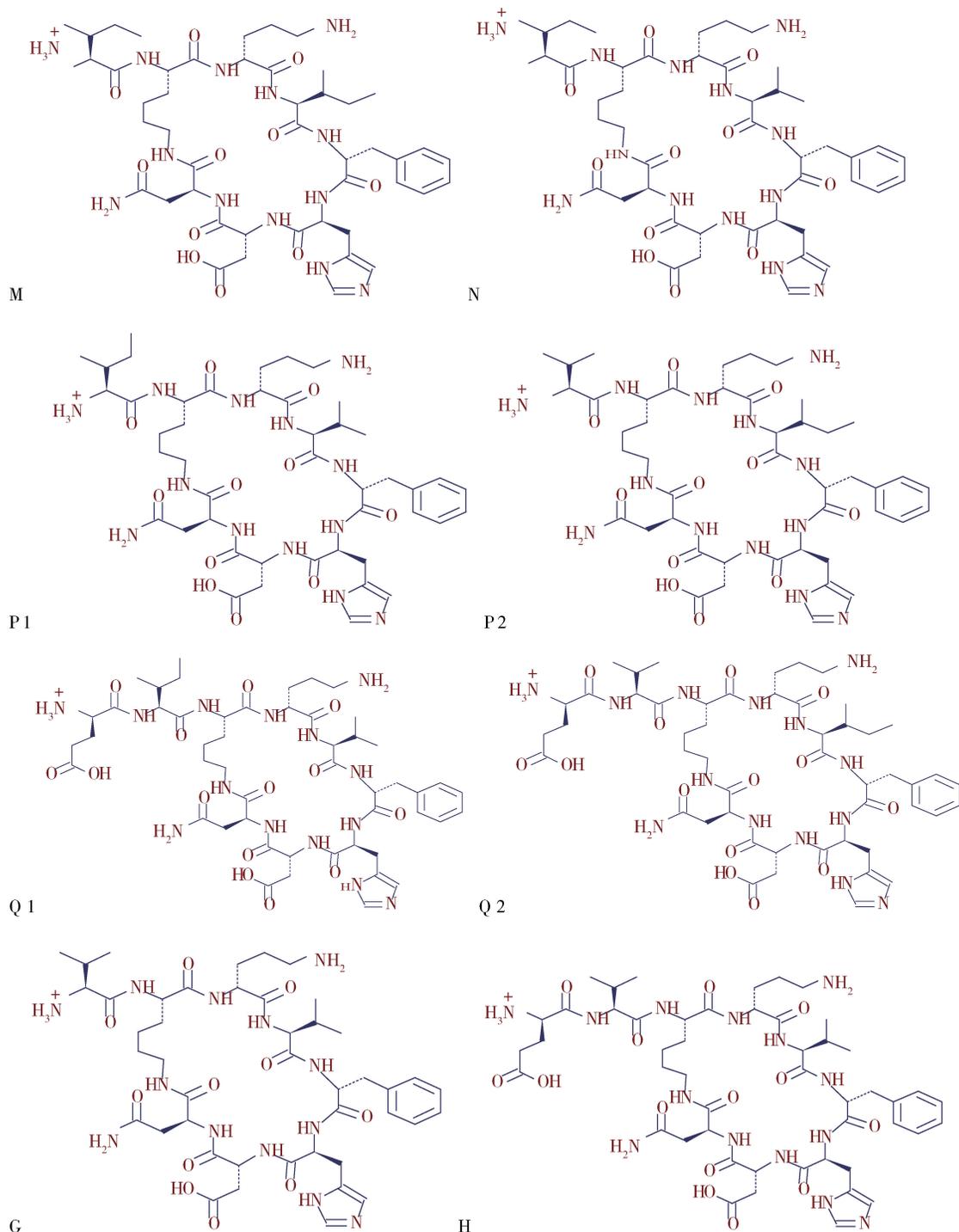


图 11 杆菌肽 B、C 碎片分子结构式 (K:869.46821;L:855.44716;M:982.54688;N:1111.58947;P1、P2:968.53123; Q1、Q2:1097.57382;G:954.51558;H:1083.55817)

Fig 11 Daughter ions structures of bacitracin B and C (K:869.46821;L:855.44716;M:982.54688;N:1111.58947; P1、P2:968.53123;Q1、Q2:1097.57382;G:954.51558;H:1083.55817)

分的归一化分析,而且从本研究结果看,质谱与紫外所测定定量结果基本保持一致,验证了该方法的合理性。

本方法建立了紫外串接四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析杆菌肽中的组分,检测灵敏度高,特异性强,检测到杆菌肽中包括主成分在内的 9 个组分。根据母离子精确质量和二级碎片推测可能的结构,并能确定组分中的同分异构体。利用超高效液相-二极管阵列-串联四级杆静电场轨道阱高分辨质谱检测和鉴定多组分药物的结构将会有更广泛的应用。

参考文献:

[1] 邓坤,冀志霞,陈守文. 溶氧对地衣芽孢杆菌 DW2 合成杆菌肽的影响[J]. 中国抗生素杂志,2009,34(11):664-668.
Deng K, Ji Z X, Chen S W. Effect of dissolved oxygen on bacitracin fermentation by *Bacillus licheniformis* DW2[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2009, 34(11): 664-668.

[2] 张含智,秦峰,刘浩. HPLC 结合组分制备分析杆菌肽中的有关物质及有效组分含量[J]. 中国药学杂志,2018,53(23):2041-2046.
Zhang H Z, Qin F, Liu H. Analysis of the Related Substances and Content of Effective Bacitracin by HPLC Combined with Component Preparation[J]. Chinese Pharmaceutical Journal 2018, 53(23):2041-2046.

[3] 仲伟潭,宋盼,彭亮,等. 高压液相色谱技术分离制备杆菌肽各组分的研究[J]. 安徽医药,2018,22(3):422-425.
Zhong W T, Song P, Peng L, et al. Preparation of bacitracin components by preparative HPLC[J]. Anhui Medica Pharmaceutical Journal, 2018, 22(3): 422-425

[4] 李阳,吴非,蔡冬波,等. 地衣芽孢杆菌 DW2 中敲除氨基酸转运蛋白基因 yhdG 提高杆菌肽产量[J]. 生物工程学报,2018,34(6):916-927.
Li Y, Wu F, Cai D B, et al. Enhanced production of bacitracin by knocking out of amino acid permease gene yhdG in *Bacillus licheniformis* DW2 Chinese Journal of Biotechnology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(6): 916-927.

[5] 康媛媛,孟珺,王艳阳,等. 抗菌肽功能特性与作用机制的研究进展[J]. 食品科技, 2021,46(1):265-270.
Kang Y Y, Meng J, Wang Y Y, et al. Research Progress on Functional Characteristics and Mechanism of Antimicrobial Peptides[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(1): 265-270

[6] 刘静,魏书林,蒋玲玉,等. 饲料中多肽类抗生素检测技术的研究进展[J]. 现代畜牧兽医,2019,2:52-57.
Liu J, Wei S L, Jiang L Y, et al. Research progress in detection technology of polypeptide antibiotics in feed[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 2: 52-57

[7] 王茉莉,宋更申,常俊山. HPLC 法同时测定杆菌肽原料药中主成分的含量及有关物质[J]. 中国药房, 2015,26(6):834-837.
Wang M L, Song G S, Chang J S. Simultaneous Determination of Main Components and Related Substance in Bacitracin by HPLC[J]. China Pharmacy, 2015, 26(6): 834-837.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2020 年版二部. 北京: 化学工业出版社.
State Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia (ChP) [M]. . 2020 edition Beijing: China Medical Science and Technology Press

[9] European Pharmacopoeia [S]. 9th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2017. .

[10] British Pharmacopoeia [S]. 2017, Stationery Office, London, 2017. .

[11] The United States Pharmacopoeia [S]. 40th ed US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 2017.

[12] 严凤,周哲,黄家莺,等. 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用解析泰地罗新注射液中的有关物质[J]. 中国抗生素杂志,2018,43(1):73-79.
Yan F, Zhou Z, Huang J Y et al. Analysis of the related substances in tildipirosin for injection by ultra high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2018, 43(1): 73-79

[13] 贺美莲,郭常川,石峰,等. 高分辨质谱技术在药物分析领域中的应用进展[J]. 药物分析杂志,2019,39(1):105-110.
He M L, Guo C C, Shi F, et al. Application progress of Orbitrap high resolution mass spectrometry in the field of pharmaceutical analysis[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(1): 105-110

[14] Yoshitomo I, H O, Junko H, et al. Total Structures and Antimicrobial Activity of Bacitracin Minor Components[J]. Journal of Antibiotics, 1995, 48(3): 233-242.

[15] 农业部兽药评审中心.《兽药质量标准汇编》[S].
Compilation of Veterinary Drug Quality Standards[S].