

液相色谱-质谱联用鉴定抗菌肽 Cbf-14 凝胶的有关物质

霍怡彤¹, 徐柯卉¹, 陆宇婷¹, 马菱蔓², 周长林², 杭太俊¹, 宋 敏^{1*}

(¹中国药科大学药学院,南京 211198; ²中国药科大学生命科学与技术学院,南京 211198)

摘要 多肽 Cbf-14 是由 14 个氨基酸组成的新型抗菌肽。采用优化的反相高效液相色谱-电喷雾正离子化-四极杆飞行时间串联质谱(LC-ESI-QTOF/MS)检测方法,Agilent ZORBAX SB-Phenyl(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm)色谱柱,以乙腈-20 mmol/L 甲酸铵水溶液(甲酸调节 pH 为 3.0)为流动相进行梯度洗脱,对 Cbf-14 凝胶中的有关物质进行了分离鉴定。在所建立的分析条件下,Cbf-14 及其有关物质分离良好,检测并鉴定出 Cbf-14 凝胶及其强制降解试验样品中 24 个主要有关物质,其中 5 个为制剂生产工艺杂质,19 个为降解产物,分析了有关物质的来源和多肽制剂的稳定性,为其生产工艺优化、贮存条件制定和质量控制提供了参考依据。

关键词 抗菌肽 Cbf-14 凝胶;有关物质;结构鉴定;液相色谱-质谱联用

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)05-0591-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20220509

引用本文 霍怡彤,徐柯卉,陆宇婷,等.液相色谱-质谱联用鉴定抗菌肽 Cbf-14 凝胶的有关物质[J].中国药科大学学报,2022,53(5):591–598.

Cite this article as: HUO Yitong, XU Kehui, LU Yuting, et al. Identification of the related substances of antimicrobial peptide Cbf-14 gel by LC-MS[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(5): 591–598.

Identification of the related substances of antimicrobial peptide Cbf-14 gel by LC-MS

HUO Yitong¹, XU Kehui¹, LU Yuting¹, MA Lingman², ZHOU Changlin², HANG Taijun¹, SONG Min^{1*}

¹School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

²School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Cbf-14 is a novel antimicrobial peptide composed of 14 amino acids. An optimized reversed phase high-performance liquid chromatographic method with electrospray-ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-ESI-QTOF/MS) method was developed for separation, identification and characterization of structurally related peptide impurities in Cbf-14 gel. Chromatographic separation was carried out on an Agilent ZORBAX SB-Phenyl column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), with acetonitrile-20 mmol/L ammonium formate buffer (adjusted to pH 3.0 with formic acid) as eluent using gradient elution. Under the established conditions, Cbf-14 and its structurally related peptide impurities were well separated; and a total of 24 impurities were detected and identified, of which 5 were impurities in the preparation manufacturing process and 19 were stressed products. Based on high resolution mass spectrometry analysis, the origins and formation mechanisms of these impurities were located. The obtained results are useful for the establishment of the manufacturing process, storage condition and quality control of Cbf-14 gel.

Key words antimicrobial peptide Cbf-14 gel; related substances; structural identification; LC-MS

随着抗生素的滥用,病原菌进化速度加快,多重耐药菌大量出现。近年来,抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)被认为是现有抗生素最有潜力的

替代品,与传统抗生素相比,AMPs 具有相对分子质量小、抗菌机制广、热稳定性好、毒性低等优点。由于其独特的抗菌机制和多样的生物活性,AMPs

的研究和应用已成为生物制药领域的热点^[1-2]。

Cbf-14是一种由14个氨基酸组成的阳离子抗菌肽,是根据天然抗菌肽cathelicidin-BF(BF-30)的序列利用生物信息学设计获得的多肽突变体^[3-5]。其氨基酸序列为Arg-Leu-Leu-Arg-Lys-Phe-Phe-Arg-Lys-Leu-Lys-Lys-Ser-Val(RLLRKFFRKLKKS),相对分子质量为1819.33,等电点为12.31。Cbf-14具有抵抗耐药病原菌感染的作用,还可用于治疗真菌感染^[5-6]。获得批准的专利制剂Cbf-14凝胶用于术后创面的护理及皮肤消毒处理,具有优异的杀菌活性,且无毒、无刺激。多肽药物的稳定性一直是备受关注的问题,其中的有关物质可能产生不良反应甚至毒性,因此Cbf-14凝胶整个生产过程中的杂质谱研究至关重要^[7-10]。

本研究采用液相色谱-高分辨率质谱(LC-HRMS)联用技术,分离和鉴定Cbf-14凝胶中的肽类有关物质,共鉴定出5个制剂生产工艺杂质和19个强制降解产物,以上24个杂质均未见文献报道。结合母离子及碎片离子的相对分子质量和元素组成分析,本研究阐明了以上杂质的来源和形成机制,为Cbf-14凝胶中的有关物质检查和质量控制提供了参考依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

抗菌肽Cbf-14醋酸冻干粉(纯度≥99%,南京金斯瑞生物科技有限公司,批号:C660QFK300-1/20110501-DG01),甘油、甲基纤维素(上海阿拉丁试剂有限公司);甲酸铵、甲酸(AR级,南京化学试剂有限公司);乙腈(HPLC级,德国默克公司);去离子水(市售娃哈哈纯净水)。

1.2 仪器

岛津LCMS-9030四极杆飞行时间质谱仪、Lab-Solutions数据处理系统(日本岛津公司);BS21S分析天平(德国Sartorius公司)。

2 方法

2.1 液相色谱条件

Agilent Zorbax SB-Phenyl色谱柱(150 mm×4.6 mm,3.5 μm);流动相A相为20 mmol/L甲酸铵缓冲溶液(用甲酸调节pH至3.0),B相为乙腈,线性

梯度洗脱(A:B):0 min(95:5)→30 min(80:20)→50 min(40:60)→52 min(95:5)→60 min(95:5),流速1.0 mL/min,柱温40 °C,进样量20 μL。

2.2 质谱条件

高分辨Q-TOF/MS测定,NaI溶液(400 μg/mL)准确质量校正。电喷雾正离子化,喷雾电压4.0 kV,雾化气压力230 kPa,流量3 L/min,接口温度300 °C,加热气流量10 L/min,干燥气流量10 L/min,氩气CID碰撞能量5~50 eV,扫描范围m/z 50~2 000。

2.3 样品配制

Cbf-14凝胶:将Cbf-14醋酸冻干粉20 mg和甘油100 mg溶解于无菌纯净水860 mg中,充分混匀并完全溶解。然后将甲基纤维素20 mg搅拌加入上述溶液中,溶胀均匀后,离心除去气泡即得含量为2%的Cbf-14凝胶。

供试品溶液:取Cbf-14凝胶适量(约相当于Cbf-14 10 mg),精密称定,置10 mL量瓶中,加水适量,超声使Cbf-14凝胶溶解,再以水稀释至刻度,摇匀,以0.45 μm水系滤膜过滤,取续滤液即得质量浓度为1 mg/mL的供试品溶液。精密量取上述溶液适量,加流动相定量稀释,配制0.5%的自身对照溶液。

2.4 药物稳定性

查阅相关文献^[11],本研究对Cbf-14凝胶进行了酸、碱、氧化、高温和光照加速破坏,考察Cbf-14凝胶潜在的降解杂质。强制降解实验操作如下:取Cbf-14凝胶适量(约相当于Cbf-14 10 mg),加1.0 mol/L盐酸溶液1 mL并于60 °C水浴放置2 h,或加1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL并于室温放置2 h,或加3%过氧化氢溶液1 mL并于60 °C水浴放置2 h,或于40 °C烘箱中放置1 h,或于强光照射(1.62×10^6 lx·h, 324 W·h/m², 25 °C)下放置10 d分别处理。酸碱处理溶液放置室温后分别用同浓度的酸碱溶液中和,高温干燥样品和强光照射样品分别加水适量,振摇使溶解。以上强制降解溶液分别加水稀释至10 mL,以0.45 μm水系滤膜过滤,取续滤液作为Cbf-14质量浓度约为1 mg/mL的强制降解试验溶液。同时采用空白溶液进行平行对照试验。

3 结 果

3.1 有关物质检查结果

对于含有芳香族氨基酸的多肽类物质的分析, 苯基柱是一种独特的选择, 因为它具有疏水相互作用和 $\pi-\pi$ 电子相互作用的双重分离机制, 使其显示出与烷基键合硅胶固定相不同的特性, 可以替代 ODS 和 C4 分析多肽和蛋白质。参考各国药典中关于胰岛素、醋酸奥曲肽、鲑降钙素和醋酸亮丙瑞林有关物质的分析方法, 离子对色谱法最为常用。但是, 这种分离模式不适用于 LC-MS 联用技术。本研究开发了一种使用挥发性流动相的液相色谱质谱联用方法, 用于在线分离和鉴定 Cbf-14 凝胶制剂中的有关物质, 并采用多级液相梯度以减少分析时间。

本研究建立了适用于 Cbf-14 有关物质分离检

查和 MS 鉴定的反相 HPLC 方法。供试品溶液及其强制降解试验溶液有关物质的 HPLC 检查结果见图 1。按保留时间由小到大顺序对含量大于 0.5% 的主要有关物质进行识别和编号, 共分离并检出 24 个主要有关物质, 其中有关物质 19~23 为制剂生产工艺杂质, 有关物质 1~18 和 24 为降解产物。

强制降解试验结果表明, 本品对强酸、强碱、氧化、高温条件、强光照射均不稳定。在酸破坏条件下产生 13 个主要降解产物(有关物质 1~11、15、18, 图 1-a); 在碱破坏条件下产生 4 个主要降解产物(有关物质 12~14、16, 图 1-b); 在氧化破坏条件下产生 2 个主要降解产物(有关物质 17、24, 图 1-c), 有关物质 24 的含量较大; 在高温条件下产生 4 个主要降解产物(有关物质 12~14、16, 图 1-d); 在光照条件下产生 1 个主要降解产物(有关物质 10, 图 1-e)。

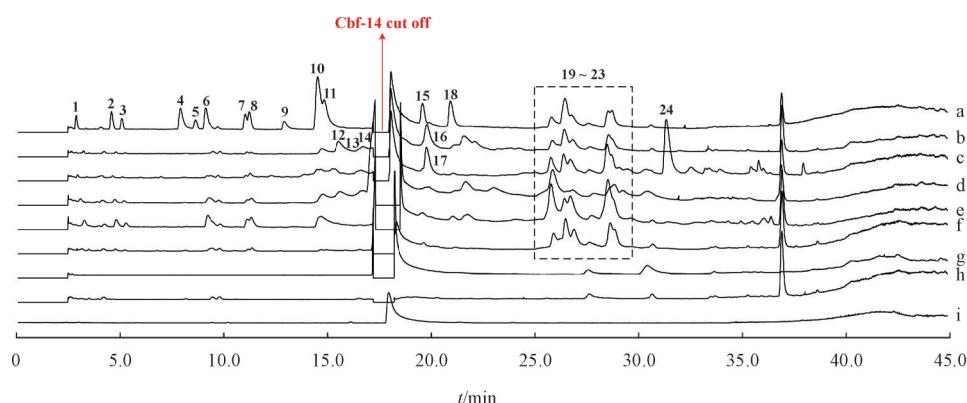


Figure 1 Total ion chromatograms of Cbf-14 gel and its stressed test solutions

a: Acid; b: Alkaline; c: Oxidation; d: Pyrolysis; e: Photolysis; f: Cbf-14 gel; g: Cbf-14 API; h: Blank gel; i: 0.5% Reference

3.2 Cbf-14 质谱裂解规律

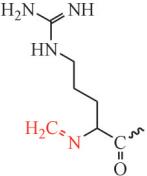
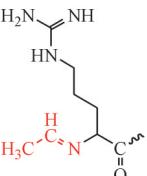
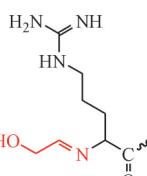
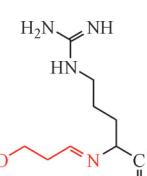
使用 HPLC-QTOF/MS 对 Cbf-14 及其有关物质在 ESI+ 模式下进行质谱分析, 质谱数据汇总见表 1。Cbf-14 的 $[M + 3H]^{3+}$ 离子的精确质量数为 m/z 607.0688, 与离子式 $[C_{86}H_{154}N_{27}O_{16}]^{3+}$ 相应。Cbf-14 的 MS/MS 二级质谱图见图 2-a, Cbf-14 的 MS/MS 主要特征碎片为 m/z 880.5747、735.4827、601.3934、574.0459、539.0317 和 533.3563。 m/z 880.5747 ($[C_{85}H_{148}N_{24}O_{16}]^{2+}$) 是由母离子中性丢失 1 分子胍 (CH_5N_3) 形成的; m/z 539.0317 ($[C_{78}H_{138}N_{25}O_{12}]^{3+}$) 归因于母离子 C 端的 Ser-Val 残基的中性丢失, 在此基础上脱去 1 分子 NH_3 , 形成 m/z 533.3563

($[C_{78}H_{135}N_{24}O_{12}]^{3+}$); m/z 574.0459 ($[C_{82}H_{145}N_{24}O_{16}]^{3+}$) 是由母离子中性丢失 1 分子 $C_4H_9N_3$, 表明 Cbf-14 分子中存在精氨酸残基。

3.3 Cbf-14 凝胶中工艺杂质的结构鉴定

为了研究 Cbf-14 凝胶制剂的工艺相关杂质, 对 Cbf-14 原料药和空白凝胶辅料进行对比分析, 如图 1 所示, 原料药和空白辅料中均未检出含量大于 0.5% 的杂质峰, Cbf-14 凝胶在 24.256 min 至 31.507 min 处检出一系列含量在 0.5% 左右的杂质峰, ESI(+)-QTOF-MS 共提取出 5 个不同的相对分子质量, 编号为杂质 19~23, 推测以上杂质为工艺杂质。

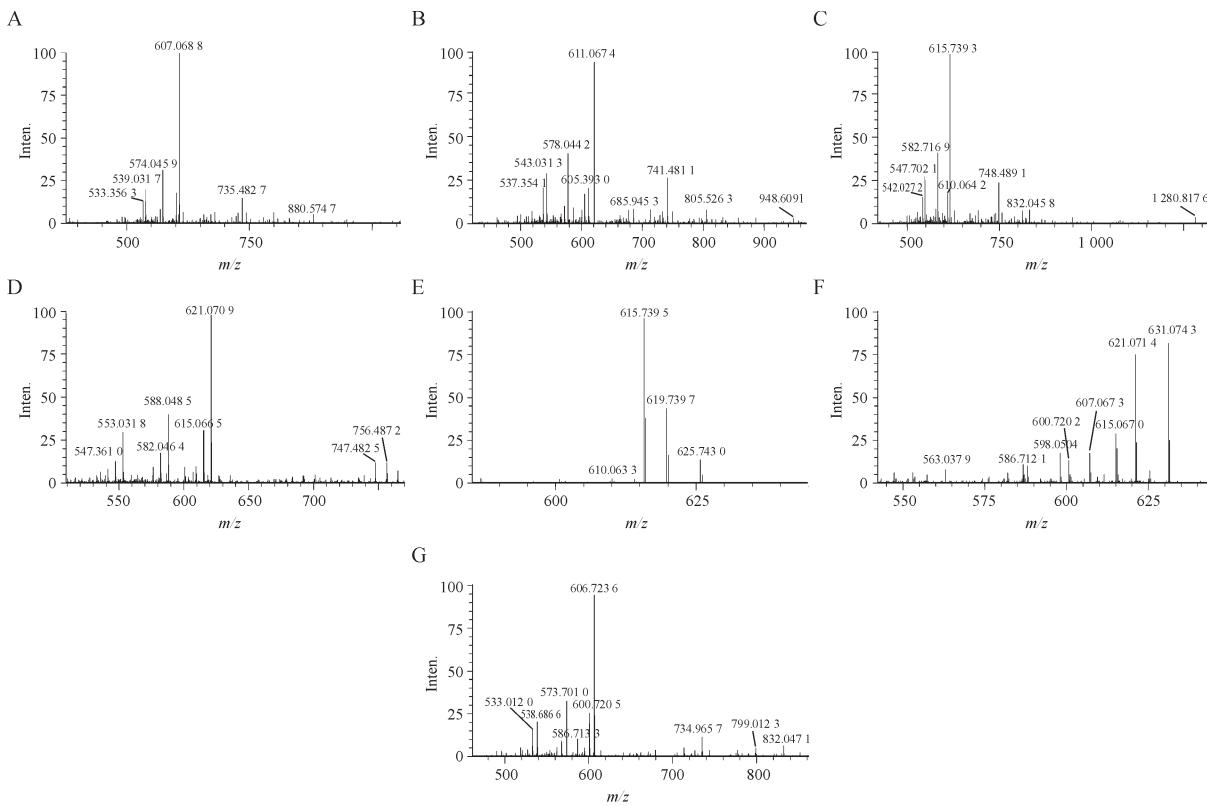
Table 1 Related substances in Cbf-14 gel identified by LC-QTOF/MS

Impurity No.	Abbreviated name	<i>m/z</i>	Ion	Formula	Diff.(×10 ⁻⁶)	Sequence	Origins
1	Cbf-14(1-5)	343.245 2	[M + 2H] ²⁺	C ₃₀ H ₆₀ N ₁₂ O ₆	-0.058	RLLRK	Dr
2	Cbf-14(7-14)	503.331 8	[M + 2H] ²⁺	C ₄₇ H ₈₄ N ₁₄ O ₁₀	-0.397	FRKLKKSV	Dr
3	Cbf-14(1-4)	557.387 3	[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₄₈ N ₁₀ O ₅	-1.471	RLLR	Dr
4	Cbf-14(4-14)	718.963 9	[M + 2H] ²⁺	C ₆₈ H ₁₁₇ N ₂₁ O ₁₃	-0.431	RKFFRKLKKSV	Dr
5	Cbf-14(1-3)	401.286 5	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₃₆ N ₆ O ₄	-1.271	RLL	Dr
6	Cbf-14(5-14)	640.913 4	[M + 2H] ²⁺	C ₆₂ H ₁₀₅ N ₁₇ O ₁₂	-0.421	KFFRKLKKSV	Dr
7	Cbf-14(1-6)	416.779 5	[M + 2H] ²⁺	C ₃₉ H ₆₉ N ₁₃ O ₇	0.384	RLLRKFF	Dr
8	Cbf-14(6-14)	576.865 9	[M + 2H] ²⁺	C ₅₆ H ₉₃ N ₁₅ O ₁₁	-0.468	FFRKLKKSV	Dr
9	Cbf-14(3-14)	517.339 9	[M + 3H] ³⁺	C ₇₄ H ₁₂₈ N ₂₂ O ₁₄	-0.019	LRKFFRKLKKSV	Dr
10	Cbf-14(1-12)	545.035 7	[M + 3H] ³⁺	C ₇₈ H ₁₃₇ N ₂₅ O ₁₃	1.651	RLLRKFFRKLKK	Dr
11	Cbf-14(1-13)	574.045 8	[M + 3H] ³⁺	C ₈₁ H ₁₄₂ N ₂₆ O ₁₅	0.505	RLLRKFFRKLKK	Dr
12	Cbf-14 isomer 1	607.068 2	[M + 3H] ³⁺	C ₈₀ H ₁₅₁ N ₂₇ O ₁₆	-0.181	RLLRKFFRKLKKSV	Dr
13	Cbf-14 isomer 2	607.068 8	[M + 3H] ³⁺	C ₈₀ H ₁₅₁ N ₂₇ O ₁₆	0.774	RLLRKFFRKLKKSV	Dr
14	Cbf-14 isomer 3	607.068 8	[M + 3H] ³⁺	C ₈₀ H ₁₅₁ N ₂₇ O ₁₆	0.774	RLLRKFFRKLKKSV	Dr
API	Cbf-14	607.068 8	[M + 3H] ³⁺	C ₈₀ H ₁₅₁ N ₂₇ O ₁₆	0.774	RLLRKFFRKLKKSV	—
15	Cbf-14(1-8)	568.364 1	[M + 2H] ²⁺	C ₅₄ H ₉₀ N ₁₈ O ₉	-0.106	RLLRKFFR	Dr
16	Cbf-14 isomer 4	607.067 2	[M + 3H] ³⁺	C ₈₀ H ₁₅₁ N ₂₇ O ₁₆	-1.796	RLLRKFFRKLKKSV	Dr
17	Cbf-14(2-14)	555.034 5	[M + 3H] ³⁺	C ₈₀ H ₁₃₉ N ₂₃ O ₁₅	-0.144	LLRKFFRKLKKSV	Dr
18	Cbf-14(1-10)	688.953 5	[M + 2H] ²⁺	C ₆₆ H ₁₁₃ N ₂₁ O ₁₁	-0.232	RLLRKFFRKL	Dr
19	<i>N</i> ² -methylene-Cbf-14	611.067 6	[M + 3H] ³⁺	C ₈₇ H ₁₅₁ N ₂₇ O ₁₆	-1.173		Pr
20	<i>N</i> ² -ethylidene-Cbf-14	615.739 4	[M + 3H] ³⁺	C ₈₈ H ₁₅₃ N ₂₇ O ₁₆	-1.169		Pr
21	<i>N</i> ² -(2-hydroxyethylidene)-Cbf-14	621.071 0	[M + 3H] ³⁺	C ₈₈ H ₁₅₃ N ₂₇ O ₁₇	-1.270		Pr
22	<i>N</i> ² -(3-hydroxypropylidene)-Cbf-14	625.743 0	[M + 3H] ³⁺	C ₈₉ H ₁₅₅ N ₂₇ O ₁₇	-1.183		Pr

(Continued)

Impurity No.	Abbreviated name	<i>m/z</i>	Ion	Formula	Diff.($\times 10^{-6}$)	Sequence	Origins
23	N^2 -(2,3-dihydroxypropylidene)-Cbf-14	631.075 1	[M + 3H] $^{3+}$	$C_{89}H_{155}N_{27}O_{18}$	-0.381		Pr
24	[1-AIMAOPA]Cbf-14	606.723 6	[M + 3H] $^{3+}$	$C_{86}H_{148}N_{26}O_{17}$	-1.302		Dr

Pr: Process related substance; Dr: Degradation related substance; AIMAOPA: 5-[(Aminoiminomethyl)amino]-2-oxopentanoic acid

**Figure 2** Product mass spectra of Cbf-14 gel and impurities 19~24

A: Cbf-14 (m/z 607.068 8); B: Impurity 19 (m/z 611.067 4); C: Impurity 20 (m/z 615.739 4); D: Impurity 21 (m/z 621.071 0); E: Impurity 22 (m/z 625.743 0); F: Impurity 23 (m/z 631.074 3); G: Impurity 24 (m/z 606.723 6)

3.3.1 一级质谱数据解析 采用高分辨 QTOF/MS 测定各有关物质的母离子及子离子的相对分子质量和元素组成，并与 Cbf-14 的质谱特征进行对比分析，鉴定出各主要有关物质的结构。杂质 19~23 的一级质谱图见图 3，质谱数据汇总见表 1。分析一级质谱信息，共提取出 10 种不同的加合物离子。其中，611.067 2、615.739 5、621.070 9、

625.743 0、631.074 3 为 $[M + 3H]^{3+}$ 离子，916.100 8、923.109 2、931.106 4、938.114 5、946.111 4 为相应的 $[M + 2H]^{2+}$ 离子。

ESI(+) -QTOF-MS 测得杂质 19 $[M + 3H]^{3+}$ 的 m/z 为 611.067 2，与分子式 $C_{87}H_{151}N_{27}O_{16}$ 相应，其相对分子质量为 1830.183 2，与 Cbf-14 相比，其相对分子质量增加 12，与 Cbf-14 分子结构中引入一个亚

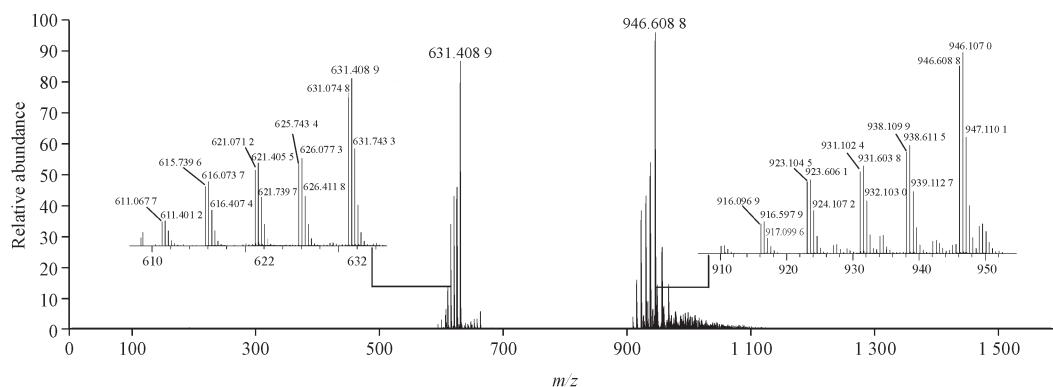


Figure 3 Mass spectrum of impurities 19–23 in Cbf-14 gel

甲基($\text{CH}_2=$)相应。

ESI(+)-QTOF-MS测得杂质**20** $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 的 m/z 为615.739 5,与分子式 $\text{C}_{88}\text{H}_{153}\text{N}_{27}\text{O}_{16}$ 相应,其相对分子质量为1 844.198 9,与Cbf-14相比,其相对分子质量增加26,与Cbf-14分子结构中引入一个亚乙基($\text{CH}_3\text{CH}=$)相应。

ESI(+)-QTOF-MS测得杂质**21** $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 的 m/z 为621.070 9,与分子式 $\text{C}_{88}\text{H}_{153}\text{N}_{27}\text{O}_{17}$ 相应,其相对分子质量为1 860.193 8,与杂质**20**相比,其相对分子质量增加16,与杂质**20**分子结构中引入一个氧(O)相应。

ESI(+)-QTOF-MS测得杂质**22** $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 的 m/z 为625.743 0,与分子式 $\text{C}_{89}\text{H}_{155}\text{N}_{27}\text{O}_{17}$ 相应,其相对分子质量为1 874.209 4,与杂质**21**相比,其相对分子质量增加14,与杂质**21**分子结构中引入一个亚甲基(- CH_2-)相应。

ESI(+)-QTOF-MS测得杂质**23** $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 的 m/z 为631.074 3,与分子式 $\text{C}_{89}\text{H}_{155}\text{N}_{27}\text{O}_{18}$ 相应,其相对分子质量为1 890.204 3,与杂质**22**相比,其相对分子质量增加16,与杂质**22**分子结构中引入一个氧(O)相应。

Cbf-14的分子结构中有8个伯胺,其中有3个来自精氨酸胍基、4个来自赖氨酸氨基、1个来自N端游离氨基酸。杂质**19~23**的MS/MS主要特征碎片有 m/z 1 280.816 9、948.611 0和832.046 4,其中 m/z 1 280.816 9($[\text{C}_{62}\text{H}_{106}\text{N}_{17}\text{O}_{12}]^+$)为KFFRKLKKSV碎片离子, m/z 948.611 0($[\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{N}_{13}\text{O}_7]^+$)为FFRKLKK碎片离子, m/z 832.046 4($[\text{C}_{80}\text{H}_{141}\text{N}_{23}\text{O}_{15}]^{2+}$)为LLRKFFRKLKKSV碎片离子。根据二级质谱分析,所得结果表明甘油与Cbf-14发生反应的位点

为Cbf-14的N端精氨酸。此外,胍基是共轭结构,电子云分布均匀,其反应活性远低于伯胺。综上所述,杂质**19~23**是甘油与Cbf-14的N端游离伯胺缩合形成的N端亚胺产物,分别为 N^2 -亚甲基-Cbf-14、 N^2 -亚乙基-Cbf-14、 N^2 -(2-羟基亚丙基)-Cbf-14、 N^2 -(3-羟基亚丙基)-Cbf-14和 N^2 -(2,3-二羟基亚丙基)-Cbf-14。

3.3.2 二级碎片裂解途径归属 杂质**19~23**的MS/MS二级质谱图见图2-b~图2-f,其二级碎片裂解规律总结如下:由于Cbf-14富含赖氨酸和精氨酸,杂质**19~23**在二级裂解过程中易于丢失中性碎片氨 $[\text{NH}_3]$ 、胍 $[\text{NH}=\text{C}(\text{NH}_2)_2]$ 和精氨酸残基 $[\text{C}_4\text{N}_3\text{H}_8]$ 。杂质**19~23**还易于丢失C端的Val残基和Ser-Val残基。对于 N^2 -(3-羟基亚丙基)-Cbf-14和 N^2 -(2,3-二羟基亚丙基)-Cbf-14,由于具有游离羟甲基结构,二者均可以失去1分子的甲醛。此外, N^2 -(2,3-二羟基亚丙基)-Cbf-14的N端精氨酸胍基上的伯胺可攻击 α -碳形成二氮杂草七元环,在此基础上失去1分子3-氨基-1,2-丙二醇 $[\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2]$ 产生特征碎片离子 m/z 600.720 1($[\text{C}_{60}\text{H}_{149}\text{N}_{26}\text{O}_{16}]^{3+}$),进一步失去1分子碳二亚胺 $[\text{NH}=\text{C}=\text{NH}]$ 产生特征碎片离子 m/z 586.712 8($[\text{C}_{85}\text{H}_{147}\text{N}_{24}\text{O}_{16}]^{3+}$), N^2 -(3-羟基亚丙基)-Cbf-14具有上述相同的裂解规律。

3.4 Cbf-14凝胶中降解产物的结构鉴定

在Cbf-14凝胶强制降解试验样品中还鉴定出了19个有关物质。其中杂质**1~11、15、17、18**为Cbf-14水解产物,杂质**12~14、16**为Cbf-14异构体,杂质**24**为Cbf-14氧化产物,以上杂质的质谱数据汇总见表1。

杂质 **1~11、15、17、18** 是 Cbf-14 在酸或氧化条件下肽键水解所产生的。根据二级质谱分析, 杂质 **1** 是 Cbf-14(1-5), 杂质 **2** 是 Cbf-14(7-14), 杂质 **3** 是 Cbf-14(1-4), 杂质 **4** 是 Cbf-14(4-14), 杂质 **5** 是 Cbf-14(1-3), 杂质 **6** 是 Cbf-14(5-14), 杂质 **7** 是 Cbf-14(1-6), 杂质 **8** 是 Cbf-14(6-14), 杂质 **9** 是 Cbf-14(3-14), 杂质 **10** 是 Cbf-14(1-12), 杂质 **11** 是 Cbf-14(1-13), 杂质 **15** 是 Cbf-14(1-8), 杂质 **17** 是 Cbf-14(2-14), 杂质 **18** 是 Cbf-14(1-10)。

杂质 **12~14、16** 是 Cbf-14 的同分异构体。一般来说, 多肽分子中存在许多手性中心, 常见的消旋化机制主要有以下两种类型: 直接烯醇化和𫫇唑酮(氮杂内酯)的形成, 它们都是碱催化的消旋化机制。

杂质 **24** (m/z 606.723 6, $z = 3$) 被鉴定为 [1-AMAOA]Cbf-14, 是 Cbf-14 的氧化产物。 $\text{HO}\cdot$ 是非常强的氧化剂, 在过渡金属催化的 Fenton 或 Udenfriend 反应条件下在原位生成。原位产生的 $\text{HO}\cdot$ 氧化, 要么发生在氨基的 α -碳上, 要么在胍基

的 α -碳上。所得到的 α -羟基氨基酸残基很容易分解, 分别产生谷氨酸半醛和氨基己二酸半醛^[12-13]。由于杂质 **24** 与 API 相对分子质量相差 1, 结合其碎片信息和 Cbf-14 结构特征, 推测杂质 **24** 为 Cbf-14 N 端游离氨基的 α -C 上发生氧化所得的 α -羟基氨基酸脱去 1 分子的游离氨, 产生的 2-氧代精氨酸。形成机制见图 4。

杂质 **24** 的 MS/MS 二级质谱图见图 2-g, 其主要特征碎片为 m/z 600.720 5, 586.713 3, 573.701 0, 538.686 6 和 533.012 0。 $[\text{1-AMAOA}]$ Cbf-14 的 N 端精氨酸胍基上的伯胺可攻击 α -碳形成二氮杂卓七元环, 在此基础上失去 1 分子 H_2O 产生特征碎片离子 m/z 600.720 5 ($[\text{C}_{60}\text{H}_{149}\text{N}_{26}\text{O}_{16}]^{3+}$), 进一步失去 1 分子 碳二亚胺 [$\text{NH}=\text{C}=\text{NH}$] 产生特征碎片离子 m/z 586.713 3 ($[\text{C}_{85}\text{H}_{147}\text{N}_{24}\text{O}_{16}]^{3+}$)。 m/z 573.701 0 ($[\text{C}_{81}\text{H}_{142}\text{N}_{25}\text{O}_{16}]^{3+}$) 是由母离子 C 端的 Val 残基丢失形成的; m/z 538.686 6 ($[\text{C}_{78}\text{H}_{135}\text{N}_{24}\text{O}_{13}]^{3+}$) 归因于母离子 C 端的 Ser-Val 残基的中性丢失, 在此基础上脱去 1 分子 NH_3 形成 m/z 533.012 0 ($[\text{C}_{78}\text{H}_{132}\text{N}_{23}\text{O}_{13}]^{3+}$)。

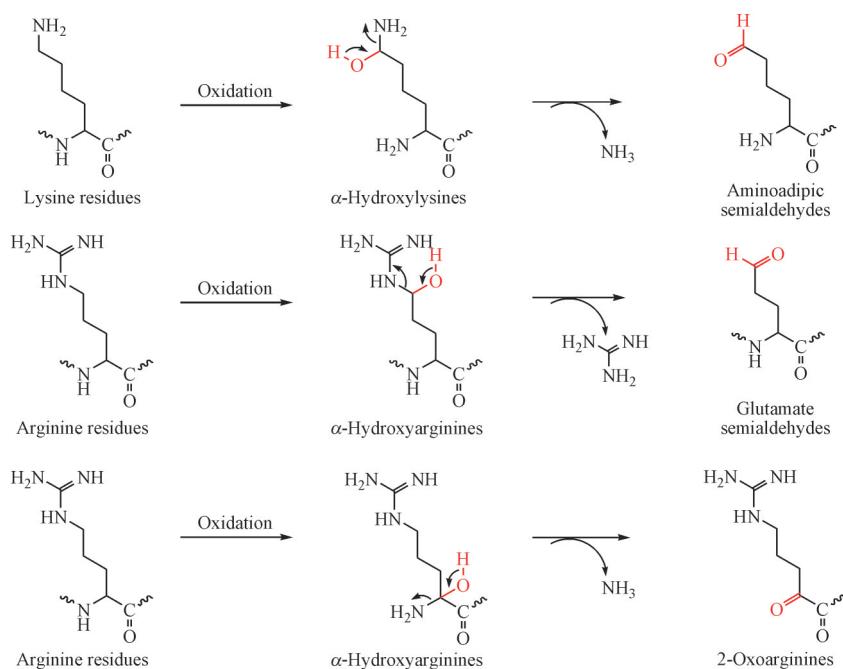


Figure 4 Formation mechanisms of aminoacidic semialdehydes, glutamate semialdehyde and 2-oxoarginine

4 讨 论

本研究建立了能够有效检测和分离 Cbf-14 及其有关物质的挥发性流动相色谱条件, 适用于 Cbf-14 有关物质的色谱-质谱联用鉴定。在此条件下,

共检测出 24 个有关物质, 其中 5 个为制剂生产工艺有关物质, 19 个为强制降解产物。对 Cbf-14 有关物质结构及来源的推测对其生产工艺质量控制、评估药物稳定性及制定存储条件具有一定意义。

本研究建立的液相色谱-质谱联用法鉴定出 Cbf-14 凝胶制剂生产工艺有关物质 **19~23** 分别为 N^2 -亚甲基-Cbf-14、 N^2 -亚乙基-Cbf-14、 N^2 -(2-羟基丙基)-Cbf-14、 N^2 -(3-羟基丙基)-Cbf-14 和 N^2 -(2,3-二羟基丙基)-Cbf-14。以上杂质为凝胶辅料甘油与原料药 Cbf-14 的 N 端游离氨基缩合形成的 N 端亚胺产物, 提示可能存在的原辅料相互作用。

强制降解试验表明, Cbf-14 凝胶在酸性条件下易发生肽键水解产生特征有关物质 **1~11, 15, 18**, 在碱性条件或高温条件下易消旋异构产生特征有关物质 **12~14, 16**, 在氧化条件下易产生水解产物 **17**, 并且易发生 α -C 氧化形成脱氨氧代产物(有关物质 **24**)。因此, Cbf-14 凝胶对酸、碱、氧化、高温及光照均比较敏感。Cbf-14 凝胶的储藏需密封避光, 避酸避碱, 尽量冷藏。

References

- [1] Gu Y. Curb the abuse of antibiotics to prevent "super bacteria" [J]. *Chin Stra Emer Indus*(中国战略新兴产业), 2017, **15**(29):68-70.
- [2] Li GN, Xia XJ, Long YH, et al. Research progresses and applications of antimicrobial peptides[J]. *Chin J Animal Nutr*(动物营养学报), 2014, **26**(1):17-25.
- [3] Zhou HM, Dou J, Wang J, et al. The antibacterial activity of BF-30 *in vitro* and in infected burned rats is through interference with cytoplasmic membrane integrity [J]. *Peptides*, 2011, **32**(6):1131-1138.
- [4] Tian YW, Wang H, Li B, et al. The cathelicidin-BF Lys16 mutant Cbf-K16 selectively inhibits non-small cell lung cancer proliferation *in vitro*[J]. *Oncol Rep*, 2013, **30**(5):2502-2510.
- [5] Ma LM, Wang YR, Wang MX, et al. Effective antimicrobial activity of Cbf-14, derived from a cathelin-like domain, against penicillin-resistant bacteria[J]. *Biomaterials*, 2016, **87**:32-45.
- [6] Yu CZ, Wei SS, Han XR, et al. Effective inhibition of Cbf-14 against *Cryptococcus neoformans* infection in mice and its related anti-inflammatory activity [J]. *Fungal Genet Biol*, 2018, **110**:38-47.
- [7] Wang P. Analysis of key problems on synthesis of synthetic peptide drugs[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2010, **19**(2):102-105.
- [8] Hu YX, Jiang Y, Han TJ. Effects of manufacturing process and process control on related substances of synthetic peptide drugs [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2017, **26**(18):2143-2148.
- [9] Hu YX, Jiang Y, Han TJ, et al. Quality control and related substances of synthetic peptide drugs[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2018, **27**(5):502-508.
- [10] D'Hondt M, Bracke N, Taevernier L, et al. Related impurities in peptide medicines[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, **101**:2-30.
- [11] Tian WJ, Ren X, Liao HM, et al. Research progress of the quality control of peptide drugs[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2013, **33**(7):1115-1120.
- [12] Requena JR, Chao CC, Levine RL, et al. Glutamic and aminoacrylic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**(1):69-74.
- [13] Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences [J]. *Free Radic Biol Med*, 1990, **9**(4):315-325.