

液质联用法测定重组人脑利钠肽的质量肽图

张 竞¹ 安进城² 李丹丹¹ 周志艳¹ 任新桐¹ 邹 卫^{3▲}

1. 河北冀兆联科技发展有限公司研发中心, 河北石家庄 050051;

2. 石家庄医学高等专科学校冀联校区医院中医科, 河北石家庄 050057;

3. 河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018

[摘要] **目的** 建立重组人脑利钠肽(rhBNP)的肽图分析方法,同时绘制其质量肽图并鉴定二硫键位点。方法摸索合适的酶切条件,用液质联用的方法绘制质量肽图和定位二硫键,并进行重复性、精密度和耐用性相关验证。**结果** rhBNP经还原及烷基化后进行酶切,胰蛋白酶与蛋白质量比为1:100时,可以得到稳定的肽图谱。通过分析理论结果,确认二硫键位置。方法学验证结果表明,该方法重复性、精密度及耐用性良好。对连续3批生产的中试产品进行肽图分析,供试品与对照品的肽图谱完全一致。**结论** 本研究建立的肽图分析方法可应用于rhBNP的鉴别和质量控制。

[关键词] 液质联用; 肽图; 重组人脑利钠肽; 心力衰竭

[中图分类号] R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-0616(2025)05-0017-05

DOI:10.20116/j.issn2095-0616.2025.05.04

Determination of mass peptide map of recombinant human brain natriuretic peptide by liquid chromatography-mass spectrometry

ZHANG Jing¹ AN Jincheng² LI Dandan¹ ZHOU Zhiyan¹ REN Xintong¹ ZOU Wei³

1. Research and Development Center, Hebei Jizhaolian Technology Development Co., Ltd., Hebei, Shijiazhuang 050051, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Hospital of Shijiazhuang Medical College in Jilian Campus, Hebei, Shijiazhuang 050057, China; 3. College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Hebei, Shijiazhuang 050018, China

[Abstract] **Objective** To establish a peptide map analysis method for recombinant human brain natriuretic peptide (rhBNP), simultaneously draw its mass peptide map and identify disulfide bond sites. **Methods** The suitable conditions of enzyme digestion were explored, the mass peptide map was drawn, and disulfide bonds were located according to the liquid chromatography-mass spectrometry method, and the related repeatability, precision and durability were verified. **Results** After reduction and alkylation, the rhBNP was digested by enzyme. When the ratio of trypsin to protein was 1:100, a stable peptide map could be obtained. By analyzing the theoretical results, the locations of disulfide bonds were confirmed. The results of methodology verification showed that the method had good repeatability, precision and durability. The peptide maps of the pilot products produced in three consecutive batches were analyzed, and the peptide maps of the test products and the reference products were completely consistent. **Conclusion** The peptide map analysis method established in this research can be applied to the identification and quality control of rhBNP.

[Key words] Liquid chromatography-mass spectrometry; Peptide map; Recombinant human brain natriuretic peptide; Cardiac failure

人脑利钠肽(human brain natriuretic peptide, hBNP)又称B型利钠肽,为人体分泌的一种内源性多肽,是在病因诱导下发生心力衰竭后人体应激产生的一种补充代偿机制^[1],也是继心钠肽后利钠肽家族的又一成员。基础实验^[2-4]表明,利钠肽是治疗心力衰竭非常有前景的药物。注射用重组人脑利钠肽(recombinant human brain natriuretic peptide, [基金项目]中央引导地方科技发展资金项目(226Z2404G)。

▲通讯作者

rhBNP)是一种通过重组DNA技术合成的、分子量为3464 Da的生物制剂,由于与心室肌产生的内源性多肽有相同的氨基酸序列,因此有同样的作用机制^[5]。rhBNP首次由美国Scios公司开发,以商品名NATRECOR在美国批准上市。2005年,国内成都诺迪康生物制药有限公司开发此药品,以商品名新活素在中国批准上市。目前该药品无药典收藏质量标准。

肽图分析是基因工程药物质量控制中非常重

要的检测项目之一^[6-8],能够精准解析蛋白质的一级结构并检测潜在的结构变异,在确保药物质量方面具有关键作用。本实验室采用胰蛋白酶^[9-10]裂解rhBNP,结合反相高效液相色谱(high pressure liquid chromatography, HPLC)和液质联用技术,建立了一种灵敏、可靠的肽图分析方法。该方法在识别复杂蛋白质结构变异和确保产品质量的一致性方面具有创新性和优越性,为rhBNP及其他类似重组蛋白药物的质量控制提供了重要支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Waters, e2695-2998)、超高效液相色谱(Waters, UPLC ACQUITY™)、高分辨质谱仪(Waters, Micromass Q-TOF micro™)。

1.2 试剂

rhBNP 理化对照品及原液(石家庄沃泰生物科技有限公司,理化对照品批号:20130601,三批原液批号:20161101、20161102、20161103);碳酸氢铵(分析纯,货号:20180304);胰蛋白酶(Promega,货号:V5113);乙腈(Sigma,货号:34851);三氟乙酸(Merck,货号:8.08260.0500);DTT(Sigma,货号:D0632);碘乙酰胺(Sigma,货号:V900335)。

2 方法与结果

2.1 HPLC和凝胶法分析样品纯度

HPLC法:色谱柱采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相A为含0.1%三氟乙酸的水溶液,流动相B为含0.1%三氟乙酸的乙腈溶液;流速为1.0 ml/min。上样量约为20 μg,检测波长为215 nm,梯度洗脱30 min(A液从100%~40%,B液从0~60%),记录图谱,主峰纯度按峰面积归一化法计算,测得rhBNP的纯度为99.2%,见图1。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法:取供试品溶液,用非还原型SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法,分离胶浓度为15%,加样量应不低于10 μg。通过凝胶成像系统灰度分析软件分析各条带纯度,测得rhBNP的纯度为100.0%,见图2。

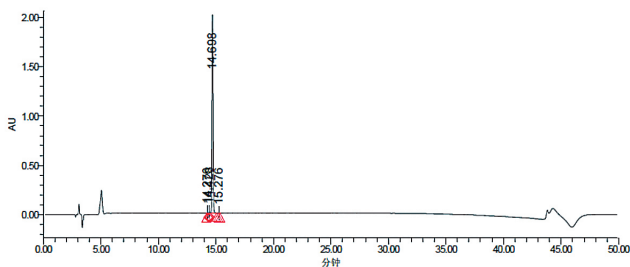


图1 原液纯度检定HPLC图谱

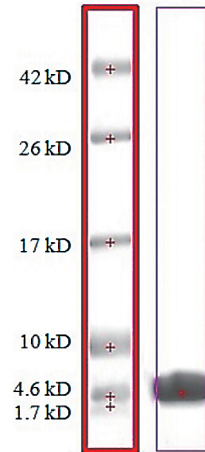
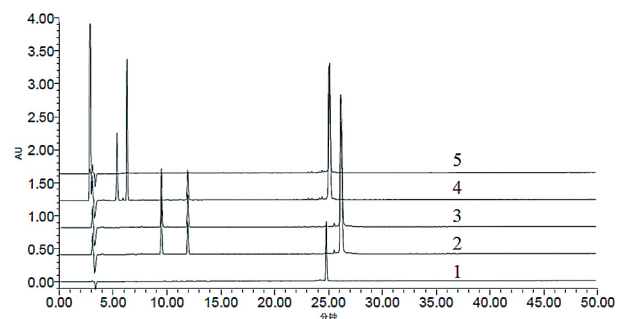


图2 重组人脑利钠肽(HF-01)原液纯度电泳检测图谱

2.2 样品的还原与烷基化

将rhBNP原液稀释为1 mg/ml(缓冲溶液为50 mmol/L碳酸氢铵溶液)。根据文献报道^[11-12],加入5 mmol/L DTT,分别采用37℃水浴1 h和56℃水浴30 min来摸索二硫键还原的条件。加入10 mmol/L碘乙酰胺,25℃避光30 min进行烷基化。

经HPLC法检测,无论是37℃水浴1 h还是56℃水浴30 min,二硫键均能被还原,因此选择用时更短的条件(56℃水浴30 min)。加入10 mmol/L碘乙酰胺,25℃避光30 min可以使样品完成烷基化,见图3。



注 1:理化对照品;2:二硫键还原56℃30 min;3:二硫键还原37℃1 h;4:烷基化;5:超滤后

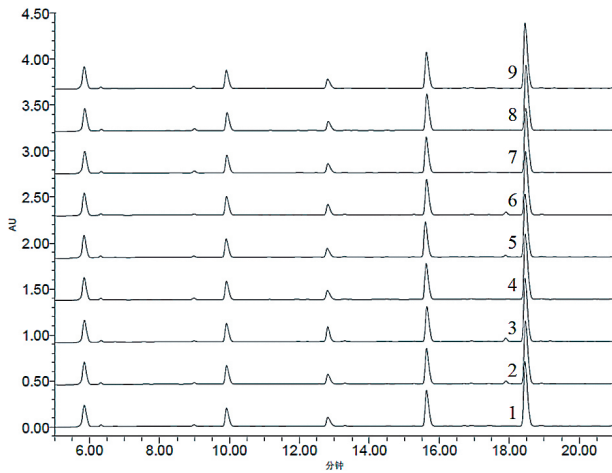
图3 方法的建立

2.3 酶切条件的摸索

将烷基化的样品与胰蛋白酶按照质量比100:1、500:1和1000:1混匀,分别37℃酶切1、4和16 h。

使用HPLC分析样品。色谱柱采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相A为含0.1%三氟乙酸的水溶液,流动相B为含0.1%三氟乙酸的乙腈溶液;检测波长为215 nm。流速为1.0 ml/min。上样量约为20 μg,检测波长为215 nm,梯度洗脱70 min(A

液从 100% ~ 30%, B 液从 0 ~ 70%), 记录图谱, 见图 4。结果表明, 蛋白质量与酶质量比为 100 : 1、37℃ 酶切 1 h 即可水解完全。



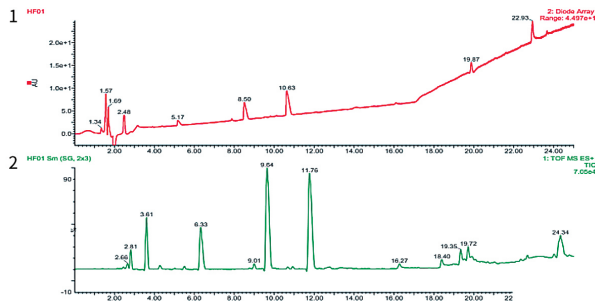
注 1: 质量比 100 : 1, 酶切 1 h; 2: 质量比 500 : 1, 酶切 1 h; 3: 质量比 1000 : 1, 酶切 1 h; 4: 质量比 100 : 1, 酶切 4 h; 5: 质量比 500 : 1, 酶切 4 h; 6: 质量比 1000 : 1, 酶切 4 h; 7: 质量比 100 : 1, 酶切 16 h; 8: 质量比为 500 : 1, 酶切 16 h; 9: 质量比 1000 : 1, 酶切 16 h

图 4 各条件酶切产物测定结果

2.4 液质联用鉴别酶切肽段与二硫键位置

理论上, 烷基化后的直链 rhBNP 会被酶切为 8 个肽段, 分别为 T1: Ser-Pro-Lys; T2: Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly-Cys-Phe-Gly-Arg; T3: Lys; T4: Met-Asp-Arg; T5: Ile-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Lys; T6: Val-Leu-Arg; T7: Arg; T8: His。

将上述酶解产物使用飞行时间液质联用仪进行分析, 检测模式: 正离子; 毛细管电压: 3500 V; Cone 电压: 10 V; 去溶剂气体温度: 250℃; 源温: 100℃; 飞行管电压: 5630 V; MCP 电压: 2300 V。使用软件计算各肽段分子量, 定位二硫键位置。结果显示, 通过肽图检查法可检测出与理论酶切肽段分子量一致的结果, 覆盖了目标 8 段序列中的 6 段, 见图 5、表 1。



注 1: UPLC 色谱图; 2: 对应质谱图

图 5 LC-MS 检测图谱

表 1 质谱结果分析

肽段	质谱保留时间 (min)	测定分子量 (Da)	对应肽段	理论分子量 (Da)
I	2.81	330.30	T1	330.38
II	3.61	548.12	T3+T4	548.67
III	6.33	386.31	T6	386.49
IV	9.64	994.26 (烷基化修饰)	T5	938.06
V	11.78	1097.13 (烷基化修饰)	T2	1041.21

2.5 方法学验证

2.5.1 进样重复性验证 按“2.2”“2.3”方法对同一批号样品进行制备, 重复进样 6 针。结果表明, 5 个特征肽段保留时间的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 0.2% ~ 0.6%, 均小于 1.0%, 仪器重复性良好, 见图 6、表 2。

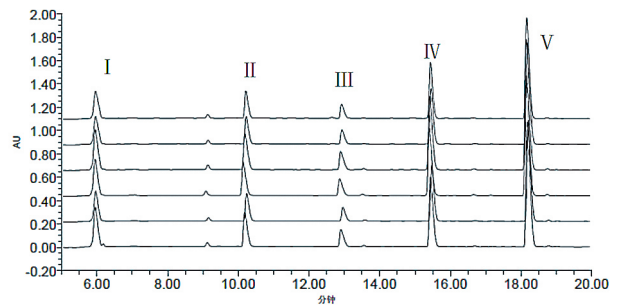


图 6 进样重复性检测结果

表 2 进样重复性考察结果 (n=6)

主要肽段	保留时间的 RSD (%)
I	0.4
II	0.6
III	0.2
IV	0.2
V	0.2

注 RSD: 相对标准偏差

2.5.2 精密度 由 3 名实验者于同一时间按“2.2”“2.3”方法分别制备 2 份样品, 6 份平行样品的肽图分析结果表明, 5 个特征肽段保留时间的 RSD 为 0.2% ~ 0.8%, 均小于 1.0%, 精密度良好, 见图 7、表 3。

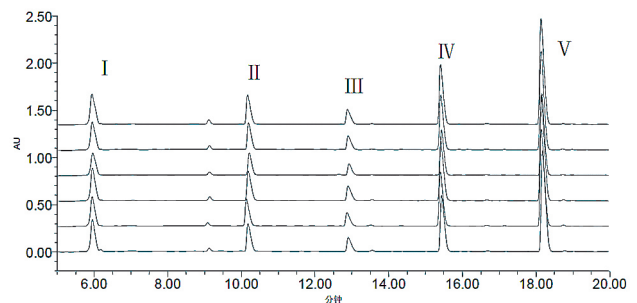


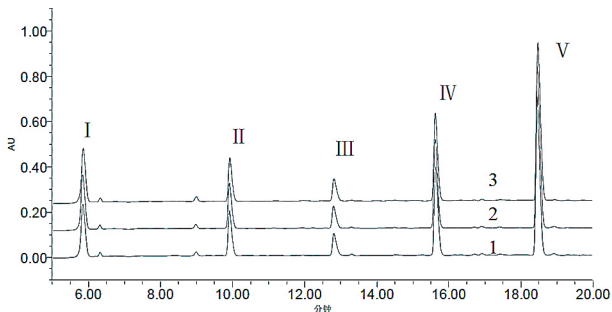
图 7 精密度检测结果

表3 精密度考察结果 (n=6)

主要肽段	保留时间的 RSD (%)
I	0.5
II	0.8
III	0.4
IV	0.2
V	0.2

注 RSD: 相对标准偏差

2.5.3 耐用性 按“2.2”“2.3”方法进行样品制备,酶切时间调整为 1、4 和 16 h。所得样品肽图分析结果表明,5个特征肽段保留时间的 RSD 为 0.1% ~ 0.2%,均小于 1.0%,酶切时间耐用性良好,见图 8、表 4。



注 1: 酶切 1 h; 2: 酶切 4 h; 3: 酶切 16 h

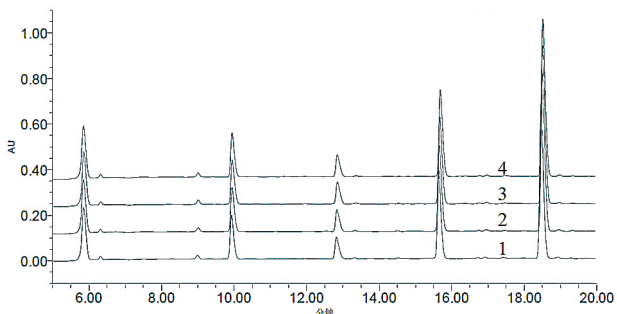
图 8 耐用性检测结果

表4 耐用性考察结果 (n=3)

主要肽段	保留时间的 RSD (%)
I	0.2
II	0.1
III	0.1
IV	0.1
V	0.1

注 RSD: 相对标准偏差

2.5.4 样品肽图测定 对连续生产的 3 批原液和理化对照品按“2.2”“2.3”方法进行肽图分析,3 批原液与对照品肽图图谱一致,见图 9。



注 1: 理化对照品; 2 ~ 4: 3 批重组人脑利钠肽原液

图 9 肽图测定结果

3 讨论

肽图分析是基因工程药物产品质量标准控制的一种重要方法^[13-16]。本研究通过肽图分析对 rhBNP 进行结构确证及质量控制。样品纯度控制在 95% 以上,确保了分析结果的准确性。rhBNP 理论序列为 SPKMQGSGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH, 因胰蛋白酶能选择性水解赖氨酸或精氨酸的羧基肽链,故烷基化后的直链 rhBNP 理论上会被酶切为 8 个肽段。本研究结果与理论预测结果高度一致,覆盖了 8 个目标肽段中的 6 个。T7 和 T8 为单个氨基酸,未被检测到符合预期; T2 和 T5 肽段的烷基化修饰表明它们之间存在二硫键,这与理论结构相符。

方法学验证进一步巩固了这一方法的可靠性,仪器重复性的 RSD 均在 0.2% ~ 0.6%,精密度的 RSD 均在 0.2% ~ 0.8%,均小于 1.0%,这表明该方法具有良好的重复性和精密度。此外,酶切时间在 1 ~ 16 h 内均可使样品酶解完全且无非特异酶切,表明方法耐用性良好。对连续 3 批中试产品进行肽图分析,供试品与对照品结果一致,进一步验证了该方法的专属性和一致性。

综上所述,本研究建立的 rhBNP 肽图分析方法可作为该蛋白结构确证的常规检测手段,能够保证产品的安全性和有效性。该方法为本产品的生产和质量控制提供了技术保障,也为其他类似蛋白质药物的开发和质控提供了借鉴。未来的研究可以在此基础上进一步优化,以适应不断变化的技术需求和标准。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Idebrandt P. Natriuretic peptides: prediction of cardiovascular disease in the general population and high risk populations[J]. Dis Markers, 2009, 26: 227-233.
- [2] 王华, 梁延春. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10): 760-789.
- [3] Kawakami R, Saito Y, Kishimoto I, et al. Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2004, 110(21): 3306-3312.
- [4] Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, et al. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group[J]. N Engl J Med, 2000, 343(4): 246-253.

(下转第 66 页)

- [7] 穆海芳, 李文清, 贾青珍. 丹参活血汤联合西药治疗心血瘀阻型冠心病心绞痛临床疗效及对血液流变学和血脂代谢的影响[J]. 四川中医, 2023, 41(2): 101-104.
- [8] Li ZM, Xu SW, Liu PQ. *Salvia miltiorrhiza* Burge (Danshen): a golden herbal medicine in cardiovascular therapeutics[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 39(5): 802-824.
- [9] 张立国, 黄凯雯, 倪力军, 等. HPLC-MS/MS 法鉴定丹参与紫丹参的水溶性成分[J]. 中成药, 2022, 44(12): 4063-4067.
- [10] Ling S, Na ZY. Compound Danshen dripping pills in treating with coronary heart disease: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2022, 101(7): e28927.
- [11] 王卓, 钟凌云, 解杨, 等. 基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(3): 882-897.
- [12] 郝珍飞, 刘迪, 付明月, 等. 补益类降脂中药治疗血脂异常的研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(5): 132-136.
- [13] Wen B, Dang YY, Wu SH, et al. Antiatherosclerotic effect of dehydrocorydaline on ApoE (-/-) mice: inhibition of macrophage inflammation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1408-1418.
- [14] Zheng B, Qi J, Yang Y, et al. Mechanisms of cinnamic aldehyde against myocardial ischemia/hypoxia injury *in vivo* and *in vitro*: Involvement of regulating PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 147: 112674.
- [15] Wu XX, Li XK, Yang CX, et al. Target Characterization of Kaempferol against Myocardial Infarction Using Novel In Silico Docking and DARTS Prediction Strategy[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12908.
- [16] Fang YQ, Duan CC, Chen SY, et al. Tanshinone- II A inhibits myocardial infarct *via* decreasing of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in myocardiocytes[J]. *Int J Mol Medicine*, 2021, 48(2): 1-11.
- [17] 王静, 李东野, 夏勇, 等. 转染 Akt1 基因对缺血再灌注大鼠心肌线粒体通透性转换的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(1): 80-85.
- [18] Yasong L, Dan C, Dongye L, et al. Luteolin inhibited hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration by suppressing the Src and Akt signalling pathways[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(4): 597-603.

(收稿日期: 2024-07-18)

(上接第 20 页)

- [5] 谢洪智, 朱文玲. 重组人脑利钠肽和硝酸甘油治疗急性失代偿性心力衰竭疗效和安全性的随机、开放、平行对照的多中心临床研究[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(3): 222-226.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 3部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 553-684.
- [7] 桂芳, 杨兰兰, 潘勇兵, 等. 抗人 TNF- α 单克隆抗体液质联用肽图分析方法的建立及验证[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(1): 51-63.
- [8] 饶春明, 张翊, 韩春梅, 等. 重组人白细胞介素-11 的胰蛋白酶切肽图分析[J]. 药学学报, 2000, 35(5): 378-380.
- [9] Mouchahoir T, Schiel JE. Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NISTmAb[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(8): 2111-2126.
- [10] Wang HB, Zeng F, Wang YY, et al. Evaluation of the site-unspecified peptide identification method for proteolytic peptide mapping[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(61): 37182-37186.
- [11] 魏敬双, 程立均, 刘进怀, 等. 重组单抗药物的肽图分析[J]. 生物技术通报, 2008(S1): 172-175.
- [12] 王继峰, 赵新元, 赵焱, 等. 酶切过程中肽段过烷基化对蛋白质定性和定量分析的影响[J]. 色谱, 2013, 31(10): 927-933.
- [13] Visser J, Feuerstein I, Stangler T, et al. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab[J]. *Bio Drugs*, 2013, 27(5): 495-507.
- [14] Chirino AJ, Anthony MS. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes[J]. *Nat Biotechnology*, 2004, 22(11): 1383.
- [15] Toole EN, Dufresne C, Ray S, et al. Rapid highly-efficient digestion and peptide mapping of adeno-associated viruses[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(30): 10403-10410.
- [16] 王绿音, 杨慧敏, 李晶, 等. 甘精胰岛素肽图分析方法研究[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(5): 667-676.

(收稿日期: 2024-07-11)