

# 利用 Q-TOF 定性分析多肽类药物生长抑素中的聚集体

## LCMS-QTOF-050

**摘要：** 本文使用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法，使用岛津 LabSolutions Insight Explore 软件对色谱峰进行解析，并对多电荷结果进行解卷积分析。实验结果显示，该方法可以分离多肽类药物生长抑素的主成分和聚集体，分离出的 4 个色谱峰分别为生长抑素的四聚体，三聚体，非共价二聚体和共价二聚体。

**关键词：** Q-TOF 多肽类药物 生长抑素 聚集体

生长抑素全称为生长激素释放抑制激素，由 Brazeau 等于 1973 年首次从绵羊的下丘脑中提取。天然生长抑素很难实现工业化大生产，现在生长抑素已经实现了人工合成，并且合成生长抑素与天然生长抑素的化学结构及药理作用方面完全相同。生长抑素由 14 个氨基酸残基组成，其中第 3 位及第 14 位的氨基酸由二硫键连接呈环状结构。

作为一种多肽类药物，生长抑素在纯化和放置的过程中，受到加热、冷冻、搅拌等外力作用时可能发生结构改变，产生聚集体。聚集体的存在可能

会降低药物活性，改变半衰期及增加免疫原性，影响药物的安全性和有效性。因此对药物中的聚集体进行监测和评价，是对药物进行质量评价的一个重要方面。

本文使用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法，使用岛津 LabSolutions Insight Explore 软件对色谱峰进行解析，并对多电荷结果进行解卷积分析。



生长抑素结构

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 - 四极杆飞行时间质谱仪，配置信息如下：

系统控制器：CBM-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40B XS

柱温箱：CTO-40S

脱气机：DGU-403

质谱：LCMS-9030

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：凝胶色谱柱 TSK-GEL G2000SWx1 (7.8x300 mm I.D., 5.0 μm)

流动相：三氟乙酸：乙腈：水 =0.2:30:70

进样体积：20 μL

柱温：40°C

流速：0.5 mL/min

洗针液：甲醇 / 水 =1:1 (v:v)

洗脱方式：等度洗脱

质谱条件

离子化模式：ESI(+)

加热模块温度：400°C

雾化气流速: 3.0 L/min

接口温度: 300 °C

DL 温度: 250 °C

碰撞气: 氦气

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: MS, m/z 1000-2500

接口电压: 3.5 kV

事件时间: 0.1 s

### 1.3 样品前处理

精密称取样品 10 mg, 加 1 mL 水溶解制成 10 mg/mL 溶液, 加水稀释成 0.5 mg/mL 的溶液。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 生长抑素色谱图解析

按照 1.2 分析条件分析 0.5 mg/mL 的样品溶液, 得到色谱图如图 1 所示。从图可知, 生长抑素的保留时间为 18.649 min, 对该色谱峰进行解析, 检测到 m/z 1637.72272、819.36403 和 546.57778 的准分子离子峰。其中 m/z 1637.72272 为  $[M+H]^+$  峰, m/z 819.36403 为  $[M+2H]^{2+}$  峰, m/z 546.57778 为  $[M+3H]^{3+}$  峰。

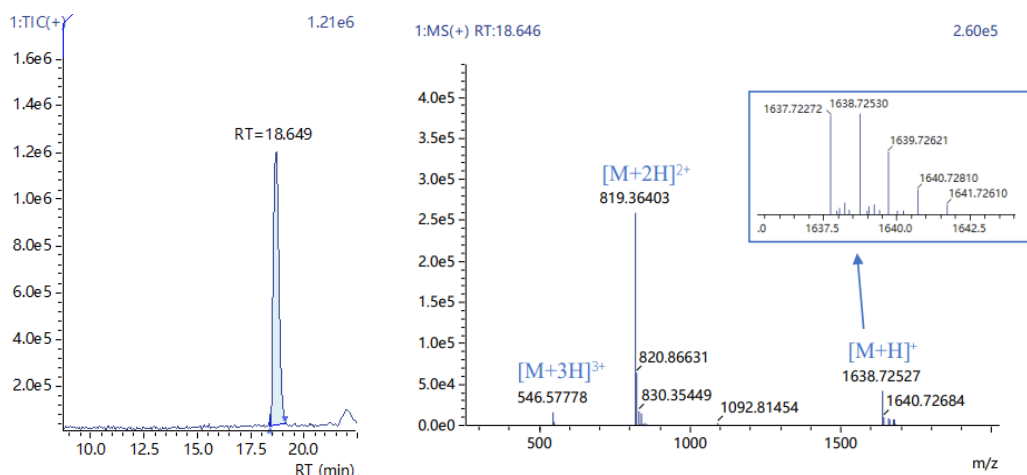


图 1 生长抑素的色谱图和质谱图

### 2.2 生长抑素中聚集体色谱图解析

为了能检测到生长抑素中的微量聚集体杂质, 在进行杂质分析时提高样品浓度到 10 mg/mL。在分析过程中为了避免高浓度样品进入质谱, 在软件中设置阀切换程序, 将 18 min 以后的高浓度组分切入废液。由图 2 可知, 共检测到 4 个色谱峰。通过 LabSolutions Insight Explore 软件对 14.5~17.5 min 四个色谱峰进行分析, 可知为生长抑素的四个聚集体杂质峰。

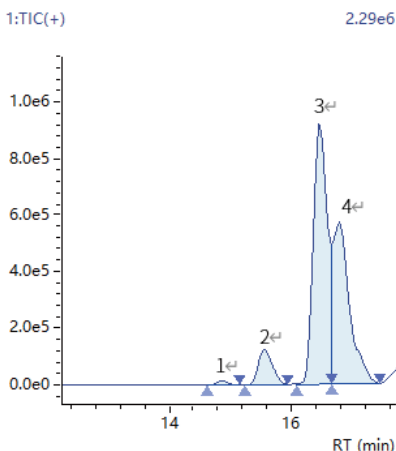


图 2 生长抑素的聚集体分离色谱图

### 2.2.1 四聚体色谱峰解析

对图 2 中 1# 峰的质谱图进行解析，检测到  $m/z$  1638.98576 的准分子离子峰，可以看到同位素峰间隔为 0.25 Da，该聚集体带 4 个电荷，分子量约为 6550.90，为生长抑素的四聚体。

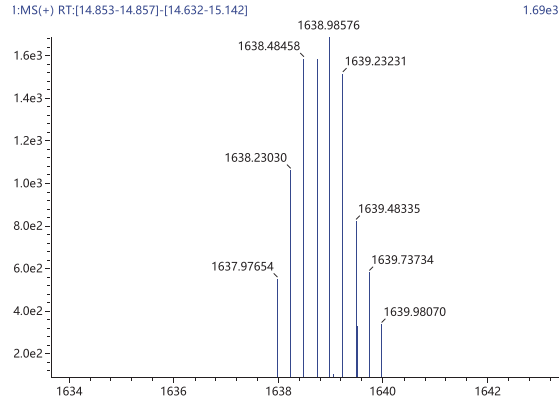
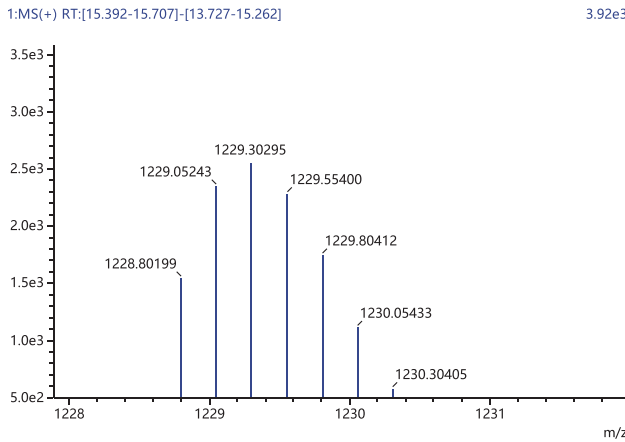


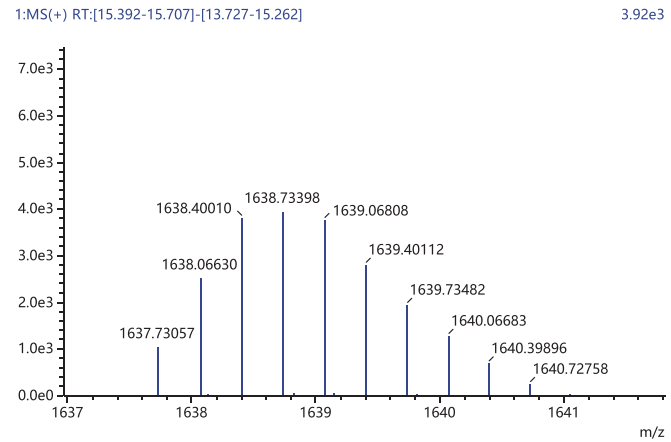
图 3 四聚体色谱峰的质谱图

### 2.2.2 三聚体色谱峰解析

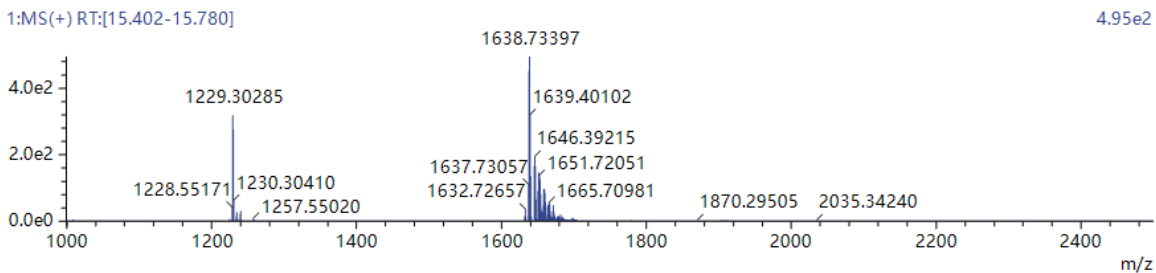
对图 2 中 2# 峰的质谱图进行解析，检测到  $m/z$  1229.30295 与 1638.73398 的准分子离子峰，其中  $m/z$  1229.30295 峰的同位素峰间隔为 0.25 Da，该聚集体带 4 个电荷。 $m/z$  1638.73398 峰的同位素峰间隔为 0.33 Da，该聚集体带 3 个电荷。通过 LabSolutions Insight Explore 软件对两个不同电荷数（3 个电荷和 4 个电荷）的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为 4913.17，为生长抑素的三聚体。



a.4 个电荷质谱图



b.3 个电荷质谱图

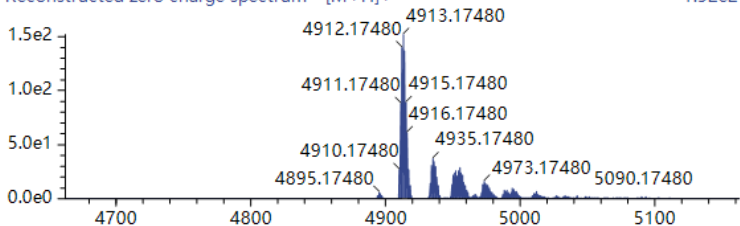


**Charge Deconvoluted components**

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	4913.17474	2	152.06	0.0073

Mass: 4913.17474

Reconstructed zero charge spectrum - [M+H]<sup>+</sup>



1.52e2

#	m/z	Charge	Mass	Weight
1	1638.73051	3	4913.16968	0.64
2	1229.30321	4	4913.18373	0.36

c. 解卷积结果图

图 4 三聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

### 2.2.3 非共价二聚体色谱峰解析

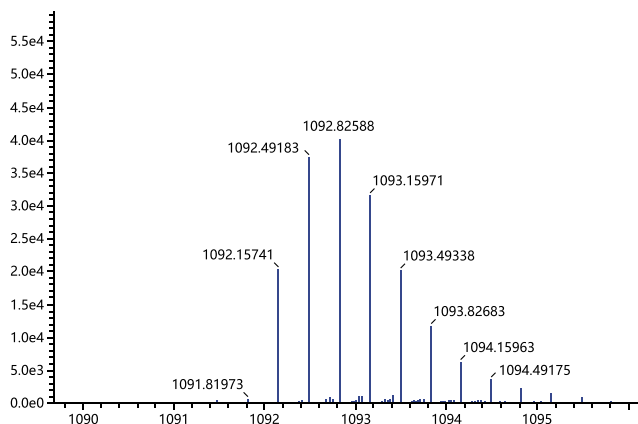
对图 2 中 3# 峰的质谱图进行解析, 检测到  $m/z$  1092.82588 与 1638.73517 的准分子离子峰, 其中  $m/z$  1092.82588 峰的同位素峰间隔为 0.33 Da, 该聚集体带 3 个电荷。 $m/z$  1638.73517 峰的同位素峰间隔为 0.50 Da, 该聚集体带 2 个电荷。通过 LabSolutions Insight Explore 软件对两个不同电荷数 (2 个电荷和 3 个电荷) 的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为 3275.45, 为非共价二聚体。

1:MS(+) RT:[16.355-16.557]-[15.872-16.287]

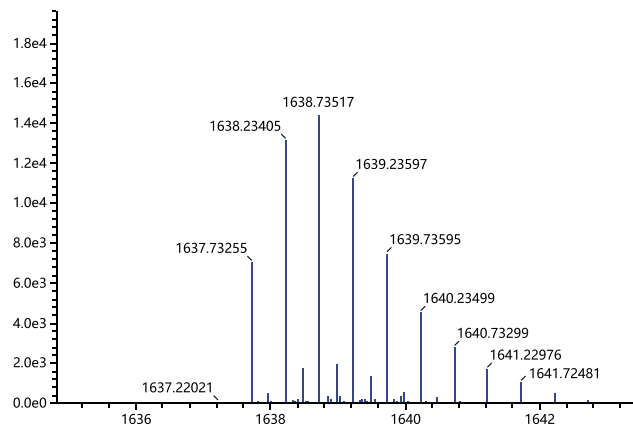
4.01e4

1:MS(+) RT:[16.287-16.572]

3.74e4



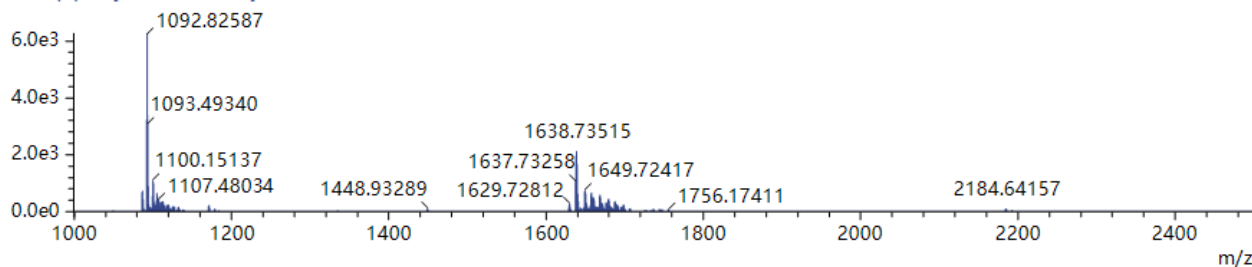
a. 3 个电荷质谱图



b. 2 个电荷质谱图

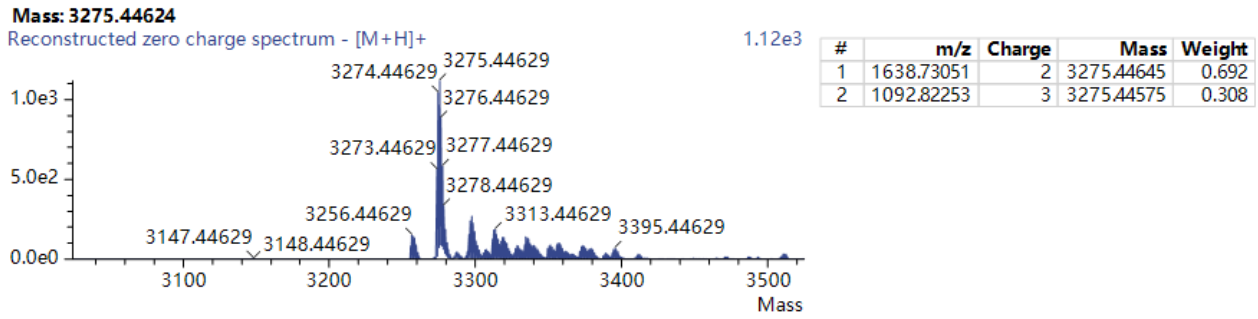
1:MS(+) RT:[16.347-16.575]

6.27e3



**Charge Deconvoluted components**

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	3275.44624	2	1118.69	0.0004



c. 解卷积结果图

图5 非共价二聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

### 2.2.4 共价二聚体色谱峰解析

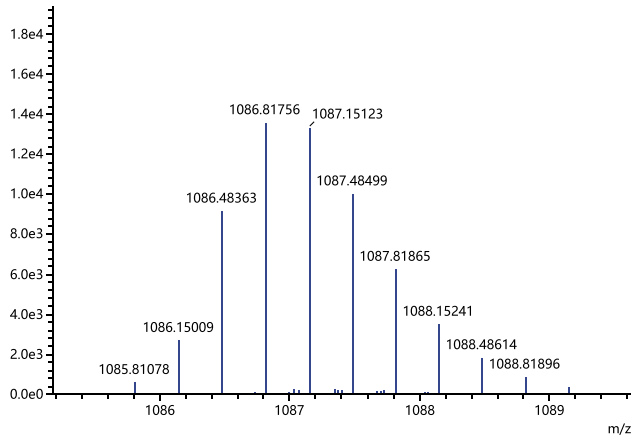
对图2中4#峰的质谱图进行解析,检测到 m/z 1086.81756 与 1629.72276 的准分子离子峰,其中 m/z 1086.81756 峰的同位素峰间隔为 0.33 Da,该聚集体带 3 个电荷, m/z 1629.72276 峰的同位素峰间隔为 0.50 Da,该聚集体带 2 个电荷。通过 LabSolutions Insight Explore 软件对两个不同电荷数(2 个电荷和 3 个电荷)的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为 3257.43,为共价二聚体。

1:MS(+) RT:[16.730-17.092]-[17.127-17.585]

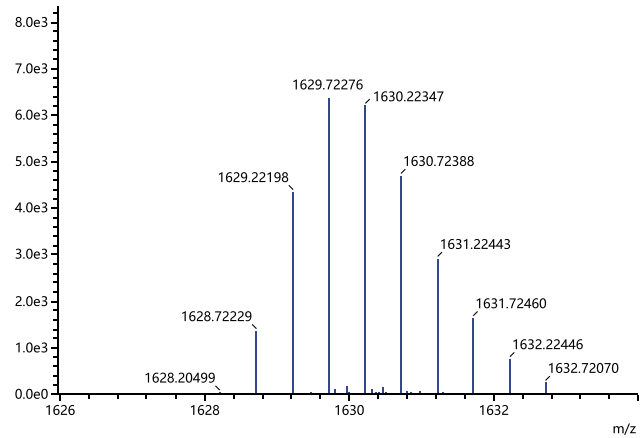
1.36e4

1:MS(+) RT:[16.730-17.092]-[17.127-17.585]

1.36e4



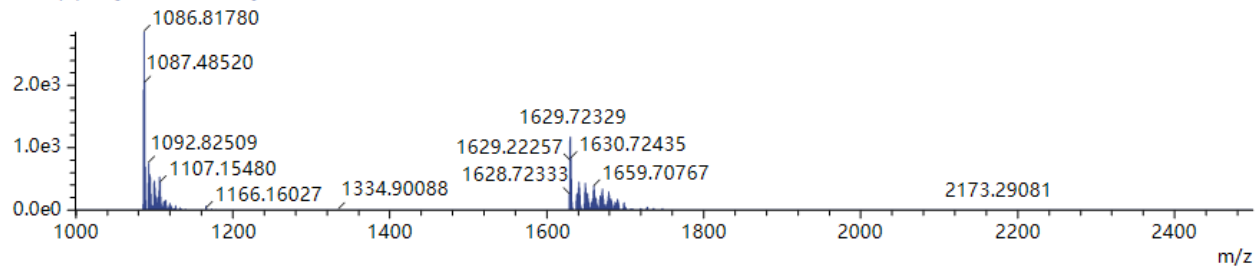
a.3 个电荷质谱图



b.2 个电荷质谱图

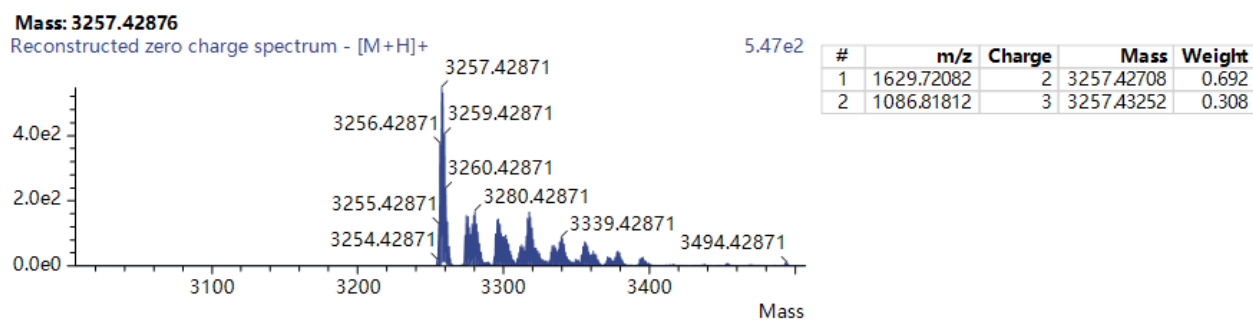
1:MS(+) RT:[16.692-16.952]

2.86e3



#### Charge Deconvoluted components

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	3257.42876	2	546.66	0.0029



c. 解卷积结果图

图 6 共价二聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

## 2.2.5 四个聚集体色谱峰解析汇总

表 1 梯度洗脱时间程序

峰号	m/z	同位素峰间隔 (Da)	电荷数	分子量	聚集体
1#	1638.98576	0.25	4	6550.90	四聚体
2#	1229.30295	0.25	4	4913.17	三聚体
	1638.73398	0.33	3		
3#	1092.82588	0.33	3	3275.45	非共价二聚体
	1638.73517	0.50	2		
4#	1086.81756	0.33	3	3257.43	共价二聚体
	1629.72276	0.50	2		

## ■ 结论

本文使用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法。实验结果显示，该方法可以分离多肽类药物生长抑素的主成分和聚集体，通过 LabSolutions Insight Explore 软件对色谱峰进行解析，并对多电荷结果进行解卷积分析可知，分离出的 4 个色谱峰分别为生长抑素的四聚体，三聚体，非共价二聚体和共价二聚体。该方法可为多肽类药物的聚集体分析提供参考。

岛津应用云

