

## 利用 LC-MS/MS 法解析化学修饰型胰岛素类似物的氨基酸序列

胡馨月<sup>1</sup>, 丁晓丽<sup>1</sup>, 孙悦<sup>1</sup>, 秦希月<sup>2</sup>, 张慧<sup>1</sup>, 李晶<sup>1</sup>, 梁成罡<sup>1</sup>

(1 中国食品药品检定研究院激素室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629; 2 吉林大学, 长春 130015)

**[摘要]** **目的:** 德谷胰岛素和地特胰岛素是以长链脂肪酸化学修饰为代表的第 3 代胰岛素类似物, 有必要建立专属性强、灵敏度高的 LC-MS/MS 法测定化学修饰型胰岛素类似物的氨基酸序列。**方法:** 氨基酸序列测定方法的色谱参数为 ACQUITY UPLC peptide BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 300 Å), 流动相 A 为 0.1% 甲酸/水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸/乙腈溶液, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 质谱参数为 MS<sup>E</sup> 采集模式, 碰撞能量为 30 ~ 40 eV。**结果:** 德谷胰岛素和地特胰岛素序列覆盖率良好, 化学修饰位点的碎片离子 y1& 可检出, 中高強度离子的离子强度 RSD 在 15% 之内, 可有效区分与其他未修饰胰岛素的序列。**结论:** 建立了重复性好、专属性强和耐用性好的脂肪侧链修饰型胰岛素类似物氨基酸序列 LC-MS/MS 方法, 为该类产品信息结构的研究方法提供了借鉴意义。

**[关键词]** 脂肪侧链修饰型胰岛素类似物; 德谷胰岛素; 地特胰岛素; LC-MS/MS 法; 氨基酸序列定位; 酶切

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)03-0301-10

## Identification of amino acid sequence of chemically modified insulin analogues by LC-MS/MS

HU Xin-yue<sup>1</sup>, DING Xiao-li<sup>1</sup>, SUN Yue<sup>1</sup>, QIN Xi-yue<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, LIANG Cheng-gang<sup>1</sup>

(1 Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China; 2 Jilin University, Changchun 130015, China)

**[Abstract]** **Objective:** Insulin degludec and insulin detemir are the third generation of insulin analogues that are chemically modified on long chain aliphatic acid. It is necessary to establish a specific and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of amino acid sequences of chemically modified insulin analogues. **Methods:** The separation was achieved by an ACQUITY UPLC peptide BEH C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 300 Å) with a mobile phase of 0.1% FA/H<sub>2</sub>O as Solvent A and 0.1% FA/acetonitrile as Solvent B in a gradient mode. The flow rate was set at 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. MS<sup>E</sup> was used as the detection mode of mass spectrometry, and the collision energy was 30 ~ 40 eV. **Results:** The coverage rate of insulin degludec and insulin detemir sequences was good as expected, and the fragment ion y1& was detected by chemical modification. RSD% of ionic strength of medium and high strength ions was within 15%. Both insulin sequences can be effectively distinguished it from other unmodified ones. **Conclusion:** A liquid mass spectrometry method for amino acid sequences of adipose-side chain modified insulin analogs with good repeatability, specificity and durability was established, providing reference for the research method of sequence structure of this kind of products.

**[基金项目]** 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题项目 (2022A3)

**[作者简介]** 胡馨月, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 激素类药物质量控制。联系电话: (010)53851462, E-mail: huxinyue@nifdc.org.cn。

**[通讯作者]** 梁成罡, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 激素类药物质量控制及标准研究。联系电话: (010)53851638, E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn。李晶, 女, 博士, 主任药师, 研究方向: 激素类药物质量控制及标准研究。联系电话: (010)53851465, E-mail: li\_jing@nifdc.org.cn。

**[Key words]** chemically modified insulin analogues; insulin degludec; insulin detemir; LC-MS/MS; amino acid sequence localization; enzyme digestion

天然胰岛素存在体内半衰期短、注射频繁等缺点,作用时间较短,无法覆盖全天基础血糖控制需求<sup>[1]</sup>。因此,为了解决上述人胰岛素的不足,胰岛素类似物应运而生,通过改变氨基酸结构或进行相关修饰,改变胰岛素的药动学特性,使药物能缓慢地吸收和分布,达到较长的半衰期,同时保留胰岛素的生物学特性和稳定性。其中,以脂肪侧链化学修饰为代表的第3代胰岛素类似物为德谷胰岛素和地特胰岛素。地特胰岛素去掉了天然胰岛素分子 B30 位的苏氨酸,在 B29 位的赖氨酸连接了 1 个 14 碳的脂肪酸侧链(见图 1B),脂肪侧链结构的引入可以提高六聚体形成的速度和稳定性,减缓在体内吸收和扩展的速率,也可以使胰岛素与白蛋白进行可逆性结合,发挥长效降糖作用<sup>[2-3]</sup>,半衰期为 16~24 h<sup>[4]</sup>。德谷胰岛素同样是在人胰岛素分子天然结构的基础上去掉了 B30 位的苏氨酸,在 B29 位赖氨酸上,将 1 个 16 碳脂肪二酸通过 1 个 L- $\gamma$ -谷氨酸连接子与其相连接(见图 1A)<sup>[5-6]</sup>。这种独特的分子结构使其

在注射前以稳定的可溶性、双六聚体形式存在于制剂中。皮下注射后,随着制剂中苯酚的弥散,德谷胰岛素可迅速形成多六聚体,脂肪侧链在锌离子存在下形成多六聚体储存库,持久地发挥其降糖作用,这是主要的长效作用机制;随后,锌离子分散,多六聚体解离并释放出单体进入血液循环,脂肪侧链与血浆白蛋白发生可逆性结合,进一步形成“缓冲带”,半衰期超过 24 h<sup>[7]</sup>,降糖作用更持久。脂肪侧链化学修饰型胰岛素类似物为重组 DNA 技术产品,产品的一级结构决定了其高级结构以及所发挥的生物学功能,因此,氨基酸排列顺序是关系到该类产品的安全性与有效性的关键质量属性。《中华人民共和国药典》2020 年版人用重组 DNA 蛋白总论<sup>[8]</sup>中对其氨基酸序列的表征作出了规定。此外,具有化学修饰结构的德谷胰岛素和地特胰岛素的氨基酸序列测定还需要对脂肪侧链所修饰的氨基酸位点作出准确判断,对表征方法的准确性、专属性和方便快捷等特性提出了更高的要求。

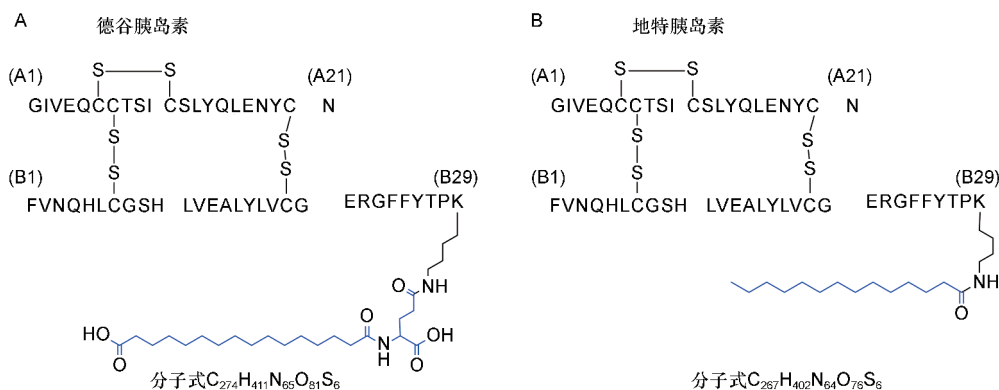


图 1 德谷胰岛素(A)和地特胰岛素(B)结构

LC-MS/MS 技术具有高灵敏度、高分辨率、高选择性和高特异性的特点,近年来逐渐成为支撑大分子表征的重要技术<sup>[9]</sup>。不同序列可以产生不同的  $m/z$  和不同的碎片离子,根据高分辨质谱提供的碎片信息可以对肽段的氨基酸序列进行确证。本实验利用 LC-MS/MS 技术对德谷胰岛素和地特胰岛素进行完整分子量、还原分子量测定,并通过二级质谱碰撞诱导裂解(collision induced cleavage, CID)模式对还原样品、酶切样品进行了序列测定研究、验证和佐

证。为化学修饰型胰岛素类似物序列结构的研究方法提供了一定参考。

## 材料与方法

### 1 仪器

ACQUITY UPLC I-Class (Waters 公司); Synapt G2-S Q TOF (Waters 公司); UNIFI 数据处理软件 (Waters 公司)。

### 2 试剂

乙腈 (Fisher Scientific 公司); 甲酸 (Fisher Scientific 公司); 三(2-羧乙基)膦盐酸盐 [tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP, Sigma-Aldrich 公司]; 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT, Sigma-Aldrich 公司); 碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAM, Sigma-Aldrich 公司); Glu-C 酶 (Sigma-Aldrich 公司, 规格:  $50 \mu\text{g} \cdot \text{支}^{-1}$ ); 德谷胰岛素原料药和地特胰岛素原料药 (中国食品药品检定研究院激素室留样)。

### 3 实验方法

#### 3.1 溶液配制

$1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCEP 溶液的配制: 称取 TCEP 286.6 mg, 加入超纯水 1 mL, 充分混匀, 即得。 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 溶液的配制: 称取 DTT 154.2 mg, 加入超纯水 1 mL, 充分混匀, 即得。 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAM 溶液的配制: 称取 IAM 91.9 mg, 加入超纯水 0.5 mL, 超声至完全溶解, 即得。 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的碳酸氢铵溶液 ( $\text{pH} = 8.0$ ) 的配制: 称取 98.8 mg 碳酸氢铵, 加入 50 mL 超纯水溶解, 用氨水调节 pH 值至 8.0, 即得。Glu-C 酶溶液配制: 取一支 Glu-C 酶, 加入 100  $\mu\text{L}$  超纯水溶解。

#### 3.2 样品处理

**3.2.1 完整分子量样品前处理** 称取样品 10 mg, 用 0.1% 磷酸水溶液定容至 10 mL, 配成浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液。取  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的胰岛素样品溶液 100  $\mu\text{L}$  置于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1% 甲酸水溶液定容至刻度, 混匀, 作为完整分子量供试品溶液。

**3.2.2 还原样品前处理** 称取样品 10 mg, 用 0.1% 磷酸水溶液溶解并定容至 10 mL, 配成浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液。取  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的胰岛素样品溶液 100  $\mu\text{L}$  置于 10 mL 容量瓶中, 0.1% 甲酸水溶液定容至刻度, 混匀。取适量上述溶液 900  $\mu\text{L}$  加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TCEP 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,  $55^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 作为供试品溶液。

**3.2.3 酶切样品前处理** 还原酶切样品处理: 称取样品 10 mg, 用  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的碳酸氢铵溶液 ( $\text{pH} = 8.0$ ) 溶解并定容至 10 mL, 配成浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液。取该溶液 200  $\mu\text{L}$ , 加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 溶液 2  $\mu\text{L}$ ,  $55^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IAM 溶液 4  $\mu\text{L}$ , 避光放置 30 min。取还原后的溶液 20  $\mu\text{L}$ , 加入  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的碳酸氢铵溶液 ( $\text{pH} = 8.0$ ) 98  $\mu\text{L}$ , 超纯水 78  $\mu\text{L}$ , Glu-C 酶 4  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 3 h。加入甲酸 3  $\mu\text{L}$  停止反应, 作为还原酶切供试品溶液。

#### 3.3 实验仪器方法

**3.3.1 完整分子量和序列测定仪器方法** 液相条

件: ACQUITY UPLC peptide BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 300  $\text{\AA}$ , 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 为 0.1% 甲酸/水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸/乙腈溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 3% ~ 60% B; 8 ~ 8.5 min, 60% ~ 95% B; 8.5 ~ 10.5 min, 95% B; 10.5 ~ 11 min, 95% ~ 3% B; 11 ~ 15 min, 3% B), 0 ~ 3 min, 10 ~ 15 min 可切换至废液; 流速  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温  $50^\circ\text{C}$ ; 进样体积 10  $\mu\text{L}$ 。

质谱条件: 液质联用仪器为 Waters UPLC I-Class/synapt G2-S Q TOF; 实时校正 (LockSpray): 亮氨酸-脑啡肽 (leucine ~ 5-enkephalin, LE, 200  $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ); 离子源: 电喷雾离子源 (ESI), 锥孔气流速:  $50.0 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 采集模式: 正离子、分辨率模式; 锥孔电压: 40.0 V; 扫描范围: 50 ~ 2 000 Da; 完整分子量: 检测模式为 MS; 序列测定检测模式为  $\text{MS}^E$ , 碰撞能量: 30 ~ 40 eV。

**3.3.2 酶切测定方法** 液相条件: ACQUITY UPLC peptide BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ ); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 3% B; 3 ~ 50 min, 3% ~ 60% B; 50 ~ 50.1 min, 60% ~ 95% B; 50.1 ~ 53 min, 95% B; 53.00 ~ 53.1 min 95% ~ 3% B; 53.1 ~ 63 min, 3% B)。流速  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温  $50^\circ\text{C}$ ; 进样体积 10  $\mu\text{L}$ 。质谱条件: 液质联用仪器为 Waters UPLC I-Class/Synapt G2-S Q TOF; 质谱条件为实时校正 (LockSpray): 亮氨酸-脑啡肽 (leucine ~ 5-enkephalin, LE, 200  $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ); ESI, 检测模式  $\text{MS}^E$ , 优化参数后如下: 锥孔气流为  $50.0 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 采集模式: 正离子模式; 锥孔电压: 40.0 V; 扫描范围: 50 ~ 2 000 Da;  $\text{MS}^E$  碰撞能量: 20 ~ 30 eV。

#### 3.4 数据处理方法

**3.4.1 完整分子量及氨基酸序列 CID 测定处理方法** Waters-UNIFI, 输入胰岛素理论氨基酸序列。胰岛素理论序列 A: 1-21AA (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN); B: 1-29AA (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK), 德谷胰岛素固定修饰 K&(C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>6</sub>N, 397.246 4 Da), 地特胰岛素固定修饰 K&(C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O, 210.198 3 Da)。一级质量数和二级质量数质量容差为 20 ppm。

**3.4.2 酶切佐证测定处理方法** Waters-UNIFI 中, 输入胰岛素理论氨基酸序列。德谷胰岛素固定修饰 K&(C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>6</sub>N, 397.246 4 Da), 地特胰岛素固定修饰 K&(C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O, 210.198 3 Da)。固定修饰为碘乙酰胺烷基化 (carbamidomethyl-C), 可变修饰为脱氨

基(deamidation N)。还原酶切样品选择 Glu-C 酶(碳酸氢铵溶液 pH = 8)。一级质量数和二级质量数质量容差为 20 ppm。

## 结 果

### 1 完整分子量检测

对长效胰岛素进行 MS 一级质谱采集,完整分

子量结果显示,德谷胰岛素实测单一同位素质量数  $[M + H]^+$  为 6 100. 878 9,理论单一同位素质量数  $[M + H]^+$  为 6 100. 843 7,偏差为 5. 8 ppm;德谷胰岛素实测单一同位素质量数  $[M + H]^+$  为 5 913. 828 2,理论单一同位素质量数  $[M + H]^+$  为 5 913. 795 6,偏差为 5. 5 ppm,可判定德谷胰岛素和地特胰岛素完整分子量正确,去卷积质谱图详见图 2A 和图 2B。

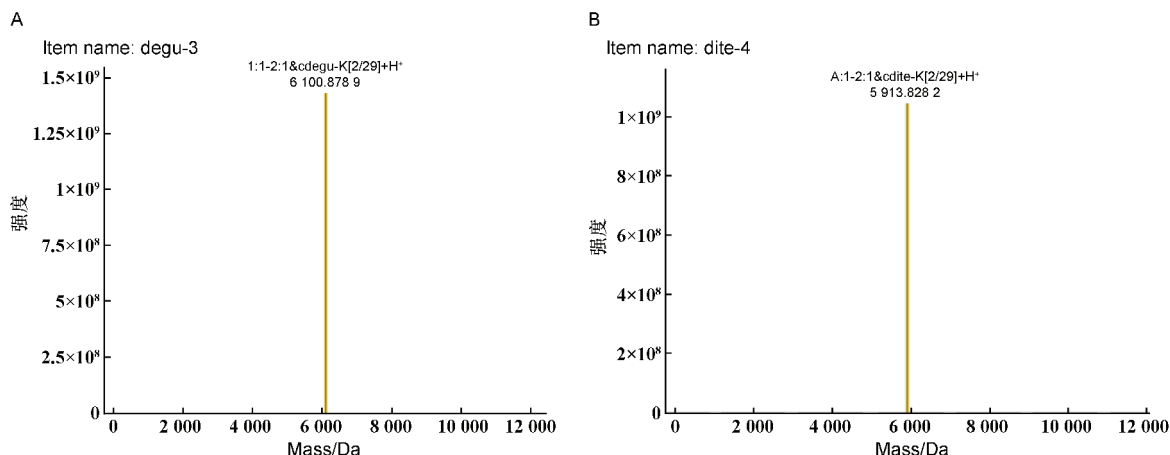


图 2 德谷胰岛素(A)和地特胰岛素(B)去卷积一级质谱

### 2 氨基酸序列测定

#### 2.1 一级质量数测定

对德谷胰岛素和地特胰岛素同“3.2.2”项下还原处理和“3.3.1”项下方法采集,使用 UPLC I-Class/Synapt G2-S Q TOF 液质联用仪对 A 链和 B 链进行分离和序列测定。如图 3 所示,A 链和 B 链得到较好的分离,由于 B 链的脂肪链修饰,使得 B 链的极性相对较小,A 链出峰时间早于 B 链。德谷胰岛素与地特胰岛素的 A 链序列一致,出峰时间一致;由

于地特胰岛素的脂肪链没有亲水基团,所以其 B 链出峰更晚于德谷胰岛素 B 链。德谷胰岛素 A 链和 B 链实测单一同位素质量数  $[M + H]^+$  为 2 383. 005 6 和 3 724. 882 0,地特胰岛素 A 链和 B 链实测单一同位素质量数  $[M + H]^+$  为 2 383. 005 6 和 3 537. 841 8,两者的实测质量数较理论质量数的相对偏差 < 10 ppm,可判定德谷胰岛素和地特胰岛素 A 链和 B 链实测质量数与理论质量数一致。

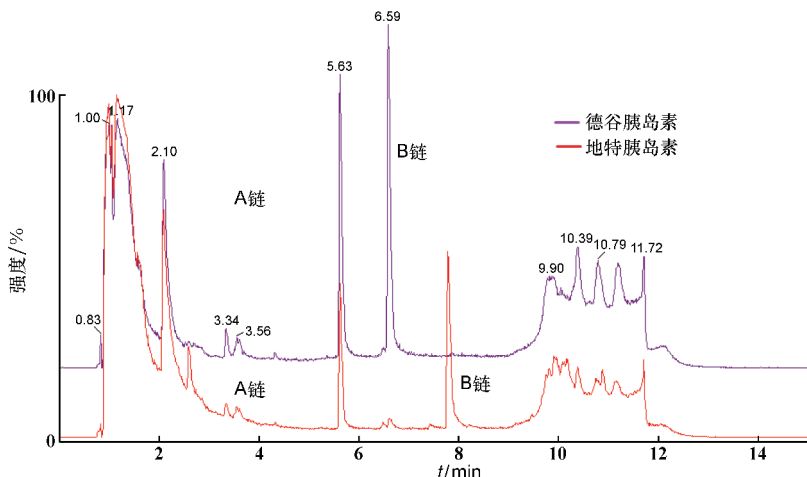
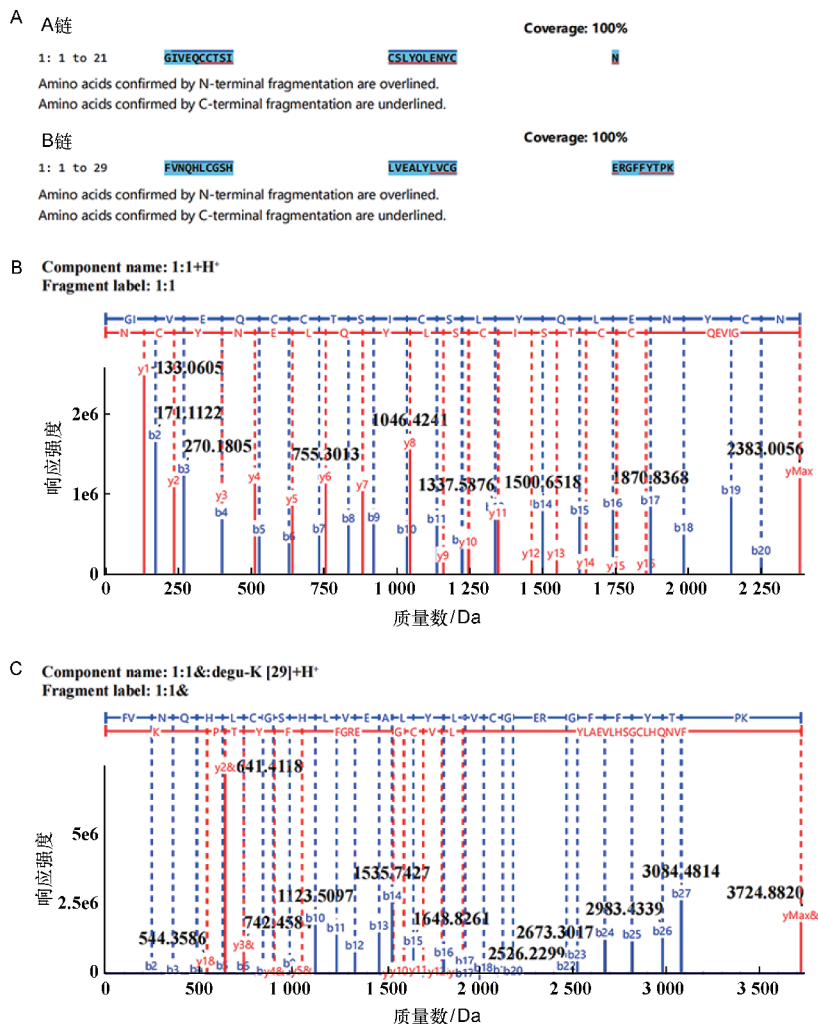


图 3 长效胰岛素总离子流(TIC)图

## 2.2 二级序列测定

德谷胰岛素 A 链和 B 链的序列覆盖度和碎片离子图见图 4, A 链和 B 链一级覆盖率为 100%,

A 链二级覆盖率为 95.2%, b/y 离子总数为 35 个, B 链二级覆盖率为 96.6%, b/y 离子总数为 35 个。

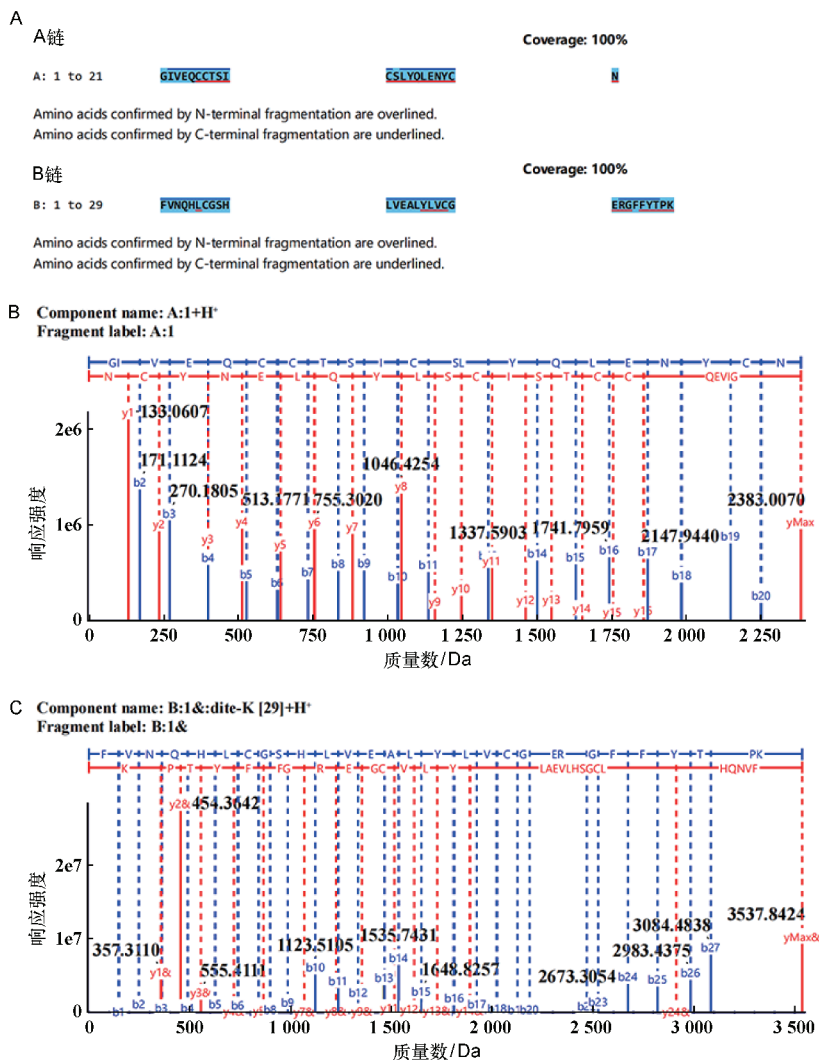


A: 德谷胰岛素 A 链和 B 链覆盖率;一级覆盖率为 100%, 二级覆盖率:氨基酸上方蓝线为 b 离子,下方红线为 y 离子,b 或者 y 离子之一存在皆可证明该氨基酸被覆盖,二级覆盖率 = 覆盖的氨基酸个数/氨基酸总数 × 100%; B: 德谷胰岛素 A 链碎片离子; C: 德谷胰岛素 B 链碎片离子

图 4 德谷胰岛素序列覆盖度和碎片离子图

地特胰岛素 A 链和 B 链的序列覆盖度和碎片离子图见图 5, A 链和 B 链一级覆盖率为 100%, A 链二级覆盖率为 95.2%, b/y 离子总数为 34 个, B 链二级覆盖率为 100%, b/y 离子总数为 39 个。在 UNIFI 软件中“&”表示该碎片离子带上了修饰,针对 B29 位脂肪侧链修饰氨基酸位点的定位,匹配结

果需满足 b1 ~ b28 无“&”, y1 ~ yMax 有“&”。分析结果显示,德谷胰岛素和地特胰岛素 B 链皆满足以上条件(德谷胰岛素 & 为 C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>6</sub>N, 地特胰岛素 & 为 C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O), 并且 y1& 碎片离子可直接证明修饰位在 B 链的 C 端 K 氨基酸上。



A:地特胰岛素 A 链和 B 链覆盖率;一级覆盖率为 100% ,二级覆盖率:氨基酸上方蓝线为 b 离子,下方红线为 y 离子,b 或者 y 离子之一存在皆可证明该氨基酸被覆盖,二级覆盖率 = 覆盖的氨基酸个数/氨基酸总数 × 100% ;B:地特胰岛素 A 链碎片离子;C:地特胰岛素 B 链碎片离子

图 5 地特胰岛素序列覆盖度和碎片离子图

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 b/y 离子和覆盖率统计** 质谱采集完毕,通过 Waters-UNIFI 数据处理分析,分别统计德谷胰岛素和地特胰岛素的 A 链和 B 链 b/y 离子总个数(样本量  $n = 40$ ),其中,德谷胰岛素与地特胰岛素 A 链和 B 链一级覆盖率均为 100%,一级质量数偏差均  $< 10$  ppm,二级覆盖率均  $> 85%$ 。德谷胰岛素和地特胰岛素 A 链中 b/y 离子总数均  $> 32$  个;德谷胰岛素和地特胰岛素 B 链中 b/y 碎片离子总数分别  $> 30$  和  $33$  个,脂肪侧链定位碎片离子 y1& 皆可被检出。将上述每条链中高强度离子按照由高到低排

序,统计每个样本前 5 个强度最高的离子,结果显示德谷胰岛素和地特胰岛素 A 链中 y1, b2, y8 这 3 个离子均包含在内 ( $n = 40$ ), B 链中 y2&, b27, b14 这 3 个离子均包含在内 ( $n = 40$ ),故选择以上离子做进一步的精密度考察。

**2.3.2 精密度** 同“3.2.2”项下处理方法,将供试品溶液重复进样 6 针,考察德谷胰岛素和地特胰岛素 A 链中 y1, b2, y8 及 B 链中 y2&, b27, b14 的离子强度 RSD ( $n = 6$ ),表 1 和表 2 结果显示,均  $< 15%$ ,表明精密度结果良好。

表1 德谷胰岛素精密度考察

n = 6

碎片离子	A 链碎片离子			B 链碎片离子		
	y1	b2	y8	y2&	b27	b14
离子强度	2 997 405	1 986 430	1 917 731	9 983 323	3 101 708	3 151 635
	2 987 431	1 996 963	1 832 672	10 266 554	2 888 276	3 210 192
	2 995 293	1 974 328	1 817 784	9 668 760	2 613 344	3 106 059
	3 021 037	1 990 216	1 853 122	10 161 348	3 010 045	3 138 666
	2 940 239	1 922 890	1 770 397	9 453 610	2 635 236	2 929 644
	2 807 771	1 854 885	1 604 514	9 283 189	2 421 633	2 772 752
平均离子强度	2 958 196	1 954 285	1 799 370	9 802 797	2 778 374	3 051 491
RSD/%	2.65	2.84	5.94	4.04	9.46	5.45

表2 地特胰岛素精密度考察

n = 6

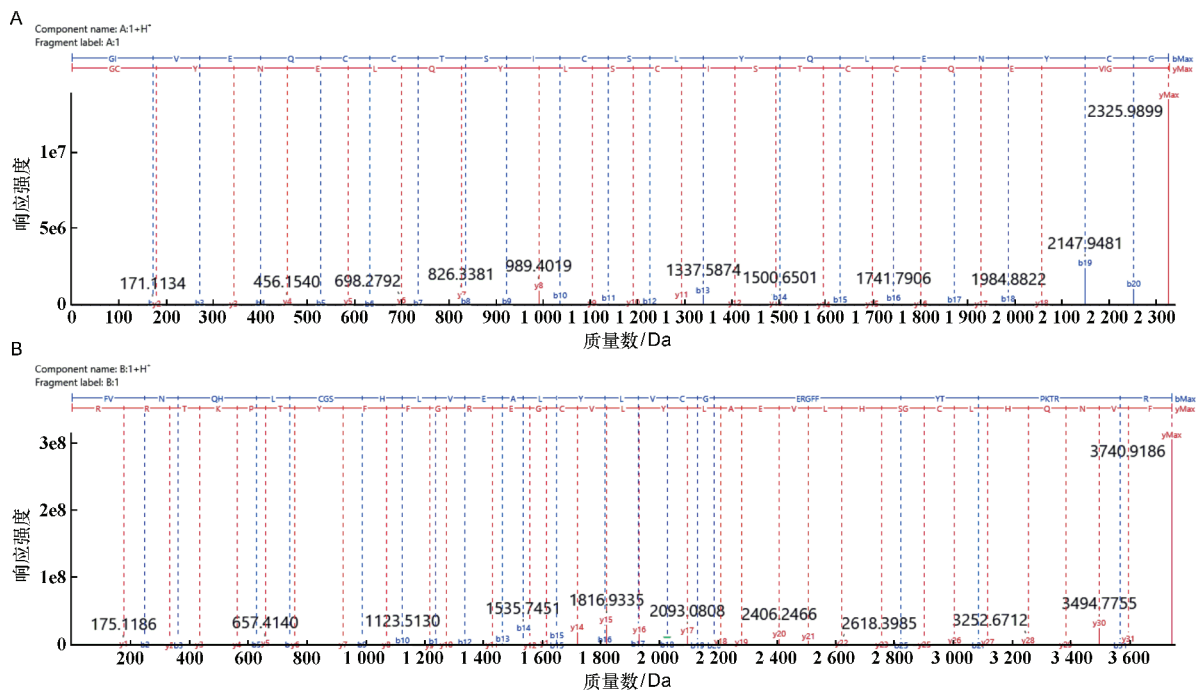
碎片离子	A 链碎片离子			B 链碎片离子		
	y1	b2	y8	y2&	b27	b14
离子强度	2 043 585	1 318 919	1 260 276	24 952 894	9 117 184	5 419 719
	2 084 551	1 340 232	1 245 458	24 911 592	9 085 160	5 358 277
	2 079 614	1 324 684	1 241 827	24 654 486	8 808 867	4 897 194
	2 063 135	1 324 189	1 246 790	24 962 462	9 073 871	5 415 558
	1 995 461	1 278 424	1 195 261	24 093 982	8 812 675	5 225 782
	1 886 154	1 218 968	1 140 647	23 154 180	8 301 195	4 602 796
平均离子强度	2025417	1 300 903	1 221 710	24 454 933	8 866 492	5 153 221
RSD/%	3.73	3.47	3.73	2.94	3.49	6.47

**2.3.3 专属性** 空白溶剂为 0.1% 甲醇水溶,空白溶剂在德谷胰岛素和地特胰岛素 A 链和 B 链出峰位置无干扰。氨基酸序列测定时,A 链和 B 链一级质量数必须与理论值一致,才可判定为该胰岛素。将其他 4 种胰岛素(见表 3)同“3.2.2”项下处理方

法处理,分析条件同“3.3.1”项下。用德谷胰岛素或地特胰岛素的数据处理方法解析其他胰岛素,A 和 B 链序列无法同时匹配,二级碎片也不一致(例如图 6 甘精胰岛素的二级碎片图),证明该方法专属性良好。

表3 不同胰岛素 A 链和 B 链的单一同位素质量数 [M + H]<sup>+</sup>

胰岛素名称	测得值/Da	理论值/Da	偏差/ppm	胰岛素名称	测得值/Da	理论值/Da	偏差/ppm
德谷胰岛素	A; 2 383.014 3	A; 2 383.007 3	2.9	赖脯胰岛素	A;2 383.015 7	A;2 383.007 3	3.5
	B; 3 724.914 5	B; 3 724.890 6	6.4		B;3 428.715 3	B;3 428.691 9	6.8
地特胰岛素	A;2 383.013 1	A;2 383.007 3	2.4	门冬胰岛素	A;2 383.017 5	A;2 383.007 3	4.3
	B;3 537.863 8	B;3 537.842 5	6.0		B;3 446.690 5	B;3 446.666 0	7.1
重组人胰岛素	A;2 383.016 7	A;2 383.007 3	3.9	甘精胰岛素	A;2 325.991 2	A;2 325.985 8	2.3
	B;3 428.717 6	B;3 428.691 9	7.5		B;3 740.920 0	B;3 740.894 1	6.9



A: 甘精胰岛素 A 链碎片离子; B: 甘精胰岛素 B 链碎片离子

图 6 甘精胰岛素碎片离子图

**2.3.4 耐用性考察** 将碰撞能参数改变为 20 ~ 40 和 30 ~ 50 eV, 其他条件同“3.3.1”项下。德谷胰岛素与地特胰岛素 A 链和 B 链一级覆盖率为 100%, 一级质量数偏差均 < 10 ppm, 二级覆盖率为 > 85% (见表 4), B 链脂肪侧链定位碎片离子 y1 皆可检出, 表明该方法耐用性良好。

表 4 改变碰撞能后胰岛素 A 链和 B 链二级覆盖率

碰撞能	二级覆盖率	
	德谷胰岛素	地特胰岛素
20 ~ 40 eV	A 链: 96.2% B 链: 89.6%	A 链: 96.2% B 链: 93.1%
30 ~ 50 eV	A 链: 96.2% B 链: 96.6%	A 链: 96.2% B 链: 100%

### 3 还原酶切处理胰岛素佐证

按照“3.2.3”项下方法, 对德谷胰岛素和地特胰岛素样品进行还原、烷基化、V8 酶孵育水解, 采集方法同“3.3.2”, 针对酶切后的肽段进行鉴定, 根据肽段序列推导氨基酸序列。德谷胰岛素检测 6 条肽段主要肽段, A 链 3 条, B 链 3 条; 地特胰岛素检测 7 条肽段主要肽段, A 链 3 条, B 链 4 条。其中, NYCN 肽段不被色谱柱保留, 随溶剂峰共流出, *t* 约为 1.61 min。每条肽段的质量数、*t*、序列和 b/y 离子数详见表 5 和表 6, 表中显示的所有酶切肽段可覆盖德谷胰岛素和地特胰岛素氨基酸序列, 并且肽段 RGFFYTPK 的 y1 碎片离子可确证 B 链 C 端氨基酸 K 的修饰位点。德谷胰岛素和地特胰岛素还原酶切后的 TIC 图见图 7。

表 5 德谷胰岛素还原酶切质量肽图数据

峰号	肽段名称	链	肽段序列	修饰位置	<i>m/z</i>		电荷数	质量数偏差/ppm	<i>t</i> /min	b/y 离子总数
					实测	理论				
1	A: V3&; carbamidomethyl C [3] + H <sup>+</sup>	A	NYCN	carbamidomethyl C [3]	570.197 8	570.197 7	1	0.2	1.61	4
2	A: V1 + H <sup>+</sup>	A	GIVE	—	417.233 7	417.234 4	1	-1.6	7.30	4
3	B: V1&; carbamidomethyl C [7] + H <sup>+</sup>	B	FVNQHLGSHLVE	carbamidomethyl C [7]	770.374 4	770.372 3	2	2.8	12.99	18
4	B: V2&; carbamidomethyl C [6] + H <sup>+</sup>	B	ALYLVCGE	carbamidomethyl C [6]	924.450 5	924.449 5	1	1	16.36	13
5	A: V2&; carbamidomethyl C (3) [2 3 7] + H <sup>+</sup>	A	QCCTSICSLYQLE	carbamidomethyl C (3) [2 3 7]	831.354 8	831.352 0	2	3.4	18.90	19
6	1: V3&; degu-K [8] + H <sup>+</sup>	B	RGFFYTPK	degu-K [8]	706.896 3	706.894 8	2	2	31.2	10

表 6 地特胰岛素还原酶切质量肽图数据

峰号	肽段名称	链	肽段序列	修饰位置	<i>m/z</i>		电荷数	质量数偏差/ppm	<i>t</i> /min	<i>b</i> / <i>y</i> 离子总数
					实测	理论				
1	A: V3&; carbamidomethyl C [3] + H <sup>+</sup>	A	NYCN	carbamidomethyl C [3]	570.197 6	570.197 7	1	-0.1	1.61	4
2	A: V1 + H <sup>+</sup>	A	GIVE	—	417.233 4	417.234 4	1	-2.4	7.26	4
3	B: V1&; carbamidomethyl C [7] + H <sup>+</sup>	B	FVNQHLCGSHLVE	carbamidomethyl C [7]	770.375 1	770.372 3	2	3.6	12.97	16
4	B: V2&; carbamidomethyl C [6] + H <sup>+</sup>	B	ALYLVCGE	carbamidomethyl C [6]	924.450 6	924.449 5	1	1.1	16.30	11
5	A: V2&; carbamidomethyl C (3) [2 3 7] + H <sup>+</sup>	A	QCCTSICSLYQLE	carbamidomethyl C (3) [2 3 7]	831.355 3	831.352 0	2	4	18.20	20
7	B: V1-3&; carbamidomethyl C (2) [7,19], dite-K [29] + H <sup>+</sup>	B	FVNQHLCG-SHLVEALYL-VCGERGFYTPK	carbamidomethyl C (2) [7,19], dite-K[29]	913.733 8	913.726 8	4	7.7	37.17	30
8	B: V2-B: V3&; dite-K [8] + H <sup>+</sup>	B	RGFFYTPK	dite-K [8]	613.372 2	613.370 8	2	2.3	39.68	9

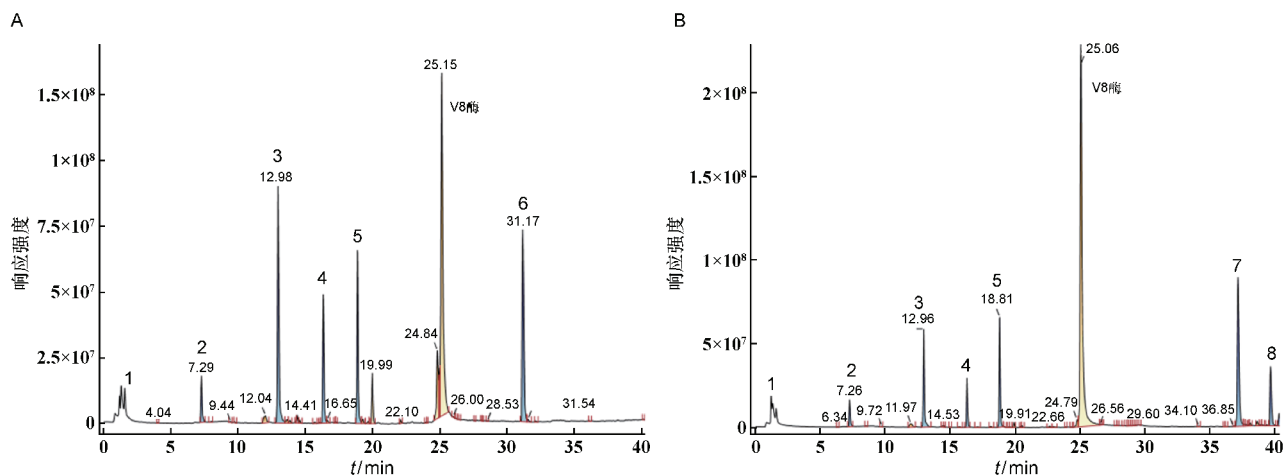


图 7 德谷胰岛素(A)和地特胰岛素(B)还原酶切后的 TIC 图

## 讨 论

德谷胰岛素和地特胰岛素为化学修饰型的长效胰岛素类似物,化学结构上与人胰岛素的氨基酸序列具有高度同源性<sup>[10]</sup>。目前,Edman 降解法是人胰岛素及其类似物氨基酸序列测定的传统方法,该方法不能鉴定 N 端封闭和修饰的情况,且操作繁琐、灵敏度较低。该方法一般只检测 N 端 15 个氨基酸<sup>[11-12]</sup>,然而,除谷赖胰岛素外,人胰岛素及其类似物的 A 链和 B 链的 N 末端 15 个氨基酸皆一致,专属性较差,也无法给出德谷胰岛素和地特胰岛素的脂肪酸修饰的氨基酸信息。随着质谱技术的发展,仪器灵敏度和分辨率提高,可以利用 LC-MS/MS 技术进行氨基酸序列测定和修饰位点的定位。

本研究通过对 2 个脂肪酸侧链修饰型的长效胰岛素类似物样品进行简单的还原处理,采用“自上

而下”的策略,对样品进行还原处理,分别对 A 链和 B 链进行序列测定,前处理方面优化了之前文献<sup>[13]</sup>报道的方法,直接在酸性条件下还原处理(酸性条件下二硫键不容易复性,可不再做烷基化封闭巯基处理),经质谱二级采集和数据处理,可较好地覆盖全序列,*y*1& 离子可以直接判断 2 个胰岛素的脂肪酸侧链的修饰位点(Lys)。针对化学修饰型的长效胰岛素类似物的质谱序列测定可以设置序列覆盖率或 *b*/*y* 离子数的系统适用性条件,与无脂肪侧链修饰的其他胰岛素相比,可考虑增加修饰位点定位碎片离子检出的系统适用性。经过重复性实验、中离子精密度实验、专属性实验和耐用性实验,证明该方法具有良好的重复性、精密度、专属性和耐用性,并且还进行了还原酶切的序列测定的佐证。

本研究的方法可满足《中华人民共和国药典》2020 年版三部人胰岛素及其类似物原料各论项下

的 N 末端氨基酸序列分析需求,且本法的化学修饰型的胰岛素类似物的序列测定方法,可为该类产品的序列结构的研究方法提供借鉴和新思路。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] HIRSCH IB, JUNEJA R, BEALS JM, *et al.* The evolution of insulin and how it informs therapy and treatment choices[J]. *Endocr Rev*, 2020, 41(5): 733 - 755.
- [2] 张星艳, 李亚卓, 曾勇, 等. 三种长效基础胰岛素类似物的研究进展[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(11): 1671 - 1676.
- [3] HAVELUND S, PLUM A, RIBEL U, *et al.* The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(8): 1498 - 1504.
- [4] NASRALLAH SN, REYNOLDS LR. Insulin degludec, the new generation basal insulin or just another basal insulin? [J]. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*, 2012, 5: 31 - 37.
- [5] 尹华静, 余珊珊, 尹茂山, 等. 重组人胰岛素类似物研发进展和安全性特点[J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(21): 2578 - 2583.
- [6] JONASSEN I, HAVELUND S, HOEG-JENSEN T, *et al.* Design of the novel protraction mechanism of insulin degludec, an ultra-long-acting basal insulin[J]. *Pharm Res*, 2012, 29(8): 2104 - 2114.
- [7] HEISE T, NØRSKOV M, NOSEK L, *et al.* Insulin degludec: lower day-to-day and within-day variability in pharmacodynamic response compared with insulin glargine 300 U/mL in type 1 diabetes[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19(7): 1032 - 1039.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 43.
- [9] KANG LJ, WENG ND, JIAN WY. LC-MS bioanalysis of intact proteins and peptides[J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(1): e4633.
- [10] 王凯, 张培彪, 林明, 等. 地特胰岛素酰化工序参数优化[J]. *中国医药工业杂志*, 2021, 52(6): 794 - 797.
- [11] 田沛霖, 张国林. 重组人胰岛素原料药 N 末端氨基酸序列的测定[J]. *中国合理用药探索*, 2020, 17(12): 89 - 94.
- [12] 郭玮, 于传飞, 李萌, 等. N 端测序作为单克隆抗体常规放行分析方法的探讨[J]. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1473 - 1480.
- [13] 胡馨月, 丁晓丽, 陈莹, 等. 人胰岛素及其类似物 UPLC-MS/MS 全序列分析研究[J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(1): 13 - 22.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2022 - 09 - 21