

SCIEX多中心切割2D-LC-X500B 系统用于胰岛素前体中的杂质分析

The Application of Multiple Heart-Cutting 2D-LC in the Analysis of Drug Impurities in Proinsulin

刘一颖, 罗继, 郭立海

Liu Yiyang, Luo Ji, Guo Lihai

SCIEX中国, 应用支持中心

SCIEX China, Application Center

Keywords: 2D-LC-X500B, TOF MS, Multiple Heart-Cutting, Drug Impurities, Proinsulin

关键词: 2D-LC-X500B, 多中心切割, 药物杂质, 胰岛素前体

前言

胰岛素是美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的首个用于人类的基因重组药物。随着基因工程技术的不断发展, 以及市场对降糖药需求的不断增加, 生物制药公司开发出了各种基于不同表达系统的胰岛素类似物。这些胰岛素类似物均由 A、B 两条肽链通过二硫键连接而成。胰岛素前体则是由 B 链、C 肽和 A 链 3 部分组成的多肽。C 肽链的长度因表达系统种属的不同而存在差异, 主要起到分子间柔性连接的作用。当 C 肽被切除后, 即可转化成双链胰岛素。

由于胰岛素的生产来源于生物过程, 不同的表达系统和生产工艺都会产生各种各样的杂质。因此, 对胰岛素前体中杂质的定性和定量分析是有效控制胰岛素产品质量、提高药物安全性的关键环节。在2015版中国药典中, 胰岛素的杂质分离方法采用的是反相色谱法, 流动相中加入了0.2 M硫酸钠来实现更好的色谱峰形和分离度。但是, 高浓度的非挥发性盐大大降低了质谱的灵敏度并对质谱系统造成污染。在使用质谱对杂质进行定性分析时, 通常需要将非挥发性缓冲盐体系置换成挥发性的添加剂, 但是这一操作可能造成杂质的保留时间变化, 从而无法对杂质进行定位。

针对这个问题, 本文建立了 二维液相-质谱联用 (2D-LC-X500B) 的方法, 保证了在各个峰的保留行为不发生变化的情况下, 将原始条件下的质谱不兼容流动相置换为兼容流动相, 从而

实现用液质联用方法对未知杂质进行定性分析。本文在X500B 质谱系统上, 利用二维多中心切割技术来实现在不改变原始色谱条件的情况下, 对胰岛素前体中的6个杂质峰进行了分子量检测。

方法具有以下特点:

- 1、此方法可以在完全不改变原有分析方法选择性的情况下, 准确将样品中的杂质峰收集到定量环 (loop环) 或者捕集柱中。
- 2、此方法可以在第一维运行时, 一针进样收集多个杂质峰, 实现多中心切割, 更加高效。
- 3、X500B 高分辨质谱的动态范围宽, 对高丰度和低丰度的杂质分子量检测都有很好的灵敏度。

2D-LC多中心切割技术的基本原理与操作步骤

基本原理: 第一维液相使用原始液相色谱流动相 (如非挥发性流动相) 及方法对胰岛素前体和杂质进行分离。当目标杂质组分出峰时, 通过阀切换将目标杂质保存在Loop环或者捕集柱中。第一维液相一针进样可以收集多个目标杂质组分。随后, 第二维液相将收集的组分一一洗脱进行质谱检测。

实验包括三个步骤, 如图1所示。

第一步: L阀和R阀均处于0号位置, 第一维液相在分离分析, 第二维液相在平衡色谱柱, 而等度泵以恒定的流速稀释洗脱液中的有机相比例。

第二步: 切换L阀的位置至1号位开始收集馏分, 通过切换C阀和D阀的位置将第一维中的目标组分收集到不同的Loop环或者捕集

柱中。

第三步：切换L阀至0号位，R阀至1号位，第二维泵将收集在各个Loop环或者捕集柱中的目标组分送入第二维色谱柱中进行分离，并用X500B进行分析。

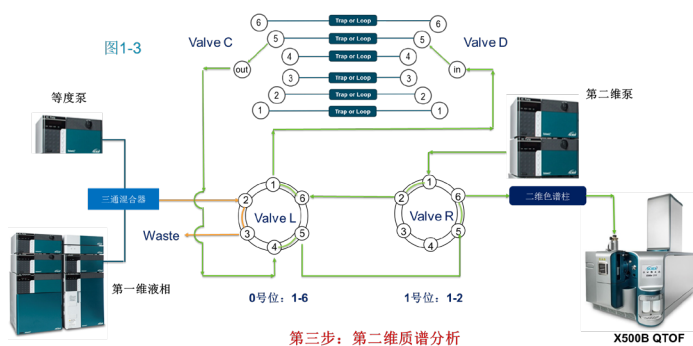
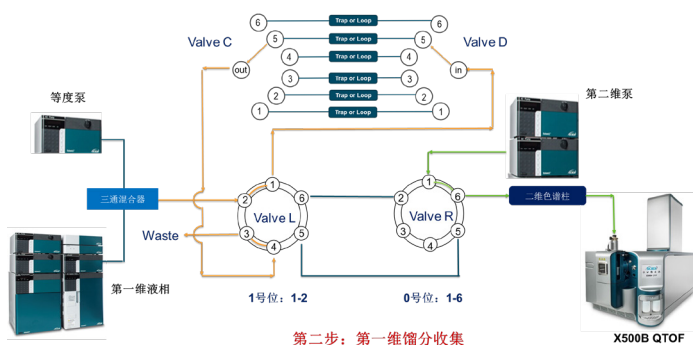
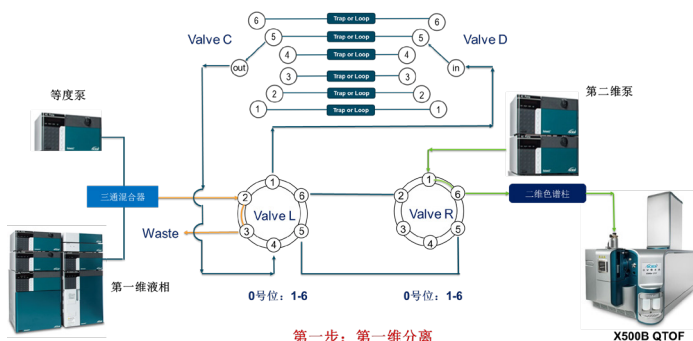


图1. 2D-LC 多中心切割流程图。图中第一维流路由橙色标出，第二维流路由绿色标出。L和R两个两位六通阀的0号位置均表示1-6连通，1号位置均表示1-2连通，六根Loop环分别接在C阀和D阀相对应的孔位上。

实验条件

液相方法

一维液相色谱条件：

流动相：A：0.2 M 硫酸钠 水溶液(使用0.2 M 磷酸水溶液调节 pH至2.3);乙腈 = 9:1

B：乙腈

洗脱梯度：	Time	B/%
	0	15
	0.5	15
	20	24
	26	45
	26.5	80
	30	80
	30.5	15
	45	15

流速：1 mL/min

柱温：40 °C

色谱柱：C4色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 300 Å)

等度泵流动相：水；

流速：0.5 mL/min

二维液相色谱条件：

流动相：A：水，0.1%甲酸

B：乙腈，0.1%甲酸

洗脱梯度：	Time	B/%
	0	5
	0.5	5
	5	50
	5.5	80
	7	80
	7.1	5
	10	5

流速: 0.4 mL/min
 柱温: 40 °C
 色谱柱: C18色谱柱 (100 mm × 2.1mm, 1.6 μm, 300 Å)

质谱方法:

离子源: ESI 源, 正离子模式;
 TOF MS采集模式
 离子源参数:
 电喷雾电压: 5500 V 气帘气 CUR: 30 psi
 雾化气 GS1: 55 psi 辅助加热气 GS2: 55 psi
 离子源温度 TEM: 550 °C 碰撞气 CAD: 7 psi

实验结果

1. 一维液相分析结果

一维液相的分析的主要目的是确定目标杂质的保留时间, 以便将其准确收集到Loop环中, 结果见图 2所示。图中标出了胰岛素前体样本中主峰的位置, 以及6个目标杂质峰的位置。表1中列出了每个馏分的收集时间, 以及收集Loop环的位置。例如, 第一个杂质的保留时间为11.53 min, 馏分收集时间为11.48 min至11.58 min, 此时馏分的保存位置为1号Loop环, 即C阀和D阀的位置均切至1号位置。

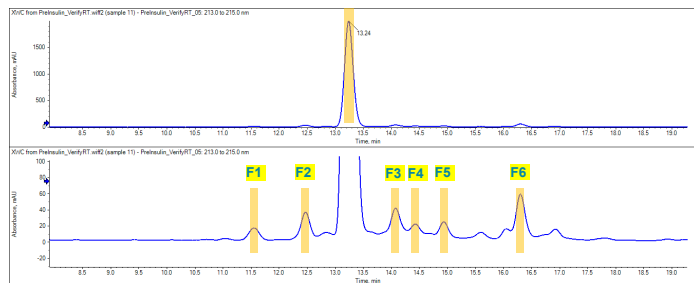


图2. 一维液相的紫外检测图谱。

表1. 馏分收集时间与位置。

馏分编号	收集时间	C/D阀位置
Fraction 1	11.48 min - 11.58 min	1
Fraction 2	12.40 min - 12.50 min	2
Fraction 3	14.02 min - 14.12 min	3
Fraction 4	14.36 min - 14.46 min	4
Fraction 5	14.86 min - 14.96 min	5
Fraction 6	16.25 min - 16.35 min	6

2. 二维液相分析结果

根据一维液相的UV色谱结果, 确定了目标杂质的保留时间, 通过在液相方法中设置阀的切换时间, 将6个杂质依次切入到第二维色谱柱中, 二维液相中的挥发性流动相依次将目标杂质冲入质谱中进行分析, 结果如图 3所示。从TOF MS谱图上可以看出, SCIEX X500B 系统对高丰度和低丰度的杂质分子量检测都有很好的峰形和灵敏度。通过Bio Tool kit TM软件解卷积后得到, 各个杂质中的分子量检测结果分别为5712.0 Da (馏分1)、5811.2 Da (馏分2)、6057.7 Da (馏分3)、6120.5 Da (馏分4)、6071.6 Da (馏分5)和6105.6 Da (馏分6)。

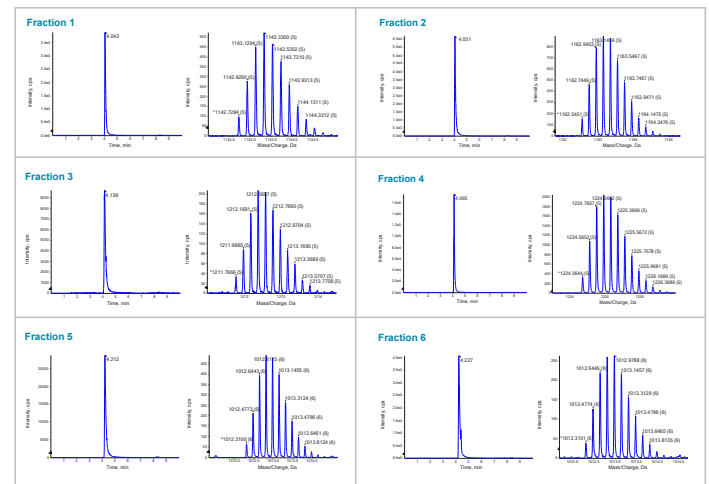


图3. 6个杂质馏分的提取离子谱图 (XIC图) 和一级质谱图 (TOF MS图)。

已知胰岛素前体的序列为FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKAAKGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN, 平均分子量为5958.8。根据分子量的差值, 大致可以判断各个杂质的序列如表2所示, 但这一结果还需要采集二级谱图数据来进行验证。

表2. 各个馏分中杂质的结构预测。

馏分编号	平均分子量 (Da)	结构预测
Fraction 1	5712	N端FV缺失
Fraction 2	5811.2	N端V缺失
Fraction 3	6057.7	序列中多一个V
Fraction 4	6120.5	糖化 (+[Hex])
Fraction 5	6071.6	序列中多一个I或L
Fraction 6	6105.6	序列中多一个F

总结

本文通过胰岛素前体杂质分子量检测这一实例，介绍了SCIEX基于阀切换的2D-LC多中心切割技术与SCIEX X500B联用的方法。该方法可有效解决非挥发盐流动相与质谱检测器的兼容性问题。不但可以节省工作人员在杂质检测和分析中重新方法开发液相方法的时间，还可以将更多液相分离模式与质谱检测器联用。比如，本方法可以将离子交换色谱法与质谱联用，在进行多肽或蛋白类药物电荷异质性分析的同时检测酸碱变异体的分子量，从而获得更多的药物相关信息。除此之外，通过实验数据可以看出，SCIEX X500B质谱系统可以为广大生物制药的分析工作者提供非常高质量的数据。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11929-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)