

Trap-Free 2DLC Q-TOF 定性分析宫缩抑制剂阿托西班中的多聚体杂质

LCMS-QTOF-053

摘要： 本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 对多肽药物阿托西班中的单体和多聚体杂质进行定性分析。测试结果使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对杂质的分子式进行预测，结果显示阿托西班单体、二聚体和三聚体的 MS^1 的离子质荷比同理论值均小于 1 mDa。使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测目标物的分子量，预测分子量和理论分子量的误差小于 3 ppm。

关键词： Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 阿托西班 多聚体杂质

技术特点：

- ❖ 利用 Trap-Free 2DLC Q-TOF 联用系统分析阿托西班中的多聚体杂质，可实现一维和二维不同流动相直接转换，也能避免液相色谱直接分析浓度过高而导致的质谱信号饱和的问题。
- ❖ LCMS-9030 在分析中拥有高分辨率和准确的质量数，为目标化合物的鉴定提供可靠信息。

阿托西班是一种合成的多肽类物质，其作用机制是与催产素竞争子宫肌层、蜕膜、胎膜上的催产素受体，拮抗催产素作用，从而达到抑制子宫收缩的作用可在受体水平对人催产素产生竞争性抑制作用。在临床中，常用于治疗孕期早产。

杂质研究是药物质量研究的一项重要内容，是药物质量保证的关键因素之一。为了提高临床用药安全，需对合成过程中产生的工艺杂质和储存过程中产生的降解杂质进行了详细的研究。由于托西班化学结构特性，其在生产和储存过程中可能产生杂质，而这些杂

质可能引起过敏反应、毒性及其他不良反应。

针对多肽药物中的由两个或多个多肽组成的稳定的多聚体杂质，可利用体积排阻色谱法 (SEC) 分离相关杂质。本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-free 2DLC+LCMS-9030，既能避免 SEC 的色谱条件于质谱离子源不匹配，也能有效解决液相色谱分析浓度过高而导致的质谱信号饱和的问题。本文成功对阿托西班多肽药物中的多聚杂质进行定性确证，为相关检测人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 Trap-free 2DLC+LCMS-9030 四极杆飞行质谱联用仪系统。具体配置为

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-20AD XR × 4	自动进样器：	SIL-20ACXR
柱温箱：	CTO-20AC	质谱仪：	LCMS-9030
检测器 A：	SPD-M20A	检测器 B：	SPD-20A
切换阀：	FCV-32AH ₂ × 2	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

一维液相色谱条件：

色谱柱：SHIMSEN Ankylo SEC-150 (300 mm × 7.8 mm I.D., 3.0 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-01215-04)

流动相：水：异丙醇：乙酸 (150/150/200, V/V/V)

流速：0.3 mL/min

柱温：30°C

进样量：10 μL

洗脱方式：等度洗脱

二维液相色谱条件：

色 谱 柱： Shim-Pack GISS C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30048-02)

流 动 相： A相 -0.5% 乙酸水 B相 - 乙腈

流 速： 0.3 mL/min

柱 温： 30°C

洗脱方式： 梯度洗脱，B相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
31.60	柱温箱	CTO.RVR	0*
31.70	柱温箱	CTO.RVR	1*
34.50	泵	B.Conc3	10
50.00	泵	B.Conc3	90
52.00	泵	B.Conc3	90
52.10	泵	B.Conc3	10
60.00	控制器	Stop	

注：* “0” 表示流路切换至捕集定量环，流路切换的时间根据一维液相色谱的保留时间变化；“1” 表示一维流路直接进入废液，

LCMS-9030 质谱条件：

离 子 源： ESI(+)

接 口 电 压： 4.5 kV

加热模块温度： 400°C

雾化气流速： 3.0 L/min

D L 温 度： 300°C

干燥气流速： 10.0 L/min

接 口 温 度： 300°C

加热气流速： 10.0 L/min

碰 撞 气： 氩气

扫 描 模 式： MS

1.3 样品前处理方法

准确称取多肽样品约 5 mg，加入一维流动相 1.6 mL 振荡溶解后，上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 Trap-Free 2DLC 系统介绍

Trap-Free 2DLC 系统是一套支持在线流动相转换的二维液相与色谱 - 质谱联用仪的组合系统，系统结构示意图见图 1。本系统的第一维液相色谱系统，可使用非挥发性流动相或者与质谱分析不匹配的流动相体系，通过系统中切换阀、程序命令的组合，对第一维液相色谱系统分离的组分进行分馏。本系统的第二维液相色谱系统，可以采用适合 LCMS 分析的液相色谱条件，针对分馏的组分，进行针对性的质量分析。

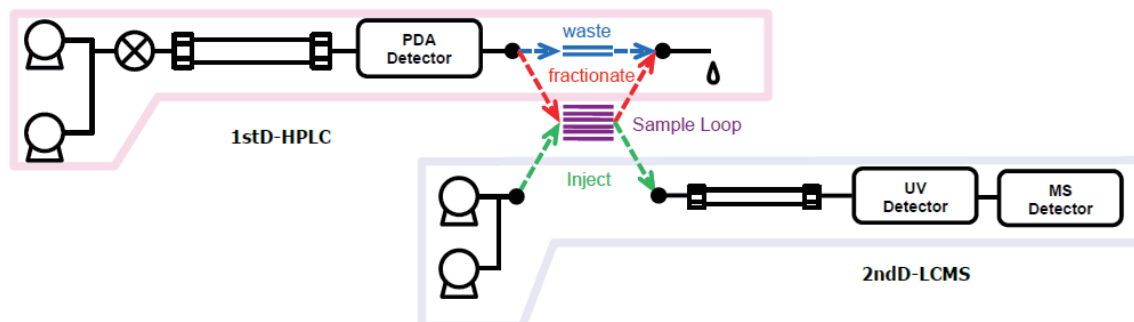


图 1 Trap-free 2DLC Q-TOF 系统的原理图

样品分析过程：

- 1) 第一维 HPLC，使用 PDA 检测器检测杂质，已杂质峰的保留时间为指标，将目标组分馏至样品环。
- 2) 样品环，在样品环 1-5 内保留馏后的组分。样品环 6 用于第一维与第二维的流动相置换。
- 3) 第二维 LCMS，利用第二维的色谱柱分离样品环内的组分后，使用 UV 检测器和 MS 检测器进行检测。

2.2 多肽样品一维 SEC 色谱图

首先样品通过一维液相色谱分析，确认各目标物的出峰时间。根据分子排阻色谱的原理，目标化合物依据分子的体积大小而分离，样品按照分子量由大到小的顺序出峰。在阿托西班牙样品的一维液相色谱图中可以看到单体及多聚体的色谱峰，其中单体（峰 3）的出峰时间最晚，出峰时间更早的峰 1、2 为不同分子量的杂质。



图 2 阿托西班牙样品一维液相色谱图

2.3 通过 MS¹ 质谱图定性多聚体杂质

由于一维 SEC 分析的流动相中含有 40% 乙酸，不能直接应用于质谱分析中。使用 Trap-free 2DLC 系统，可以针对性馏目标组分，然后用于质谱匹配的流动相条件进行分离分析，并于质谱联用进行质量分析。针对不同馏组分，需要根据分析目标峰的一维 SEC 分离的保留时间修改对应的时间程序。

2.3.1 阿托西班牙二聚体杂质

根据阿托西班牙二聚体在一维液相色谱中的保留时间，更新时间程序中的阀切换使时间。二维液相 UV 色谱图和 MS¹ 总离子流色谱图如图 3 所示，二聚体杂质的出峰时间约为 42.5 min。因为一维色谱的流动相中异丙醇和乙酸的比例较高，二维液相色谱峰出现了明显的前沿峰。阿托西班牙二聚体平均质谱图见图 4，可以分别观察到带双电荷和三电荷的分子离子峰。

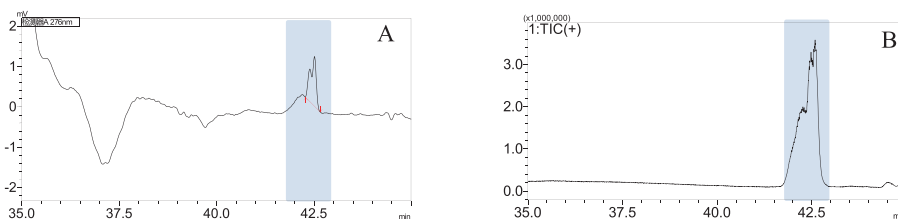


图 3 阿托西班牙二聚体二维液相 UV 色谱图 (A) 和 MS¹ 总离子流色谱图 (B)

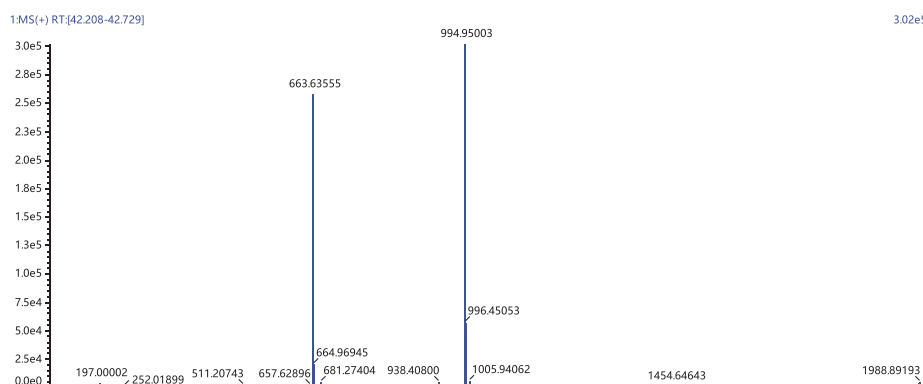


图 4 阿托西班牙二聚体的平均质谱图

使用 Insight Explore 软件中分子式预测功能对分子离子峰基于准确分子量和同位素丰度比进行预测，预测结果显示，阿托西班二聚体的 $[M+2H]^{2+}$ 的质荷比误差为 0.09 mDa， $[M+3H]^{3+}$ 的质荷比误差为 -0.19 mDa，相对偏差均小于 1 ppm。

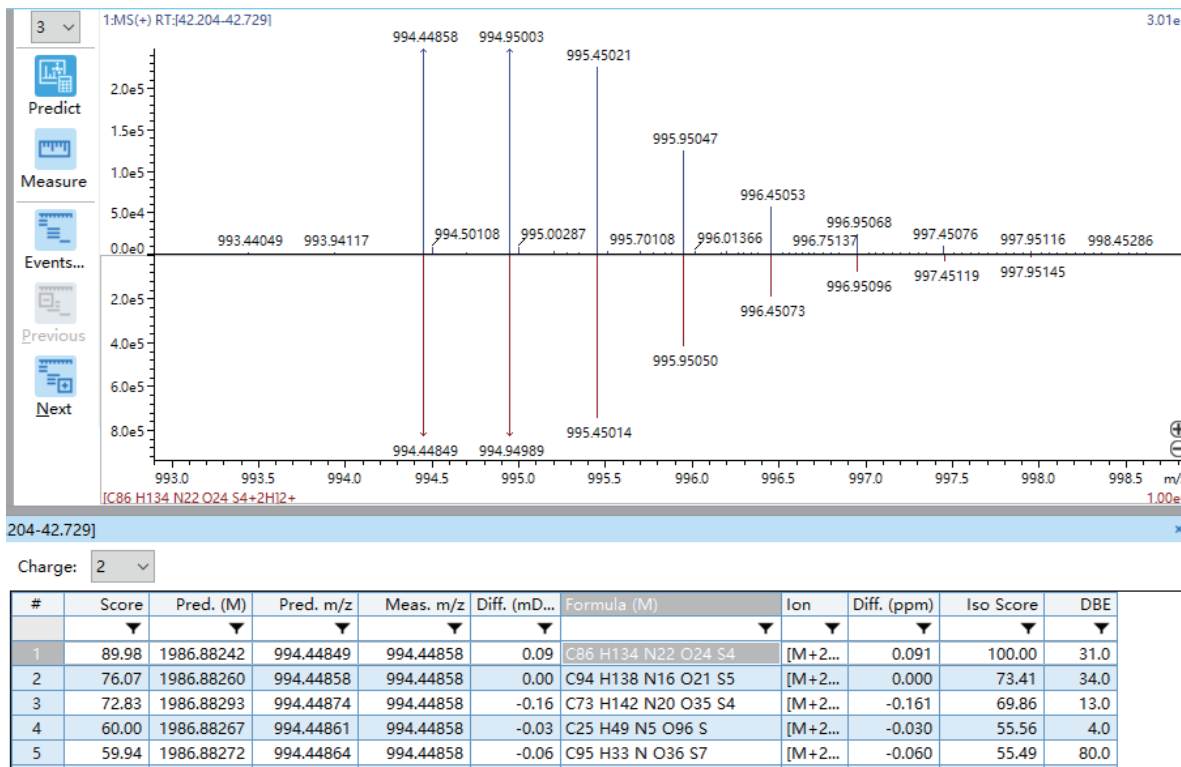


图 5 阿托西班二聚体的 $[M+2H]^{2+}$ 峰分子式预测结果

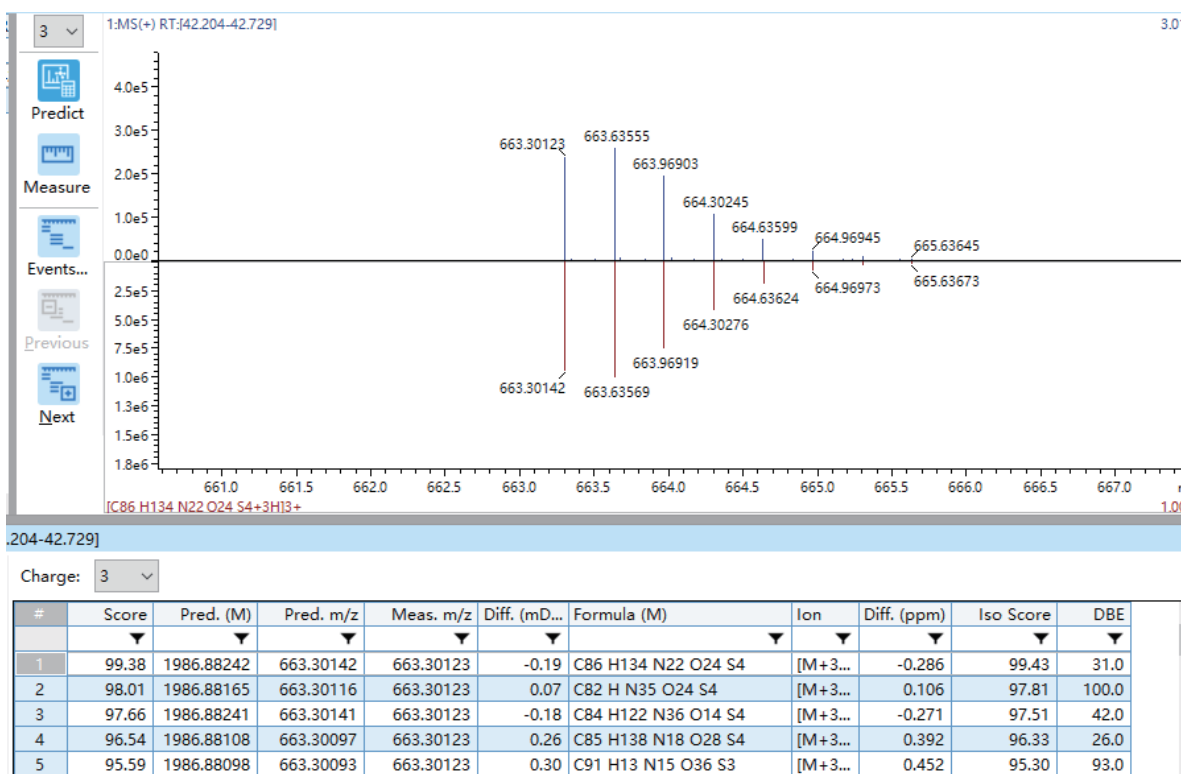


图 6 阿托西班二聚体的 $[M+3H]^{3+}$ 峰分子式预测结果

使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测阿托西班二聚体的分子量，如图 7 所示，预测结果显示，阿托西班二聚体的预测分子量为 1987.88611，误差为 -3.58 mDa，相对偏差为 -1.80 ppm。

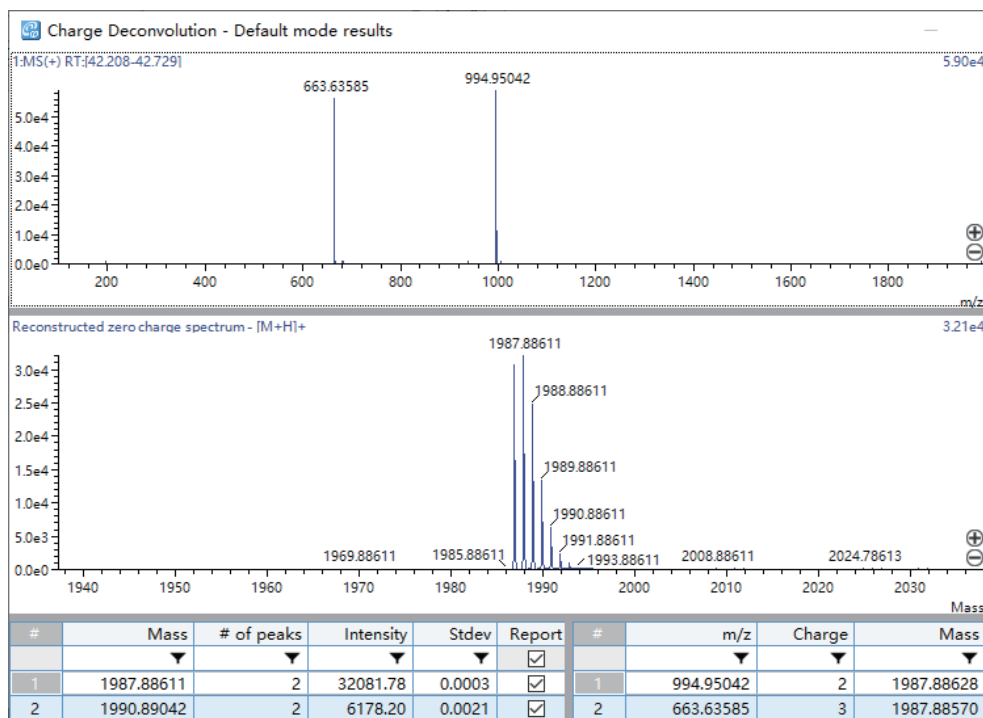


图 7 阿托西班二聚体解卷积分析结果

2.3.2 阿托西班三聚体

根据阿托西班二聚体在一维液相色谱中的保留时间，更新时间程序中的阀切换使时间。二维液相色谱和 MS¹ 总离子流色谱图如图 8 所示，三聚体杂质的保留时间约为 42.7 min。因为一维色谱的流动相中异丙醇和乙酸的比例较高，二维液相色谱峰出现了前沿峰。阿托西班三聚体杂质的平均质谱图见图 9，可以分别观察到带双电荷、三电荷的分子离子峰。

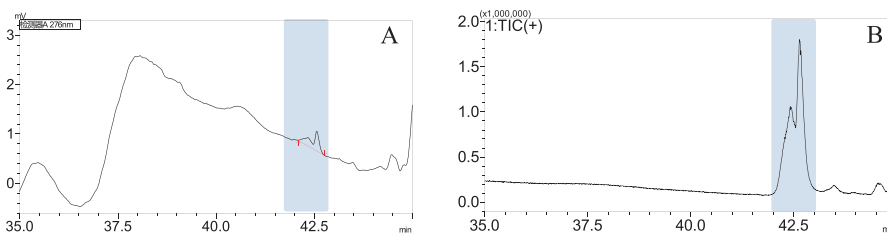


图 8 阿托西班三聚体二维液相色谱图 (A) 和 MS¹ 总离子流色谱图 (B)

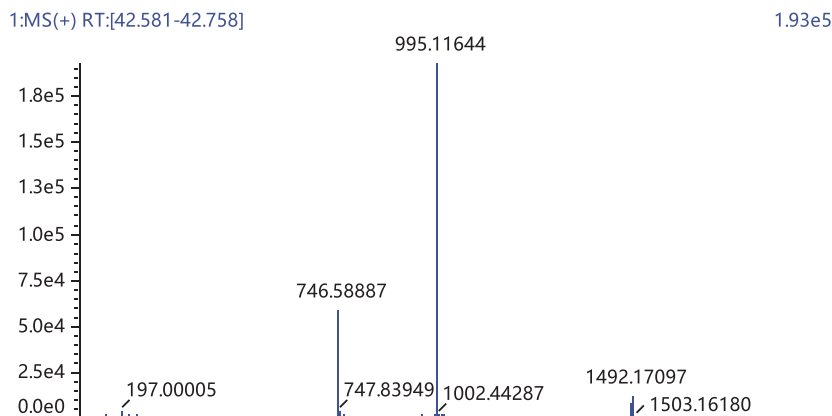


图 9 阿托西班三聚体的 MS¹ 质谱图

使用 Insight Explore 软件中分子式预测功能对分子离子峰基于准确分子量和同位素丰度比进行预测，预测结果显示，阿托西班三聚体的 $[M+2H]^{2+}$ 的质荷比误差为 -0.087 mDa， $[M+3H]^{3+}$ 的质荷比误差为 -0.151 mDa，相对偏差均小于 1 ppm。

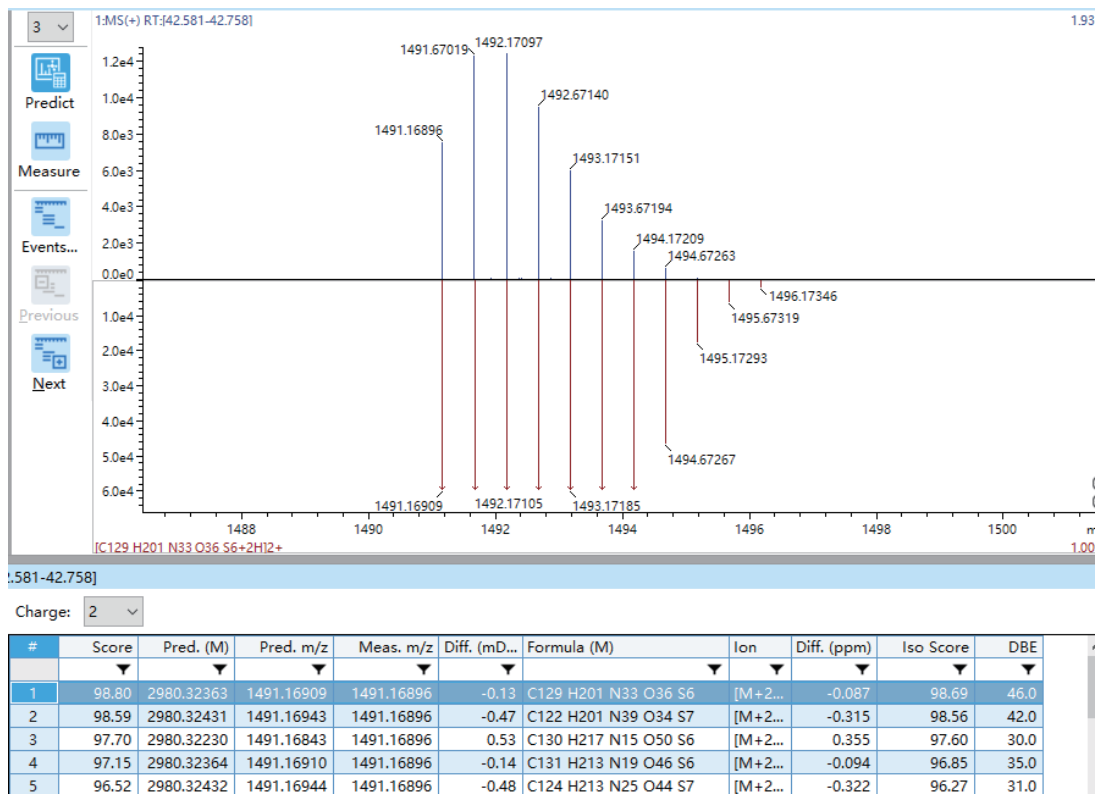


图 10 阿托西班三聚体的 $[M+2H]^{2+}$ 峰分子式预测结果

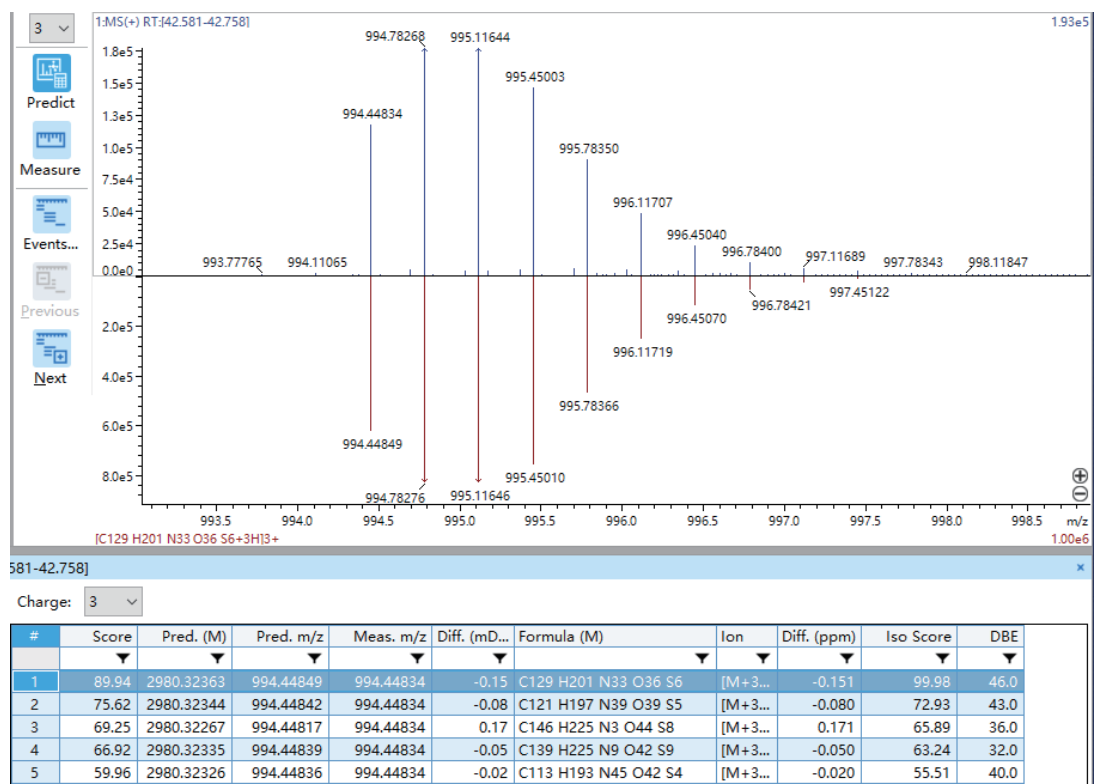


图 11 阿托西班三聚体的 $[M+3H]^{3+}$ 峰分子式预测结果

使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测阿托西班三聚体的分子量，如图 17 所示，预测结果显示，阿托西班三聚体的预测分子量为 2980.32690，误差为 3.27 mDa，相对偏差为 1.10 ppm。

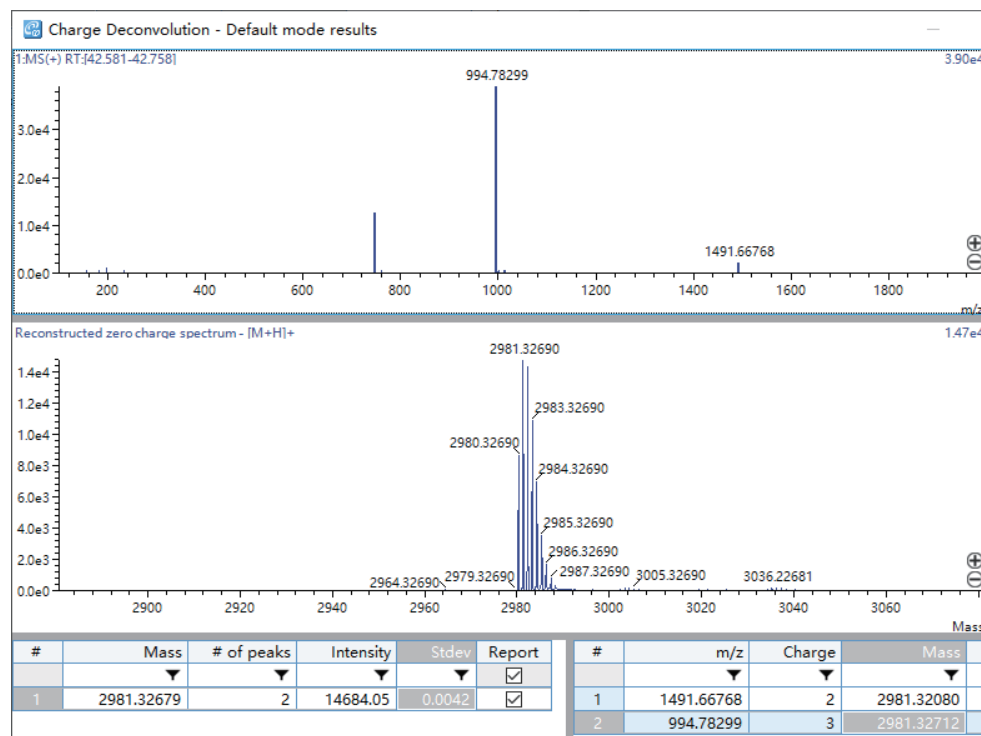


图 12 阿托西班三聚体解卷积分析结果

■ 结论

本实验采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 对多肽药物阿托西班中的多聚体杂质进行定性分析。测试结果使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对杂质的分子式进行预测，结果显示阿托西班二聚体和三聚体的 MS¹ 的离子质荷比同理论值均小于 1 mDa。使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测目标物的分子量，预测分子量和理论分子量的误差小于 3 ppm。

岛津应用云

