醋酸兰瑞肽强制降解杂质的质谱结构解析及降解机制研究

温学美，潘红娟*，李 悦，陆 静
（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院有限公司，创新药物与制剂工艺国家重点实验室，上海 201203）

摘要：建立了 LC-MS 法分析醋酸兰瑞肽在氧化、高温、碱破坏条件下的强制降解样品，结果发现 8 个主要降解杂质。应用高分辨质谱（HRMS/MS）进行结构解析，同时探讨其降解机制，通过二硫苏糖醇（DTT）还原试验进一步验证杂质中单 S 及 S-S-S 结构，为该药物降解杂质谱及相关质量控制标准的研究提供参考，此外对这类以二硫桥方式成环的环肽药物的潜在降解杂质研究也提供了一定参考。

关键词：醋酸兰瑞肽；LC-MS；高分辨质谱；降解杂质；结构解析
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)05-0703-10
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.016

Mass Spectrometry Analysis and Forced Degradation Mechanism of Degradation Impurities of Lanreotide Acetate

WEN Xuemei, PAN Hongjuan*, LI Yue, LU Jing
(*State Key Lab. of New Drug & Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: An LC-MS method was established to analyze the forced degradation samples of lanreotide acetate by oxidation, high temperature and alkali destructions. The results showed that eight degradation impurities were found. High resolution mass spectrometry (HRMS/MS) was used to analyze the structures of the main degraded impurities and the degradation mechanism was also discussed. The single S and S-S-S structures in impurities were further verified by the reduction test of dithiothreitol (DTT). This paper provides a reference for the studies of the degradation impurity profile and related quality control standards of this drug. In addition, it also provides some references for the study of potential degradation impurities of some cyclic peptides ringed by disulfide bridges.

Key Words: lanreotide acetate; LC-MS; high resolution mass spectrometry; degradation impurity; structural analysis

醋酸兰瑞肽（lanreotide acetate，**1**）是一种新型八肽类长效生长抑素，是许多内分泌、神经内分泌、外分泌和旁分泌机能的肽抑制剂，临床上用于外科手术和放射治疗效果不佳的肢端肥大症患者的长期治疗[1—3]，还可用于抗肿瘤[4—6]。**1** 属于合成多肽类药物，分子式为 $C_{54}H_{69}N_{11}O_{10}S_2 \cdot xC_2H_4O_2$，游离碱的相对分子质量为 1 096.34，结构式见图 1。这类药物结构中的氨基酸残基易被修饰，发生氧化、还原、水解、脱酰胺、β 消除以及二硫键断裂与交换等一系列反应[7]，在冷冻和干燥制备过程中极易发生降解，存在诸多潜在降解杂质[8]。因此，对多肽类药物降解途径及降解杂质的系统研究有利于全面控制药物的质量，保证临床用药安全。

目前，《中华人民共和国药典》2020 年版、美国药典（USP 42）以及欧洲药典（EP 10.0）中均未收录 **1**，且尚缺乏有关 **1** 的系统降解杂质谱研究。本研究首次建立了 LC-MS 法对 **1** 降解杂质进行系统

收稿日期：2021-04-07
作者简介：温学美(1996—)，女，硕士研究生，专业方向：药物分析。
通信作者：潘红娟(1976—)，女，研究员，从事药品质量分析、质量控制以及新技术新方法在药物分析上的应用研究。
E-mail：panhongjuan@sinopharm.com

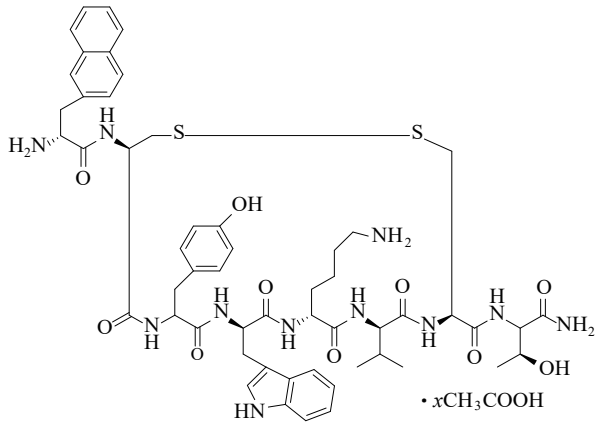


图 1　1 的化学结构式

Fig.1　Chemical Structure of **1**

性分析，对主要降解杂质进行结构推测，并初步探讨 **1** 的降解机制，为其全面的质量控制提供依据。

1　仪器与试药

3100 Detector 型液相色谱质谱联用仪和 Acquity H Class 型液相色谱仪均购于美国 Waters 公司；Vanquish Flex、Q Exactive™ Focus 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

1（本实验室自制[9]，批号 20200711-1）；二硫苏糖醇（DTT，美国 Sigma-Aldrich 公司）；甲醇、乙腈均为色谱纯，甲酸、氨水、30%过氧化氢溶液、盐酸、氢氧化钠（片状）均为分析纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 Venusil MP C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相 0.01%甲酸溶液（用氨水调至 pH 5.0）∶甲醇∶乙腈（70 ∶ 6 ∶ 24）；检测波长 220 nm；柱温 30 ℃；流速 1 ml/min；进样量 10 μl。

质谱条件：离子源 电喷雾离子源（ESI），正离子检测模式；离子扫描范围 *m/z* 50 ～ 2 000；分流比 3 ∶ 1；毛细管电压 3.2 kV；碰撞电压 50 V；离子源温度 100 ℃；脱溶剂温度 150 ℃；脱溶剂气（N_2）流量 450 L/h。

2.2　对照品溶液的配制

称取 **1** 适量，加水溶解并稀释制成每 1 ml 含 **1** 0.1 mg 的溶液，摇匀，即得。

2.3　降解试验的 LC-MS 分析

分别取适量 **1** 粉末，按以下 3 种方式氧化，获得 3 种氧化破坏样品。①固体氧化：取适量 **1**，置培养皿中，暴露于空气中约 1 个月，临用前，加水溶解并稀释成每 1 ml 含氧化固体 **1** 0.1 mg 的溶液，摇匀即得；②溶液氧化：取“**2.2**”项下的对照品溶液，开口暴露于空气中 15 d，取出即得；③过氧化氢氧化：取 **1** 适量，加入 3%过氧化氢溶液 1 ml 后，加水稀释制成每 1 ml 含 **1** 0.1 mg 的溶液，摇匀，于室温放置 24 h，即得。

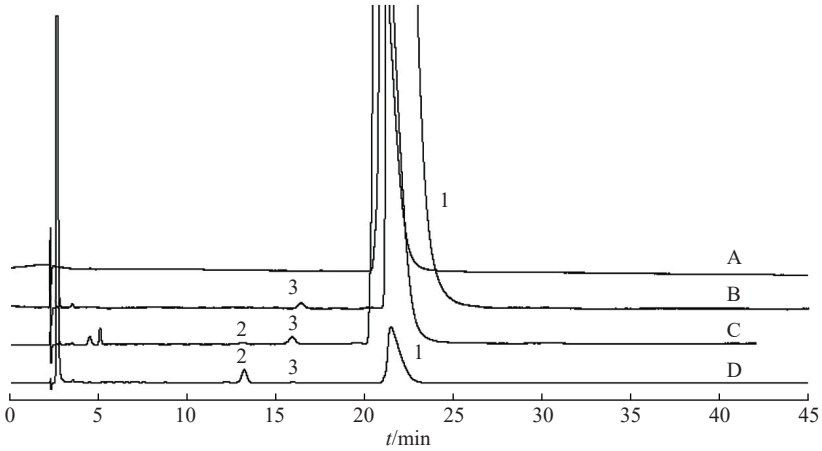
取“**2.2**”项下的对照品溶液，于 100 ℃烘箱中放置 4 h，冷却至室温，即得高温破坏样品。

取 **1** 适量，加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml 使溶解，室温放置 2 h 后，加入 0.1 mol/L 盐酸中和，并加水稀释制成每 1 ml 含 **1** 0.1 mg 的溶液，即得碱破坏样品。

将上述氧化破坏、高温破坏、碱破坏样品及“**2.2**”项下的对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进行分析，结果见图 2 ～ 3，各降解杂质情况汇总见表 1。由表 1 可知，氧化破坏试验中主要产生了 2 种氧化降解杂质（杂质 A 和 B），其中，**1** 固体暴露于空气中易氧化产生杂质 B。高温破坏和碱破坏试验均分别产生了 6 个降解杂质（杂质 C ～ H），通过对比相对保留时间，初步推测高温破坏和碱破坏试验中产生的杂质基本一致。

2.4　降解杂质的质谱解析

对“**2.3**”项下产生的降解杂质进行高分辨质谱（HRMS）分析，HRMS 分析结果见表 2。结果显示，高温破坏降解杂质和碱破坏降解杂质元素组成一一对应，进一步确证了高温破坏和碱破坏试验产生的降解杂质的一致性。杂质 E 和 H 的元素组成与 **1** 的游离碱一致，应为 **1** 的异构体；杂质 A、B、C、D、F 和 G 的元素组成均与 **1** 游离碱存在差异，其中，杂质 C、D 和 G 的元素组成相同，均比 **1** 游离碱少 1 个硫元素，三者应互为异构体（结构中部分氨基酸可能存在 L/D 构型的转化）。综上所述，**1** 的降解杂质中存在 1 组与 **1** 游离碱元素组成一致的杂质（杂质 E 和 H），4 组元素组成与 **1** 游离碱存在差异的杂质，即①杂质 A；②杂质 B；③杂质 C、D 和 G；

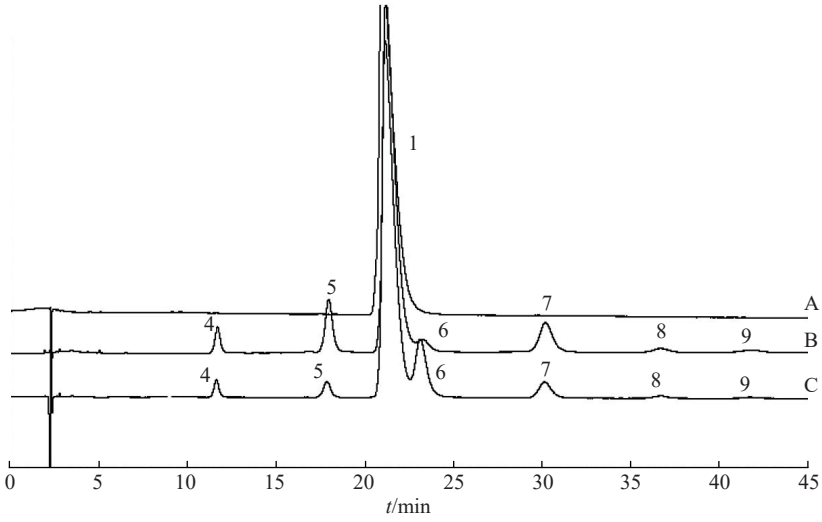


A：未破坏，B：固体氧化，C：溶液氧化，D：过氧化氢氧化

1－**1**；2－杂质 A；3－杂质 B

图 2 氧化破坏试验样品的色谱图

Fig.2 Chromatograms of the Samples in Oxidation Failure Tests



A：未破坏，B：高温破坏，C：碱破坏

1－**1**；4－杂质 C；5－杂质 D；6－杂质 E；7－杂质 F；8－杂质 G；9－杂质 H

图 3 高温、碱破坏试验样品的色谱图

Fig.3 Chromatograms of the Samples in High Temperature and Alkali Destruction Tests

④杂质 F。考虑到质谱难以对氨基酸的 D/L 构型进行有效确定，因此针对异构体不做深入研究，本研究仅对元素组成与 **1** 存在差异的 4 组杂质进行结构解析。

2.4.1 氧化降解杂质的质谱结构解析

杂质 A 的 HRMS/MS 图（图 4B）显示准分子离子峰 *m*/*z* 为 1 194.459 91（[M+H]$^+$），元素组成为 $C_{54}H_{72}O_{16}N_{11}S_2$，与 **1** 的准分子离子峰相比多了 H_2O_6。在低能碰撞诱导裂解（CID）条件下，环肽通常是抗碎裂的[10—11]，而与 **1** 的 HRMS/MS 图谱（图 4A）对比表明，杂质 A 的中等质量端碎片离子种类明显增多，离子丰度也增强，故推测该杂质具有线性肽结构。从表 3 可见，HRMS/MS 图谱中存在 3-(2- 萘基)- 丙氨酸 [β-(2-naphthyl)-Ala]、酪氨

表 1　破坏试验中降解杂质的保留时间和相对保留时间

Tab.1　Retention Time and Relative Retention Time of the Impurities Produced in Degradation Tests

破坏试验	杂质	保留时间/min	相对保留时间
固体氧化	B	16.43	0.76
溶液氧化	A	13.16	0.64
	B	15.95	0.77
过氧化氢氧化	A	13.25	0.62
	B	16.00	0.74
高温破坏	C	11.73	0.55
	D	17.99	0.85
	E	23.27	1.10
	F	30.19	1.42
	G	36.68	1.73
	H	41.75	1.97
碱破坏	C	11.67	0.55
	D	17.89	0.85
	E	23.13	1.09
	F	30.14	1.42
	G	36.68	1.73
	H	41.47	1.96

酸（Tyr）、色氨酸（Trp）、赖氨酸（Lys）的相关特征碎片及 Tyr-Trp、Trp-Lys、Lys- 缬氨酸（Val）、Tyr-Trp-Lys、Trp-Lys-Val、Tyr-Trp-Lys-Val 氨基酸片段离子，故可确定 Tyr-Trp-Lys-Val 的氨基酸连接顺序；同时未发现与半胱氨酸残基有关及 S-S 发生选择性断裂的碎片信息，进而确定二硫键已经发生了断裂。最终推测杂质 A 的结构为 3-（2- 萘基）- 丙氨酰基 -（3- 磺基）- 丙氨酰基 - 酪氨酰基 - 色氨酰基 - 赖氨酰基 - 缬氨酰基 -（3- 磺基）- 丙氨酰基 - 苏氨酰胺，是 **1** 二硫键中的 2 个硫原子被氧化成了 2 个磺酸基，从而形成的线性肽结构。线性肽在 CID 条件下会产生丰富的 b/y 系列碎片离子，而图 5 显示的 b/y 系列离子（b_2、b_3、b_4、b_5、b_6 和 y_5）进一步证明了杂质 A 的线性肽结构，也充分说明了结构中磺酸基团结构的存在，与所推测结构高度吻合。

杂质 B 的 HRMS/MS 图（图 4C）中准分子离子峰 *m*/*z* 为 1 128.462 41（$[M+H]^+$），元素组成为 $C_{54}H_{70}O_{12}N_{11}S_2$，与 **1** 的准分子离子峰相比多了 2 个 O。与 **1** 的 HRMS/MS 图（图 4A）对比可见，二者 HRMS/MS 谱图形态相似（中等质量端的碎片离子种类少、离子丰度低），可初步判定该杂质为环肽结构。表 3 显示其图谱中存在 β-（2-naphthyl）-Ala、Tyr、Trp、Lys、Thr 的相关特征碎片离子以及 Tyr-Trp、Trp-Lys、Trp-Lys-Val 氨基酸片段离子，可推测结构中除 2 和 7 位的半胱氨酸外，其他氨基酸与 **1** 一致；根据二级质谱图中 *m*/*z* 301.102 18、*m*/*z* 267.113 13 和 *m*/*z* 430.178 07 碎片离子信息，推测分别为 β-（2-naphthyl）-Ala-Cys、β-（2-naphthyl）-Ala- 脱氢丙氨酸（Dha）和 β-（2-naphthyl）-Ala-Dha-Tyr 氨基酸片段形成的 b 离子，上述离子的存在进一步证明其结构中第 2 位为半胱氨酸。综合上述信息推测，杂质 B 是 **1** 的第 7 位半胱氨酸氧化为砜基

表 2　降解杂质的高分辨质谱分析结果

Tab.2　Results of High Resolution Mass Spectrometry Analysis of the Degraded Impurities

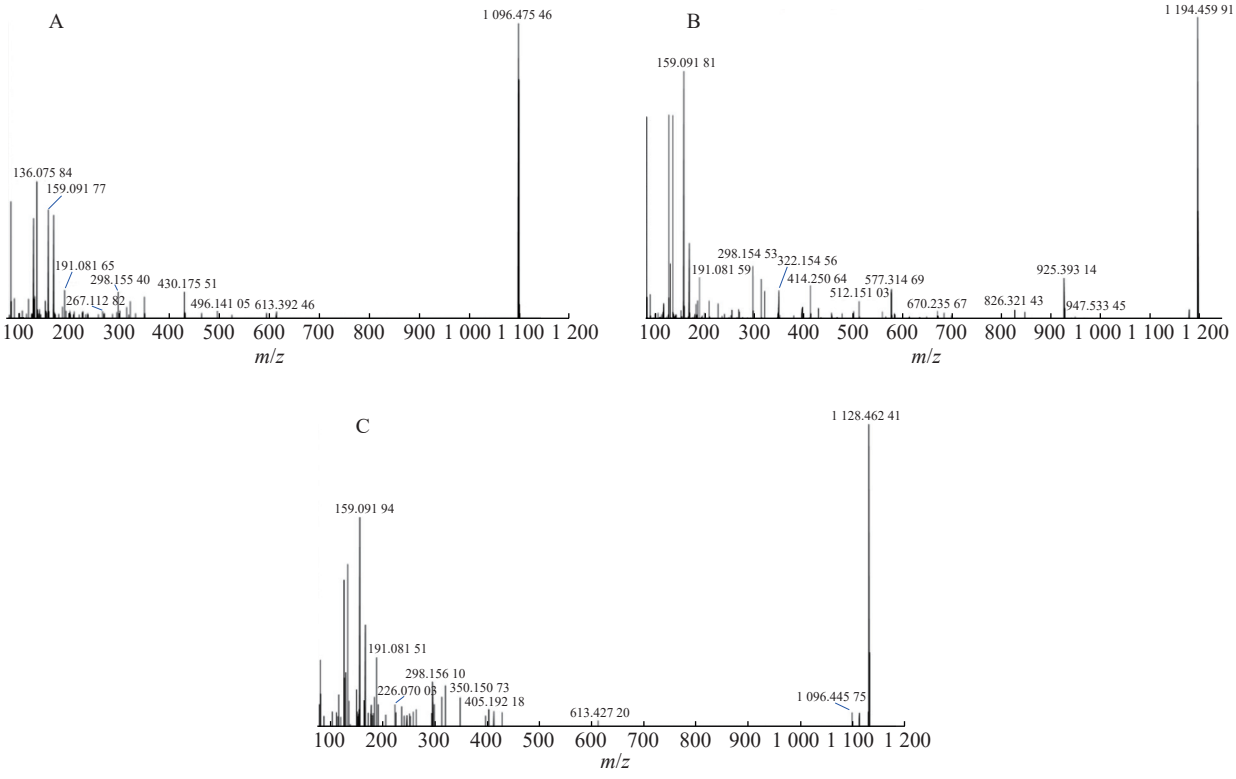
降解试验	化合物	$[M+H]^+$		误差/$\times10^{-6}$	元素组成
		m/*z*实测值	*m*/*z*理论值		
未破坏	**1**	1 096.4737 5	1 096.474 31	− 0.511	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_2$
氧化破坏	杂质A	1 194.461 07	1 194.459 44	1.362	$C_{54}H_{72}O_{16}N_{11}S_2$
	杂质B	1 128.464 77	1 128.464 13	0.563	$C_{54}H_{70}O_{12}N_{11}S_2$
高温破坏	杂质C	1 064.502 66	1 064.502 23	0.400	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S$
	杂质D	1 064.502 90	1 064.502 23	0.625	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S$
	杂质E	1 096.473 12	1 096.474 31	− 1.081	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_2$
	杂质F	1 128.447 10	1 128.446 38	0.642	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_3$
	杂质G	1 064.502 97	1 064.502 23	0.691	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S$
	杂质H	1 096.474 94	1 096.474 31	0.579	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_2$
碱破坏	杂质C	1 064.502 68	1 064.502 23	0.419	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S$
	杂质D	1 064.502 34	1 064.502 23	0.099	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S$
	杂质E	1 096.474 38	1 096.474 31	0.068	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_2$
	杂质F	1 128.447 08	1 128.446 38	0.624	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_3$
	杂质G	1 064.502 44	1 064.502 23	0.193	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S$
	杂质H	1 096.474 24	1 096.474 31	− 0.059	$C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_2$

且环化结构未断裂的产物，不考虑氨基酸的 D/L 构型，其结构为 β-(2-naphthyl)-D-Ala-Cys^{2}-Tyr-D-Trp-Lys-Val-(3-Sulfo)-Ala^{7}-Thr-NH_2。

2.4.2 高温及碱破坏降解杂质的质谱结构解析

杂质 C、D、G 为 1 组异构体，因此本研究以杂质 C 为对象，阐明质谱结构解析的过程。HRMS/MS 图（图 6B）中准分子离子峰 *m/z* 为 1 064.503 08（[M+H]$^+$），元素组成为 $C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S$，与 **1** 的准分子离子峰相比少了 1 个 S。与 **1** 的 HRMS/MS 谱图（图 6A）对比发现，二者图谱形态相似，可初步推测其为环肽结构。表 3 显示其图谱中存在 β-(2-naphthyl)-Ala、Tyr、Trp、Lys、Thr 氨基酸特征碎片离子及 Tyr-Trp、Trp-Lys 氨基酸片段离子，推测结构中除第 2 和第 7 位的半胱氨酸外，其他氨基酸与 **1** 一致；此外未发现有与半胱氨酸有关的 Dha 相关信号，可推测结构中没有 S-S 键；*m/z* 201.069 35 碎片离子是 Val-Cys'（Cys' 为 2- 氨基 -3- 磺酰亚胺 - 丙酸）氨基酸片段形成的 b 型离子。最终推测杂质 C 是 **1** 的 S-S 键脱硫形成，不考虑氨基酸的 D/L 构型，其结构为 β-(2-naphthyl)-Ala-Cys^{2}-Tyr-Trp-Lys-Val-Ala^{7}-Thr-NH_2。

杂质 F 的 HRMS/MS 图（图 6C）中准分子离子峰 *m/z* 为 1 128.445 74（[M+H]$^+$），元素组成为 $C_{54}H_{70}O_{10}N_{11}S_3$，与 **1** 的准分子离子峰相比多了 1 个 S。与 **1** 的 HRMS/MS 图（图 6A）的图谱形态一致，也可初步推测为环肽结构。表 3 显示其图谱中存在 β-(2-naphthyl)-Ala、Tyr、Trp、Lys、Thr 氨基酸特征碎片离子，可推测除 Cys 外，氨基酸种类与 **1** 一致，未发现有明显氨基酸残基发生变化修饰的现象；二级图谱中 *m/z* 267.112 7 和 *m/z* 430.175 2 的碎片离子，推测分别为 β-(2-naphthyl)-Ala-Dha 和 β-(2-naphthyl)-Ala-Dha-Tyr 氨基酸片段形成的 b 型离子，上述碎片离子的存在说明结构中存在第 2 位半胱氨酸及 S-S 键，结合 Tyr-Trp、Trp-Lys 氨基酸片段离子，可推测其氨基酸连接顺序为 β-(2-naphthyl)-Ala-Cys-Tyr-Trp-Lys。综合上述信息，推测杂质 F



A：**1**，B：杂质 A，C：杂质 B

图 4 1、杂质 A、杂质 B 的 HRMS/MS 图

Tab.4 HRMS/MS Chromatograms of **1**, Impurities A and B

的结构为 **1** 中 S-S 键中插入 1 个硫原子形成 S-S-S 结构，不考虑氨基酸的 D/L 构型，其结构为 β-(2-naphthyl)-Ala-S-thio-Cys^2-Tyr-Trp-Lys-Val-Cys^7-Thr-NH_2。

2.5 降解机制的研究

1 是一种合成环肽药物，共有 8 个氨基酸，从 N 端到 C 端的第 2 个氨基酸（Cys^2）和第 7 个氨基酸（Cys^7）以二硫键方式成环。在氧化、高温和碱性条件下，药物稳定性较差。主要降解途径为 **1** 的 2 个半胱氨酸形成的 S-S 键中，硫原子外层轨道由于缺电子，与氧原子共轭得到电子，硫醚氧化形成砜或磺酸结构，最终形成杂质 A 和 B，该反应机制与卡贝缩宫素和依来多辛中因半胱氨酸和甲硫氨酸残基在不同氧化阶段产生砜和磺酸的杂质研究结论相符[12]，故可推测以 S-S 成环的环肽药物，S-S 易被氧化生成磺酸基，同时 S-S 键发生断裂，环肽开环为线性肽，其等电点、溶解度等物理性质会发生变化，此过程也被应用在脱毛、羽毛角蛋白的开发利用中[13]。已有研究报道了蛋白质中胱氨酸的二硫键受热、碱作用后的降解历程，目前较一致的观点是 β- 消除历程[14—16]：半胱氨酸的 α 碳受 OH^- 的作用失去 H^+ 后发生 β 消除，脱去 1 个硫原子形

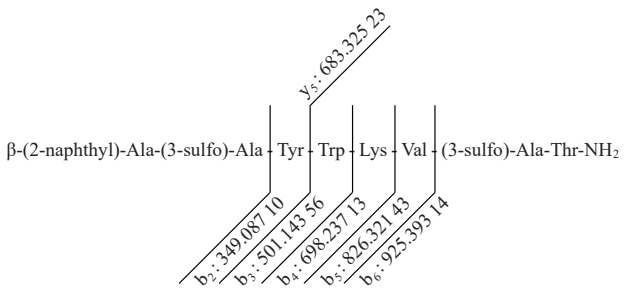
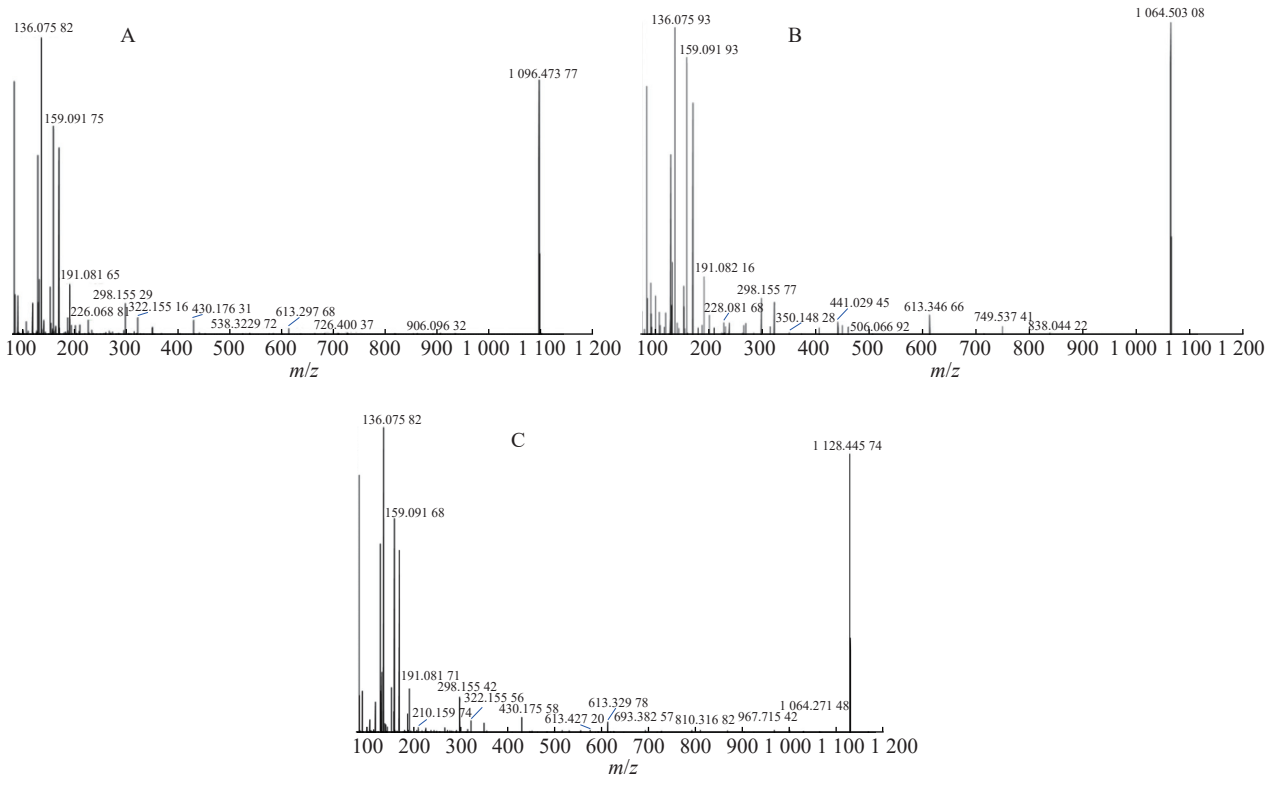


图 5　杂质 A 的 HRMS/MS 图中其余特征碎片离子结构

Tab.5　Ion Structures of the Remaining Characteristic Fragments in HRMS/MS Map of Impurity A



A：**1**，B：杂质 C，C：杂质 F

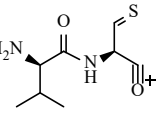
图 6　1、杂质 C、杂质 F 的 HRMS/MS 图

Fig.6　HRMS/MS Chromatograms of **1**, Impurities C and F

表 3 杂质 A、B、C、F 的 HRMS/MS 部分碎片离子解析汇总

Tab.3 Analytical Summary of Some Fragment Ions in HRMS/MS Chromatograms of Impurities A, B, C and F

	碎片	元素组成	杂质A		杂质B		杂质C		杂质F	
			m/z	误差/×10^{-6}	*m/z*	误差/×10^{-6}	*m/z*	误差/×10^{-6}	*m/z*	误差/×10^{-6}
氨基酸的种类	β-(2-naphthyl)-Ala	$C_{12}H_{12}N$	170.096 5	0.467	170.096 8	0.364	170.096 5	0.040	170.096 6	0.204
		$C_{12}H_9$	153.069 9	0.033	153.070 5	0.593	153.069 9	0.063	153.070 0	0.103
		$C_{11}H_9$	141.070 1	0.223	141.072 4	2.493	141.070 3	0.383	141.069 5	−0.337
	Tyr	$C_8H_{10}ON$	136.075 7	0.039	136.075 8	0.079	136.075 9	0.259	136.075 8	0.209
		C_8H_7O	119.049 3	0.159	119.049 5	0.379	119.049 2	0.089	119.049 3	0.189
		C_8H_8O	107.049 2	0.079	107.049 2	0.059	107.049 1	−0.021	107.049 4	0.229
		C_7H_7	91.054 3	0.093	91.054 8	0.583	91.054 3	0.073	91.054 4	0.193
	Trp	$C_{11}H_{11}ON_2$	187.087 0	0.380	187.086 8	0.210	187.087 3	0.69	187.087 2	0.610
		$C_{11}H_8ON$	170.060 1	0.090	170.060 4	0.350	170.060 4	0.34	170.096 6	0.204
		$C_{10}H_{11}N_2$	159.091 8	0.135	159.091 9	0.265	159.091 9	0.245	159.091 7	0.105
		$C_{10}H_{10}N$	144.081 2	0.434	–	–	144.080 5	−0.236	144.080 8	0.044
		C_9H_8N	130.065 1	−0.056	130.065 4	0.264	130.065 2	0.114	130.065 3	0.194
	Lys	$C_6H_{13}ON_2$	129.102 3	0.070	129.102 4	0.170	129.102 4	0.160	129.102 4	0.150
		$C_5H_{10}N$	84.080 8	0.044	84.080 9	0.134	84.080 9	0.144	84.080 9	0.124
	Thr-NH_2	$C_4H_{11}O_2N_2$	–	–	–	–	119.081 5	−0.054	119.082 0	0.496
		$C_4H_9ON_2$	–	–	–	–	–	–	101.071 1	0.181
		C_4H_6NO	–	–	84.044 5	0.130	–	–	–	–
氨基酸的连接顺序	Tyr-Trp	$C_{20}H_{20}O_3N_3$	350.148 9	−1.038	350.150 7	0.812	350.148 3	−1.638	350.149 9	−0.068
		$C_{19}H_{20}O_2N_3$	322.154 6	−0.443	322.157 3	2.317	322.155 6	1.847	322.155 6	0.029
	Trp-Lys	$C_{17}H_{23}O_2N_4$	315.181 3	−0.282	315.182 9	1.358	315.181 3	−0.252	315.183 3	1.728
		$C_{17}H_{20}O_2N_3$	298.154 5	−0.473	298.156 1	1.097	298.155 8	0.857	298.155 4	0.307
	Lys-Val	$C_{11}H_{22}O_2N_3$	228.171 6	0.897	–	–	–	–	–	–
		$C_{10}H_{22}ON_3$	200.175 3	−0.449	–	–	–	–	–	–
	Tyr-Trp-Lys	$C_{26}H_{32}O_4N_5$	478.246 0	1.099	–	–	–	–	–	–
	Trp-Lys-Val	$C_{22}H_{32}O_3N_5$	414.250 6	0.674	414.251 8	1.874	–	–	–	–
	Tyr-Trp-Lys-Val	$C_{31}H_{41}O_5N_6$	577.314 7	1.395	–	–	–	–	–	–
与S-S键相关的碎片	β-(2-naphthyl)-Ala-Cys	$C_{16}H_{17}O_2N_2S$	–	–	301.102 2	1.645	–	–	–	–
	β-(2-naphthyl)-Ala-Dha	$C_{16}H_{15}O_2N_2$	–	–	267.113 1	1.235	–	–	267.112 7	−0.114
	β-(2-naphthyl)-Ala-Dha-Tyr	$C_{25}H_{24}O_4N_3$	–	–	430.178 1	4.509	–	–	430.175 2	−0.973
	Val-Cys'[1)]	$C_8H_{13}O_2N_2S$	–	–	–	–	201.069 4	0.125	–	–

注：[1)]Val-Cys'为 

成半胱氨酸的硫阴离子和脱水丙氨酸，脱水丙氨酸会和半胱氨酸的硫阴离子进一步发生交联生成羊毛硫氨酸。由此推测：**1** 在高温或碱性条件下，α 碳受 OH^- 的作用失去 H^+，经过脱水及进一步脱硫后形成杂质 C、D、G（不考虑氨基酸构型），此外，**1** 脱水后会与先前生成羊毛硫氨酸时脱落的硫原子同时反应生成杂质 F（反应机制见图 7）。

杂质 F 为 S-S-S 结构，目前药物中未见有类似结构杂质的相关文献，但经 Reaxys 数据库验证，存在类似结构化合物（如 CAS 号为 3658-80-8、182192-90-1、94839-53-9），故本研究采用 DTT 还原反应对上述结构进一步验证。取高温破坏样品加入 1 mol/L DTT 20 μl，在 NH_4HCO_3 碱性条件下，经 56 ℃高温反应 40 min 后进行 LC-MS 分析，结果发现杂质 C、D、G 未发生变化，而含 S-S 的 **1**、杂质 E、杂质 H 以及含 S-S-S 的杂质 F 均消失，同时在保留时间 30 min 左右明显增加了相对分子质量为 1 097 的峰，应为还原后线性结构的 **1**，试验结

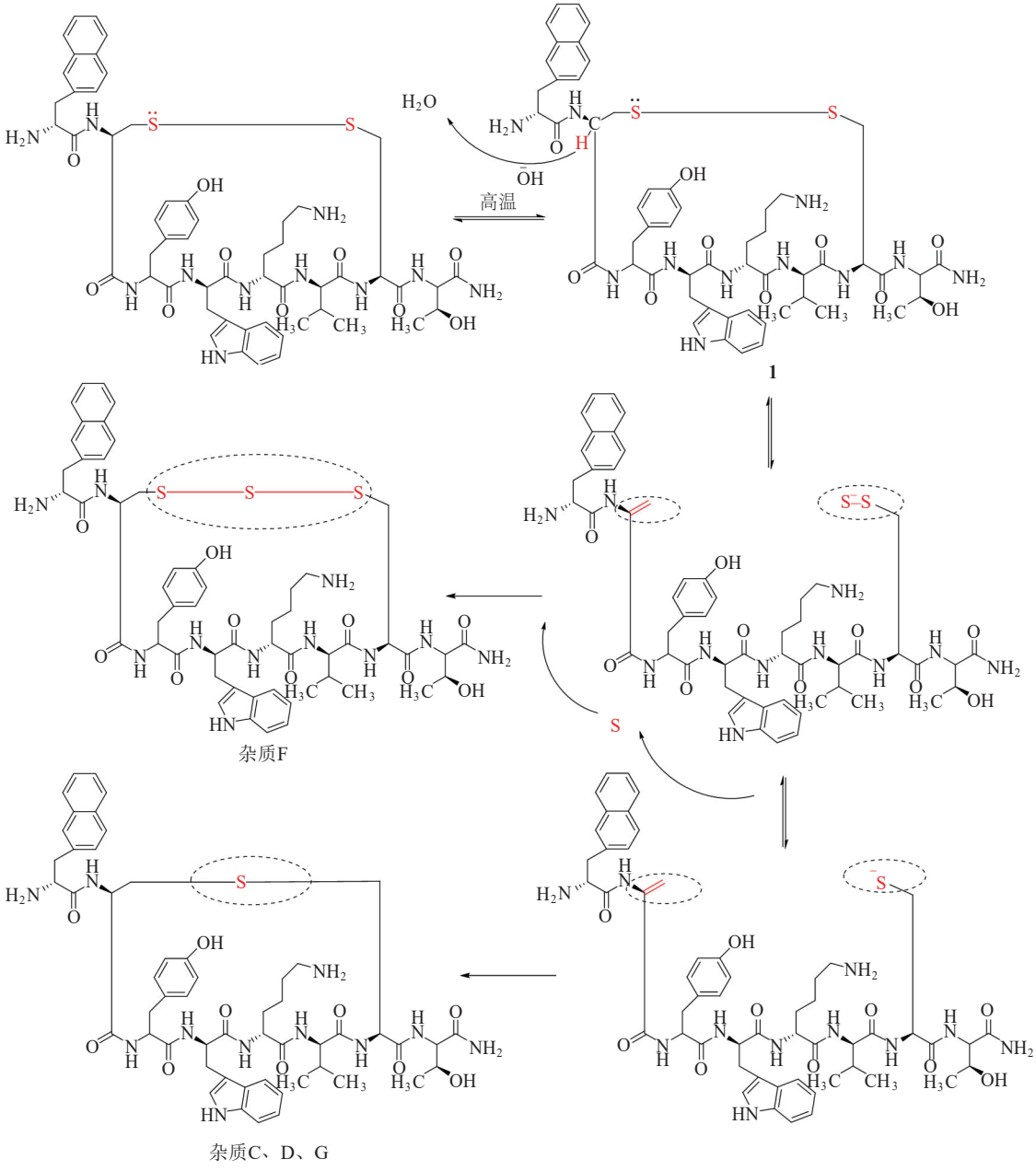


图 7　1 的高温及碱破坏降解机制

Fig.7　Degradation Mechanism of High Temperature and Alkali Destructions of **1**

果与所推测的杂质结构相吻合。

3　讨论

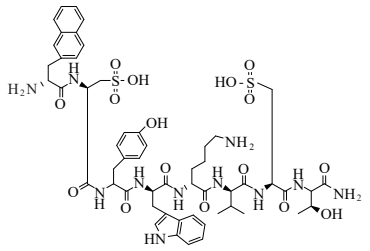
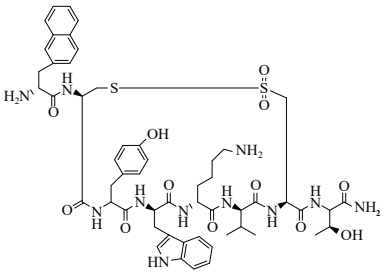
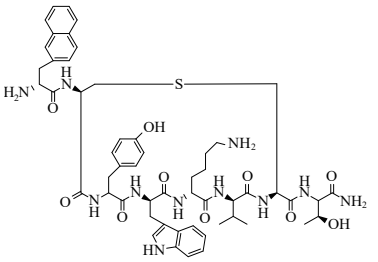
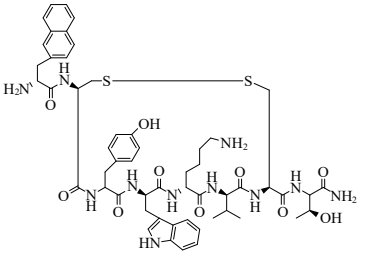
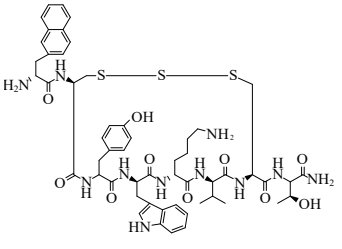
多肽药物的杂质谱复杂，而杂质谱中的降解杂质是决定多肽药物下游制剂安全性的重要因素，强制降解试验作为杂质谱研究中的一种辅助手段，可明确杂质产生与环境因素之间的相互影响信息，为原料药工艺、贮存及包材选择提供指导信息[17]。串联质谱在不稳定多肽药物有关物质分析方面具有独特的优势，即在不得到纯杂质的情况下，可给出杂质的一级甚至多级质谱信息，从而获得该杂质的相对分子质量及序列信息，为相关肽的定性和结构解析提供依据。

本研究采用 LC-MS 法对 **1** 及其强制降解（氧化、高温及碱破坏）样品进行分析，通过 HRMS/

MS，结合高分辨元素组成和二级质谱图对降解杂质进行结构解析（见表 4）。**1** 的 S-S 键易被氧化产生砜和磺酸结构，经高温及碱破坏，S-S 键降解成单 S 及 S-S-S 结构。通过设计 DTT 还原试验，进一步验证了存在含单 S 及 S-S-S 结构的降解杂质的可能。本研究仅针对降解杂质的一级结构（氨基酸

表 4 降解杂质质谱结构推测汇总（不考虑氨基酸的 D/L 构型）

Tab.4 Summary of Structure Speculation of Degraded Impurities by Mass Spectrometry (Regardless of Amino Acid D/L Configurations)

降解杂质	化合物名称	化学结构式
杂质A	3-(2-萘基)-丙氨酰基-(3-磺基)-丙氨酰基-酪氨酰基-色氨酰基-赖氨酰基-缬氨酰基-(3-磺基)-丙氨酰基-苏氨酰胺	
杂质B	3-(2-萘基)-丙氨酰基-半胱氨酰基-酪氨酰基-色氨酰基-赖氨酰基-缬氨酰基-*S*-硫代磺基-丙氨酰基-L-苏氨酰胺，(环2～7)二硫化物	
杂质C、D、G	3-(2-萘基)-丙氨酰基-半胱氨酰基-酪氨酰基-色氨酰基-赖氨酰基-缬氨酰基-丙氨酰基-苏氨酰胺，环(2～7)硫化物	
杂质E、H	3-(2-萘基)-丙氨酰基-半胱氨酰基-酪氨酰基-色氨酰基-赖氨酰基-缬氨酰基-半胱氨酰基-苏氨酰胺，环(2～7)二硫化物	
杂质F	3-(2-萘基)-丙氨酰基-*S*-硫代半胱氨酰基-酪氨酰基-色氨酰基-赖氨酰基-缬氨酰基-半胱氨酰基-苏氨酰胺，环(2～7)三硫化物	

序列）进行研究，未明确组成氨基酸的 D/L 构型，后期将进一步制备杂质，结合核磁、红外等其他方法对结构进行确证，并根据需要通过化学合成等多种方法明确杂质中氨基酸的 D/L 构型。

参考文献：

[1] BURNESS C B, DHILLON S, KEAM S J. Lanreotide Autogel®: a review of its use in the treatment of patients with acromegaly [J]. *Drugs*, 2014, **74**(14): 1673-1691.

[2] PANDIT A, FAY N, BORDES L, *et al*. Self-assembly of the octapeptide lanreotide and lanreotide-based derivatives: the role of the aromatic residues [J]. *J Pept Sci*, 2008, **14**(1): 66-75.

[3] 张琳琳. 醋酸兰瑞肽(1anreotide acetate)[J]. 中国药物化学杂志, 2008, **18**(1): 80.

[4] BASUROY R, SRIRAJASKANTHAN R, PRACHALIAS A, *et al*. The investigation and management of gastric neuroendocrine tumours [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, **39**(10): 1071-1084.

[5] SALVATORI R, WOODMANSEE W W, MOLITCH M, *et al*. Lanreotide extended-release aqueous-gel formulation, injected by patient, partner or healthcare provider in patients with acromegaly in the United States: 1-year data from the SODA registry [J]. *Pituitary*, 2014, **17**(1): 13-21.

[6] 程　欣. 基于醋酸兰瑞肽的纳米载药系统的制备及其抗肿瘤性能研究[D]. 秦皇岛: 燕山大学硕士学位论文, 2020.

[7] 李治国, 高　静, 郑爱萍. 提高蛋白质, 多肽类药物稳定性的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, **44**(11): 79-84.

[8] 原国家食品药品监督管理局. 合成多肽药物药学研究技术指导原则[EB/OL]. (2007-10-23)[2021-03-20]. https://www. chinacourt. org/law/detail/2007/10/id/122520. shtml.

[9] 姬胜利, 殷金岗, 王广胜, 等. 一种兰瑞肽的固相合成方法: 中国: 108059667A [P]. 2018-02-10.

[10] MORMANN M, EBLE J, SCHWOPPE C, *et al*. Fragmentation of intra-peptide and inter-peptide disulfide bonds of proteolytic peptides by nanoESI collision-induced dissociation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, **392**(5): 831-838.

[11] YUN C, QIAO S L, WANG C. Fragmentation of peptides with intra-chain disulfide bonds in triple quadrupole mass spectrometry and its quantitative application to biological samples [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2009, **288**(1): 68-74.

[12] 胡玉玺, 蒋　煜, 韩天娇, 等. 合成多肽药物质控及杂质谱研究[J]. 中国新药杂志, 2018, **27**(5): 502-508.

[13] 许　伟, 张宗才, 戴　红. 氧化还原剂辅助山羊皮酶脱毛技术的研究[J]. 中国皮革, 2006, **35**(19): 39-41.

[14] 陈　忱, 何雄飞, 曾润颖. 羽毛角蛋白提取工艺及应用研究现状[J]. 生物学杂志, 2015, **32**(4): 73-76.

[15] 单志华, 李　晶, 邵双喜, 等. 清洁技术从基础做起——脱毛技术进步的思考[J]. 中国皮革, 2010, **39**(21): 26-29.

[16] 单志华. 碱法脱毛中碱与毛蛋白的反应机理[J]. 皮革科学与工程, 1995, **5**(1): 22-27.

[17] 杨长花, 王月茹, 刘　峰, 等. UPLC-Q-TOF-MS研究依拉地平原料药的降解杂质[J]. 华西药学杂志, 2019, **34**(3): 286-290.