

# 使用 2D-LC 作为 MSD 分析的自动脱盐工具

由 MS 不兼容的 USP 方法直接进行药物多肽的质量选择检测

## 应用简报

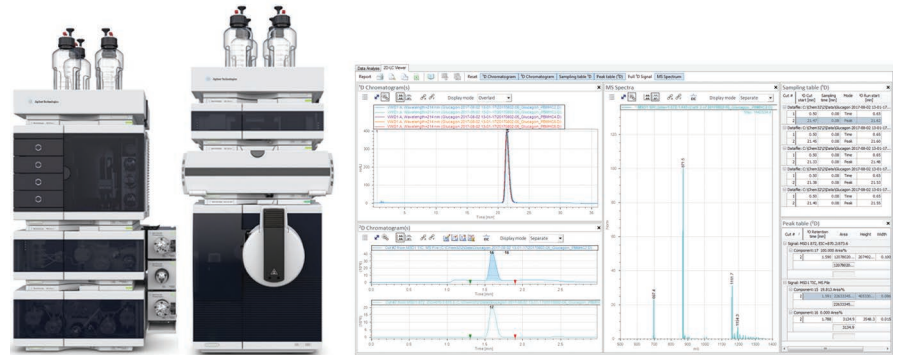
生物制剂与生物仿制药

### 作者

Sonja Krieger  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

治疗性多肽和蛋白质的表征及杂质分析需要联合使用色谱分离和质量选择检测。然而，多肽和蛋白质的色谱分离方法通常使用 MS 不兼容的流动相。本应用简报采用多中心切割 (MHC) 二维液相色谱 (2D-LC) 作为质量选择检测的自动脱盐工具。在第一维中，使用 MS 不兼容的流动相根据 USP 39 分析多肽胰高血糖素。然后在第二维中进行自动脱盐和质量选择检测。



Agilent Technologies

## 前言

在药物研究和开发中，治疗性多肽和蛋白质受到了越来越多的关注。这些大分子的复杂结构和杂质谱为其表征和杂质分析带来了难题。要解决这些难题，需要联用色谱分离和质量选择检测 (MSD) 来分析上述分子<sup>1</sup>。多肽和蛋白质的色谱分离方法通常使用 MS 不兼容的流动相，例如含有高浓度盐或非挥发性缓冲液的流动相<sup>1,2</sup>。为了使这些色谱方法能够使用 MS 检测，通常需要将方法转换为 MS 兼容的流动相或收集馏分脱盐后进行离线 MS 分析<sup>1</sup>。

在二维液相色谱 (2D-LC) 中，第二维可作为有效的脱盐工具，从而实现使用 MS 不兼容流动相的色谱方法与 MS 检测的在线联用<sup>1</sup>。配置二维液相色谱软件 A.01.04 的 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案为使用安捷伦单四极杆质谱仪的 MSD 联用 2D-LC 提供了从方法设置到数据分析的完全集成的解决方案。分流阀可在每次第二维 (<sup>2</sup>D) 运行开始时自动将第一维 (<sup>1</sup>D) 流动相中的盐或缓冲液分流至废液。Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱可用于在第二维中进行快速有效脱盐，如之前的应用简报所述<sup>3</sup>。除了脱盐之外，当使用的标准长度色谱柱和条件可提供与第一维分离不同的选择性时，还可在第二维中实现进一步分离<sup>2</sup>。

胰高血糖素是一种含有 29 种氨基酸的多肽类激素，用于低血糖的紧急治疗<sup>4</sup>。根据 USP 39，在流动相中使用磷酸钾缓冲液，通过 LC 结合 UV 检测进行胰高血糖素的有机杂质分析<sup>5</sup>。而

这与 MS 检测不兼容。本应用简报采用多中心切割 (MHC) 2D-LC，在第一维中根据 USP 39 进行胰高血糖素分析，在第二维中进行自动脱盐和 MSD 检测。

## 实验部分

### 设备

Agilent InfinityLab 2D-LC 解决方案包括以下模块：

- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备冷却装置 (选件 #100)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备标准流通池 (部件号 G1314-60186)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 2 位/4 通双向阀头 (二维液相色谱阀 1300 bar：部件号 5067-4244)
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40  $\mu$ L 定量环的多中心切割阀 (部件号 G4242-64000)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 2 位/6 通阀 800 bar (部件号 5067-4282)

质量选择检测采用配备安捷伦喷射流电喷雾离子源 (部件号 G1958-65538) 的 Agilent 6150 单四极杆液质联用仪 (G6150BA) 进行。

## 软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，版本 C.01.07 SR3 [465] 以及二维液相色谱软件，版本 A.01.04。

## 色谱柱

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu$ m (部件号 959963-302)
- Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱, 2.1  $\times$  12.5 mm (部件号 PL1612-1102)，带小柱柱套 (部件号 820999 901)

## 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。乙腈购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22  $\mu$ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钾、甲酸和胰高血糖素 (合成粉末，经过细胞培养测试) 购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。盐酸和磷酸分别购自 Merck (Darmstadt, Germany) 和 J.T.Baker (Deventer, Netherlands)。

## 样品

将胰高血糖素复溶于 0.01 mol/L HCl 中配制成浓度约为 0.5 mg/mL 的胰高血糖素标准溶液。按照 USP 39 说明<sup>5</sup> 配制胰高血糖素系统适用性溶液，将约 0.5 mg/mL 胰高血糖素的 0.01 mol/L HCl 溶液在 50  $^{\circ}$ C 下保存 48 小时。

## 方法

第一维	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm
溶剂	A) 16.3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 溶于 800 mL 水, 调整 pH 至 2.7/200 mL 乙腈 B) 水/乙腈 (60/40)
梯度	0 分钟 – 33.80% B 30 分钟 – 33.80% B 34 分钟 – 88.00% B 35 分钟 – 88.00% B 36 分钟 – 33.80% B
停止时间	36 分钟
后运行时间	40 分钟
在 <sup>2</sup> D 泵中设置停止时间和后运行时间, 软件会自动将停止时间延长至所有切割均完成 <sup>2</sup> D 分析。	
流速	0.500 mL/min
温度	45 °C
检测	VWD, 214 nm, 信号峰宽: > 0.025 min (20 Hz) 为保护流通池不受阀切换产生的压力脉冲的影响, 在 VWD 和二维液相色谱谱阀之间安装压力释放工具包 (G4236-60010)。
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水/乙腈 (70/30) 清洗 3 s

第二维	
使用 0.075 × 340 mm 限流毛细管 (部件号 5067-4783) 将 <sup>2</sup> D 泵连接至二维液相色谱谱阀以提供足够的反压。	
色谱柱	Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱, 2.1 × 12.5 mm
溶剂	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
梯度	0.00 分钟 – 5% B 1.00 分钟 – 5% B 1.50 分钟 – 80% B 二维梯度停止时间: 2.00 分钟 二维分析周期: 3.00 分钟
流速	0.400 mL/min
温度	未控制
检测	质量选择检测 (MSD) 安装了一个 2 位/6 通阀作为分流阀, 用于将液流引导至 MSD 或废液。

MSD		
MSD 信号	极性	正
	模式	扫描
	质量范围	600–1350 m/z
	碎裂电压	100 V
	增益	1.00
	阈值	150
	步长	0.10
	峰宽	0.10 min
	数据存储	全存储
	停止时间	无限制
将停止时间设置为无限制, 以使运行时间延长至所有切割均完成 <sup>2</sup> D 分析。		
雾化室	干燥气流速	10.0 L/min
	雾化器压力	35 psig
	干燥气温度	200 °C
	鞘气温度	300 °C
	鞘气流速	10.0 L/min
	毛细管电压	2500 V
	喷嘴电压	300 V

基于峰的多中心切割二维液相色谱	
二维液相色谱模式	中心切割
采样表	基于时间 0.50 min, 采样时间 0.08 min 基于峰 19.00 min, 采样时间 0.65 min 基于峰 22.50 min, 采样时间 0.40 min
峰检测	峰检测模式: 阈值 阈值: 5 mAU
分流阀	1.00 min 后切换至 MSD

基于时间的多中心切割二维液相色谱	
二维液相色谱模式	中心切割
采样表	使用胰高血糖素系统适用性溶液的 <sup>1</sup> D 色谱图作为参比色谱图, 设置采样表如下: 基于时间 0.50 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 1.55 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 3.70 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 7.23 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 11.07 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 17.70 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 21.38 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 23.81 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 24.91 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 29.45 min, 采样时间 0.08 min 基于时间 30.25 min, 采样时间 0.08 min
分流阀	1.00 min 后切换至 MSD

## 结果与讨论

根据 USP 39，在流动相中使用磷酸钾缓冲液，通过 LC 结合 UV 检测进行胰高血糖素的有机杂质分析<sup>5</sup>。而这与 MS 检测不兼容。多中心切割二维

液相色谱使用第二维作为有效脱盐工具，从而可将此液相色谱方法与质谱检测在线联用。配置二维液相色谱软件 A.01.04 的 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案为使用安捷伦单四极杆质谱仪的 MSD 联用 2D-LC 提供

了完全集成的解决方案。为了便于在 MS 检测前进行脱盐，在每次第二维 (<sup>2</sup>D) 运行开始时使用分流阀自动将第一维 (<sup>1</sup>D) 流动相中的盐或缓冲液分流至废液，如图 1 所示。

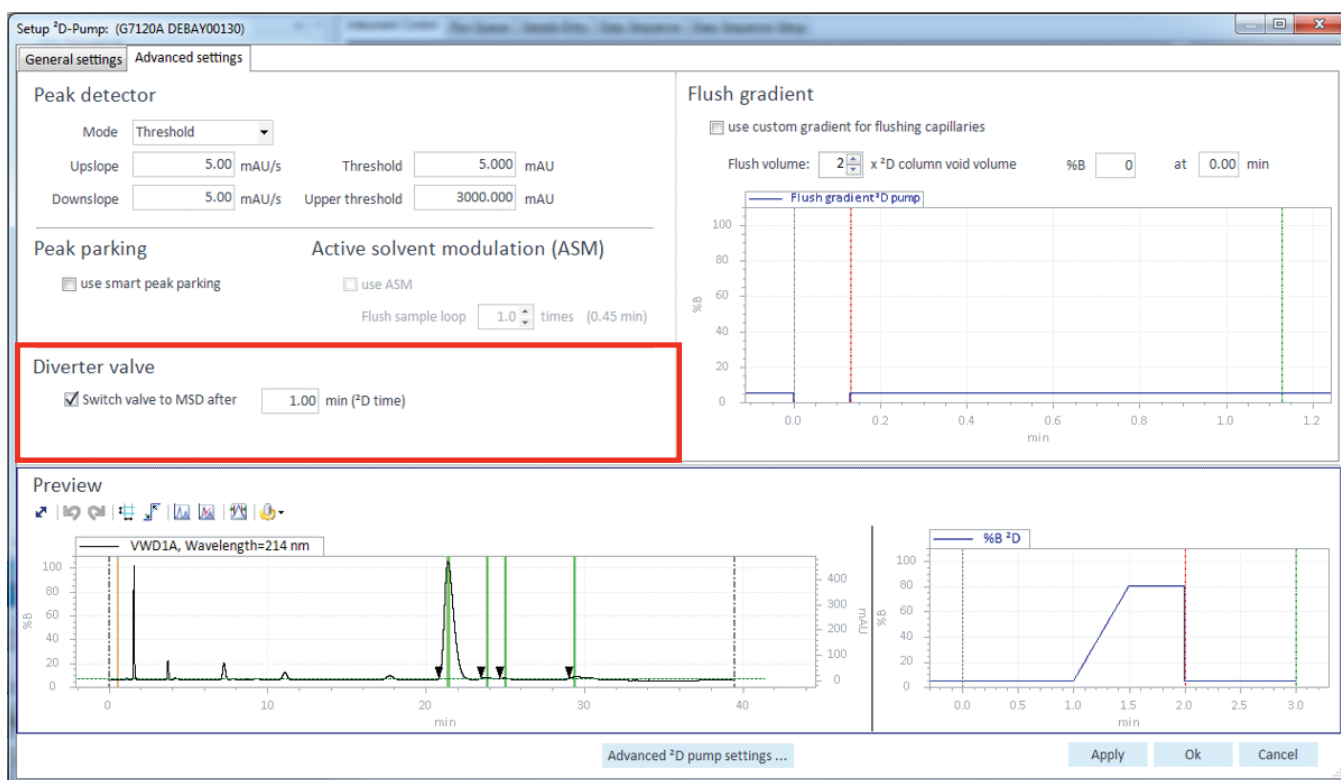


图 1. 二维液相色谱方法设置，用于每次 <sup>2</sup>D 运行开始时自动将 <sup>1</sup>D 流动相中的盐或缓冲液分流至废液

图 2 为二维液相色谱查看器中胰高血糖素标准溶液基于峰的多中心切割二维液相色谱分析结果。二维液相色谱查看器显示了胰高血糖素标准溶液五个<sup>1</sup>D 色谱图的叠加色谱图以及相应的

<sup>1</sup>D 采样表。二维液相色谱查看器还包括胰高血糖素峰的一次<sup>2</sup>D 分析的<sup>2</sup>D MSD 色谱图，显示为总离子流色谱图 (TIC) 和提取离子色谱图 (EIC) 以及相应的质谱图。

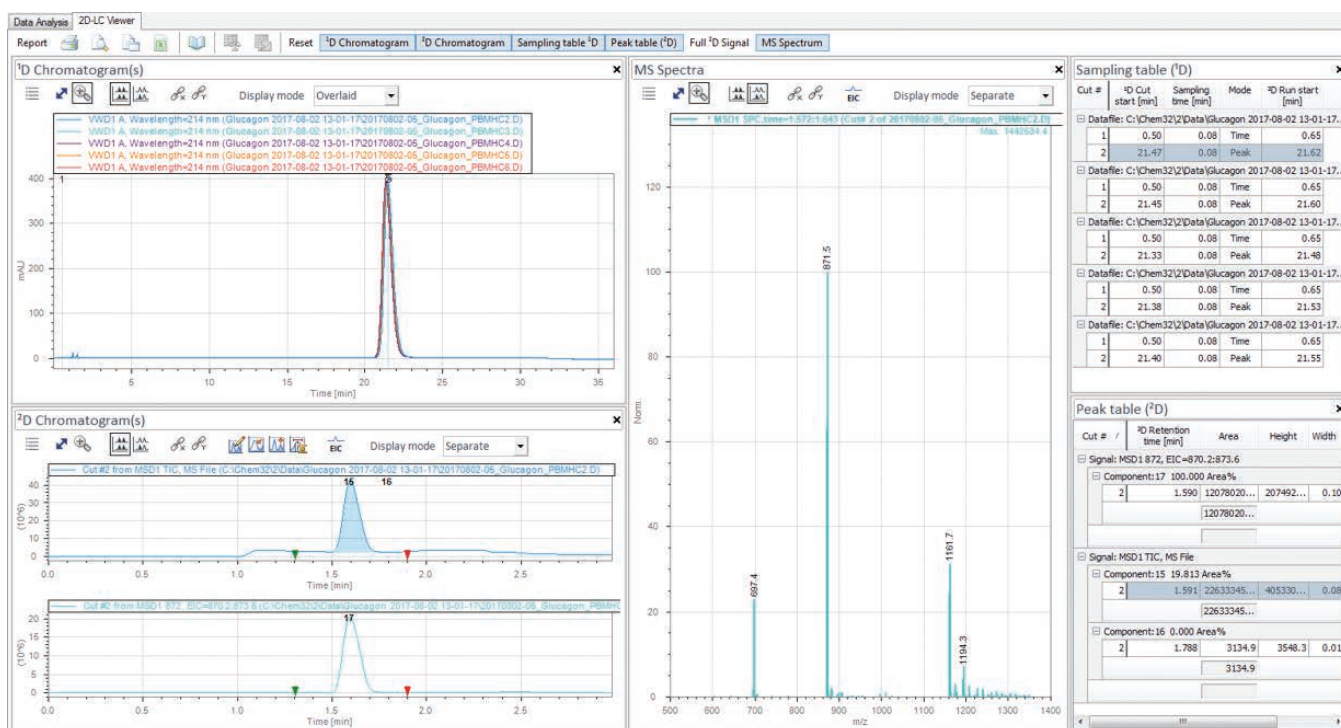


图 2. 显示胰高血糖素标准溶液基于峰的多中心切割二维液相色谱分析结果的二维液相色谱查看器

根据 USP 39, 胰高血糖素分析需要满足相关胰高血糖素标准溶液和系统适用性溶液分析的某些系统适用性要求。图 3 显示了胰高血糖素五次标准溶液分析和胰高血糖素系统适用性溶液分析的 <sup>1</sup>D 色谱图。在胰高血糖素系统适用性溶液中, 可清楚看见胰高血糖素峰后洗脱的四个峰, 根据 USP 39, 这些峰归属于胰高血糖素的脱酰胺基化。脱酰胺基化是指分别从天冬酰胺或谷氨酰胺中脱去氨基生成天冬氨酸或谷氨酸。这将使侧链酰胺生成侧链羧酸残基<sup>4</sup>, 质量数增加 1 Da。例如, 脱酰胺基化是常见的蛋白质降解途径, 发生在热应力过程中<sup>4</sup>。多肽胰高血糖素包含一个天冬酰胺和三个谷氨酰胺残基。

表 1 总结了 USP 39 的相关系统适用性要求, 并表明通过二维液相色谱方法的第一维分析极好地满足了这些要求。

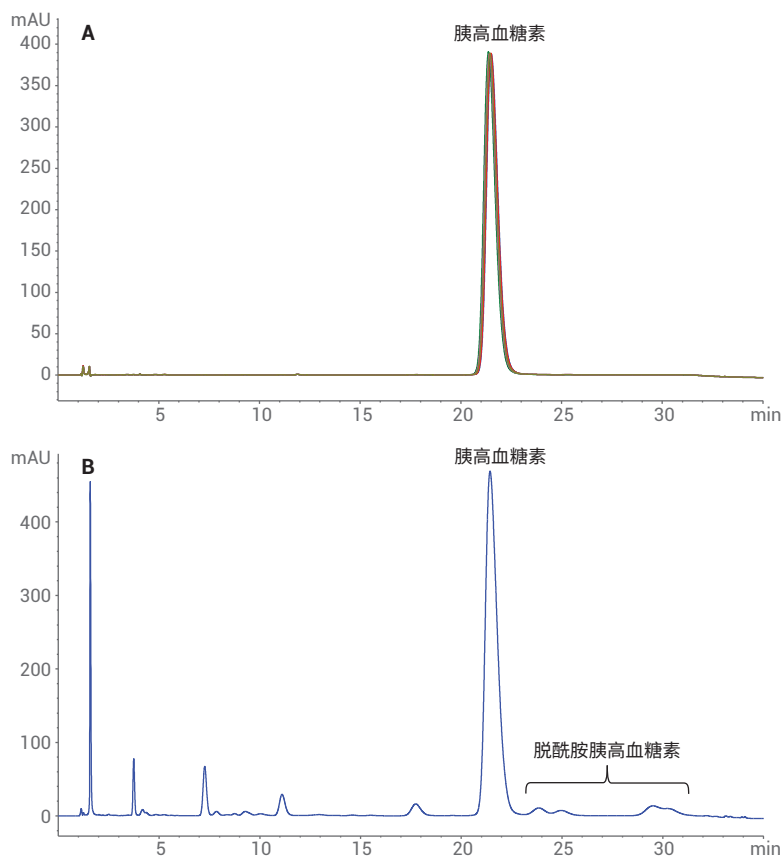


图 3. 根据 USP 39 进行的胰高血糖素分析 <sup>1</sup>D 色谱图。A) 胰高血糖素标准溶液五次分析的叠加色谱图。B) 胰高血糖素系统适用性溶液分析的色谱图

表 1. 相关的 USP 39 适用性要求以及二维液相色谱方法的 <sup>1</sup>D 分析结果

适用性要求 <sup>5</sup>	结果
相对标准偏差 (RSD): NMT 2.0%, 标准溶液	标准溶液中的胰高血糖素 (N = 5): 保留时间 RSD: 0.27%, 面积 RSD: 0.11%
拖尾因子: 胰高血糖素峰 NMT 1.8, 标准溶液	标准溶液中的胰高血糖素: USP 拖尾: 1.3
分离度 (Rs): 可清楚看见胰高血糖素峰之后洗脱的四个脱酰胺胰高血糖素峰。主峰和第一个洗脱的脱酰胺峰之间的分离度 NLT 1.5, 系统适用性溶液	系统适用性溶液: 可清楚看见胰高血糖素峰之后洗脱的四个峰。 胰高血糖素与第一个洗脱的脱酰胺峰之间的分离度: 2.3

NMT = 不大于  
NLT = 不小于

图 4 展示了二维液相色谱查看器中胰高血糖素标准溶液基于峰的多中心切割二维液相色谱分析的 <sup>1</sup>D 和 <sup>2</sup>D 色谱图。采用 5 mAU 阈值和 0.65 分钟的采样时间，对 <sup>1</sup>D 胰高血糖素峰的峰顶点进行中心切割，然后在第二维中进行分析。在 <sup>2</sup>D MSD 色谱图中，在 AdvanceBio 脱盐反相小柱上有效捕集胰高血糖素后进行检测。图 5 为胰高血糖素峰相应的质谱图。通过检测 [M+5H]<sup>5+</sup>、[M+4H]<sup>4+</sup> 和 [M+3H]<sup>3+</sup> 离子实现对胰高血糖素的检测。未检测到加合物，表明在第二维中进行了有效脱盐。

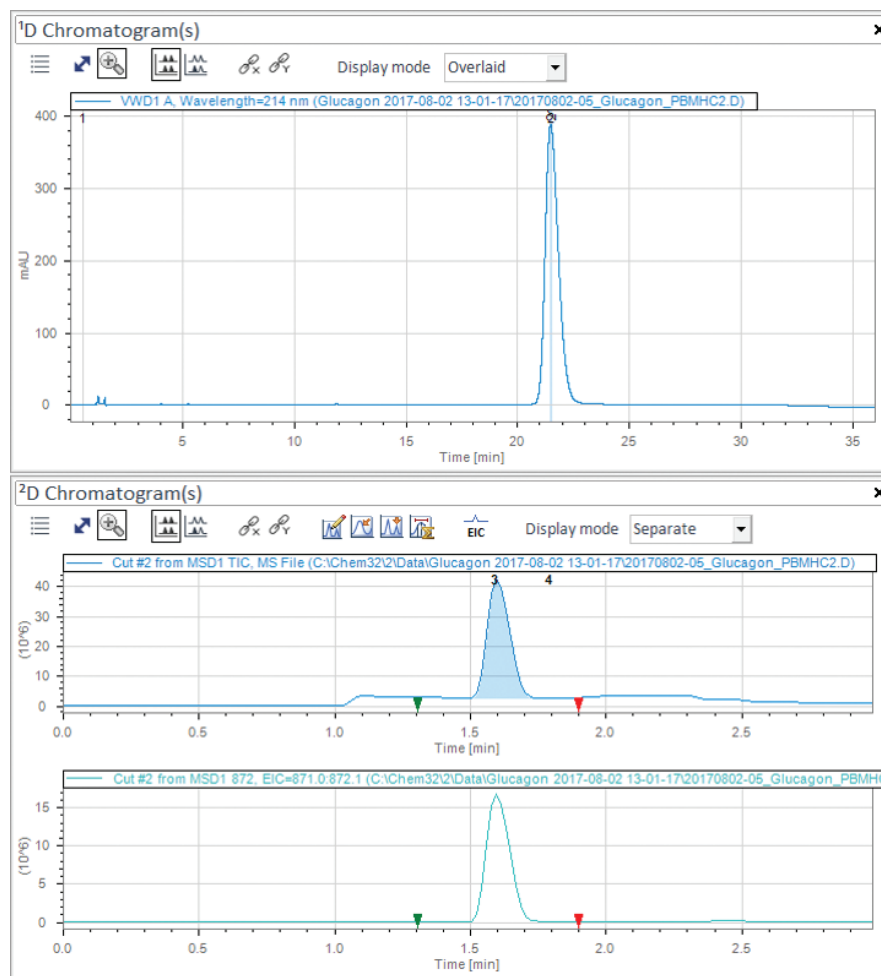


图 4. 胰高血糖素标准溶液基于峰的多中心切割二维液相色谱分析的 <sup>1</sup>D UV 和 <sup>2</sup>D MSD 色谱图 (m/z 871.0–872.1 的 TIC 和 EIC 图)

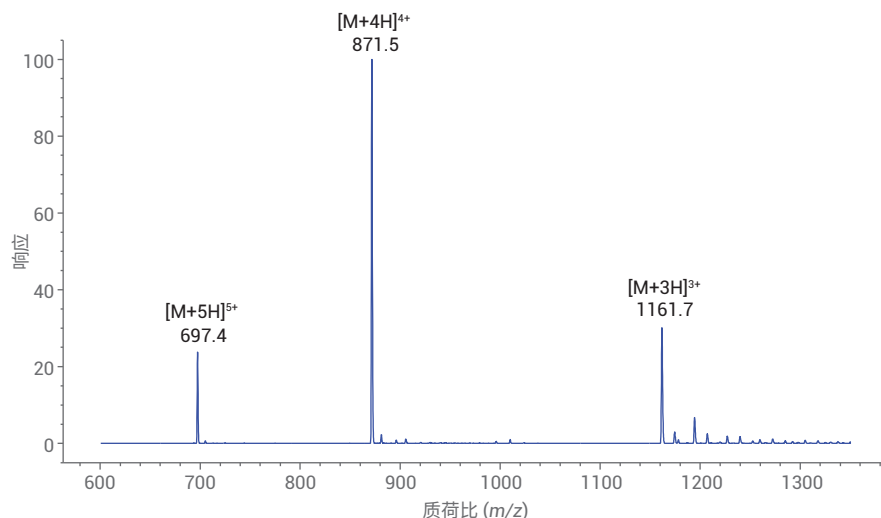


图 5. 胰高血糖素峰的质谱图

对胰高血糖素系统适用性溶液进行了基于峰和基于时间的多中心切割二维液相色谱分析。基于峰的多中心切割二维液相色谱分析的目的是对胰高血糖素峰以及胰高血糖素脱酰胺基化后的峰进行多中心切割，以获取这些峰的质量数信息。对基于峰的中心切割采用不同的采样时间，可将不同峰宽的峰在其峰顶点附近进行中心切割。图 6A 显示由于第四个脱酰胺胰高血糖素峰没有与第三个脱酰胺胰高血糖素峰完全分离，在该条件下未进行中心切割。使用基于时间的多中心切割二维液相色谱，可实现对目标峰（例如胰高血糖素峰、胰高血糖素脱酰胺基化的四个峰以及胰高血糖素其他降解产物的峰）的中心切割（图 6B）。采用这种方式，可在第二维中脱盐之后获得所有目标峰的质量数信息。

图 7 展示了在基于峰的多中心切割二维液相色谱分析后获得的第一个脱酰胺胰高血糖素峰的质谱图。四个脱酰胺胰高血糖素峰的质谱图相似（相关数据未显示）。所观察到的  $[M+5H]^{5+}$ 、 $[M+4H]^{4+}$  和  $[M+3H]^{3+}$  离子与胰高血糖素峰相比质量数有所增加，证实这些峰归属于胰高血糖素的脱酰胺基化。

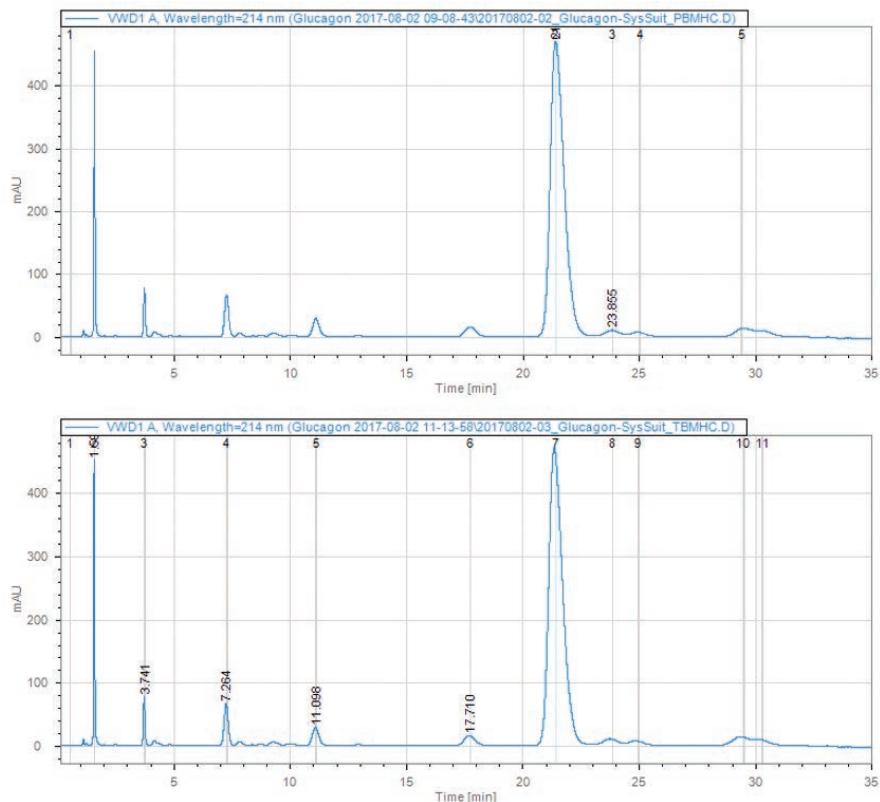


图 6. 使用中心切割的胰高血糖素系统适用性溶液的  $^1D$  色谱图，(A) 基于峰的多中心切割二维液相色谱图 (B) 基于时间的多中心切割二维液相色谱图

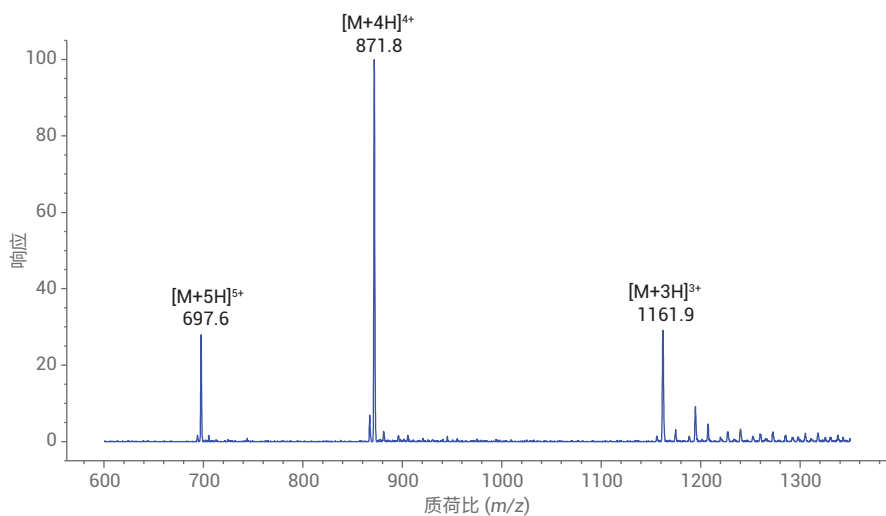


图 7. 第一个脱酰胺胰高血糖素峰的质谱图

## 结论

使用 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案的多中心切割二维液相色谱 (2D-LC) 可作为有效的脱盐工具, 实现使用 MS 不兼容流动相的色谱方法与质谱检测的在线联用。根据 USP 39, 在流动相中使用磷酸钾缓冲液对多肽胰高血糖素进行分析。将此 MS 不兼容的色谱方法在第二维中脱盐后与质量选择检测联用。未检测到加合物, 表明使用 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱可实现有效脱盐。获得了目标峰 (例如胰高血糖素峰和胰高血糖素脱酰胺基化产生的峰) 的质量数信息。

## 参考文献

1. Luo, H.; et al. 2D-LC as an on-line desalting tool allowing peptide identification directly from MS unfriendly HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *137*, 139-145
2. Petersson, P.; Haselmann, K.; Buckenmaier, S. Multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry: Towards real time determination of related impurities of bio-pharmaceuticals in salt based separation methods. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1468*, 95-101
3. Suresh, Babu C. V.; Ravindra, G. 用于 2D-LC/MS mAb 分析中在线脱盐的 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-7066CHCN, **2016**
4. Joshi, A. B.; Rus, E.; Kirsch, L. E. The degradation pathways of glucagon in acidic solutions. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *203*, 115-125
5. "Glucagon" *Official Monographs USP* **2016** 39, December 1

查找当地的安捷伦客户中心：

**[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)**

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

**[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)**

在线询价：

**[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)**

**[www.agilent.com](http://www.agilent.com)**

仅限研究使用。  
不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017  
2017年9月1日，中国出版  
5991-8437ZHCN



**Agilent Technologies**