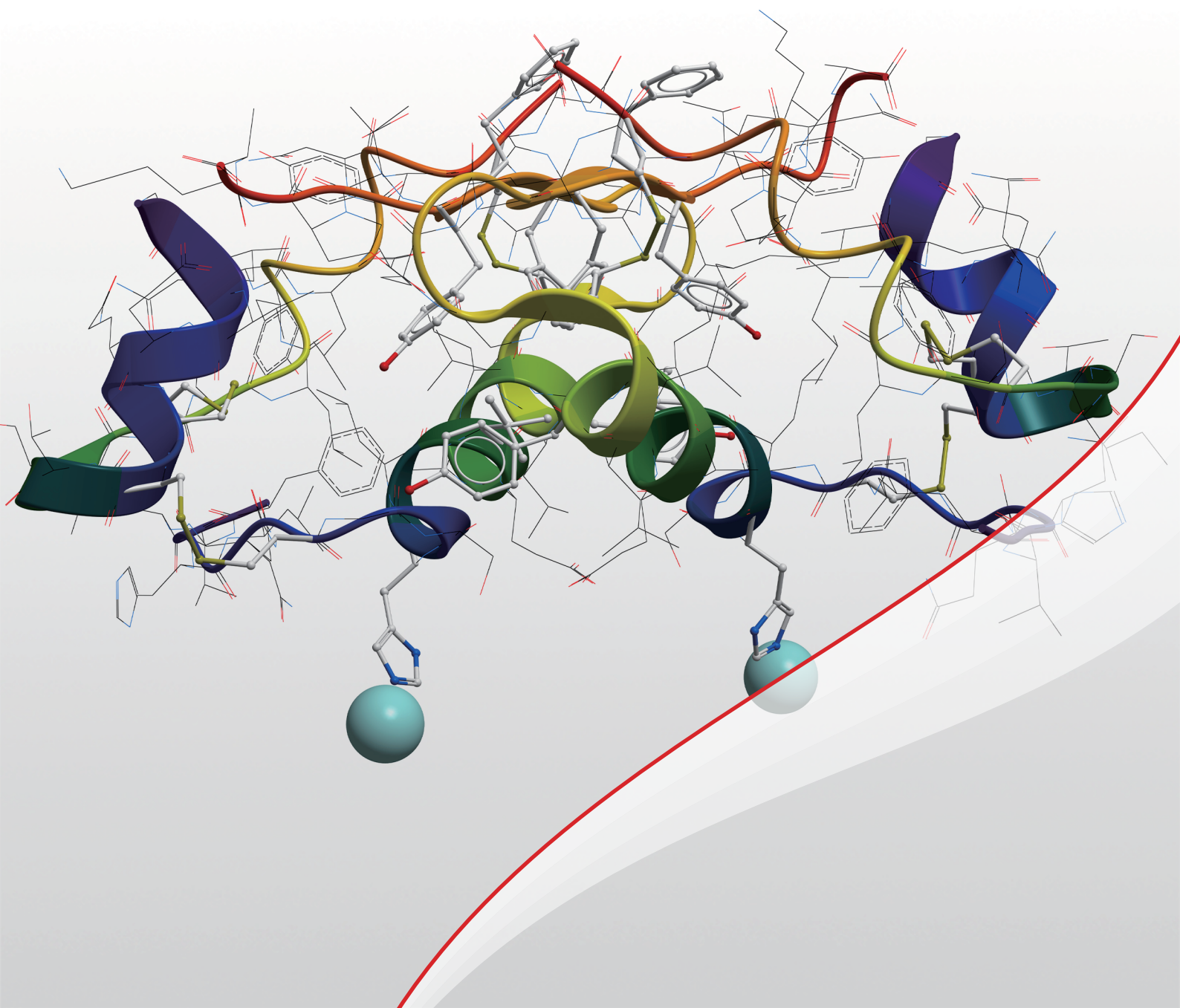


岛津生物药整体解决方案（五）

—多肽类药物分析篇



前言

多肽是由多个氨基酸通过酰胺键（也称为肽键）连接而成的链状结构的生物分子，其长度通常在 10 到 100 个氨基酸之间，作为许多生理功能的内在信号分子，多肽在人体的多种生理过程(包括激素、神经递质)或在炎症反应中发挥主要作用，通过作用于细胞膜表面的受体，模拟配体的结构和功能，从而调控生理过程以发挥药效。多肽药物具有稳定性强、选择性高、副作用低等优势。与小分子药物和蛋白质药物相比，多肽药物具有显著优势。相对于小分子药物而言，多肽药物表现出更高的生物活性和更强的选择性，特别在复杂疾病治疗方面表现出卓越的优势；且由于多肽由氨基酸组成，其代谢产物为氨基酸，通常对人体没有或只有很小的副作用；相较于蛋白质药物，多肽药物具备较好的稳定性、高纯度、低生产成本以及较低或无免疫原性等优势。

近年来，随着多肽合成相关技术、设备和工艺等方面的迅速发展，多肽药物研发和生产成本得以大幅度下降，多肽药物的开发持续升温；整个医疗领域都热衷于对多肽进行研究，研究其在广泛适应症中的潜在效用，尤其是在代谢病、肿瘤疾病和罕见病等领域。截至 2023 年 1 月，全球已上市多肽药物约 180 种，其中司美格鲁肽 2022 年销售额超百亿美元！预计 2030 年，全球多肽药物市场规模将达到 1418 亿美元，而中国多肽类药物行业市场规模呈现快速增长趋势，从 2016 年的 63 亿美元上升至 2020 年的 85 亿美元，年复合增速达到了 8%，远远超过了全球增速。伴随多肽结构修饰与化学改造方法迭代，包括肽链骨架的改造，以及引入脂肪酸、聚乙二醇、蛋白融合等进行修饰优化，叠加新靶点开发、新适应症拓展以及剂型优化，为多肽药物市场空间带来新增量，并催生了更加前沿的“多肽新经济产业”。

目前多肽合成方法可分为生物合成法及化学合成法，随着基因重组技术的发展，多肽生物合成法除传统的天然提取法，酶解法、基因重组法也在多肽合成逐步得到应用；多肽化学合成法通过氨基酸之间的缩合反应来实现氨基酸连接延长，以获得特定序列的多肽。化学合成法具有研发周期短、可快速生产等优点，逐渐成为主流。在多肽药物的开发和生产过程中需要对产品和工艺相关杂质进行检测和评估，以保证药物质量可靠并且安全有效；目前主要的参考指南有国家药品监督管理局（NMPA）药品审评中心于 2023 年 2 月颁布的《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则（试行）》以及之前发布的《制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响》、《合成多肽药物质控及杂质谱研究》等，涉及到氨基酸的组成和序列分析、多肽的分子量、含量、纯度和结构表征等质控分析，可利用 HPLC、LC-MS、Q-TOF、MALDI-TOF、Edman 降解法等进行相关检测分析。

岛津作为全球知名的分析仪器综合生产厂商，始终秉承“以科学技术向社会做贡献”的创业宗旨，致力于提供技术领先的仪器设备及全面可靠的综合方案。岛津始终密切关注多肽药物分析需求，使用多种仪器（MALDI-TOF、LC-QTOF、LC-MS、PPSQ、生物惰性液相等），开发了一系列多肽药物的分子量、聚集体、纯度、序列分析、原料质控等相关分析方法，汇编并推出《岛津生物药整体解决方案（五）-多肽类药物分析篇》，以供相关客户参考。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

第 1 章 岛津生物技术药物整体解决方案	1
第 2 章 氨基酸相关分析	9
使用超高效液相色谱-质谱法分析缩宫素 D/L 氨基酸构型	10
MALDI-TOF 分析多肽药物化学合成起始物料的分子量	19
第 3 章 多肽原料药分析	22
LCMS-2050 在多肽分子量定性分析检测中的应用	23
台式 MALDI-8030 用于司美格鲁肽的快速合成质控	27
MALDI-TOF 快速分析聚乙二醇化多肽药物及原料的分子量	31
使用双极性台式 MALDI-TOF MS MALDI-8030 进行合成肽的质量控制	34
应用蛋白测序仪 PPSQ-53A 进行醋酸格拉替雷仿制药与原研药 N 端相对氨基酸水平一致性评价	38
应用蛋白测序仪 PPSQ-53A 测定多黏菌素 B 的氨基酸序列	42
第 4 章 多肽制剂分析	47
应用台式 MALDI-TOF MS 对注射用胸腺法新进行聚集体分析	48
生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法分析多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质	52
利用 Q-TOF 定性分析多肽类药物生长抑素中的聚集体	55
Trap-Free 2DLC Q-TOF 定性分析宫缩抑制剂阿托西班中的多聚体杂质	62
高效液相色谱法测定司美格鲁肽注射液中主成分及抑菌剂的含量	70
生物兼容性液相结合尺寸排阻色谱法分析司美格鲁肽制剂中聚集体	75
第 5 章 多肽类药物 DMPK 分析	80
LC-MS/MS 法测定血浆中利拉鲁肽的浓度	81
LCMS-8050 测定大鼠血浆中的艾塞那肽	85
超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法测定人血浆中多肽类药物戈舍瑞林含量	90
超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中多肽类药物奥曲肽	98
附录：快速索引	106

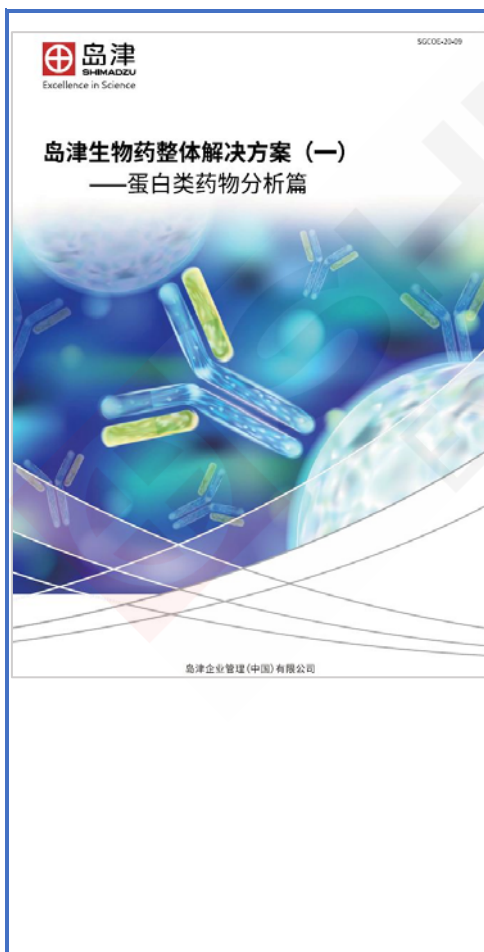
第 1 章 岛津生物技术药物整体解决方案

生物技术药物（以下简称生物药）是指采用 DNA 重组技术或者其他创新生物技术生产的一大类预防、诊断和治疗疾病的药物，如蛋白质类生物药（单克隆抗体、融合蛋白、细胞因子、激素、酶等）、多肽类药物、基因/细胞治疗药物（mRNA、寡核苷酸、病毒载体类基因治疗药物、非病毒载体类基因治疗药物、细胞治疗产品等）。

基于质量源于设计（QbD）的理念，在生物药研发到生产的全过程均需进行质量研究与控制，以确保产品的安全、有效。岛津紧跟行业发展，密切关注生物药质量研究和控制需求，不断钻研先进的分析技术，开发了生物药整体解决方案，包括《蛋白类药物分析篇》、《核酸类药物和疫苗篇》、《细胞培养上清液和培养基分析篇》、《生物药杂质和辅料分析篇》、《多肽类药物分析篇》五个分册，助力生物药的研发与质控，其他分册持续更新中。

1. 《岛津生物药整体解决方案（一）—蛋白类药物分析篇》

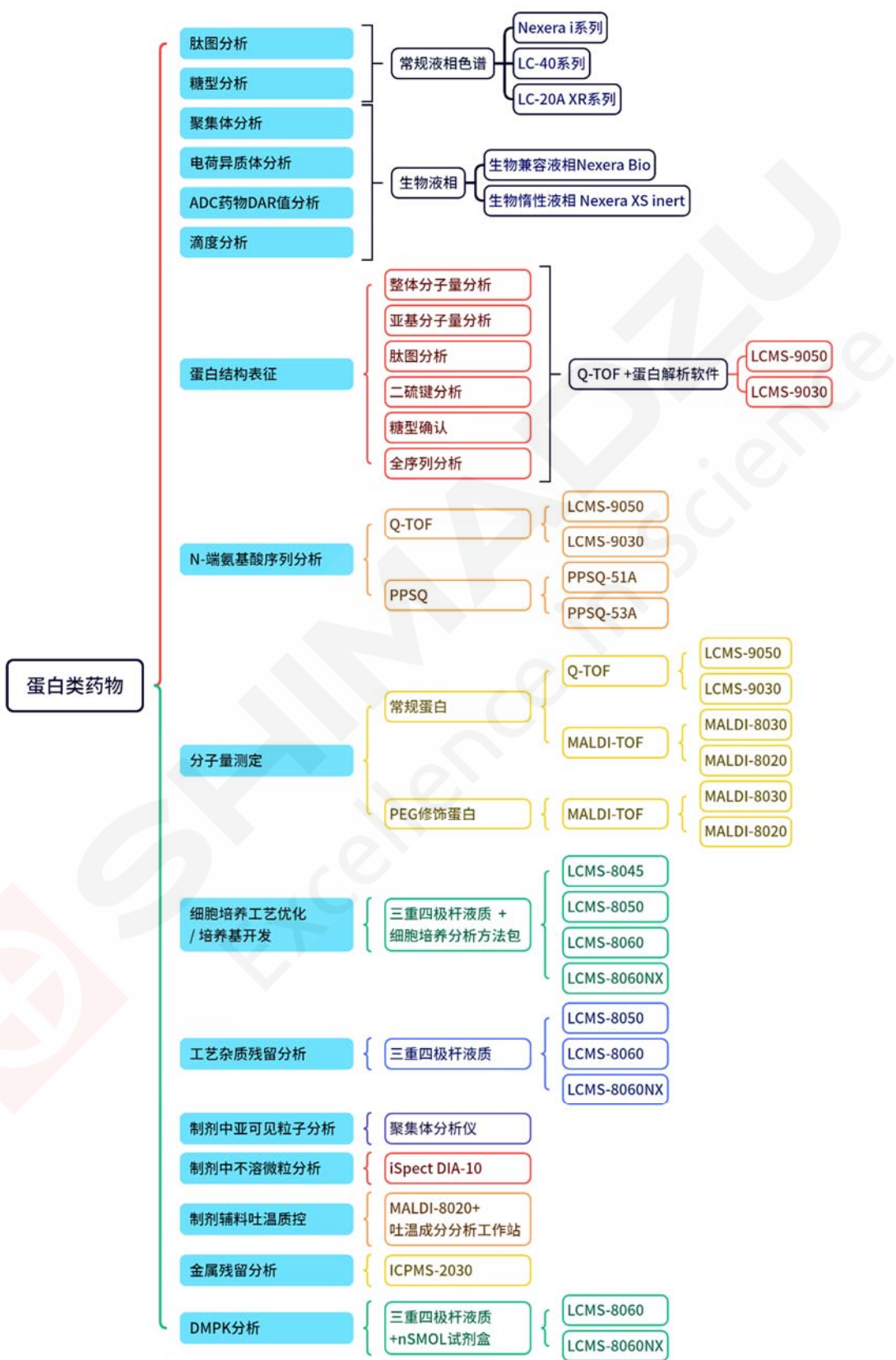
蛋白类药物，以单克隆抗体为例，我们已开发了涉及研发、生产工艺开发与优化、质量控制及临床试验全流程的分析解决方案。在蛋白质结构表征、细胞培养基开发和培养工艺优化、产品质量控制、工艺杂质残留、DMPK 分析等方面积累了丰富的案例，汇编为《岛津生物药整体解决方案（一）—蛋白类药物分析篇》应用文集，供您参考。



精彩掠影：


- **蛋白质结构表征**
 - Q-TOF LCMS-9030/LCMS-9050 结合蛋白分析软件可进行整体分子量分析、亚基分子量分析、肽图分析、二硫键分析、糖型确认、全序列分析等；
 - MALDI-TOF 进行 PEG 修饰蛋白的分子量表征；
- **细胞培养工艺优化/培养基方法开发**
 - LC-MS/MS 结合细胞培养分析方法包（第三版）可一针进样 17 min 内同时分析 144 种化合物，覆盖胞内胞外代谢物，结果可视化；
- **产品质量控制**
 - 生物惰性液相 Nexera XS inert 可进行聚集体分析、电荷异质性分析、ADC 药物 DAR 值分析、滴度分析、肽图分析、糖型分析等，可抑制金属吸附、耐酸耐碱耐高盐，稳定性好、耐用性佳；
- **工艺杂质残留分析**
 - 开发了浸出物和工艺杂质分析方案，如来自一次性培养袋的浸出物 bDtBPP，来自包材的己内酰胺、2-巯基苯并噻唑、全氟辛酸、双酚 A 和氮亚硝胺类化合物，以及来自工艺过程的氢化可的松、甲氨蝶呤等杂质分析方法。
- **DMPK 分析**
 - LC-MS/MS 结合 nSMOL 技术可对抗体药物 Fab 区域选择性酶解，获得靶标蛋白特异性肽段，实现抗体定量。

一图速览《岛津生物技术药物整体解决方案（一）—蛋白类药物分析篇》



2. 《岛津生物药整体解决方案（二）—核酸类药物和疫苗篇》

核酸药物主要分为寡核苷酸和mRNA两大类。寡核苷酸质量评价通常涉及分子量确认、序列确认、递送介质定量分析、纯度分析、原料纯度分析、解链温度分析等方面。mRNA质量评价通常涉及mRNA结构表征、原料分子量确认、递送介质定量分析、mRNA纯度分析、原料纯度分析、质粒构型分析等方面。岛津始终密切关注核酸药物分析需求，使用多种仪器，开发了一系列寡核苷酸药物、mRNA疫苗和核酸药物递送系统分析方法，《岛津生物药整体解决方案（二）—核酸类药物和疫苗篇》应用文集，供您参考。

 <p>岛津 SHIMADZU Excellence in Science</p> <p>SGCOE-23-11</p> <p>岛津生物药整体解决方案（二） —核酸类药物和疫苗篇</p> <p>岛津企业管理（中国）有限公司</p>	<p>精彩掠影：</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 结构表征<ul style="list-style-type: none">▪ MALDI-TOF 可进行寡核苷酸分子量和碱基序列确认，以及共转录加帽和酶法加帽反应后 mRNA 的帽子端分析，分析速度快、结果解析简单直观；▪ 原料质控<ul style="list-style-type: none">▪ MALDI-TOF 可进行寡核苷酸原料亚磷酸胺单体、mRNA 体外转录原料以及 mRNA 加帽原料帽子类似物分析，可快速、准确、直观地进行分子量确认；▪ 递送介质分析<ul style="list-style-type: none">▪ 岛津液相色谱结合蒸发光散射检测器 ELSD-LT III 可进行脂质纳米粒（LNP）中四种成分，以及寡核苷酸递送介质聚乙烯亚胺含量测定，方法灵敏度高、线性范围宽、重复性好；▪ 纯度、质粒构型分析<ul style="list-style-type: none">▪ 生物惰性液相 Nexera XS inert 可抑制磷酸基团的金属吸附、耐酸耐碱耐高盐，尤其适合核酸药物及其原料纯度分析、质粒的三种构型（超螺旋、线性和开环）相对含量分析，方法残留小、重复性好、准确可靠。▪ 解链温度 Tm 分析<ul style="list-style-type: none">▪ 紫外可见分光光度计搭配 Tm 分析系统可进行双链结构核酸药物解链温度分析，Tm 分析软件可直观读出解链温度。
---	--



Q-TOF LCMS-9030/LCMS-9050

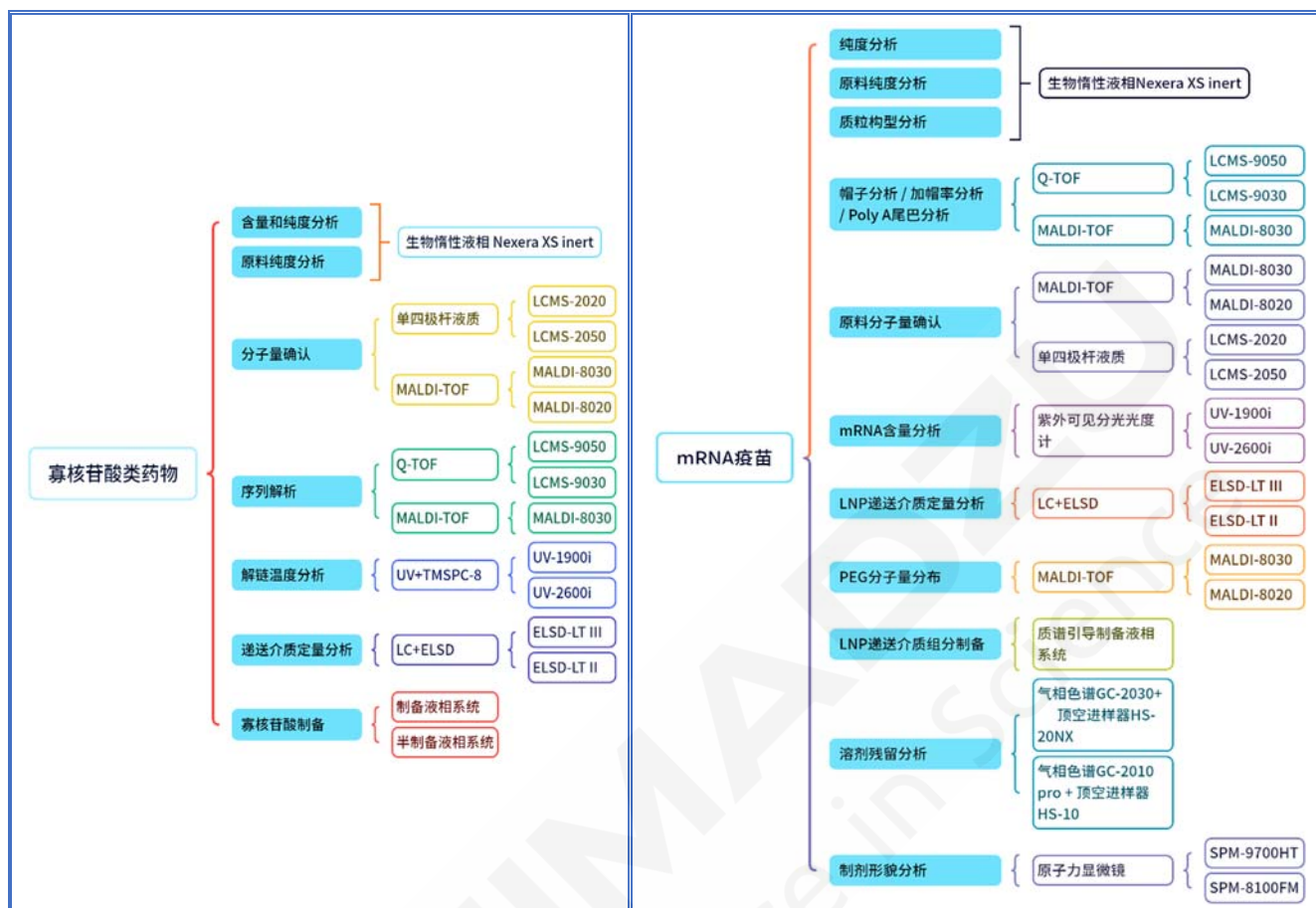


MALDI-8020/8030



LC-40+ELSD-LT III

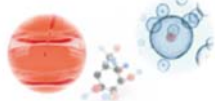
一图速览《岛津生物技术药物整体解决方案（二）——核酸类药物和疫苗篇》



3. 《岛津生物药整体解决方案（三）——细胞培养上清液和培养基分析篇》

现代生物技术一般包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程技术，细胞培养是其重要环节。开发合适的培养基配方和优化培养条件是保证产品产量、质量及批间一致性的关键因素。为了满足日益增长的细胞培养基、细胞培养上清液和细胞内代谢物组分的全面、快速、同时分析需求，岛津开发了“细胞培养分析方法包”。该技术采用超快速三重四极杆液质联用仪，可在 20 分钟内同时对最多 144 种化合物进行快速分析。测定目标物涵盖糖、氨基酸、维生素、核酸及细胞胞内胞外代谢物。搭配 Muti-omics 多组学分析软件可实现分析结果可视化，可直观展示组分含量随时间的变化趋势，以及胞内和胞外代谢物在代谢通路图中的位置及其含量变化趋势，帮助分析者更好的决策。基于该技术平台，岛津在细胞培养基和培养工艺优化方面，已积累了丰富的应用案例，现汇编为《岛津生物药整体解决方案（三）——细胞培养上清液和培养基分析篇》，供您参考。

LC/MS/MS Method Package for Cell Culture Profiling Ver. 3 for LabSolutions LCMS



第三代细胞培养用分析方法包

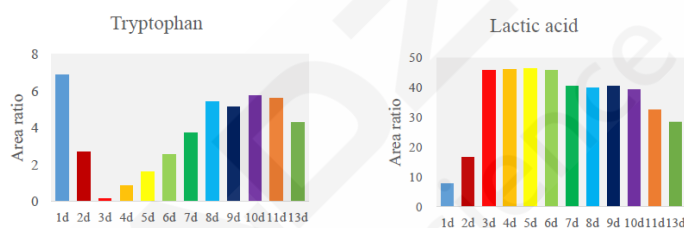


超快速三重四极杆液质联用仪



精彩掠影:

- **细胞培养基分析**
 - 应用于含血清和无血清培养基成分差异分析，帮助开发更符合要求、营养丰富的无血清培养基；
 - 应用于三种抗体药物生产用培养基组成和相对含量的差异分析，可用于不同类别、不同批次培养基的一致性评估。
- **细胞培养过程监控**
 - 应用于抗体药物生产的 CHO 细胞株、哺乳动物细胞、藤黄杆菌、链霉菌、酵母菌和真菌等培养过程监控，可以直观显示培养过程中上清液组分含量变化趋势，从而为培养工艺的改进提供直接的参考依据。



示例：哺乳动物细胞 1-13 天培养过程中化合物相对含量变化情况

4. 《岛津生物药整体解决方案（四）—生物药杂质和辅料分析篇》

生物药杂质可能来源于生产过程中可能产生的聚集体，或工艺中所用到的试剂残留，也可能来自于细胞培养材料或包装材料中的浸出物污染。生物药辅料如吐温 80，可以防止蛋白质在溶解过程中变性、聚集、表面吸附和絮凝，但其降解产物可能会对人体产生副作用。故对生物药杂质和辅料建立可靠的分析方法，对其含量或纯度进行分析和评估，对产品的安全性和有效性至关重要。岛津在生物药杂质和辅料分析方面，已积累了丰富的应用案例，现汇编为《岛津生物药整体解决方案（四）—生物药杂质和辅料分析篇》，供您参考。



动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10



生物惰性液相色谱 Nexera XS inert



电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030



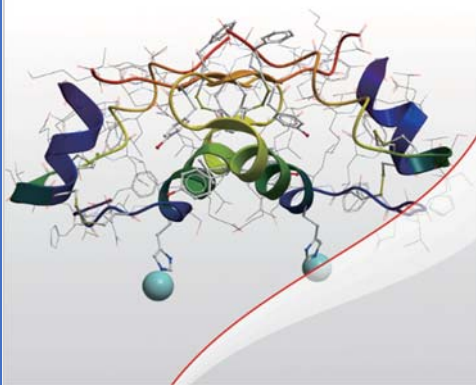
精彩掠影：

- **浸出物和工艺杂质分析**
 - LC-MS/MS 分析一次性细胞培养袋浸出物抗氧化剂双（2,4-二叔丁基苯基）磷酸酯（bDtBPP），该物质过量将抑制细胞生长，本方法快速、灵敏、可靠，可用于含量监控。
 - ICPE-9820 测定单抗药物中消泡剂残留量，方法简便、快速、准确，适用于蛋白类药物中消泡剂残留量测定。
- **聚集体和不溶性微粒分析**
 - 生物兼容液相 Nexera Bio 分析贝伐单抗、阿达木单抗和 Fc 融合蛋白多聚体，分离度好、重复性佳。
 - 使用动态颗粒图像分析系统 iSpect DIA-10 分析了单抗药物中不溶性颗粒的粒度、粒形和颗粒圆度，发现该药物中存在少量粒径较大且形状不规则的颗粒。
- **药用辅料分析**
 - 使用 MALDI-TOF 分析了药用辅料聚乙二醇的分子量及分布；通过比较标品和吐温 80 的分子量分布，对注射剂辅料吐温 80 降解程度进行了评价。
 - 使用 LC-MS/MS 分析了重组人白介素中助溶剂十二烷基硫酸钠（SDS）含量，方法线性范围宽、灵敏度高、重复性好，适合用于 SDS 含量监控。

5. 《岛津生物药整体解决方案（五）—多肽类药物分析篇》

多肽药物的质量研究与控制，主要涉及氨基酸序列和分子量、聚合物杂质、DL 氨基酸构型和 DMPK 分析等。涵盖了研发、生产工艺开发与优化、质量控制及临床试验全流程的分析解决方案。岛津始终密切关注多肽药物分析需求，使用多种仪器，开发了一系列多肽药物分析方法（例如分子量、聚集体、纯度、序列分析、原料质控等），汇编并推出《岛津生物药整体解决方案（五）—多肽类药物分析篇》应用文集，供您参考。

岛津生物药整体解决方案（五） —多肽类药物分析篇



精彩掠影：

- **结构表征**
 - LCMS 结合 LabSolutions 软件的多电荷解卷积分析可进行多肽分子量分析，质量准确度高，计算结果可靠；
 - MALDI-TOF 可用于多肽的分子量表征，分析速度快、无需液相分离、结果简单直观；
 - 蛋白测序仪 PPSQ-53A 可进行多肽药物序列分析，操作简单、检测灵敏可靠；
- **产品质量控**
 - 超高效生物惰性液相 Nexera XS inert 结合 Q-TOF 可对多肽药物中聚集体杂质进行分离并定性分析；
 - MALDI-TOF 可直接通过分子量测定对制剂中聚集体的存在情况进行监测，简便快捷；
 - LC-MS/MS 结合 DL 氨基酸分析方法包，可在 10 min 内完成对 42 种 D/L 型氨基酸检测分析，准确高效；
- **原料质控**
 - MALDI-TOF 可对多肽药物的起始物料保护氨基酸进行定性分析，结果简单直观；
- **DMPK 分析**
 - LC-MS/MS 可用于血浆中多肽药物的含量测定及其人体药代动力学研究，分析速度快、灵敏度高、重复性好。



Q-TOF LCMS-9030/LCMS-9050

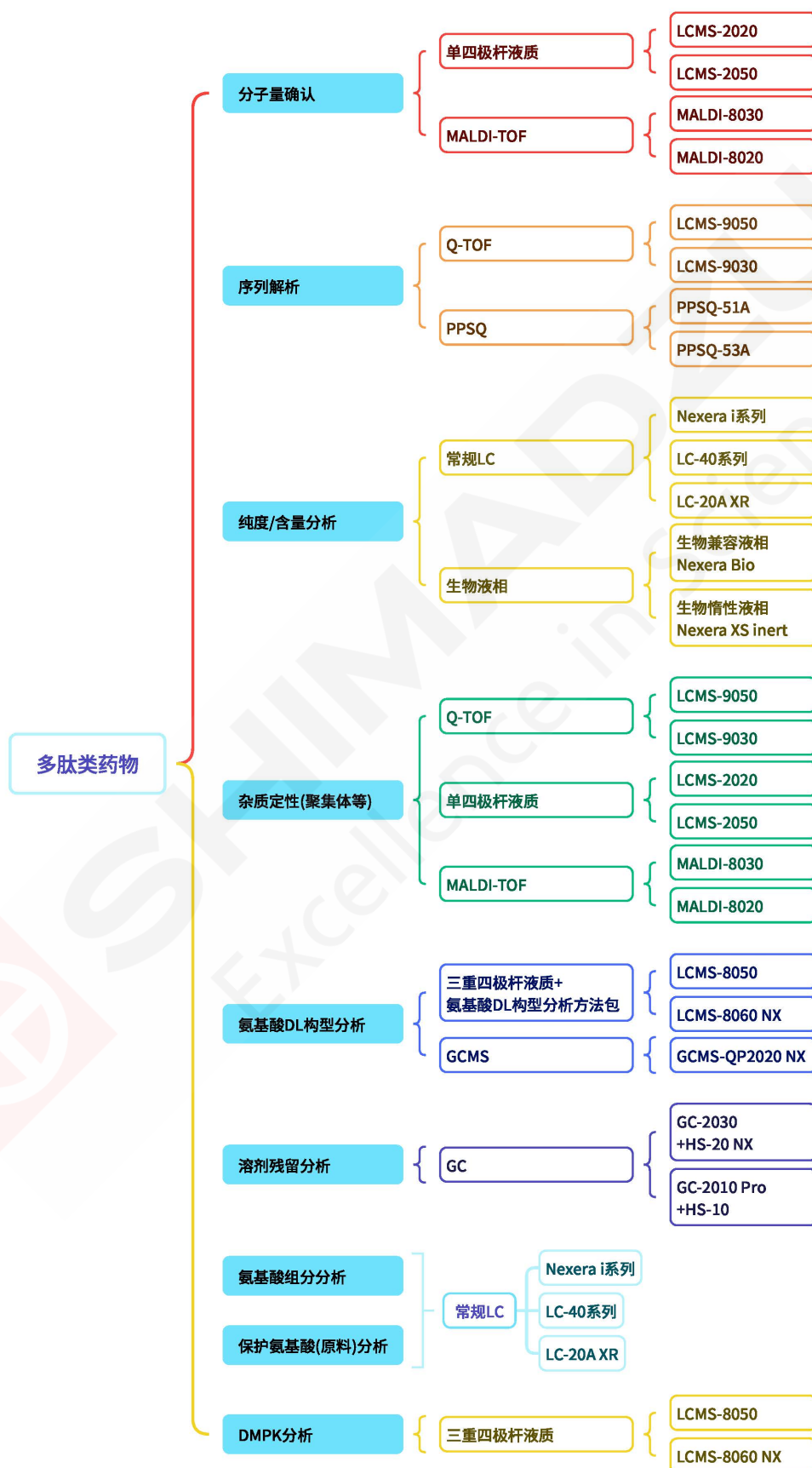


MALDI-TOF MALDI-8020/8030



生物惰性液相色谱 Nexera XS inert

一图速览《岛津生物技术药物整体解决方案（五）—多肽类药物分析篇》



第 2 章 氨基酸相关分析

在多肽药物的研发与生产中，氨基酸的相关分析是一项至关重要的步骤。这一过程不仅涉及到氨基酸的 DL 构型鉴定，也包括了对保护性氨基酸分子量的精确测量。DL 构型分析主要是识别氨基酸的手性形式，因为 L 型和 D 型氨基酸的生物学功能和效果可能大相径庭。L 型氨基酸是蛋白质的主要构成形式，而 D 型氨基酸在自然界中较为罕见，但在特定多肽药物设计中可能起到关键作用。手性中心的确切构型对于多肽药物的生物活性、稳定性以及与生物体内受体的相互作用至关重要。因此，通过氨基酸 DL 构型分析可以确定多肽药物的手性纯度，确保其具有预期的生物活性和药效，并减少潜在的不良反应风险。常见的氨基酸 DL 构型分析方法包括手性色谱分析和核磁共振（NMR）技术等。

保护性氨基酸是在多肽合成过程中使用的一类特殊氨基酸，通过在氨基酸的反应性基团上添加保护基团来防止非特异性反应。这些保护基团在合成的最后阶段被去除。因此，对保护性氨基酸分子量的准确测定对于确保合成过程的精确度和最终产品的纯度至关重要。分子量的测定通常通过质谱(MS)、高效液相色谱(HPLC)等方法进行，这些方法可以提供关于氨基酸及其保护基团精确分子量的重要信息，从而确保多肽药物的合成质量和效能。

整体而言，氨基酸的 DL 构型分析和保护性氨基酸的分子量测定对于多肽药物的开发至关重要。这些分析不仅确保了多肽药物的活性和安全性，还保障了生产过程的高效率和高质量。岛津推出 LC/MS/MS DL 氨基酸分析方法包，结合三重四极杆液相色谱质谱联用仪和手性色谱柱，可实现在 10 分钟之内完成高灵敏度的氨基酸异构体的分离和检测，该方法无需衍生化，有良好精密度与重复性，为多肽药物质量控制提供更为便捷、准确高效的技术手段；同时岛津台式 MALDI-TOF 质谱仪可以对 Fmoc 保护氨基酸的分子量进行精确测定，避免了传统液相分离流动相中酸对 Boc 基团的影响，可作为多肽药物化学合成起始物料快速质量控制的参考。

使用超高效液相色谱-质谱法分析缩宫素 D/L 氨基酸构型

摘要: 本文建立并验证了使用岛津 LCMS-8050 结合 DL 氨基酸分析方法包, 对 D 型与 L 型氨基酸准确高效的分析方法。该方法无需衍生化, 在 10 min 内即可完成对 42 种 D/L 型氨基酸同时检测分析, 具有良好精密度与重复性。使用该方法对缩宫素水解样品进行检测分析, 准确得出 D/L 型氨基酸所占比例。岛津 D/L 氨基酸构型分析方法的建立, 为多肽药物质量控制提供更为便捷、准确高效的技术手段。

关键词: 超高效液相色谱-质谱法 缩宫素 D/L 氨基酸

L 型氨基酸属于天然存在的氨基酸构型, 可合成蛋白质, 作为营养物质在人体内大量存在, 而 D 型氨基酸体内含量极低, 多为人工合成, 但它对于发酵食品成分分析、生理功能分析、神经系统分析和生物标志物检索等各个领域起着至关重要的作用, 甚至关乎人类的健康和美丽。氨基酸 (除了甘氨酸) 都有一个手性碳原子相邻的羧基。氨基酸手性中心的立体异构会形成一对以彼此为镜像的立体异构。结构彼此十分相似, 就好像的左手、右手。这些镜像被称为对映异构体。

然而, D/L 两种氨基酸成分分析经常受到各种各样的肽或氨基化合物的背景干扰, 分析难度大, 并且传统的氨基酸异构体分析必需进行氨基酸的衍生化处理, 分析时间长 (通常分析时间超过 10 小时)。因此急需建立灵敏、高效的分析方法。

面对氨基酸异构体的分析难点, 岛津推出 LC/MS/MS DL 氨基酸分析方法包。本方法采用手性色谱柱实现在 10 分钟之内完成高灵敏度的氨基酸异构体的分离和检测, 同时结合 LCMS-8045/8050/8060 的高灵敏度分析能力可省去氨基酸衍生化的实验流程。

本实验使用 DL 氨基酸分析方法包结合 LCMS-8050 对多肽药物缩宫素水解氨基酸进行异构体分析, 供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为:

系统控制器	: CBM-20A	在线脱气机	: DGU-20A5
输液泵	: LC-30AD×2	质谱仪	: LCMS-8050
自动进样器	: SIL-30AC	色谱工作站	: LabSolutions Version 5.99
柱温箱	: CTO-20AC		

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱 : 参照 DL 氨基酸分析方法包
流 动 相 : 参照 DL 氨基酸分析方法包
流 速 : 0.4 mL/min
柱 温 : 25°C
进 样 体 积 : 0.5 μ L
洗 脱 方 式 : 参照 DL 氨基酸分析方法包
时 间 程 序 : 参照 DL 氨基酸分析方法包

质谱条件

分 析 仪 器 : LCMS-8050	D L 温 度 : 250°C
离 子 源 : ESI	加 热 模 块 温 度 : 300°C
雾 化 气 流 速 : 3.0 L/min	接 口 温 度 : 250°C
加 热 气 流 速 : 5.0 L/min	扫 描 模 式 : 多 反 应 监 测 (MRM)
干 燥 气 流 速 : 15.0 L/min	M R M 参 数 : 参 照 DL 氨 基 酸 分 析 方 法 包

1.3 标准品配制

精密称取 D 型与 L 型氨基酸共 42 种标准品适量, 使用 0.1 mol/L HCL 溶解并稀释, 配置成 10 μ g/mL 混标, 待用。

1.4 样品制备

取多肽样品适量, 放置于反应管中, 按照酸水解的水解方法进行样品前处理。水解完成后, 对所得氨基酸进行冻干, 制备成干粉。检测前, 使用纯水 500 μ L 对冻干粉进行溶解, 进样检测分析。

2. 结果与讨论

2.1 典型色谱图

按照选定的色谱条件, 测定氨基酸标准品 (10 μ g/mL)。为使异构化或理化性质相近的氨基酸有效分离, 方法包推荐使用两根色谱柱进样检测。由所得结果可知, 该方法可有效分离 D 型和 L 型氨基酸及理化性质相近的氨基酸种类, 所得典型 MRM 色谱图见图 1-4。

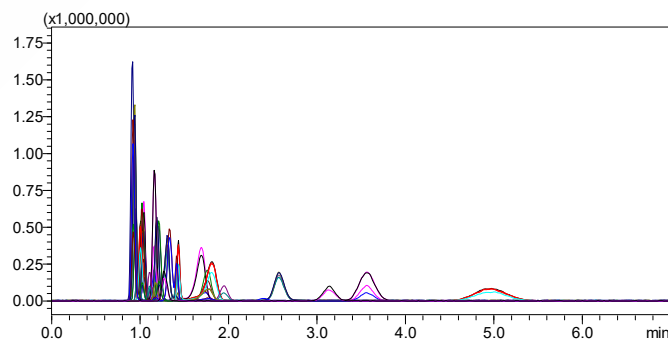
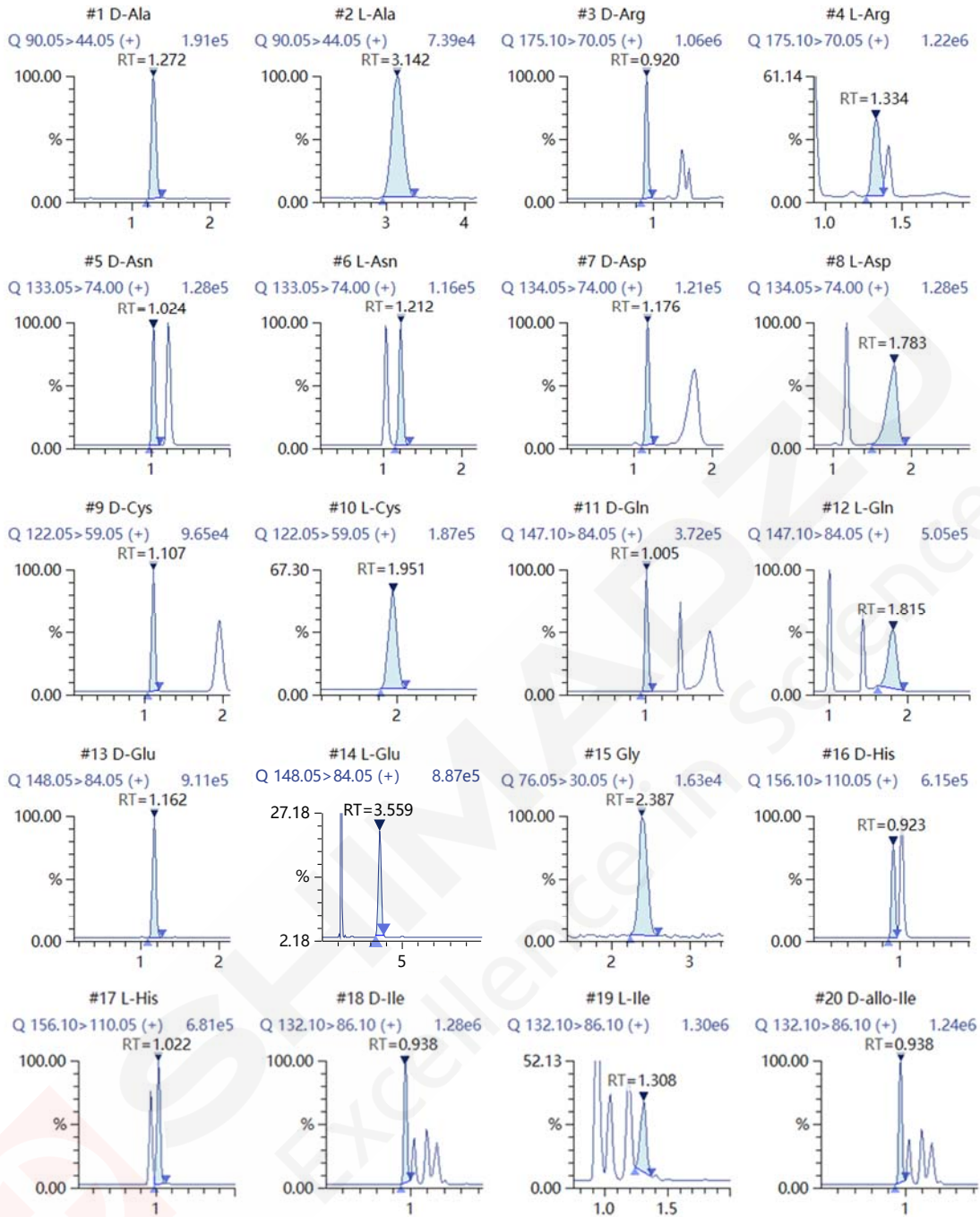


图 1. 42 种 D/L 型氨基酸 MRM 色谱图总图 (分析方法包推荐色谱柱一)



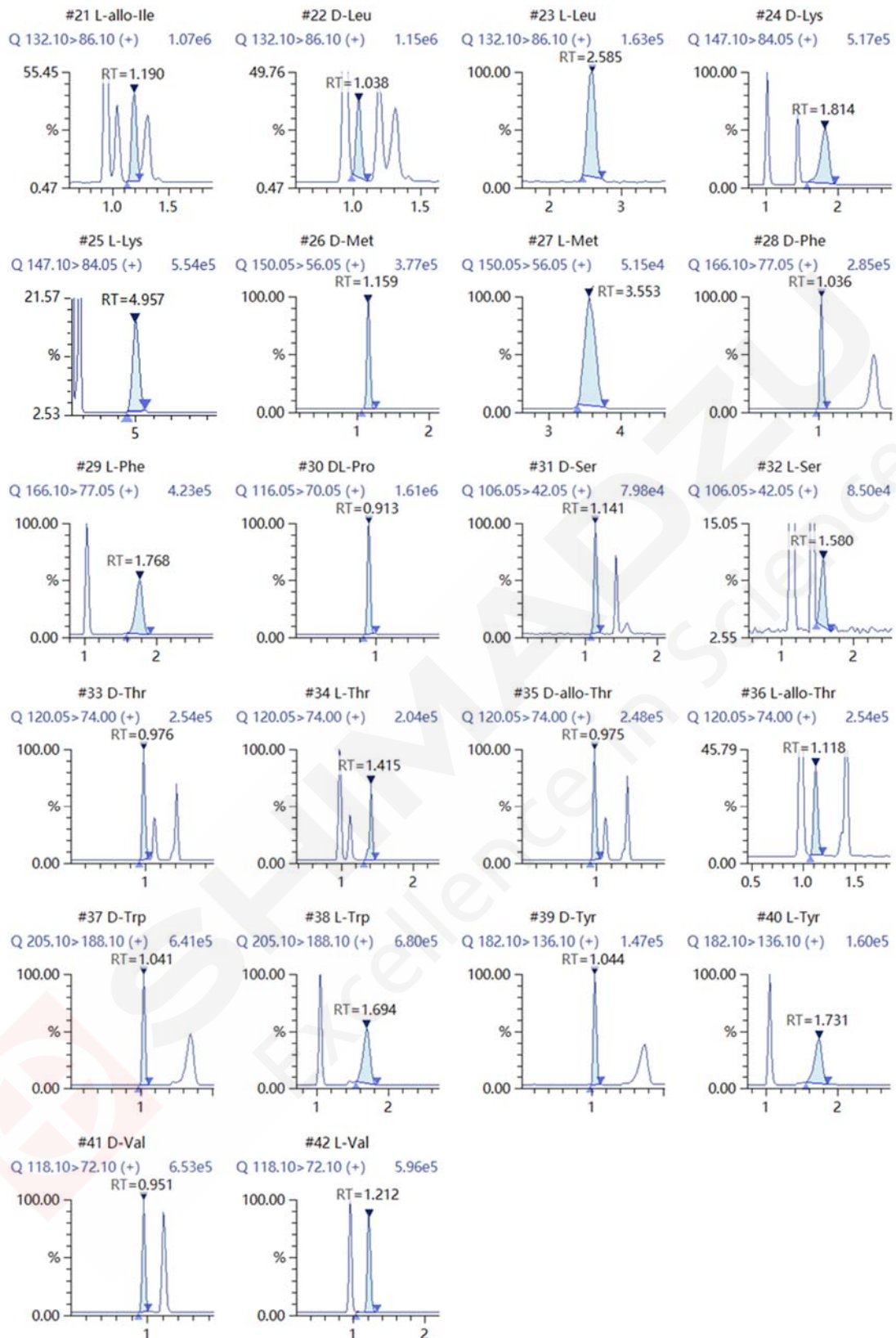


图 2.42 种 D/L 型氨基酸 MRM 色谱图单图 (方法包推荐色谱柱一)

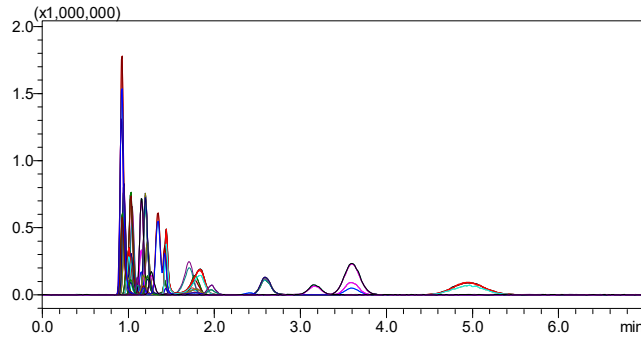
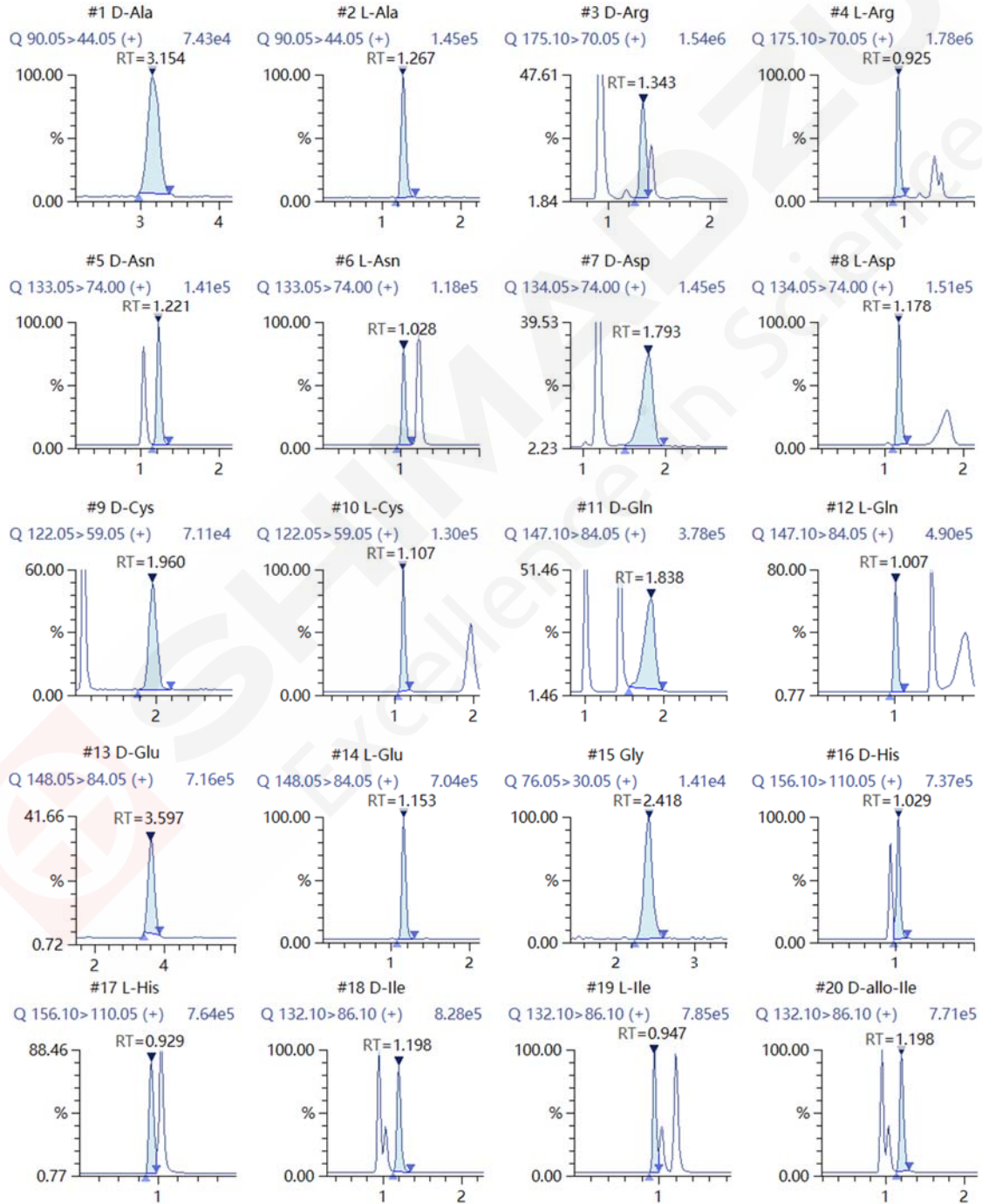


图 3.42 种 D/L 型氨基酸 MRM 色谱图总图 (分析方法包推荐色谱柱二)



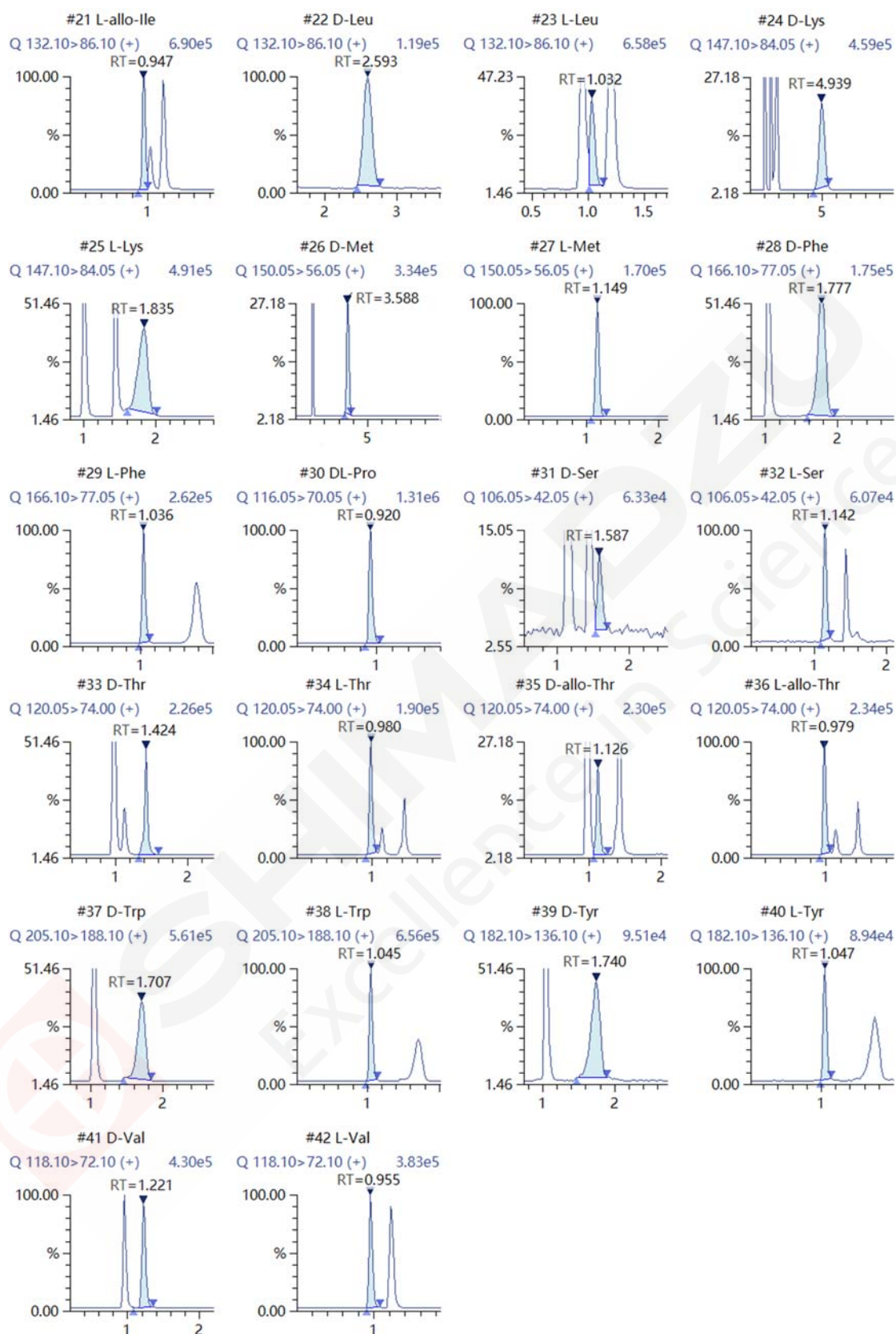


图 4.42 种 D/L 型氨基酸 MRM 色谱图单图 (分析方法包推荐色谱柱二)

2.2 重复性

按照 1.2 项下色谱条件, 使用氨基酸混标溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 连续进样 6 次, 考察 D/L 氨基酸使用分析方法包推荐色谱柱所得结果的精密度, 所得结果见表 1。由结果可知, 42 种 D/L 氨基酸在色谱柱上的保留时间 RSD%均在 0.55%以内, 峰面积 RSD%均在 4.6%以内, 结果表明实验结果具有良好精密度。

表 1. 氨基酸混标溶液精密度结果 (n=6)

No.	氨基酸	分析方法包推荐色谱柱一		分析方法包推荐色谱柱二	
		保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	D-Ala	0.090	2.324	0.184	2.669
2	L-Ala	0.209	1.236	0.093	1.674
3	D-Arg	0.051	1.237	0.049	1.323
4	L-Arg	0.044	1.394	0.032	1.151
5	D-Asn	0.032	1.642	0.054	2.455
6	L-Asn	0.050	1.872	0.044	2.745
7	D-Asp	0.064	2.041	0.471	3.295
8	L-Asp	0.312	0.961	0.069	1.532
9	D-Cys	0.026	3.036	0.283	2.680
10	L-Cys	0.198	1.830	0.038	2.689
11	D-Gln	0.043	1.469	0.204	1.513
12	L-Gln	0.142	2.424	0.044	1.367
13	D-Glu	0.043	1.310	0.156	2.230
14	L-Glu	0.188	1.025	0.038	1.213
15	Gly	0.267	2.965	0.220	3.302
16	D-His	0.041	2.633	0.029	1.049
17	L-His	0.051	1.849	0.043	1.055
18	D-Ile	0.034	1.338	0.068	1.768
19	L-Ile	0.023	0.872	0.060	2.036
20	D-allo-Ile	0.036	2.168	0.051	2.107
21	L-allo-Ile	0.039	2.368	0.042	3.395
22	D-Leu	0.030	1.281	0.180	2.281
23	L-Leu	0.249	2.563	0.043	2.866
24	D-Lys	0.265	2.538	0.711	1.167
25	L-Lys	0.543	1.415	0.277	2.336
26	D-Met	0.044	2.488	0.214	2.032
27	L-Met	0.316	3.290	0.037	1.898
28	D-Phe	0.071	2.065	0.071	3.884
29	L-Phe	0.296	2.748	0.043	2.211
30	DL-Pro	0.021	1.020	0.041	1.937
31	D-Ser	0.041	3.462	0.234	3.453
32	L-Ser	0.160	4.471	0.095	1.145
33	D-Thr	0.040	3.975	0.010	3.570
34	L-Thr	0.021	1.590	0.061	3.532

35	D-allo-Thr	0.042	1.607	0.108	4.323
36	L-allo-Thr	0.054	1.651	0.039	1.603
37	D-Trp	0.043	2.683	0.217	3.989
38	L-Trp	0.093	1.821	0.050	2.386
39	D-Tyr	0.070	1.986	0.359	3.553
40	L-Tyr	0.442	1.861	0.103	4.599
41	D-Val	0.038	1.651	0.070	2.919
42	L-Val	0.049	2.080	0.047	1.957

2.3 实际样本检测结果

按照 1.4 项下前处理操作,对缩宫素药物进行酸水解。按照 1.2 项下分析条件,对所得水解样品进行检测。由分析结果得出,在该多肽水解样品中共检测到 12 种氨基酸,其中 D 型氨基酸 5 种、L 型氨基酸 5 种。Cys-Cys 二硫键未打开, Tyr 部分水解被破坏, Gln 水解转化为 Glu, Asn 水解转化为 Asp, 因此 Cys、Gln、Asn 三种氨基酸未检测到, DL-Pro 是一种仲胺,不能用当前分析条件分离, Gly 无手性。有关 D/L 型氨基酸色谱图见图 5。对检测到的 12 种氨基酸进行峰面积对比分析,所得 D/L 型氨基酸峰面积比结果见表 2。

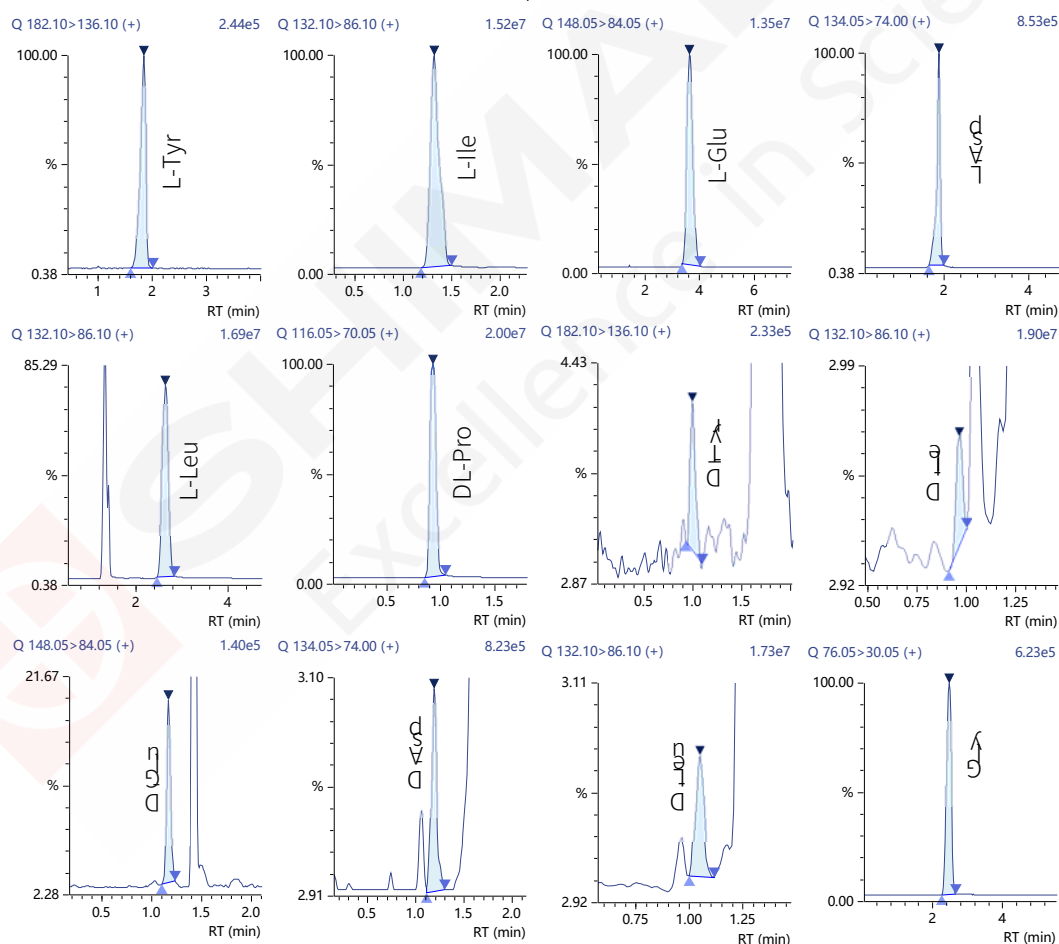


图 5. 水解样品总 D/L 型氨基酸色谱图

表 2. 水解样品 D/L 型氨基酸峰面积比结果

氨基酸	类型	峰面积	D/L 峰面积比	氨基酸	类型	峰面积	D/L 峰面积比
Cys	D 型	N.D.	-	Glu	D 型	55274	0.027%
	L 型	N.D.			L 型	204428704	
Tyr	D 型	6182	0.343%	Asn	D 型	N.D.	-
	L 型	1801298			L 型	N.D.	
Ile	D 型	20257	0.024%	Asp	D 型	4091	0.083%
	L 型	84930810			L 型	4908262	
Gln	D 型	N.D.	-	Leu	D 型	55604	0.045%
	L 型	N.D.			L 型	123798266	
Pro	DL 型	79705982	-	Gly	-	5929118	-

3. 结论

实验使用岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪 LCMS-8050 结合 DL 氨基酸分析方法包，可对 D/L 型氨基酸异构体实现有效分离。所建方法准确、高效，对多肽水解样品所有氨基酸无需衍生化直接进行检测，并通过对 D/L 型氨基酸峰面积数据进行分析，可准确得出 D/L 型氨基酸所占比例。该方法包的使用与检测方法的建立，完美解决 D 型与 L 型氨基酸的含量监控，为多肽药物质量控制提供新型检测手段。

MALDI-TOF 分析多肽药物化学合成起始物料的分子量

摘要：Fmoc 保护氨基酸是多肽药物化学合成常用的起始物料，分子量是药物合成物料质控的关键指标。本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8030 检测了 6 种 Fmoc 保护氨基酸的分子量，本方法无需液相分离、操作简便，还能够直接分析酸性条件下不稳定的含 Boc 基团的氨基酸衍生物的分子量，避免了传统液相分离流动相中酸对 Boc 基团的影响，可作为多肽药物化学合成起始物料快速质量控制的参考。

关键词：MALDI-TOF 多肽药物 Fmoc保护氨基酸 分子量

技术特点：

- ❖ 无需液相分离,基质为中性,可以直接分析在酸性条件下不稳定的含 Boc 基团的氨基酸。
- ❖ 操作简便,图谱直观,除目标化合物外,还可以分析样品中含有的杂质。

多肽药物的合成方法主要包括化学合成和生物发酵法。化学合成法一般通过氨基酸缩合反应实现,主要包括固相合成法与液相合成法。固相合成法是目前多肽药物合成工艺的主流,发展较为成熟。固相合成法主要包括Fmoc(芴甲氧羰基)与Boc(叔丁氧羰基)合成法合成法。Fmoc方法则以Fmoc作为氨基保护基,与Boc合成法相比,Fmoc合成法具有酸性稳定、反应条件温和、副反应少、产率高等优势,因此在多肽固相合成领域的应用越来越广泛。在多肽药物化学合成中,起始物料的质量会对多肽活性成分的质量产生重要影响,而分子量是起始物料质量控制的关键指标。本文应用MALDI-8030测定了6种多肽药物化学合成起始物料——Fmoc保护氨基酸(Fmoc-L-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-L-Gln(Trt)-OH、Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH)的分子量,其中Fmoc-L-Lys(Boc)-OH同时具有Boc保护基团。本方法无需液相分离,操作简便,避免了常规液相条件下酸的存在对氨基酸衍生物中Boc基团的影响(Boc基团在酸性条件下易脱去)。图谱直观,除目标化合物外,还能分析样品中含有的杂质,可用于多肽化学合成起始物料的快速质量控制。

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8030

1.2 分析条件

调谐模式	: 线性正离子模式	激光能量	: 55
激光器	: 355 nm 固态激光器	离子门阈值	: 200
扫描范围	: m/z 200-2000	脉冲引出质量(Da)	: 1800

1.3 样品前处理

称量粉末加甲醇溶解，配制为1 mg/mL的样品工作液。取0.5 μ L NaTFA水溶液（1 mg/mL）、0.5 μ L样品工作液、1 μ L葱三酚基质溶液（10 mg/mL）依次点靶，自然干燥后送入质谱分析。

2. 结果与讨论

6种 Fmoc 保护氨基酸的样品信息及检测结果见表 1，质谱检测结果见图 1。如图 1 所示，6种化合物均检测到显著[M+Na]⁺峰，实测分子量与理论值相符。除[M+Na]⁺峰外，6种化合物还检测到[M-H+2Na]⁺峰，可能分别对应化合物羧基（-COOH）中的氢离子被钠离子取代后（-COONa）的加钠峰。与其他5种氨基酸衍生物不同的是，Fmoc-L-Gln(Trt)-OH还检测到[M+H]⁺峰，这可能与化合物的结构有关。

Fmoc-L-Lys(Boc)-OH 中 Lys 的 α -氨基被 Fmoc 基团保护， ϵ -氨基被 Boc 基团保护。Boc 基团在酸性条件下易发生水解，脱去 Boc 保护基。与常规液相分离条件中加酸不同的是，本实验例中无需液相分离，使用的基质条件为中性，避免了酸性条件对 Boc 基团的影响，因此质谱图中可以检测到完整的样品分子[M+Na]⁺峰 m/z 491.11。

除目标化合物外，部分氨基酸衍生物检测到杂质峰，如 Fmoc-L-Lys(Boc)-OH 检测到 m/z 649.19、m/z 761.34，Fmoc-His(Trt)-OH 检测到 m/z 596.46、m/z 800.37、m/z 910.56，Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH 检测到 m/z 640.15、m/z 752.38，Fmoc-Gly-OH 检测到 m/z 523.48、m/z 661.39 等。

表 1. Fmoc 保护氨基酸样品信息及检测结果

#	名称	CAS	分子式	理论 [M+Na] ⁺ _{mono}	实测 [M+Na] ⁺
1	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	71989-26-9	C ₂₆ H ₃₂ N ₂ O ₆	491.22	491.11
2	Fmoc-His(Trt)-OH	109425-51-6	C ₄₀ H ₃₃ N ₃ O ₄	642.24	642.29
3	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	154445-77-9	C ₃₄ H ₄₀ N ₄ O ₇ S	671.25	671.25
4	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	132327-80-1	C ₃₉ H ₃₄ N ₂ O ₅	633.24	633.17
5	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	71989-38-3	C ₂₈ H ₂₉ NO ₅	482.19	482.13
6	Fmoc-Gly-OH	29022-11-5	C ₁₇ H ₁₅ NO ₄	320.09	320.11

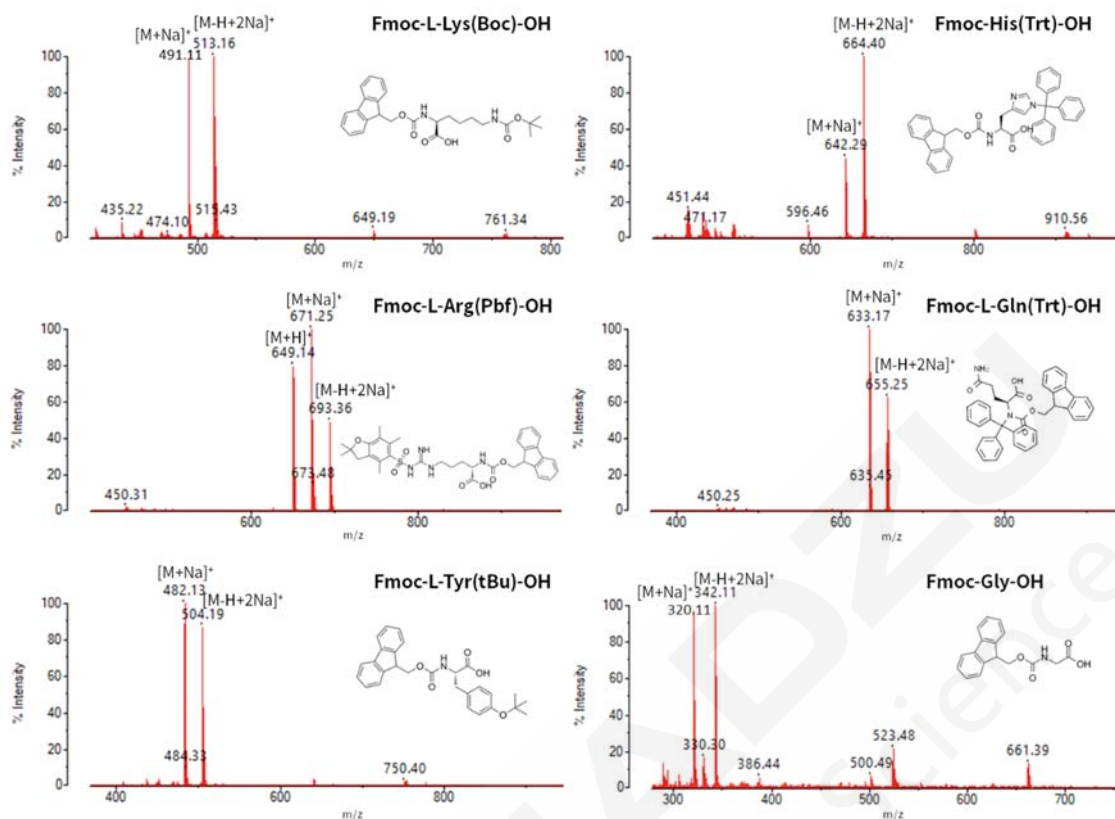


图 1. Fmoc 保护氨基酸质谱图

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 测试 6 种 Fmoc 保护的氨基酸 (Fmoc-L-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-L-Gln(Trt)-OH、Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH) 的分子量, 无需液相分离、操作简便、图谱直观, 能够直接检测酸性条件下不稳定的含 Boc 基团的氨基酸衍生物, 还能分析样品中的杂质, 为多肽药物化学合成物料质控提供直接依据。

第 3 章 多肽原料药分析

多肽原料药的质量控制是确保制备过程中所得多肽药物符合规范的重要步骤。其中，多肽及相关杂质的分子量鉴定是关键之一。目前主流的多肽类药物生产方式为化学合成法，在制备过程中，可能伴随着一系列的化学反应，产生缺失肽、插入肽等肽相关杂质和金属催化剂、缩合剂等残留物这一类的非肽杂质。这些杂质的产生不仅会影响到多肽的理化性质，使多肽药物稳定性降低而影响药效；甚至可能会触发患者的免疫反应，危及患者的健康和安全。因此在质量控制中对多肽和相关杂质进行分子量确证尤为重要，这可以确保药物的一致性和稳定性，并且分子量鉴定还能评估制备工艺的有效性，并指导药物配方的优化。

另一方面，多肽药物的序列分析是通过精确测定多肽分子中氨基酸的顺序和组成来实现的重要过程。在多肽药物的研发和制备阶段，确定其确切的氨基酸序列对于理解其生物活性、特异性以及与生物靶标的相互作用至关重要。序列分析不仅有助于确认所设计药物的预期氨基酸序列，也是质量控制中验证制备多肽药物的一致性和纯度的关键手段。这种分析常采用 Edman 降解法（例如 PPSQ）、高效液相色谱-质谱联用（HPLC-MS）、核磁共振（NMR）等方法，以保证得到准确且可靠的序列信息。

综合而言，多肽原料药的质量控制涉及多个方面，包括多肽及相关杂质的分子量鉴定和多肽的序列测定等。这些质量控制步骤确保了多肽药物的纯度、完整性和规格符合要求，从而保证了药物的安全性和有效性。岛津蛋白测序仪 PPSQ-53A 采用 Edman 降解法对多肽类药物的 N 端氨基酸序列进行测定，结果直接可靠；岛津高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050 兼顾小型化和高性能，是测定多肽类大分子化合物分子量的有力工具，同时结合 LabSolutions LCMS 的多电荷解卷积功能使得分子量计算结果更可靠，是大分子物质分子量分析的理想手段；此外岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 也可以用于多肽类药物分子量及杂质检测，其分析速度快，结果简单、直观（通常以单电荷峰为主），通过质谱图中信号离子的质荷比的大小与分布，快速确认多肽的精确分子量、合成效果及杂质组成情况，为多肽药物合成的质量控制、生产工艺的优化与调整提供参考与依据。

LCMS-2050 在多肽分子量定性分析检测中的应用

摘要：本文使用高效液相色谱四极杆质谱联用仪 LCMS-2050 对泛素（Ubiquitin）多肽进行分子量测定。采用 DUIS (ESI+APCI) 正离子模式对待测样品进行质谱扫描，以 LabSolutions 软件对质谱扫描图进行解卷积多电荷分析，各质谱扫描图中均能观测到对应多肽的不同电荷数离子信号。结果显示，8 种多电荷离子通过解卷积分析确认了分子量为 8564.81，与理论值的偏差为-0.03Da，质量准确度高，体现了 LCMS-2050 质量范围宽的特点，适合多肽、寡核苷酸等大分子物质的分子量检测（多电荷分析）。

关键词：单四极杆质谱 多肽 分子量

多肽是由三个或三个以上氨基酸分子组成，分子量通常低于10000 Da。泛素 (Ubiquitin) 是一种由76个氨基酸合成的多肽，可以通过酶促反应相互连接，进而介导靶蛋白降解。蛋白质泛素化参与许多细胞过程，例如蛋白酶体降解、胞吞、DNA修复、细胞周期调控及基因表达等。在泛素化过程中，泛素连接酶 (E3酶) 对底物的识别是决定泛素化修饰特异性的关键。因此，理解各种E3酶的底物特异性和催化机制成为泛素领域的热点问题。

为了探究泛素化反应机制，通常利用蛋白质化学合成技术先获取大量泛素化中间体模拟物，再对大量合成模拟物进行分子量监控和预判，单四极杆质谱由于质量范围受限以及质量数准确度较低，在大分子物质分子量测定上具有一定局限性。LCMS-2050作为小型化高端分析仪器，宽质量范围 (m/z 最大可设到2000) 是测定大分子化合物分子量的有力工具，例如寡核苷酸、多肽、蛋白质、聚合物等。LabSolutions软件的解卷积多电荷分析功能还可进行高精度中高分子量化合物检测，是大分子化合物和高通量实验室的理想检测器。

本文采用LCMS-2050对泛素多肽进行分子量测定，并结合岛津LabSolutions软件多电荷分析功能对质谱扫描数据进行解卷积，质量准确度高，体现了LCMS-2050的宽质量范围的特点。

1. 实验部分

1.1 仪器

系统控制器	: SCL-40	柱温箱	: CTO-40C
脱气机	: DGU-405	检测器	: SPD-40
输液泵	: LC-40D XR (含 LPGE)	质谱仪	: LCMS-2050 单四极杆质谱仪
自动进样器	: SIL-40C XR	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114



LCMS-2050

SIMPLY EFFORTLESS

兼顾小型化和高性能

灵敏度 (S/N) <small>* Reserpine 1 µg</small>	100: 1 (RMS)
质量范围	m/z 2-2000
离子化单元	加热型ESI/APCI (DUIS™)
正负离子切换时间	10 msec
扫描速度	15,000 u/s

图 1. 高效液相色谱质谱联用仪 LCMS-2050

1.2 分析条件

液相色谱条件

- 色谱柱 : Shim-pack GIST C18 Column (2.1 mm I.D.×100 mm L., 2.0 µm, P/N: 227-30001-04, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)
- 流动相 : A 相-0.1%甲酸/水, B 相-0.1%甲酸/甲醇 进样体积 : 10 µL
- 流速 : 0.3 mL/min 柱温 : 35 °C
- 洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	100
13.00	Pumps	Pump B Conc.	100
14.00	Pumps	Pump B Conc.	10
20.00	Controller	Stop	

质谱条件

- 离子源 : DUIS (ESI+APCI) 脱溶剂温度 : 450 °C
- 雾化气 : 2.0 L/min 接口电压 : +3 kV
- 干燥气 : 5.0 L/min 扫描模式 : SCAN (+)
- 加热气 : 7.0 L/min 扫描范围 : 500~2000
- D L 温度 : 250 °C

1.3 样品前处理方法

将泛素标准品溶液用去离子水稀释至 0.1 mg/mL, 待测。

2. 结果与讨论

2.1 泛素的色谱图

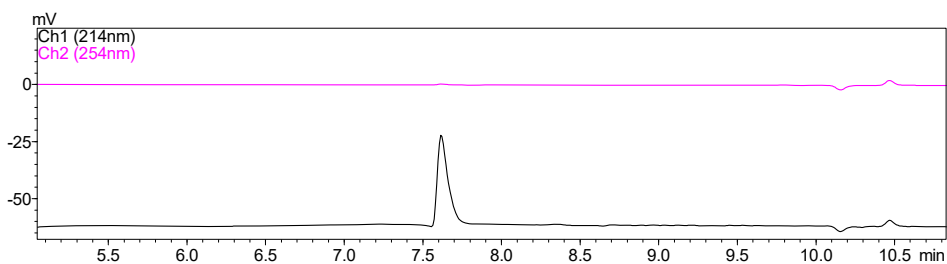


图 2. 泛素 UV 色谱图

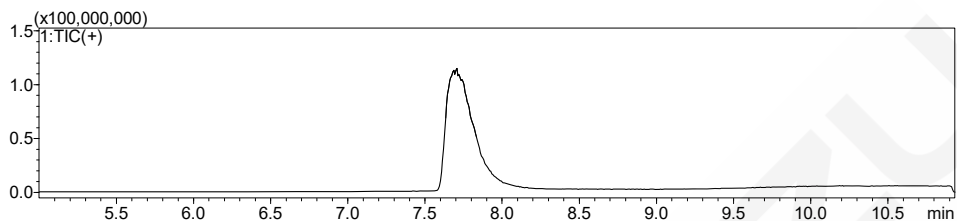


图 3. 泛素 TIC 色谱图

2.2 多电荷分析结果

通过泛素的 TIC 色谱图 (图 3) 获得 MS 数据, 质谱图结果显示, 该样品在 m/z 500~2000 范围内存在 8 种多电荷离子信号 (图 4)。通过岛津 LabSolutions™ 的解卷积功能进行多电荷分析得到待测物的分子量, 解卷积操作步骤见图 5。

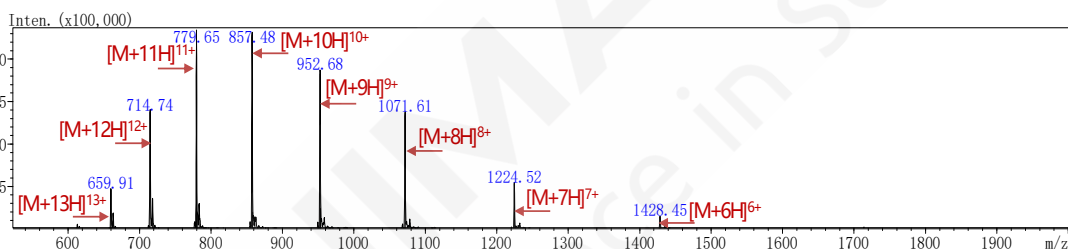


图 4. 泛素的质谱图 (m/z 500~2000)



图 5. 岛津 LabSolutions™ 的解卷积功能设置

泛素的扫描质谱图经解卷积多电荷分析，结果如图 6 所示，该多肽的 8 个带不同电荷数离子峰均被准确识别且解析得到相应电荷数和质量数，确认该多肽的分子量为 8564.81，各多电荷峰的质量数标准偏差为 0.389，质量数精准。

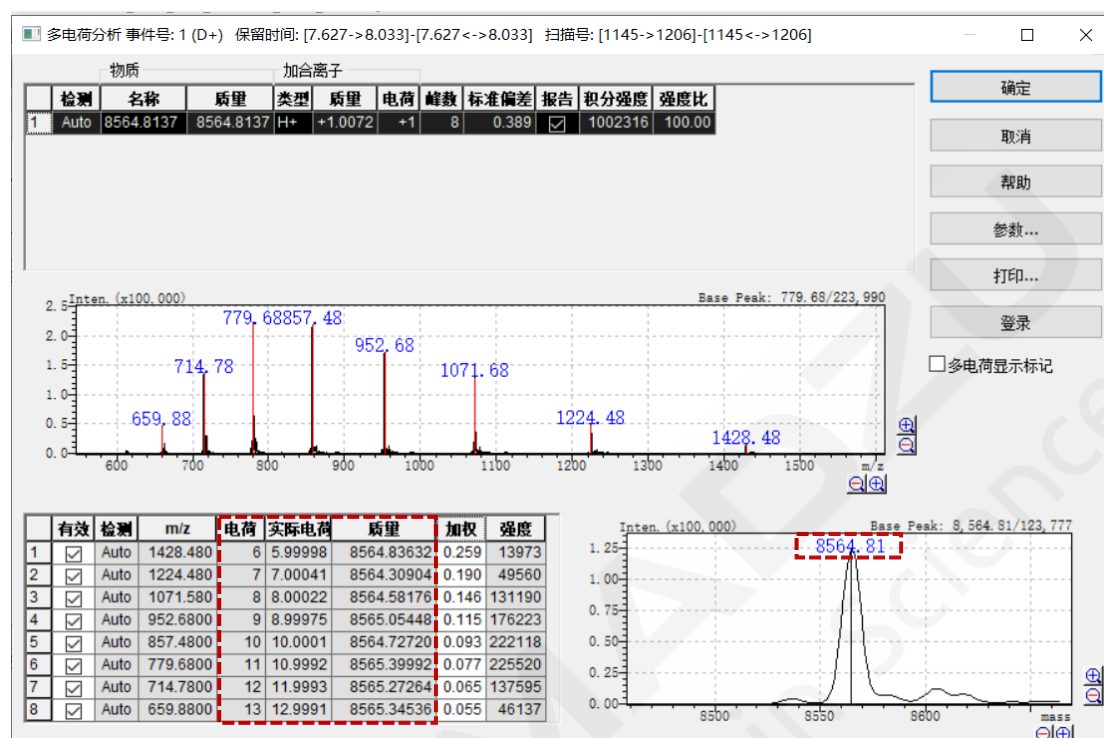


图 6. 泛素的解卷积图谱

2.3 质量准确度结果

LCMS-2050 检测到了泛素 8 种电荷数的离子信号，m/z 范围最大可到 2000。以 LabSolutions 软件对泛素的质谱图进行解卷积多电荷分析，各质谱图中均能观测到对应多肽的不同电荷数离子信号。并且，解卷积后的实测分子量与理论分子量的偏差为-0.03Da，质量准确度高。

表 2. 质量准确度测试结果

中文名	英文名	理论分子量	实测分子量	偏差 (Da)
泛素	Ubiquitin	8564.84	8564.81	-0.03

3. 结论

LCMS-2050 的宽质量范围是测定大分子化合物分子量的有力工具，例如寡核苷酸、多肽、蛋白质、聚合物等。本文以定性分析泛素多肽的分子量测定为例，检测到 m/z 500 到 2000 一系列的从 6 价到 13 价的 8 种不同电荷数的离子信号。使用 LabSolutions LCMS 的解卷积功能，泛素的分子量计算为 8564.81，与理论值的误差为-0.03 Da，宽质量范围有利于此类型分析，因为包含了更多的解卷积峰使得分子量计算结果更可靠，是分析宽质量范围的大分子物质的理想手段。

台式 MALDI-8030 用于司美格鲁肽的快速合成质控

摘要：多肽药物的分子量及杂质的确认和分析，是药物质量控制的必要环节。MALDI-TOF MS 具有分析速度快、无需液相分离、结果简单直观等优点，本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8030 分析了市售及在研的司美格鲁肽商品和合成中间体，快速获得药物的精确分子量及杂质组成情况，为多肽药物合成的质量控制、生产工艺的优化与调整提供参考与依据。

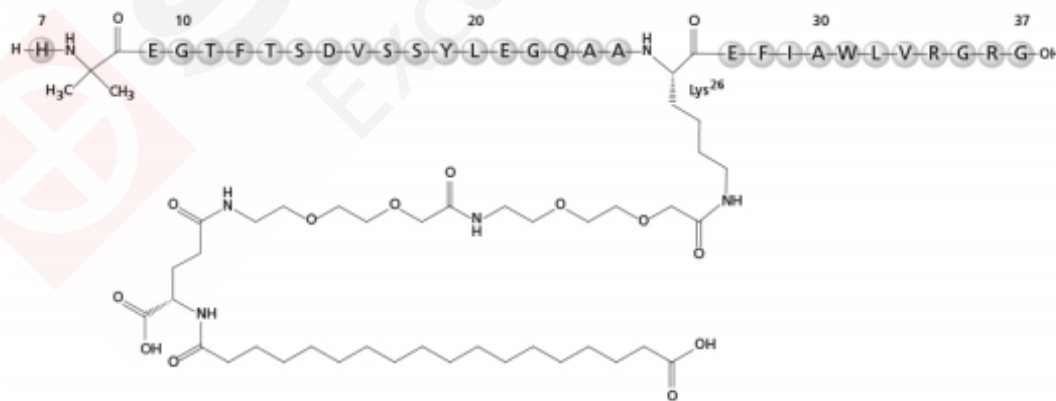
关键词： MALDI-TOF 多肽药物 司美格鲁肽 分子量 杂质

技术特点：

- ❖ 前处理简单，无需液相分离，分析速度快，可以进行高通量检测。
- ❖ 图谱简单、直观，根据质谱图中信号峰质荷比的大小及组成可快速确认多肽药物的精确分子量与杂质组成情况。

司美格鲁肽 (Semaglutide) (又叫索马鲁肽，司美格鲁肽为全球范围内通用药物名称，索马鲁肽为中国区商标) 是诺和诺德公司推出的一款长效胰高糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物，为2022年销售额最高的多肽药物，用于治疗2型糖尿病，同时因“减肥”效果备受推崇，在美国已获批用于治疗肥胖症。

多肽药物的合成方法包括通过动植物中提取、化学合成和基因重组三种，其中化学合成占比在90%以上。对合成的多肽药物进行分子量及杂质的确认，是药物质量控制的必要环节。本文展示了应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8030对市售司美格鲁肽及某企业按照半重组制备法生产的在研司美格鲁肽合成中间体进行分子量及杂质进行快速确认的例子，可作为多肽药物合成快速质控的参考。



序列：H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(AEEAc-AEEAc-γ-Glu-17-carboxyheptadecanoyl)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

图 1. 司美格鲁肽结构式

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8030

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式 激光能量：50
激光器：355 nm 固态激光器 离子门阈值：1000
扫描范围：m/z 1000-10000 脉冲引出质量(Da)：4000

1.3 样品前处理

样品：市售司美格鲁肽注射液、司美格鲁肽合成中间体。

取0.5 μL 样品工作液和0.5 μL CHCA (α -氰基-4-羟基肉桂酸) 基质溶液 (10 mg/mL) 依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。在质谱采集软件上选择待分析的样品靶点，可在几分钟内实现数十个样品的批量采集。

2. 结果与讨论

2.1 司美格鲁肽注射液分子量检测

对市场购买的司美格鲁肽注射液应用 MALDI-8030 进行分子量检测，结果见图 2。样品检测到 m/z 4114.38 的离子峰，为化合物的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 形式，对应分子量 4113.37 Da，与司美格鲁肽的理论分子量 (4113.64 Da) 接近。除 m/z 4114.38 外，样品还检测到 m/z 2057.88、m/z 8228.42 的离子峰存在，分别对应化合物的 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 与 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ 形式。样品质谱图信噪比良好，图谱上未观测到明显杂质信号。

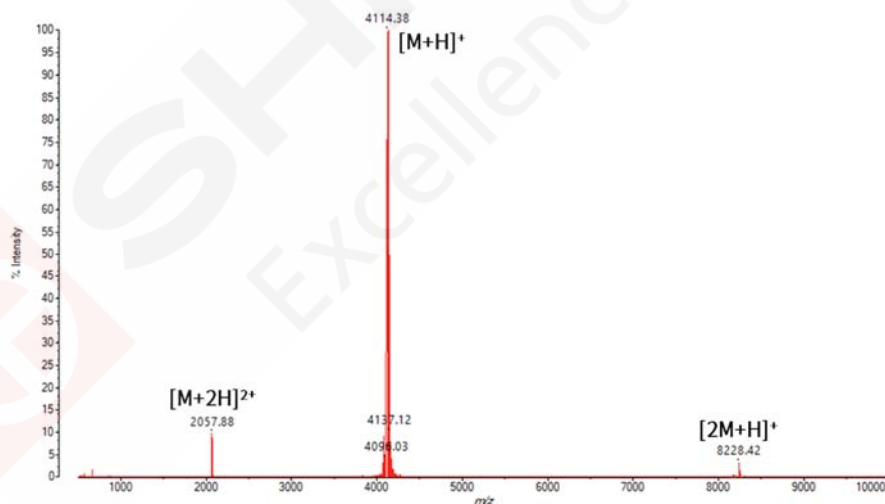


图 2. 市售司美格鲁肽的质谱图

2.2 司美格鲁肽合成中间体的分子量及杂质检测

应用 MALDI-8030 对 3 份来自某企业在研的司美格鲁肽合成中间体产品进行分子量及杂质检测，包括前体分子 (使用酿酒酵母重组表达的 GLP-1 类似物前体分子)、修饰后 (前体分子 Lys_{26} 残基的 ϵ -氨基经酰化剂 (分子式 $\text{C}_{35}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{13}$) 酰化得到的前体分子衍生物)、偶联后 (前体分子衍生物与包含非蛋白氨基酸的 N 端氨基酸突出端 (分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_4$) 进

行偶联后的产物)，质谱图见图 3-图 5。司美格鲁肽合成前体及中间体分子量及杂质检测统计结果见表 1。

表 1. 司美格鲁肽合成前体及中间体分子量及杂质检测结果

#	名称	分子式	理论 [M+H]	实测 [M+H] ⁺	误差 (Da)	杂质
1	前体分子	C ₁₄₂ H ₂₁₆ N ₃₈ O ₄₅	3176.52	3176.23	0.29-	无明显杂质信号
2	修饰后	C ₁₇₇ H ₂₇₇ N ₄₁ O ₅₇	3892.40	3891.99	0.41	m/z 3275.49、m/z 3354.49、m/z 3621.47、m/z 2135.24 等
3	偶联后	C ₁₈₇ H ₂₉₁ N ₄₅ O ₅₉	4114.65	4114.66	0.01	m/z 3821.16、m/z 3598.14、m/z 4215.26、m/z 2107.81 等

司美格鲁肽合成方法参考“GLP-1 类似物半重组制备法”（专利申请号：200880124022.1，申请人诺沃-诺迪斯克有限公司），主要合成路线包括：1. 酿酒酵母重组表达获得 GLP-1 类似物前体分子；2. 使用酰化剂（分子式 C₃₅H₆₃N₃O₁₃）在前体分子 LyS₂₆ 残基的ε-氨基进行酰化得到前体分子衍生物；3. 前体分子衍生物与包含非蛋白氨基酸的 N 端氨基酸突出端（分子式 C₁₀H₁₆O₃N₄）进行偶联，获得最终产物。

图 3 显示，前体分子检测到 m/z 3176.23 信号峰，与[M+H]⁺理论值 m/z 3176.52 相符，质谱图信噪比良好，图谱上未观测到明显杂质，表明前体分子纯度较好。

图 4 中，样品同时检测到前体分子（m/z 3176.23）与修饰后目标产物的质谱峰（m/z 3891.99），表明肽段修饰成功，但反应不完全，反应体系中仍有较多前体分子残留。除此之外，还检测到 m/z 3275.49、m/z 3354.49、m/z 3621.47、m/z 2135.24 等信号峰，可能为合成过程中的副产物。

图 5 中，样品同时检测到前体分子衍生物（m/z 3892.35）与偶联后目标产物的质谱峰（m/z 4114.66），表明肽段偶联成功，但反应不完全，反应体系中仍有较多未偶联的前体分子衍生物的残留。除此之外，样品还检测到较多杂质，包括 m/z 3821.16、m/z 3598.14、m/z 4215.26、m/z 2107.81 等，可能为偶联过程中产生。对杂质进行分析，有助于生产工艺的调整与优化。

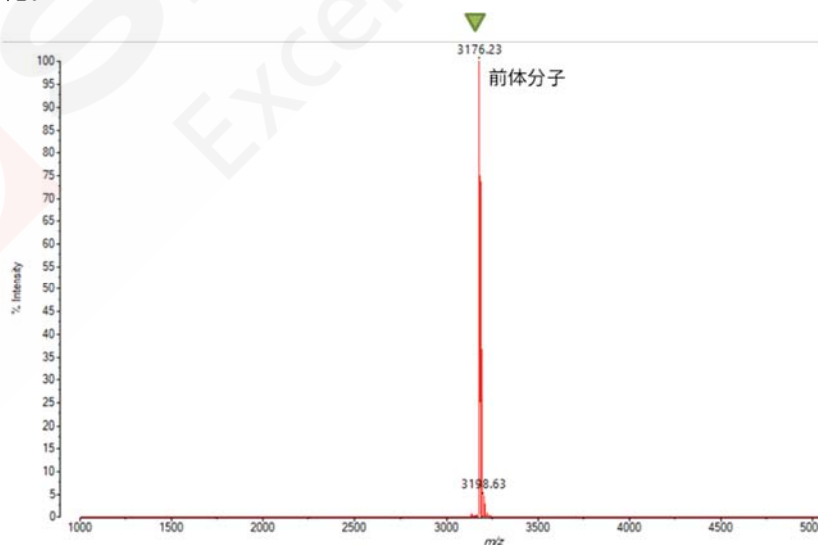


图 3. 前体分子的质谱图

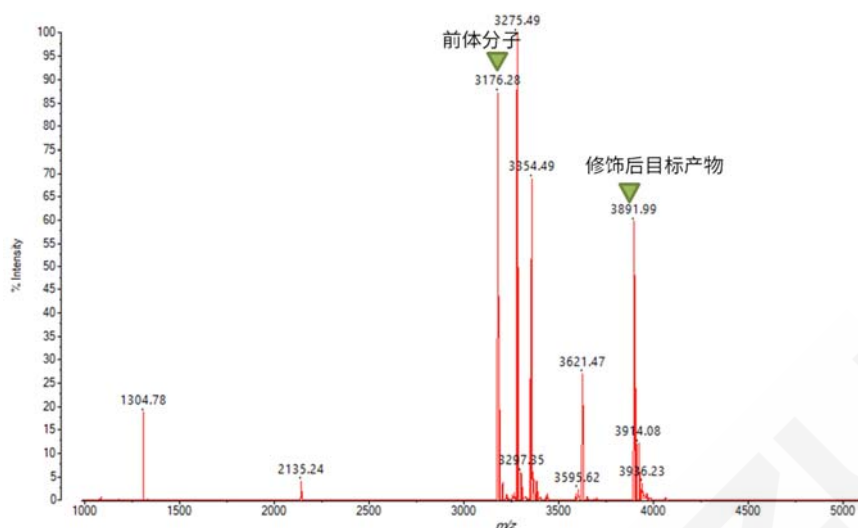


图 4. 修饰后产物的质谱图

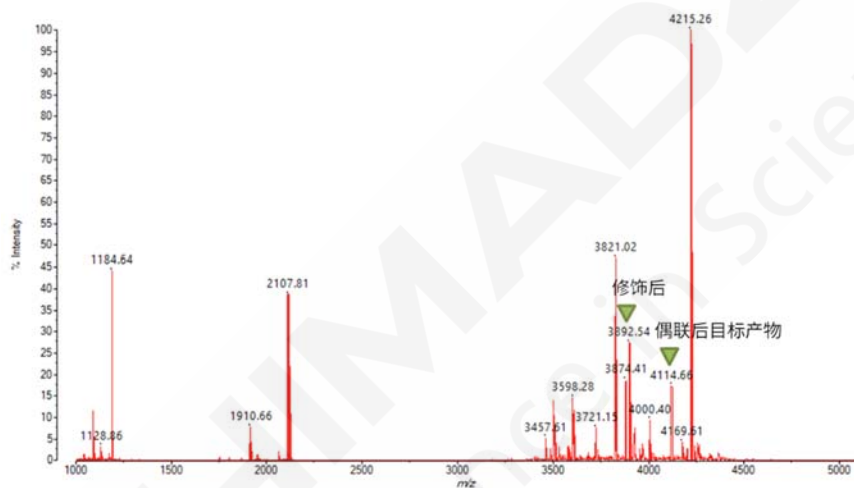


图 5. 偶联后产物的质谱图

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 对司美格鲁肽商品和在研合成中间体产品进行分子量及杂质检测, 无需液相分离以及复杂的解卷积等数据分析操作, 分析速度快, 结果简单、直观, 通过质谱图中信号离子的质荷比的大小与分布, 快速确认多肽的精确分子量、合成效果及杂质组成情况, 为多肽药物合成的质量控制、生产工艺的优化与调整提供参考与依据。

MALDI-TOF 快速分析聚乙二醇化多肽药物及原料的分子量

摘要：分子量是评价聚乙二醇修饰多肽或重组蛋白药物的重要指标，本文展示了应用MALDI-TOF 检测聚乙二醇化多肽药物及用于修饰反应的多肽、聚乙二醇等原料分子量的应用案例，本方法操作简便、分析速度快，可作为多肽药物修饰产物确认、原料质量控制的参考。

关键词： MALDI-TOF 聚乙二醇化多肽 聚乙二醇 多肽

技术特点：

- ❖ 分析速度快、操作简便，可以快速对聚乙二醇化多肽药物的原料-聚乙二醇及多肽进行质量控制。
- ❖ 图谱简单，根据分子量直接判别聚乙二醇修饰是否成功以及修饰数量。

多肽及重组蛋白药物具有活性高，选择性强等特点，但在体内容易被蛋白酶降解，半衰期短。在多肽及蛋白药物上进行聚乙二醇化修饰，可以延长半衰期，增强药物稳定性，提高药物疗效。聚乙二醇（PEG）是一种由环氧乙烷重复单元组成的合成聚合物，不会产生免疫反应，分子量是聚乙二醇对多肽或重组蛋白是否正确修饰的重要指标。《中国药典（2020年版）》提到可以采用基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）等方法测定制品的平均分子量，对聚乙二醇修饰数目的范围及相对含量进行控制。本文应用台MALDI-8030质谱仪对PEG化多肽药物及多肽、PEG原料的分子量进行检测，分析速度快、操作简便，结果直观，可为PEG化多肽药物的修饰效果、修饰数量的确认以及原料质量控制提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱仪 MALDI-8030

1.2 分析条件

调谐模式	： 线性正离子模式	激光能量	： 75-125
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门阈值	： 1000/5000
扫描范围	： m/z 1000-50000	脉冲引出质量(Da)	： 4000/23000

1.3 样品前处理

多肽 (M.W. 3542.87 Da)：称量粉末加水溶解，配制为1 mg/mL的样品工作液。取0.5 μ L 样品工作液和0.5 μ L CHCA基质溶液依次点靶，自然干燥后送入质谱分析；

聚乙二醇[mPEG-PPMA (-23k)]：称量粉末加入甲醇溶解，配制为5 mg/mL的样品工作液。取10 μ L样品工作液、10 μ L DCTB基质溶液（溶于乙腈）、5 μ L NaTFA水溶液混合，取1 μ L混合溶液点靶，自然干燥后送入质谱分析；

聚乙二醇化多肽：称量粉末加入甲醇溶解，配制为5 mg/mL的样品工作液。取0.5 μ L样品工作液和0.5 μ L SA基质溶液点靶，自然干燥后送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 多肽分子量测定

多肽原料 (M.W.理论值 3542.87 Da) 的质谱图 (图 1) 所示, 检测到 m/z 3543.96、 m/z 1772.62 与 m/z 7086.94 的离子峰, 分别对应多肽的 $[M+H]^+$ 、 $[M+2H]^{2+}$ 与 $[2M+H]^+$ 化合物形式, 化合物分子量检测值 3542.95 Da, 质量误差 0.08 Da。质谱局部放大图显示, 除目标化合物外, 样品还检测到 m/z 3498.26、 m/z 3526.25、 m/z 3604.47、 m/z 3688.62 等离子信号, 可能为样品中含有的杂质。

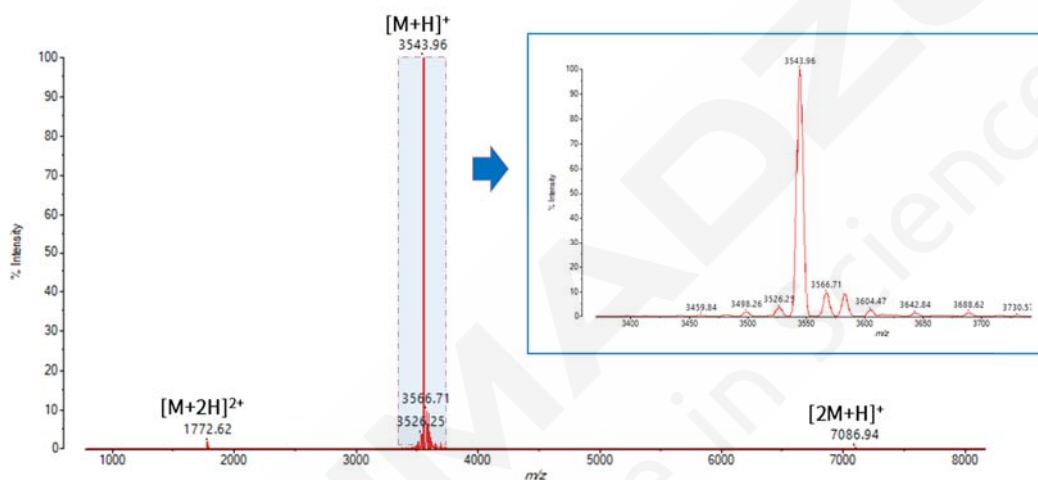


图 1. 多肽原料质谱图

2.2 聚乙二醇分子量测定

聚乙二醇原料 mPEG-PPMA (-23k) 的质谱图 (图 2) 中, 检测到 m/z 23299.09 与 m/z 11651.30 的离子峰, 根据信号强度的大小推测可能分别对应 PEG 原料的 $[M+Na]^+$ 与 $[M+2Na]^{2+}$ 离子, 化合物分子量检测值 23276 Da。不同批次及不同厂家来源的聚乙二醇原料分子量可能有一定差别, 使用 MALDI-8030 检测 PEG 原料的分子量, 可方便地进行物料控制, 及时发现原料间的差异。

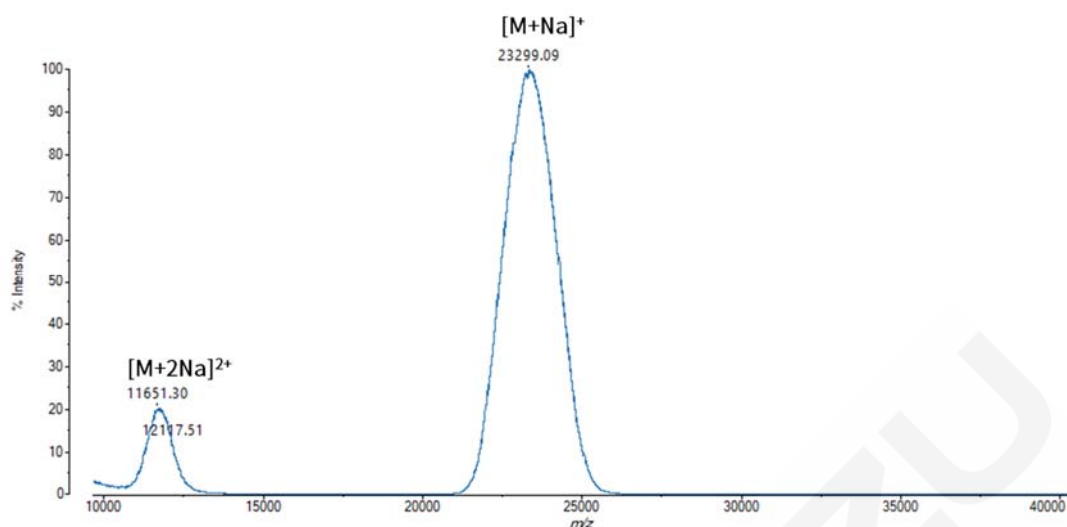


图 2. mPEG-PPMA (-23k) 原料质谱图

2.3 聚乙二醇化多肽分子量测定

PEG 修饰产物 PEG 化多肽的质谱图(图 3)显示, PEG 化多肽分子量检测值 m/z 26843.70, 与 mPEG-PPMA (-23k) 相比分子量增加 3568 Da, 增加值与多肽原料 (理论分子量 3543 Da) 分子量接近。该结果表明, 多肽药物上 PEG 修饰成功, 平均修饰 1 分子 PEG。

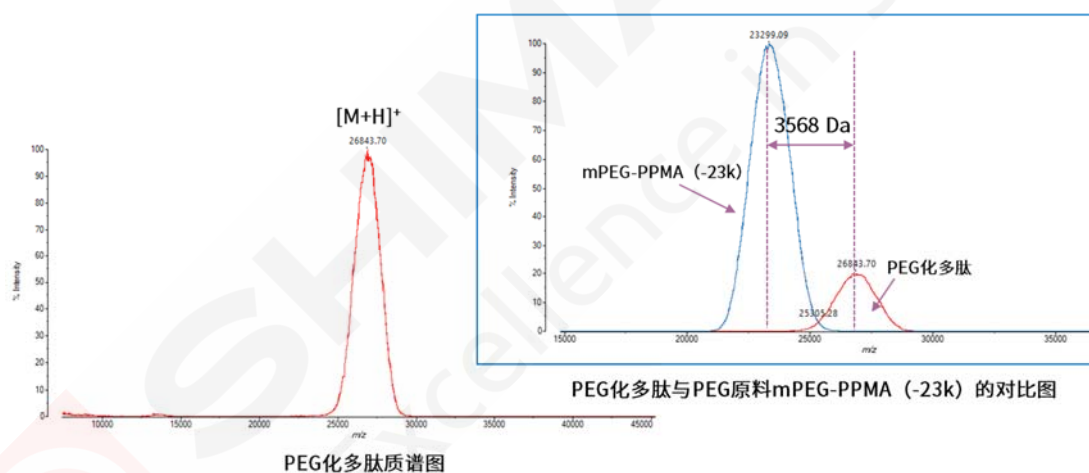


图 3. 聚乙二醇化多肽质谱图

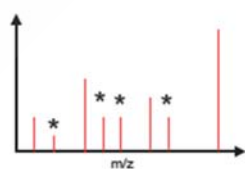
3. 结论

本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 对聚乙二醇化多肽药物及其原料多肽和聚乙二醇进行分子量检测, 分析速度快、操作简便、图谱简单直观, 通过修饰产物及原料的分子量, 可以快速判断聚乙二醇修饰效果, 并对原料进行质量控制。

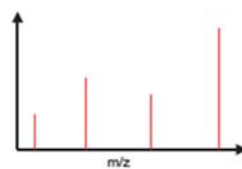
使用双极性台式 MALDI-TOF MS MALDI-8030 进行合成肽的质量控制

摘要: 目前, 合成多肽在生物化学、免疫学及医学等领域的应用日益广泛。它们满足了多种用途, 例如癌症的诊断和治疗、药物及其输送系统的开发、表位定位、抗体生产及疫苗设计等。肽的合成是一个逐步反应的过程, 它涉及一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基之间的反应, 从而形成所谓的肽键。得到的粗肽产品通常含有杂质(例如, 合成过程中产生的副产物), 因此需要纯化工序。在合成多肽的生产过程中, 质量控制(quality control; QC) 在提供高纯度产品方面扮演着重要角色。MALDI-TOF MS 被广泛用于确认最终肽的分子鉴定及其纯度。本文介绍了用于正负离子模式下合成肽QC 分析的双极性台式线性质谱仪MALDI-8030(图1)。负离子模式的优点在以下方面得到证实。

- i. 保持携带不稳定官能团的化学物质的完整性
- ii. 通过消除盐加合物的干扰, 简化质谱图的解析



正离子模式
受多种盐的影响,
质谱图复杂
(*表示盐加合物)



负离子模式
质谱图简单,
易于解析

图1 用于合成肽 QC 分析的双极性 MALDI-8030

技术特点

- ❖ 可使用平价的台式MALDI-TOF 通过轻松、简单的负离子测定实现肽的质量管理。
- ❖ 适用于携带不稳定官能团的多肽。
- ❖ 由于采用不会检测出盐加合物的负离子模式，因此可获得简洁且更易于解析的质谱图。

1. 实验部分

合成多肽样品由Bachem（英国）倾情提供。这里包含2 种不同的多肽。

- 1) 肽D：包含与2 个与酪氨酸残基结合的不稳定磺基
- 2) 肽A：以半纯化和纯化的形式提供

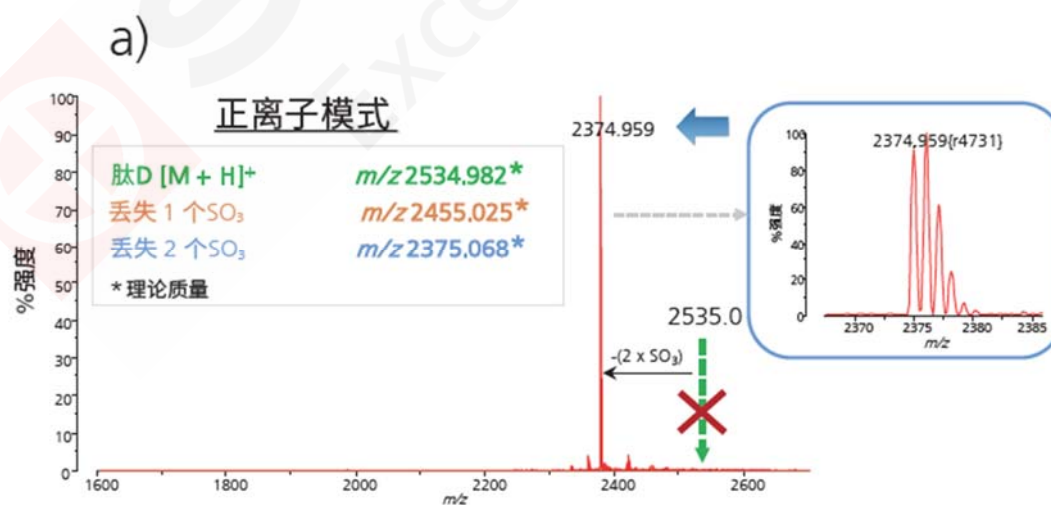
样品在乙腈/ 水1:1 的条件下制备，根据仪器极性，添加或不添加酸(0.1% 三氟乙酸(TFA))。在MALDI 分析中，所有样品均使用5 mg/mL 的 α - 氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) [乙腈/ 水 (1:1)，根据仪器极性选择添加或不添加0.1% TFA] 一起点靶。

2. 结果与讨论

2.1 肽D的结果

图 2 所示为肽D 获得的正负离子模式下MALDI 质谱图。通常在正离子模式下分析时，样品为丢失不稳定的磺基，产生带正电的物质种类（图2 a）。测定结果仅检测出相当于丢失两个磺基的物质种类（理论值 m/z 2375.068）。

在负离子模式下的质谱图（图2 b）中，2 种不稳定磺基得以保持，成功地检测出完整的多肽（理论值 m/z 2532.966），除此之外，还检测出与丢失1 个及全部2 个磺基相对应的化合物（理论值分别为 m/z 2453.010 及2373.052）。所有检测出的物质种类都已进行同位素分离（{{} 所示单一同位素谱峰的分辨率），且质量精度良好。



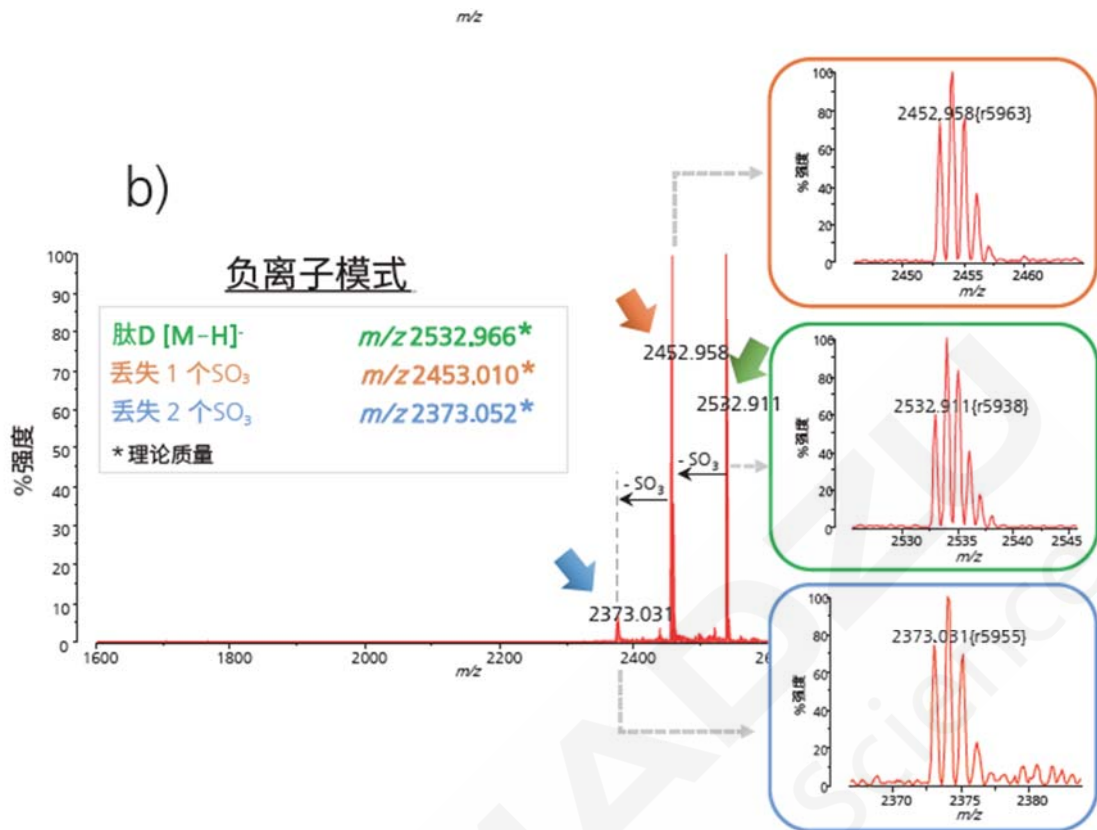


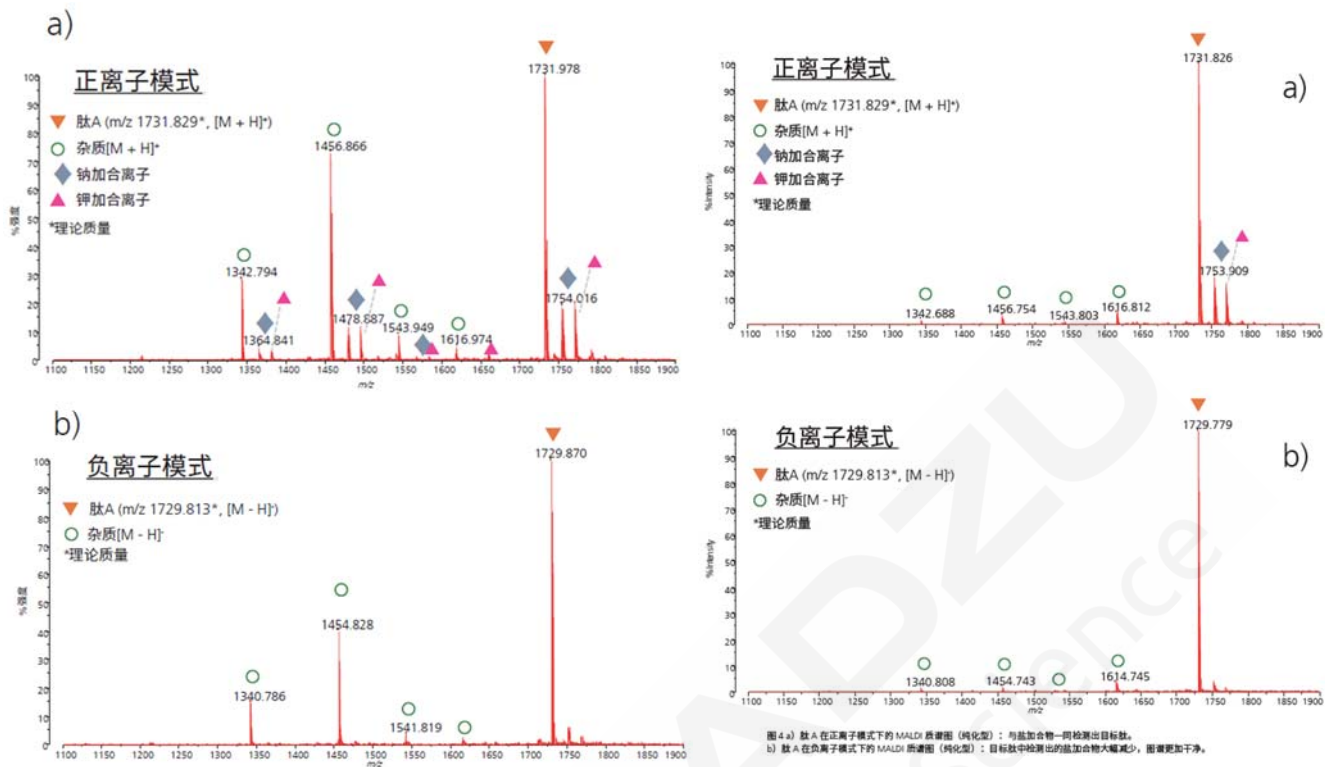
图2 肽D的质谱图

a) 正离子模式: 仅检测到对应丢失 2 个磺基的物质种类。
 b) 负离子模式: 检测到对应丢失 1 个及 2 个磺基的物质种类, 同时成功检测出完整的物质种类。
 精确计算的单一同位素质量如左侧插入图所示。检测出的单一同位素质量分辨率如() 内所示。

2.2 肽A的结果

肽A在粗产物纯化的一系列阶段后, 以半纯化及纯化的形式提供。半纯化型为含有大量杂质的中间体。图3 a 所示为肽A (半纯化型) 在正离子模式下的MALDI 质谱图。可以观察到, 由于杂质与最终产物均存在盐加合物 (钠和钾), 质谱图的解析复杂。

相比之下, 负离子模式下的MALDI 质谱图则没有盐加合物, 图谱更加干净, 解析起来更加容易 (图3 b)。在两种模式下, 最终产物肽均以良好的质量精度完成检测。类似的考虑也适用于肽A 的纯化型 (图4)。同样, 负离子模式下质谱图中目标肽产物的盐加合物显著减少, 因此质谱更加干净。



3. 结论

本应用表明负离子模式在合成肽QC 分析中的有效性。虽然在肽分析中, 正离子模式检测更为常见, 但经上述案例可以证明, 出于两种理由, 负离子模式更为有效。

- 1) 防止丢失不稳定官能团, 轻松检测出完整的物质种类。
- 2) 在负离子模式下, 盐加合物的产生显著减少, 因此所得质谱图更加干净, 更易于解析。

应用蛋白测序仪 PPSQ-53A 进行醋酸格拉替雷仿制药与原研药 N 端相对氨基酸水平一致性评价

摘要：本文应用岛津蛋白测序仪 PPSQ-53A，定量分析了醋酸格拉替雷原研药与某在研仿制药 N 端前六个循环的相对氨基酸水平，通过各氨基酸生成量的趋势变化的比较，为醋酸格拉替雷仿制药的开发及生产质控提供参考。

关键词：蛋白测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 醋酸格拉替雷

醋酸格拉替雷 (Glatiramer acetate, 简称为GA) 是一种人工合成的复杂多肽混合物，由Glu(谷氨酸)、Ala(丙氨酸)、Tyr(酪氨酸)和Lys(赖氨酸)等四种氨基酸随机聚合而成，由以色列药厂TEVA研发制造 (商品名Copaxone)，用于治疗多发性硬化症 (MS)。随着醋酸格拉替雷的专利到期，给国内厂商醋酸格拉替雷仿制药的开发推出，提供了市场机会。

醋酸格拉替雷在生产过程中，通过聚合及解聚反应，可以将分子量控制在一个较窄的范围。生产工艺的改变以及所用试剂的变化都有可能使药物的组分比例发生变化。由于醋酸格拉替雷是一种具有一系列分子量和氨基酸序列的合成多肽混合物，对每种成分进行精确分析既无可能也无必要，因此为对醋酸格拉替雷仿制药与原研药进行一致性评价，需要采用特定的表征技术对全部组分进行整体表征。

在合成多肽及重组蛋白类药物的理化性质均一性表征中，采用Edman降解法的蛋白测序仪常用来对多肽/蛋白质的N端氨基酸序列进行测定。蛋白测序仪由液相系统和可执行自动化Edman降解反应的主机组成，可将氨基酸从多肽链的N端依次切割下来，通过色谱的保留时间判定氨基酸种类，结果直接可靠。除了对N端氨基酸序列进行定性分析外，利用液相色谱稳定的定量能力，也可以对多肽的上样量或特定循环的氨基酸组成进行定量分析。本文采用蛋白测序仪PPSQ-53A测试了Copaxone与某在研仿制药N端前六个循环的相对氨基酸水平，由于生产工艺的改变可能引起GA相对氨基酸水平的变化，通过比较原研药与仿制药中Glu、Ala、Tyr和Lys等四种氨基酸经色谱检测到的相对含量水平的差异，为仿制药的开发及生产质控提供参考，可作为醋酸格拉替雷仿制药与原研药一致性评价的依据。

1. 实验部分

1.1 仪器

蛋白测序仪 PPSQ-53A



图 1. 蛋白测序仪 PPSQ-53A

1.2 分析条件

GFD 分析模式，循环数设置为 7（第一个循环不参与反应）。

1.3 样品前处理

取 2 μL 样品加水稀释 40 倍，配置为样品工作液。取 10 μL 样品工作液加入经聚酰胺处理的玻璃纤维膜上，干燥后安装到 PPSQ 反应器上进行分析。

出于时间及成本考虑，本实验仅作参考示例，未对单次实验的重复性进行考察。实验共测试了 3 个批次的原研药 Copaxone 以及 4 个批次的某在研仿制药

2. 结果与讨论

2.1 PTH-氨基酸混合标准品测试色谱图

测试 19 种 PTH-氨基酸的混合标准品，用于色谱出峰时间校准，PTH-氨基酸混合标准品测试图谱见图 2。

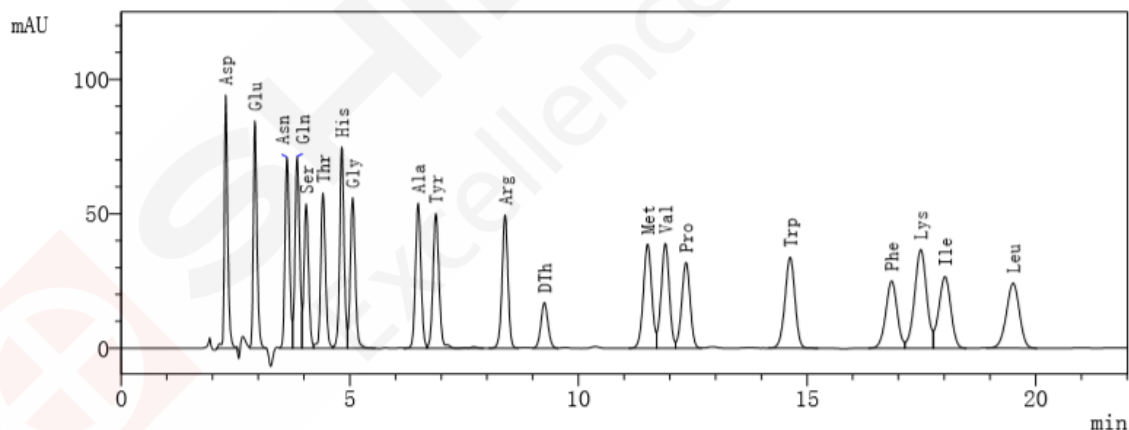


图 2. PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

2.2 醋酸格拉替雷原研药 Copaxone 及某在研仿制药 N 端氨基酸分析色谱图

醋酸格拉替雷原研药 Copaxone 与某在研仿制药 N 端前 6 个氨基酸的分析色谱图示例见图 3。从图谱来看，醋酸格拉替雷原研药及仿制药每个循环均检测到 Glu、Ala、Tyr、Lys 等 4 种氨基酸，这与药品由 Glu、Ala、Tyr、Lys 等 4 种氨基酸随机聚合而来一致。原研及仿制药的图谱较为相似。

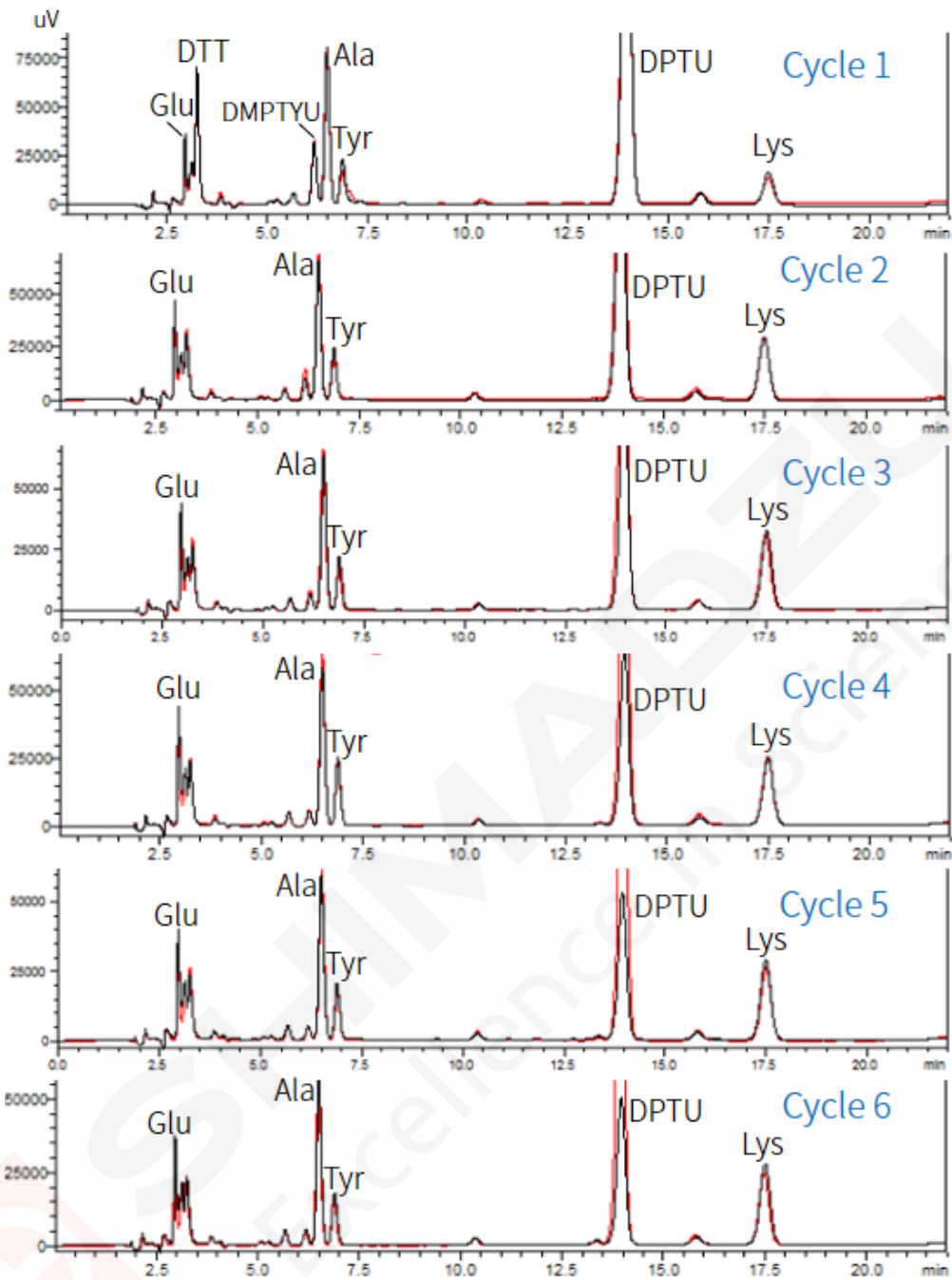


图3. 醋酸格拉替雷原研药Copaxone与某在研仿制药N端氨基酸分析色谱图示例（1-6循环）
（黑色：原研药Copaxone；红色：仿制药；DTT、DMPTU、DPTU为试剂峰）

2.3 醋酸格拉替雷仿制药与原研药N端相对氨基酸水平一致性比较

PPSQ-53A 软件可以自动生成分析报告，分析报告中包含了每个循环中各氨基酸生成量的统计。由于氨基酸的生成量与样品上样量成一定比例关系，可根据氨基酸的生成量推测样品的初始上样量，对样品原液的初始浓度进行验证。根据仪器自动生成的氨基酸生成量，计算每种氨基酸的摩尔含量，例如，Glu 的相对摩尔含量为：

$$\text{相对摩尔含量 (Glu)} = \frac{\text{mol(Glu)}}{\text{mol(Glu)} + \text{mol(Ala)} + \text{mol(Tyr)} + \text{mol(Lys)}}$$

根据氨基酸的相对摩尔含量绘制原研及仿制药各循环中各氨基酸生成量的趋势图，见图4。从趋势图来看，仿制药各循环氨基酸生成量趋势与原研整体相似，但GA仿制药-批次1的

Glu的相对含量略低，GA仿制药-批次4的各循环Tyr的相对含量略高，批次1中Glu的偏低与批次4中Tyr的偏高是否正常需要对原研进行多批次实验，以判断是否超出正常范围。GA仿制药-批次2及GA仿制药-批次3的Tyr生成量趋势与其他样品有明显不同，提示仿制药生产工艺可能存在与原研不同的地方。该结果可为仿制药的开发及生产质控提供参考。

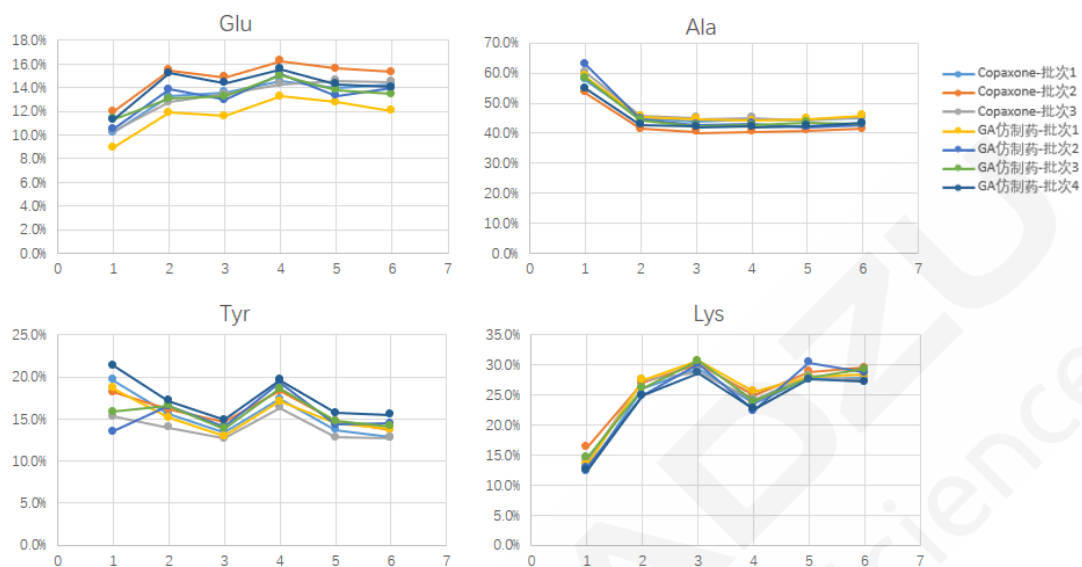


图4. 醋酸格拉替雷 Copaxone 与某在研仿制药 N 端前 6 个循环相对氨基酸水平
(纵坐标: 相对摩尔含量; 横坐标: 循环数)

3. 结论

本文应用岛津蛋白质测序仪 PPSQ-53A，定量分析了醋酸格拉替雷原研与某在研仿制药 N 端前 6 个循环的相对氨基酸水平，通过各氨基酸生成量的趋势变化的比较，为仿制药的开发及生产质控提供了参考。同时，本文说明 PPSQ-53A 不仅可以用于蛋白质 N 端氨基酸序列定性分析，也可用于样品特定循环氨基酸组成的相对定量分析。

应用蛋白测序仪 PPSQ-53A 测定多黏菌素 B 的氨基酸序列

摘要: 本文应用岛津蛋白测序仪 PPSQ-53A, 对经过无花果蛋白酶酶切解除 N 端封闭的多黏菌素 B2 组分进行氨基酸序列分析, 测得 N 端氨基酸序列为 Thr-DABA-X-DABA-Phe-Leu-DABA-DABA-Thr (X 代表信号无检出), 与理论一致。本方法操作简单、检测灵敏可靠, 可作为多肽类抗生素氨基酸序列分析时的参考。

关键词: 蛋白测序仪 PPSQ-53A 氨基酸序列 多黏菌素B

近年来, 多重耐药细菌的出现对临床抗感染治疗构成严重挑战, 多黏菌素B (Polymyxin B, PMB, 结构通式见图1) 被重新用于临床治疗, 已逐渐成为对多重耐药革兰阴性杆菌感染的最后一道防线。PMB为发酵的多肽类抗生素, 组分种类较多, 其中占比较高的四种主要组分包括B1、Ile-B1、B2、B3, 组成氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、二氨基丁酸, 除苯丙氨酸的构型为D型外, 其余氨基酸均为L型。目前对多黏菌素B结构的研究主要为氨基酸组成成分、氨基酸构型分析等, 鲜有氨基酸序列的研究报道。氨基酸序列是其能否正确发挥生物活性的重要基础, 有必要对多黏菌素B的氨基酸序列进行确证。对氨基酸构型的分析方法包括水解后的手性衍生-色谱/质谱法、直接采用手性色谱分析, 然而这种方法测定的是氨基酸混合物, 无法确定每个位点的氨基酸及其构型。Edman降解法可以弥补以上缺陷, 从N端开始测定每个位点的氨基酸, 但需裸露出N端氨基酸的 α -氨基。本研究以B2组分为例, 对其进行分离纯化和酶解后, 获得去除N-酰基脂肪链及1位二氨基丁酸的肽链, 解除了N端封闭, 通过PPSQ-53A测定其氨基酸顺序。该方法操作简单、检测灵敏可靠, 可作为多肽类抗生素氨基酸序列分析时的应用参考。

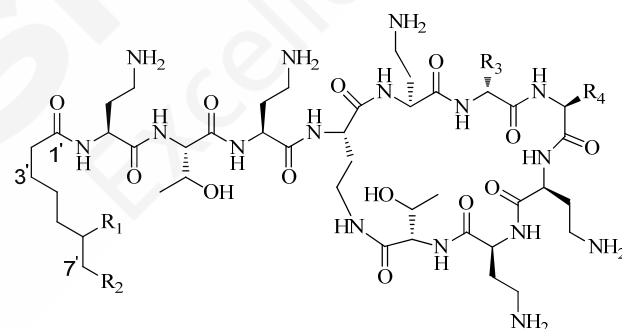


图 1. 多黏菌素 B 结构通式

表 1. 多黏菌素 B 组分信息表

Polymyxin	R1	R2	R3	R4
B1	CH3	CH3	D-Phe	L-Leu
B2	CH3	H	D-Phe	L-Leu
B3	H	CH3	D-Phe	L-Ile
Ile-B1	CH3	CH3	D-Phe	L-Ile

品测试图谱见图 4。

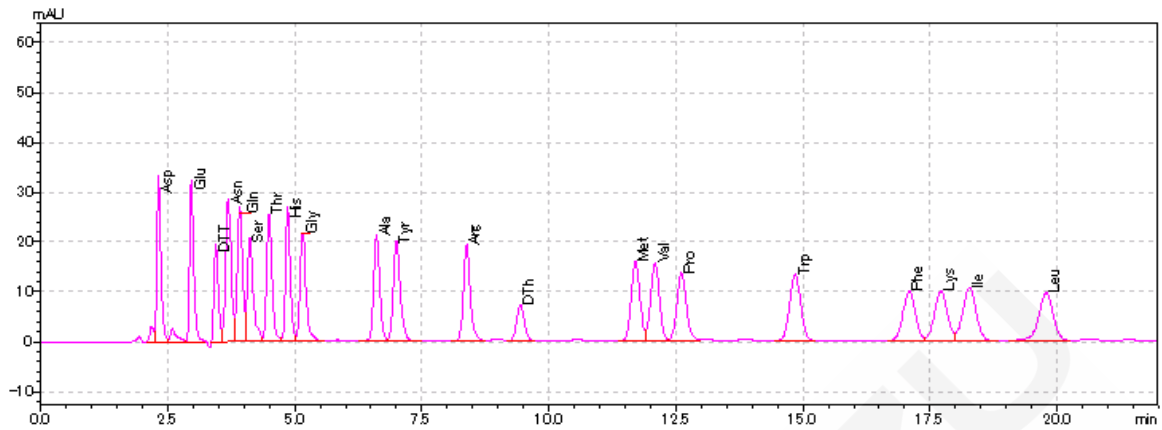


图 4. PTH-氨基酸混合标准品校准测试图谱

3.2 DABA (α , γ -二氨基丁酸) 标准品分析

取 DABA (α , γ -二氨基丁酸) 标准品以 GFD 模式上样，色谱分析结果中观测到 DABA 的信号峰，该信号峰的出峰时间用于样品多黏菌素 B2 中的 DABA 出峰时间校准，色谱图见图 5。

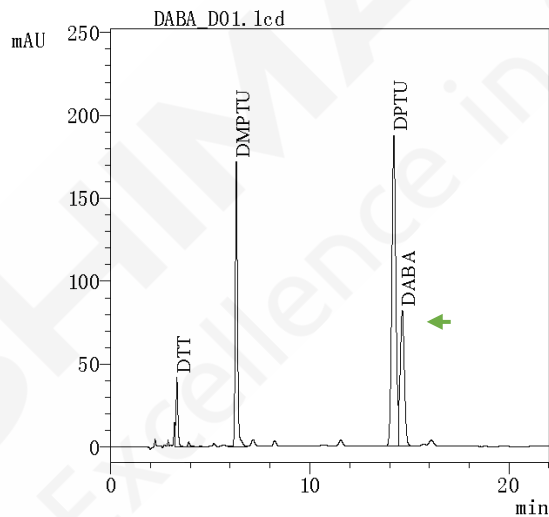
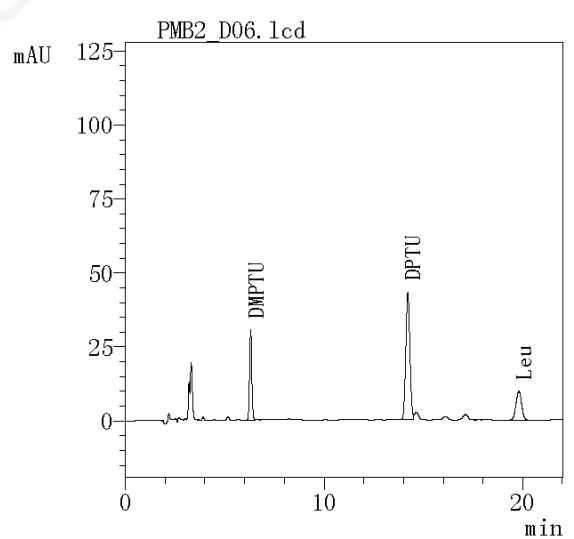
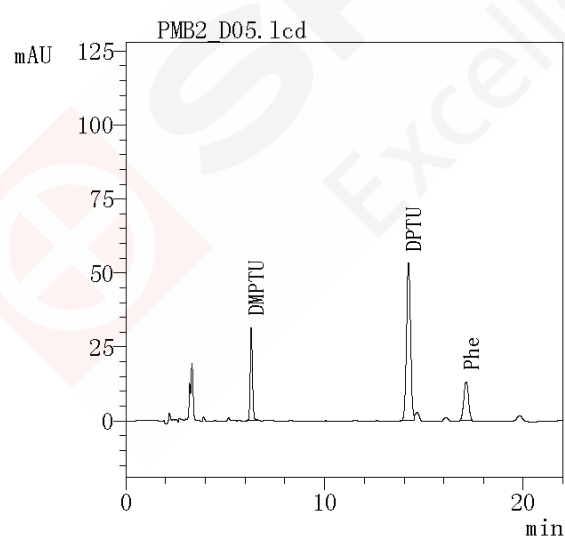
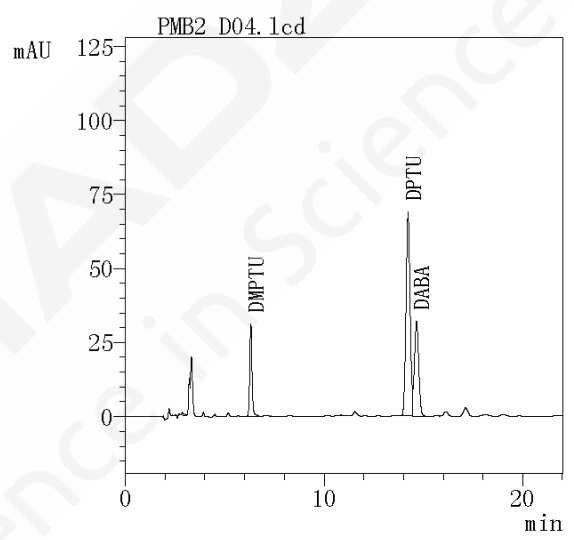
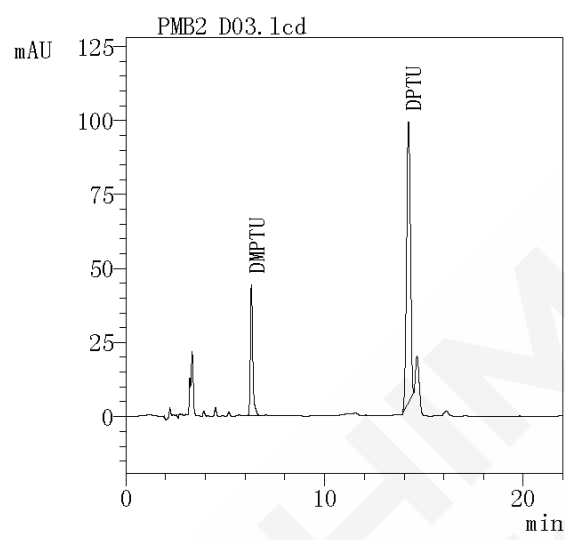
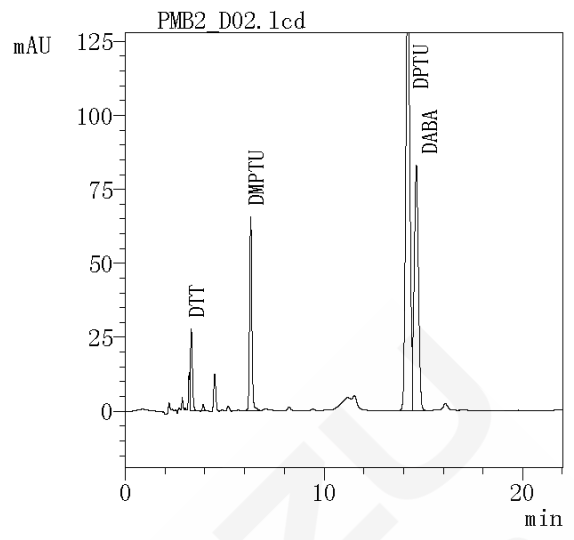
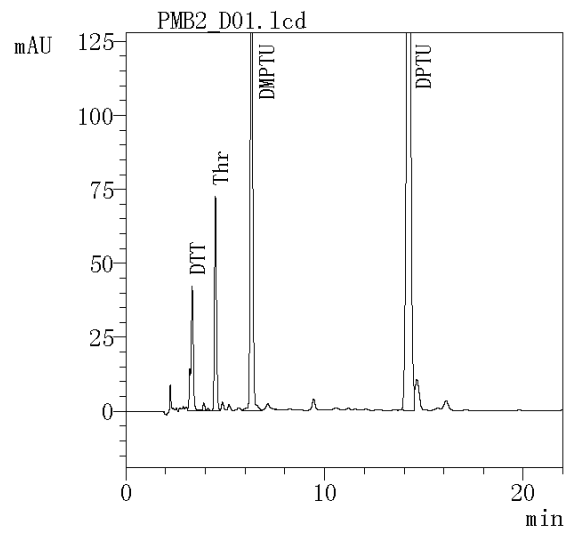


图 5. DABA 标准品测试图谱

3.3 经酶解处理的多黏菌素 B2 氨基酸序列分析色谱图

应用蛋白测序仪 PPSQ-53A 分析经酶解处理的多黏菌素 B2 组分的氨基酸序列，色谱图如图 6 所示，由图可知，样品氨基酸序列为 Thr-DABA-X-DABA-Phe-Leu-DABA-DABA-Thr (X 代表无信号检出)，与理论顺序一致。第三位氨基酸在原构型中与相邻氨基酸为环状连接，当 Edman 反应发生时，一端被切开，另一端仍与相邻氨基酸相连，因此在检测中理论无氨基酸信号产生。



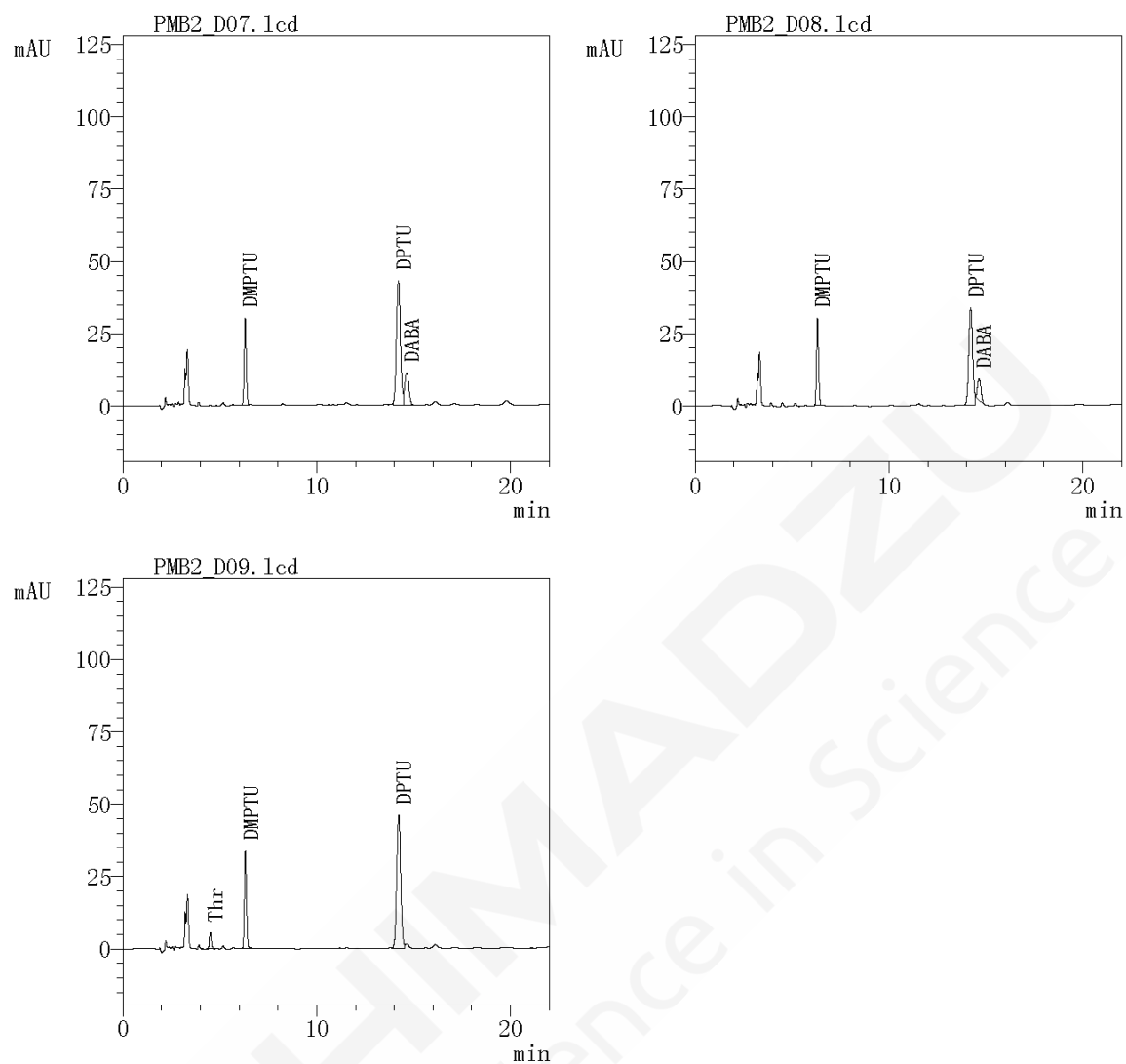


图 6. 经酶解处理的 PMB2 氨基酸序列分析色谱图

4. 结论

本文应用岛津蛋白测序仪 PPSQ-53A，对经过无花果蛋白酶解的多黏菌素 B2 组分进行氨基酸序列分析，测得 N 端氨基酸序列为 Thr-DABA-X-DABA-Phe-Leu-DABA-DABA-Thr (X 代表信号无检出)，与理论一致。PPSQ-53A 采用 SPD-M30A 检测器，检测灵敏度高、操作简便，是生物药物研发和质控管理中有力的分析工具。

第 4 章 多肽制剂分析

多肽类药物作为一类重要的生物制剂，在医药领域具有广泛的应用前景。然而，由于多肽分子的特殊结构和复杂性，其在制剂中常常存在单体和不同程度的聚集体，同时为了提高多肽类药物的稳定性、溶解度和生物利用度，制剂中经常需要添加辅料。因此，对多肽类药物制剂中的聚集体及辅料添加剂进行分析和评价具有重要意义。

多肽分子的聚集体形成主要是由于其分子间的非共价和共价相互作用所致，其中非共价作用包括疏水相互作用、氢键、静电作用等，这些相互作用导致多肽分子之间的聚集，形成不同程度的聚集体。聚集体的形成对于制剂的稳定性、药效和安全性有着重要的影响，因此需要对其进行准确的分析和评价。尺寸排除色谱法（SEC）是常用的分析方法，它能够分离和定量制剂中的多肽单体和不同程度的聚集体。此外，LC-MS、MALDI-TOF 和 Q-TOF 也可以结合使用，对聚集体进行进一步的鉴定和表征，确保分析结果的准确性和可靠性。岛津生物兼容液相生物惰性液相，MALDI-TOF 以及 Q-TOF 可以很好的对多肽药物中聚集体进行分析全方位检测。

多肽类药物制剂中的辅料添加剂是确保制剂质量和性能的关键因素之一。这些辅料包括保护剂、缓冲剂、表面活性剂、抑菌剂和 pH 调节剂等。抑菌剂的作用是抑制制剂中微生物的生长和繁殖，从而延长制剂的保质期和稳定性，常见的抑菌剂包括苯酚、对羟基苯甲酸酯等。而 pH 调节剂则用于调节制剂的 pH 值，以确保药物的稳定性和生物利用度，常用的 pH 调节剂包括磷酸盐缓冲剂、盐酸等。对于这些辅料添加剂，色谱分析方法是常用的手段，确保其在制剂中的含量和分布符合要求。岛津超高效液相色谱仪可以对多肽类药物制剂中的抑菌剂等辅料含量进行测定，准确度高。通过综合运用这些分析技术，可以全面评估制剂中辅料添加剂的质量和含量，为制剂的质量控制和改进提供可靠的依据。

应用台式 MALDI-TOF MS 对注射用胸腺法新进行聚集体分析

摘要：本文应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对注射用胸腺法新制剂及原料药进行质谱分析，可直接检测制剂中胸腺法新不同的聚集体形式，表明台式 MALDI-8020 可以简便、快捷地对胸腺法新进行聚集体分析，MALDI-8020 有望在多肽药物的聚集体评价方面有更加广泛的应用。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 胸腺法新 聚集体

胸腺法新 (thymalfasin) 是一种化学合成的由28个氨基酸组成的多肽药物制剂，具有提高免疫功能的作用，临床上可用来治疗慢性乙型肝炎，也可作为免疫损害患者的疫苗免疫增强药。2020年新冠疫情期间，注射用胸腺法新被抗疫一线广泛应用，用于提高一线医务人员的抗病毒免疫能力，国家卫健委也将胸腺法新写入《新型冠状病毒肺炎重型、危重型病例诊疗方案（试行第二版）》。

作为一种多肽类药物，胸腺法新在生产、储存和运输过程中易形成聚集体，给药时，聚集体的存在可能导致免疫原性反应（例如常见的过敏反应），影响药物的安全性和有效性。因此对药物中的聚集体进行监测和评价，是对药物进行质量评价的一个重要方面。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020在线性模式下对不同厂家来源的商品化注射用胸腺法新以及某厂家的胸腺法新原料药进行检测，方法简单、快捷，结果直接可靠，可作为多肽药物聚集体分析的日常监测手段。

1. 实验部分

1.1 仪器

台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020



图 1. 台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 2000-50000

激光器：355 nm 固态激光器

激光能量：80-100

1.3 样品前处理

取0.5 μL 样品溶液及0.5 μL CHCA基质溶液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 商品化注射用胸腺法新聚集体检测

将某商品化注射用胸腺法新使用配套的注射水溶解后，取 0.5 μL 溶液点靶并覆盖 CHCA 基质后直接使用 MALDI-8020 进行检测，结果见图 2。由质谱图可见，检测到 m/z 3109.02 与 m/z 6200.4 的显著离子峰，其中 m/z 3109.02 与胸腺法新的单体加氢峰 ($[M+H]^+$) 分子量相符 (胸腺法新单体理论相对分子质量为 3108.28 Da，加氢峰理论质荷比为 3109.29)，为胸腺法新单体的离子峰； m/z 6200.4 约是胸腺法新单体相对分子质量 (3108.28) 的 2 倍，推测为胸腺法新的二聚体，可能在结合形成二聚体时脱掉了相对分子质量为 17 Da 的基团。

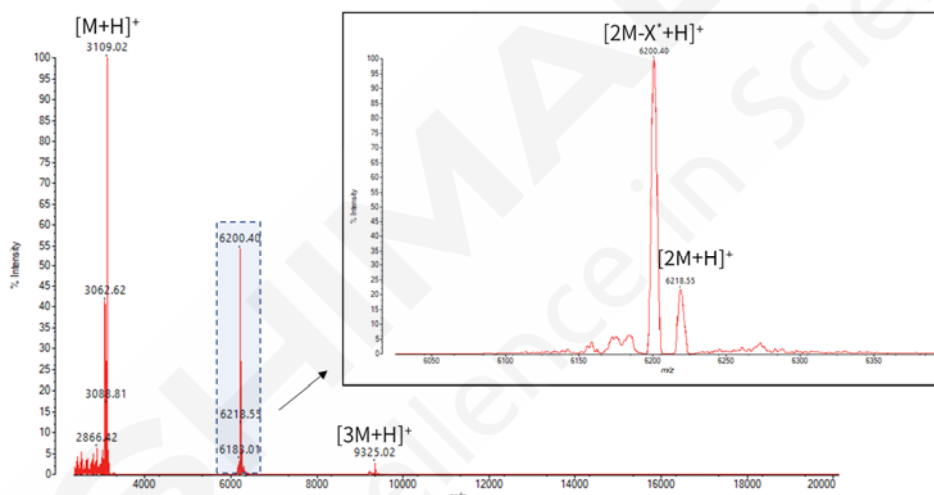


图 2. 商品化注射用胸腺法新质谱图 (m/z 2000-20000) (注: X*代表分子量为 17 Da 的基团)

将胸腺法新的二聚体质谱图进行局部放大 (图 2)，可以观测到 m/z 6218.55 的离子峰，对应为二聚体的加氢峰 ($[2M+H]^+$)。除单体及二聚体外，样品还检测到三聚体、四聚体等多聚体的离子峰 (图 3 a, b)。

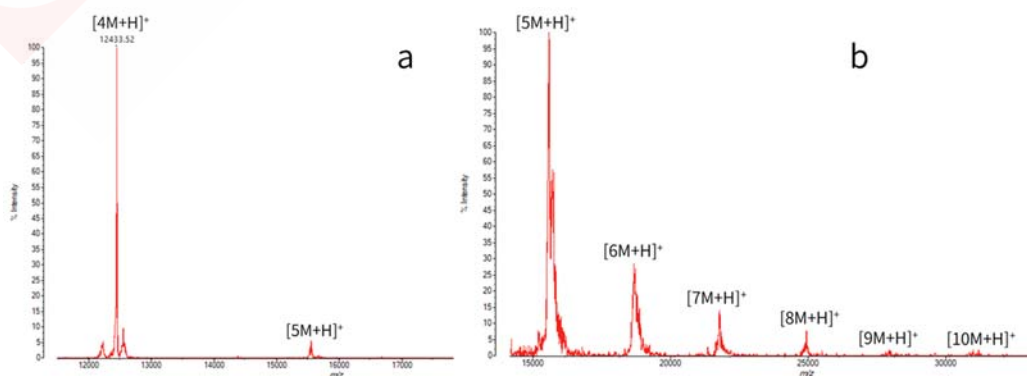


图 3. 商品化注射用胸腺法新质谱图. a. m/z 12000-20000; b. m/z 15000-35000

同法对另一品牌产品进行相关测试，同样发现较为明显的胸腺法新二聚体、三聚体等多聚体形式的存在(图 4)。

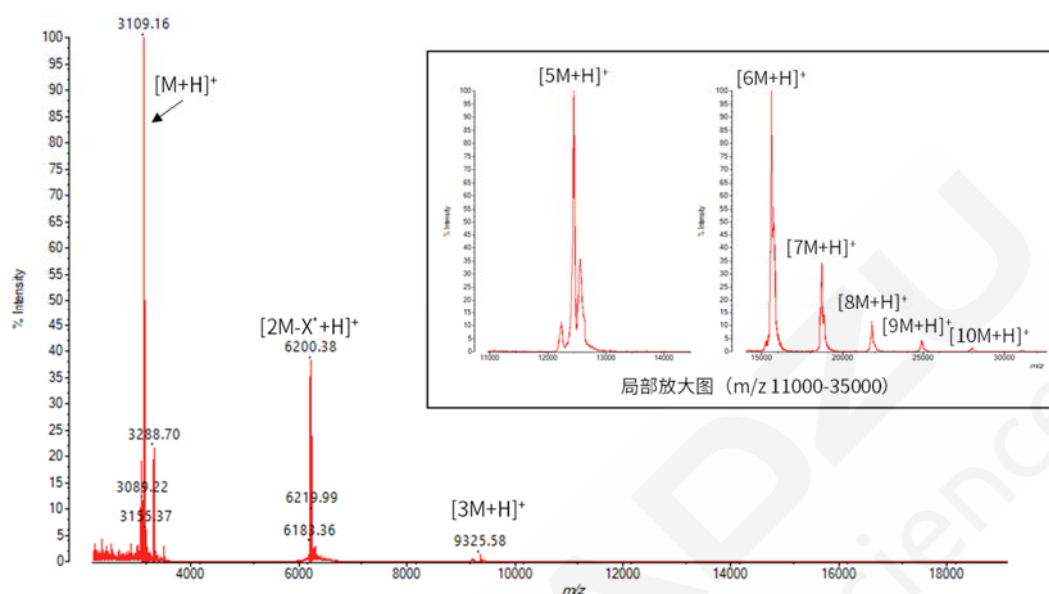


图 4. 另一品牌注射用胸腺法新产品的质谱图 (m/z 12000-20000)

a. m/z 2000-20000 (注: X*代表分子量为 17 Da 的基团); b. m/z 12000-20000; c. m/z 15000-35000

2.2 胸腺法新原料药聚集分析

为判断这些聚集体是否是在生产过程中产生,对胸腺法新原料药进行了检测,结果见图 5。由质谱图可见,胸腺法新二聚体在原料药中就存在,但未检测到明显的三聚体、四聚体等其他多聚体形式。

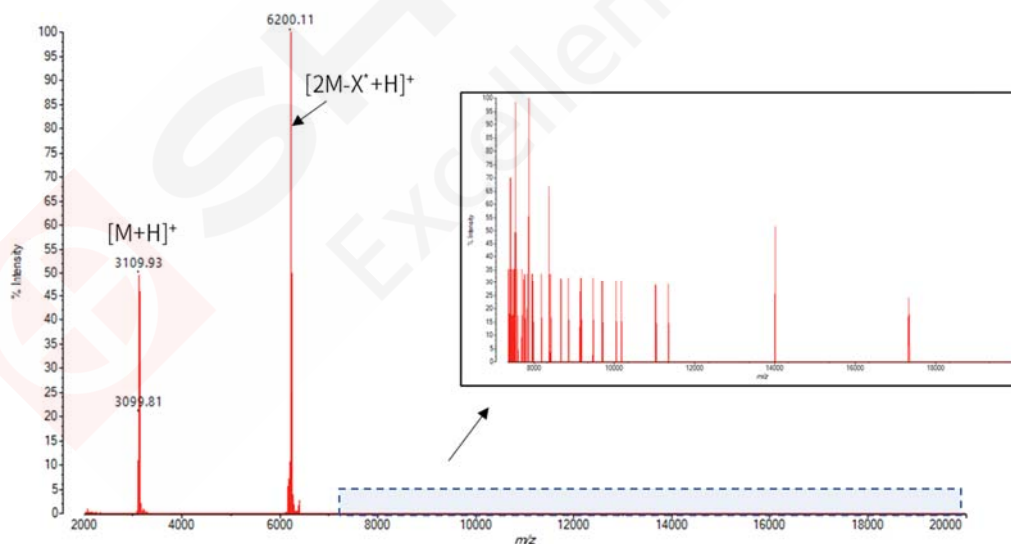


图 5. 胸腺法新原料药质谱图 (注: X*代表分子量为 17 Da 的基团)

对胸腺法新原料药中的二聚体进行液相分离纯化,质谱检测结果显示样品中的化合物形式以二聚体为主(图 6)。这表明了检测本身的可靠性,检测结果与样品状态一致,检测环节本身并不会引起聚集体形式的变化, MALDI-8020 可以较为可靠地对制剂中的多肽聚集体的产生进行监测,对生产过程中及商品化的注射用胸腺法新进行质量控制。

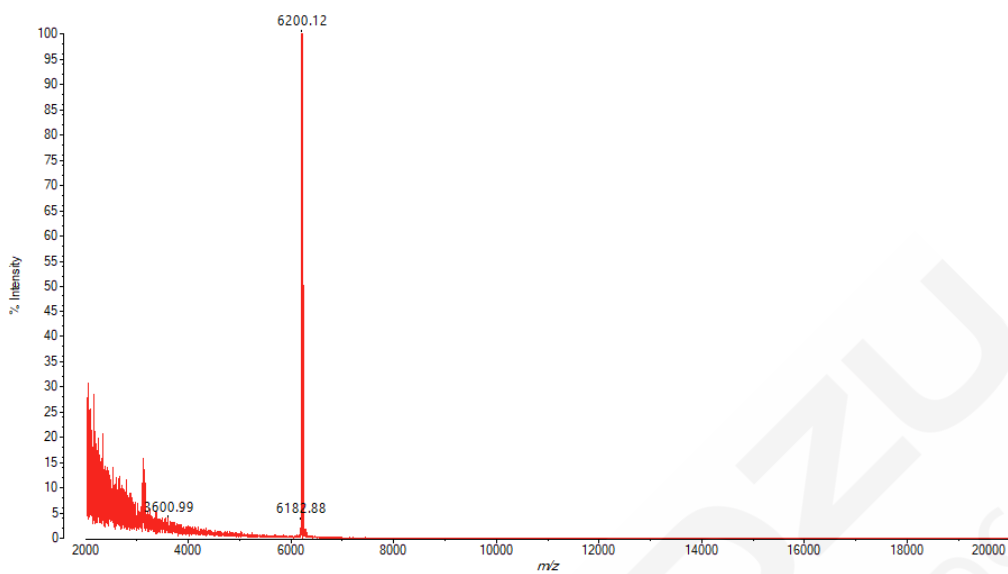


图 6. 经分离纯化的胸腺法新二聚体质谱图 (m/z 15000-35000)

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 对注射用胸腺法新制剂和原料中的多肽聚集体进行了分析，无需样品前处理及液相分离，可直接通过分子量的大小对制剂中聚集体的存在情况进行监测。同时，由于可以获得多肽的精确分子量，可以对样品中多肽的组成、杂质进行分析，有望在多肽药物聚集体评价方面有更加广泛的应用。

生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法分析多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质

摘要: 本文采用岛津生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法, 开发了一种检测多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质的新方法。优选的洗脱液和 SEC 色谱柱可以实现多肽主成分、共价结合二聚体和非共价结合二聚体的有效分离, 分离度大于 1.5。连续六次进样, 三个目标峰保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.024~0.025%和 0.048~0.130%之间, 重复性良好。多肽药物强制性降解实验样品中检出非共价结合二聚体, 峰面积百分比为 6.934%。

关键词: 生物惰性液相 尺寸排阻色谱法 多肽药物 共价结合聚集体 非共价结合聚集体

多肽药物在受到加热、冷冻、搅拌等外力作用时可能发生结构改变, 产生聚集体。多肽聚集现象可能会降低药物活性, 改变半衰期及增加免疫原性。多肽药物中聚集体杂质的分析是多肽药物开发过程中备受关注的环节, 意义重大。

多肽药物中的聚集体有可能是通过二硫键、酯或酰胺键等化学键连接而形成的共价结合聚集体, 也可能是通过氢键、疏水相互作用或静电引力等非特异性相互作用形成的非共价结合聚集体。其中共价结合聚集体结构相对稳定, 研究得较多; 非共价结合的聚集体分析难度更大, 研究得较少, 因为非特异性相互作用力很弱, 容易受到聚集体与尺寸排阻色谱柱间存在的相互作用力影响, 而导致聚集体状态发生改变。

本文采用生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法, 开发了一种检测多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体的新方法, 方法分离度好、稳定可靠, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津生物惰性超高效液相色谱系统 Nexera XS inert。具体配置为:

系统控制器	: CBM-40lite	脱气机	: DGU-405
输液泵	: LC-40D XSi	自动进样器	: SIL-40C XSi
柱温箱	: CTO-40C	检测器	: SPD-M40
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.111		

1.2 分析条件

色谱柱	: SHIMSEN Ankylo SEC-120 (300 × 7.8 mm I.D., 3.0 μm)		
	岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01215-41		
洗脱液	: 100 mM 硫酸铵水溶液 (含 20%乙腈和 0.1%TFA)		
洗脱方式	: 等度洗脱	流速	: 0.5 mL/min
洗脱时间	: 35 min	进样体积	: 20 μL

柱 温 : 35°C

检测波长 : 220 nm

1.3 样品前处理

共价结合二聚体、非共价结合二聚体、多肽药物非破坏样品和通过强制降解实验得到的破坏样品，使用洗脱液适当稀释后上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 分离度评价

使用优选的洗脱液和色谱柱组合，按照 1.2 分析条件，通过非破坏多肽药物样品中添加共价结合二聚体和非共价结合的二聚体，以评价分离度。色谱图和分离结果分别见图 1 和表 1，三个目标峰分离度大于 1.5，分离良好。

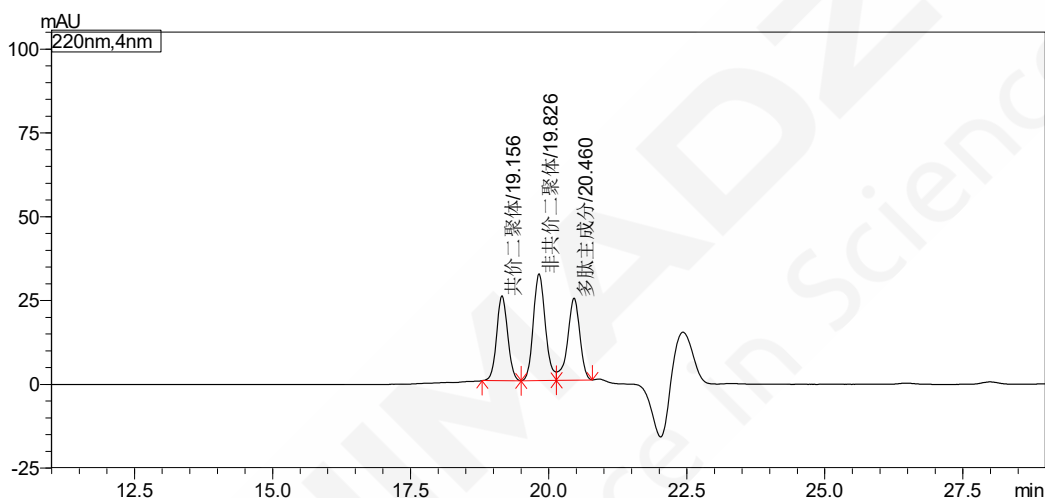


图 1. 多肽主成分、非共价结合二聚体和共价结合二聚体的分离色谱图

表 1. 分离度结果

#	目标物名称	保留时间 (min)	分离度 (USP)
1	共价结合二聚体	19.150	-
2	非共价结合二聚体	19.820	1.710
3	多肽主成分	20.456	1.560

2.2 重复性考察

以“2.1 分离度评价”用样品，重复进样 6 次，考察重复性。6 次重复进样重叠色谱图见图 2。三个目标峰保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.024~0.025 % 和 0.048~0.130 % 之间，重复性良好。

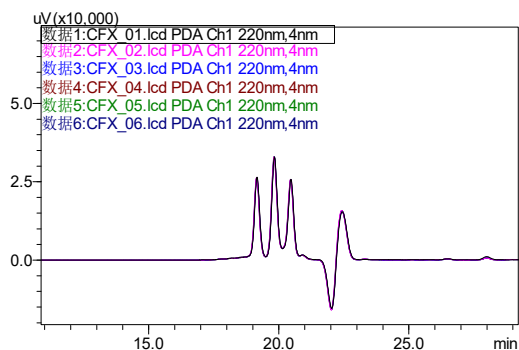


图 2. 重叠色谱图 (n=6)

表 2. 重复性结果 (n=6)

目标物名称	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
共价结合二聚体	0.025	0.130
非共价结合二聚体	0.024	0.048
多肽主成分	0.024	0.126

2.3 破坏样品分析结果

破坏样品色谱图和分析结果如图3和表3所示。样品中检测到非共价结合二聚体杂质，峰面积百分比为6.934%，未检测到共价结合二聚体。

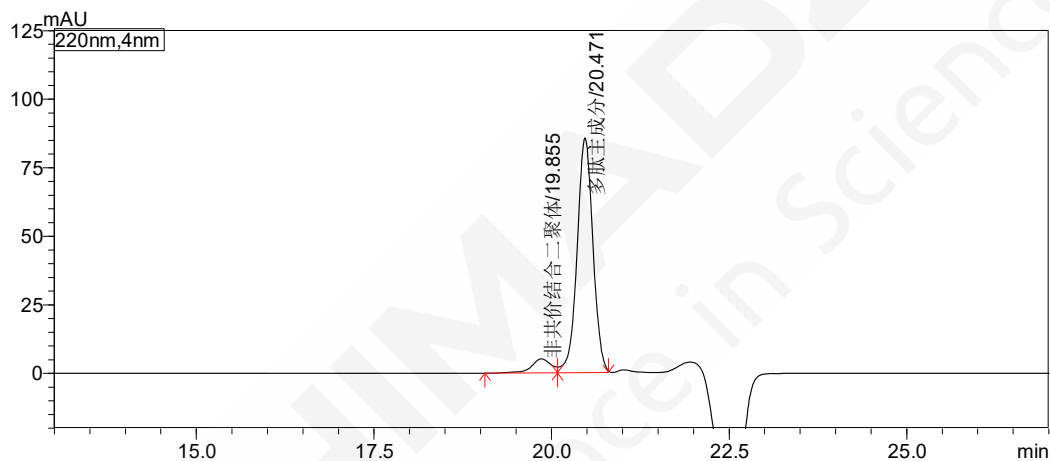


图 3. 破坏样品色谱图

表 3. 破坏样品分析结果

名称	保留时间	峰面积	峰面积%
非共价结合二聚体	19.855	98529	6.934
多肽主成分	20.471	1322445	93.066

3. 结论

使用岛津生物惰性液相色谱系统结合尺寸排阻色谱，建立了多肽药物中非共价结合二聚体和共价结合二聚体杂质检测的新方法。生物惰性液相系统可耐受高盐洗脱液，优选的岛津尺寸排阻色谱柱 SHIMSEN Ankylo SEC-120 和洗脱液组成可最大程度地减少聚集体杂质和色谱柱之间的非特异性作用，获得良好的分离和分析稳定性。本方法分离度好、重复性好，适用于多肽药物中非共价结合二聚体和共价结合二聚体杂质含量测定和评估。

利用 Q-TOF 定性分析多肽类药物生长抑素中的聚集体

摘要：本文使用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法，使用岛津 LabSolutions Insight Explore 软件对色谱峰进行解析，并对多电荷结果进行解卷积分析。实验结果显示，该方法可以分离多肽类药物生长抑素的主成分和聚集体，分离出的 4 个色谱峰分别为生长抑素的四聚体，三聚体，非共价二聚体和共价二聚体。

关键词：Q-TOF 多肽类药物 生长抑素 聚集体

生长抑素全称为生长激素释放抑制激素，由Brazeau等于1973年首次从绵羊的下丘脑中提取。天然生长抑素很难实现工业化大生产，现在生长抑素已经实现了人工合成，并且合成长抑素与天然生长抑素的化学结构及药理作用方面完全相同。生长抑素由14个氨基酸残基组成，其中第3位及第14位的氨基酸由二硫键连接呈环状结构。

作为一种多肽类药物，生长抑素在纯化和放置的过程中，受到加热、冷冻、搅拌等外力作用时可能发生结构改变，产生聚集体。聚集体的存在可能会降低药物活性，改变半衰期及增加免疫原性，影响药物的安全性和有效性。因此对药物中的聚集体进行监测和评价，是对药物进行质量评价的一个重要方面。

本文使用岛津 LCMS-Q-TOF 液质联用系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法，使用岛津 LabSolutions Insight Explore 软件对色谱峰进行解析，并对多电荷结果进行解卷积分析。



1. 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪-四极杆飞行时间质谱仪，配置信息如下：

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C X3
输液泵	: LC-40B XS	柱温箱	: CTO-40S
脱气机	: DGU-403	质谱	: LCMS-9030

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : 凝胶色谱柱 TSK-GEL G2000SWx1 (7.8x300 mm I.D., 5.0 μ m)
 流 动 相 : 三氟乙酸:乙腈:水=0.2:30:70
 进 样 体 积 : 20 μ L 柱 温 : 40 $^{\circ}$ C
 流 速 : 0.5 mL/min 洗 针 液 : 甲醇/水=1:1 (v:v)
 洗 脱 方 式 : 等度洗脱

质谱条件

离子化模式 : ESI(+)
 雾化气流速 : 3.0 L/min
 接口温度 : 300 $^{\circ}$ C
 D L 温度 : 250 $^{\circ}$ C
 碰撞气 : 氦气
 加热模块温度 : 400 $^{\circ}$ C
 干燥气流速 : 10.0 L/min
 扫描模式 : MS, m/z 400-2500
 接口电压 : 3.5 kV
 事件时间 : 0.1s

1.3 样品前处理

精密称取样品10 mg, 加1 mL水溶解制成10 mg/mL溶液, 加水稀释成0.5 mg/mL的溶液。

2. 结果与讨论

2.1 生长抑素色谱图解析

按照1.2分析条件分析0.5 mg/mL的样品溶液, 得到色谱图如图1所示。从图可知, 生长抑素的保留时间为18.649 min, 对该色谱峰进行解析, 检测到m/z 1637.72272、819.36403和546.57778的准分子离子峰。其中m/z 1637.72272为[M+H]⁺峰, m/z 819.36403为[M+2H]²⁺峰, m/z 546.57778为[M+3H]³⁺峰。

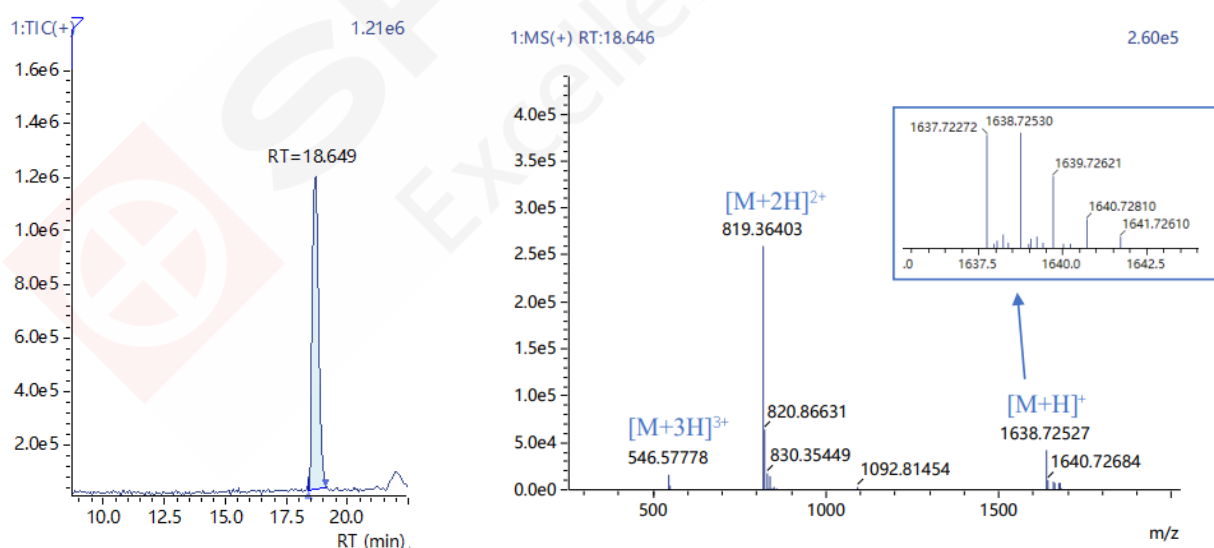


图 1. 生长抑素的色谱图和质谱图

2.2 生长抑素中聚集体色谱图解析

为了能检测到生长抑素中的微量聚集体杂质, 在进行杂质分析时提高样品浓度到10 mg/mL。

在分析过程中为了避免高浓度样品进入质谱，在软件中设置阀切换程序，将18 min以后的高浓度组分切入废液。由图2可知，共检测到4个色谱峰。通过LabSolutions Insight Explore软件对14.5~17.5 min 四个色谱峰进行分析，可知为生长抑素的四个聚集体杂质峰。

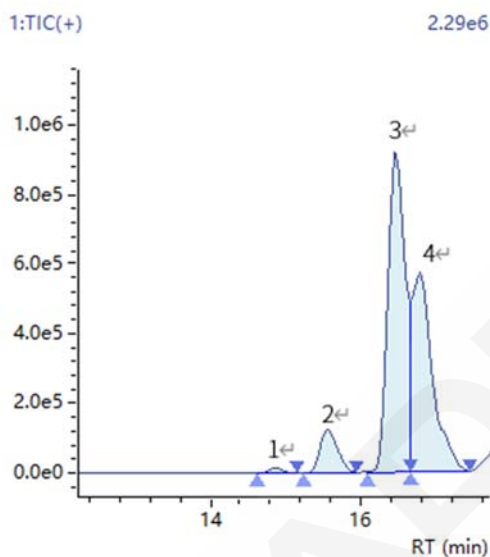


图 2. 生长抑素的聚集体分离色谱图

2.2.1 四聚体色谱峰解析

对图2中1#峰的质谱图进行解析，检测到 m/z 1638.98576的准分子离子峰，可以看到同位素峰间隔为0.25 Da，该聚集体带4个电荷，分子量约为6550.90，为生长抑素的四聚体。

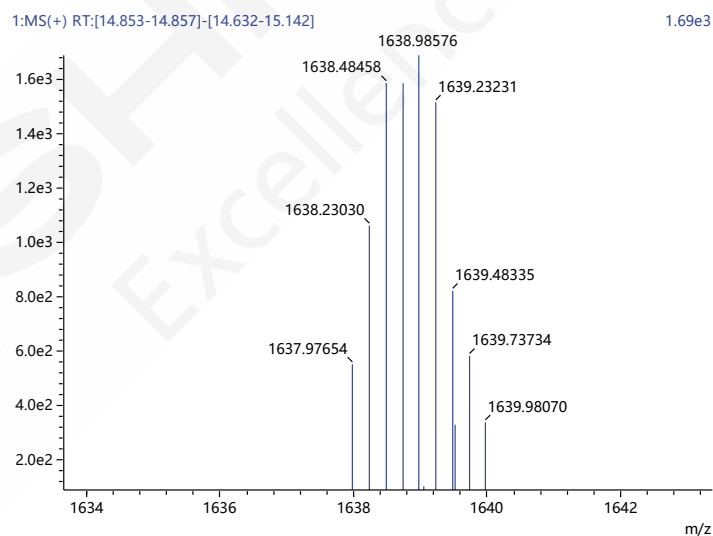
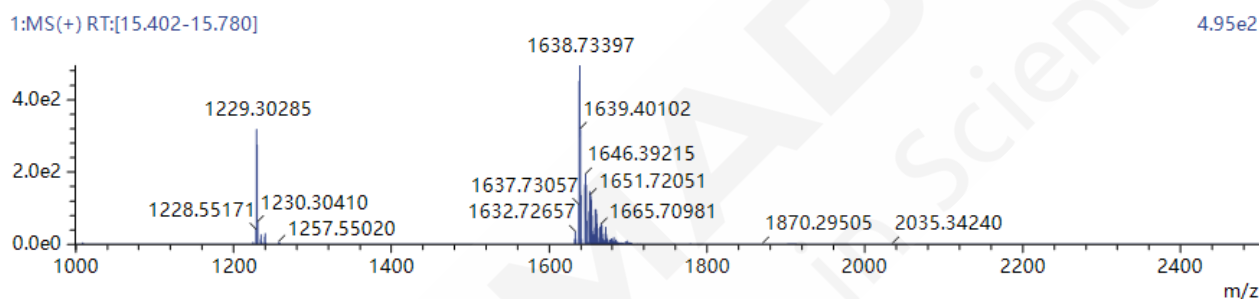
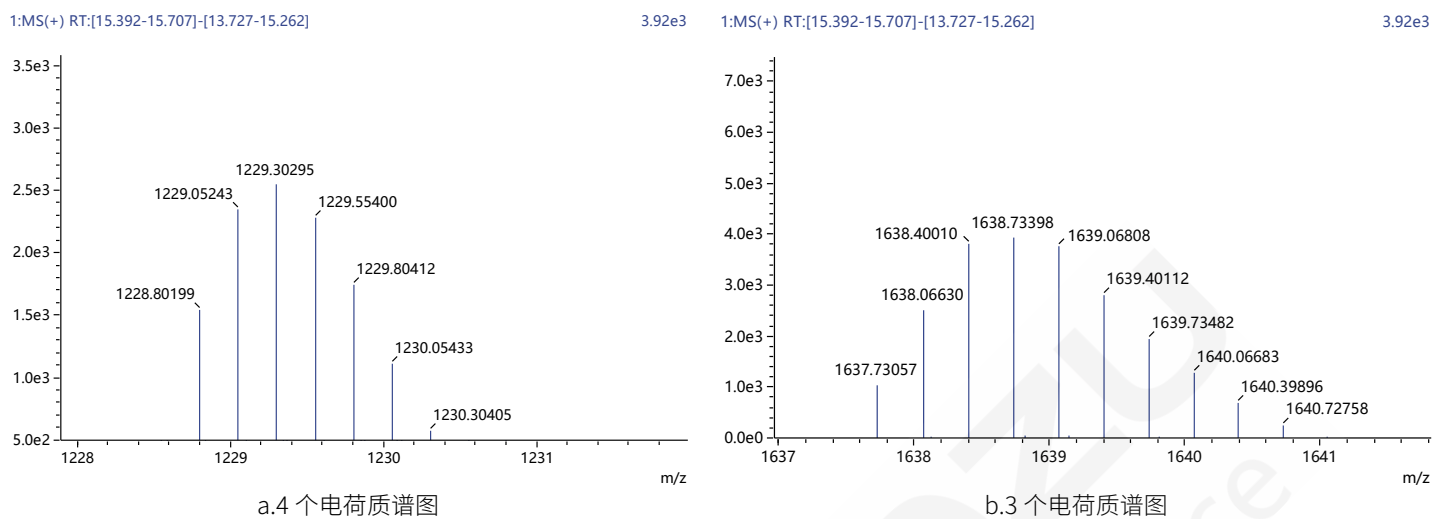


图 3. 四聚体色谱峰的质谱图

2.2.2 三聚体色谱峰解析

对图2中2#峰的质谱图进行解析，检测到 m/z 1229.30295与1638.73398的准分子离子峰，其中 m/z 1229.30295峰的同位素峰间隔为0.25 Da，该聚集体带4个电荷。 m/z 1638.73398峰的同位素峰间隔为0.33 Da，该聚集体带3个电荷。通过LabSolutions Insight Explore软件对两个不同电荷数（3个电荷和4个电荷）的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为4913.17，为生长抑

素的三聚体。

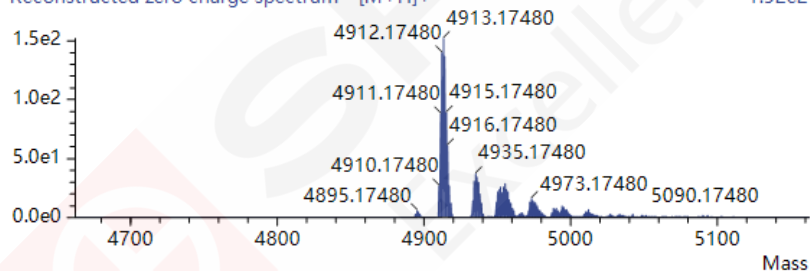


Charge Deconvoluted components

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	4913.17474	2	152.06	0.0073

Mass: 4913.17474

Reconstructed zero charge spectrum - [M+H]⁺



#	m/z	Charge	Mass	Weight
1	1638.73051	3	4913.16968	0.64
2	1229.30321	4	4913.18373	0.36

c.解卷积结果图

图 4. 三聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

2.2.3 非共价二聚体色谱峰解析

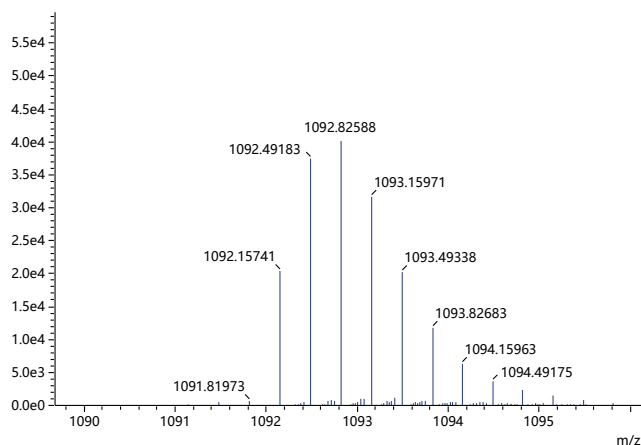
对图2中3#峰的质谱图进行解析，检测到m/z 1092.82588与1638.73517的准分子离子峰，其中m/z 1092.82588峰的同位素峰间隔为0.33 Da，该聚集体带3个电荷。m/z 1638.73517峰的同位素峰间隔为0.50 Da，该聚集体带2个电荷。通过LabSolutions Insight Explore软件对两个不同电荷数（2个电荷和3个电荷）的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为3275.45，为非共价二聚体。

1:MS(+) RT:[16.355-16.557]-[15.872-16.287]

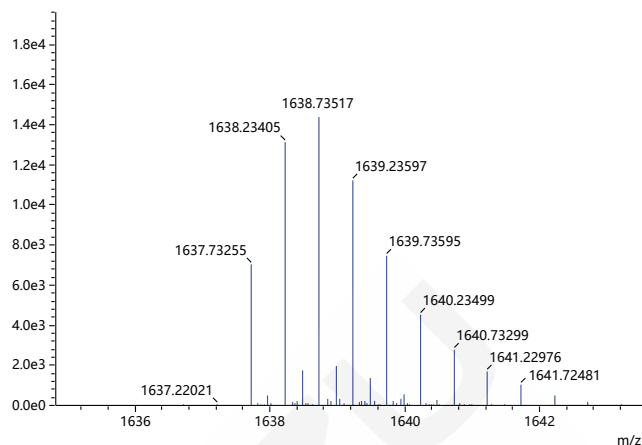
4.01e4

1:MS(+) RT:[16.287-16.572]

3.74e4



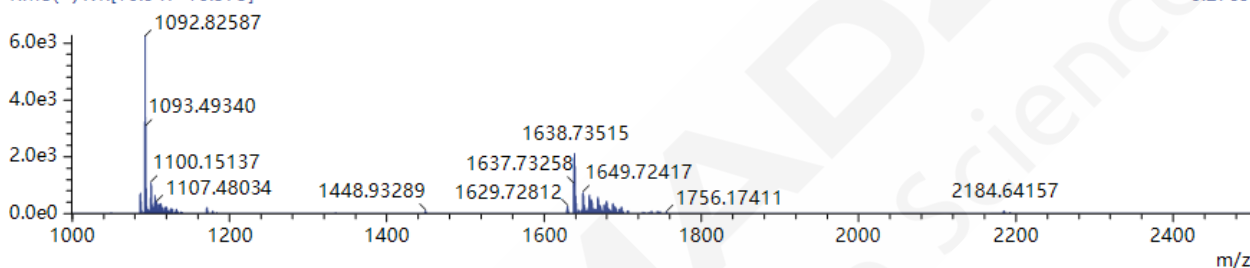
a.3 个电荷质谱图



b.2 个电荷质谱图

1:MS(+) RT:[16.347-16.575]

6.27e3



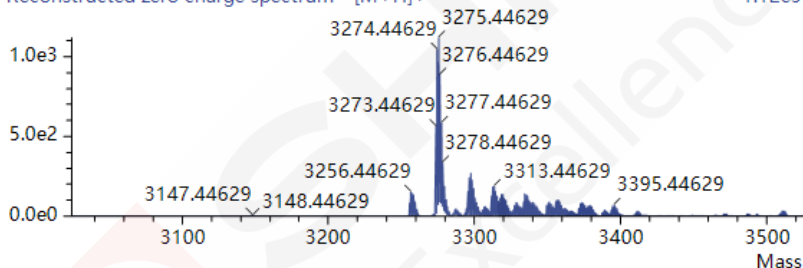
Charge Deconvoluted components

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	3275.44624	2	1118.69	0.0004

Mass: 3275.44624

Reconstructed zero charge spectrum - [M+H]⁺

1.12e3



#	m/z	Charge	Mass	Weight
1	1638.73051	2	3275.44645	0.692
2	1092.82253	3	3275.44575	0.308

c.解卷积结果图

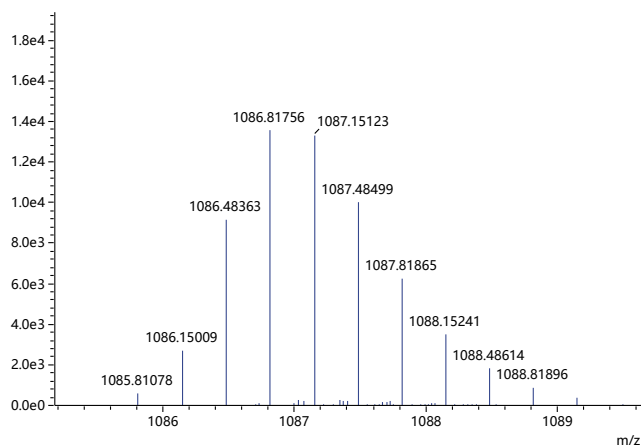
图 5. 非共价二聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

2.2.4 共价二聚体色谱峰解析

对图2中4#峰的质谱图进行解析，检测到m/z 1086.81756与1629.72276的准分子离子峰，其中m/z 1086.81756峰的同位素峰间隔为0.33 Da，该聚集体带3个电荷，m/z 1629.72276峰的同位素峰间隔为0.50 Da，该聚集体带2个电荷。通过LabSolutions Insight Explore软件对两个不同电荷数（2个电荷和3个电荷）的质谱进行计算得出该聚集体分子量约为3257.43，为共价二聚体。

1:MS(+) RT:[16.730-17.092]-[17.127-17.585]

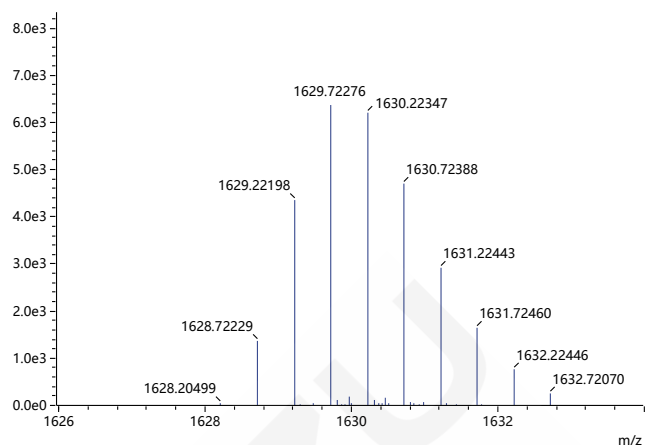
1.36e4



a.3个电荷质谱图

1:MS(+) RT:[16.730-17.092]-[17.127-17.585]

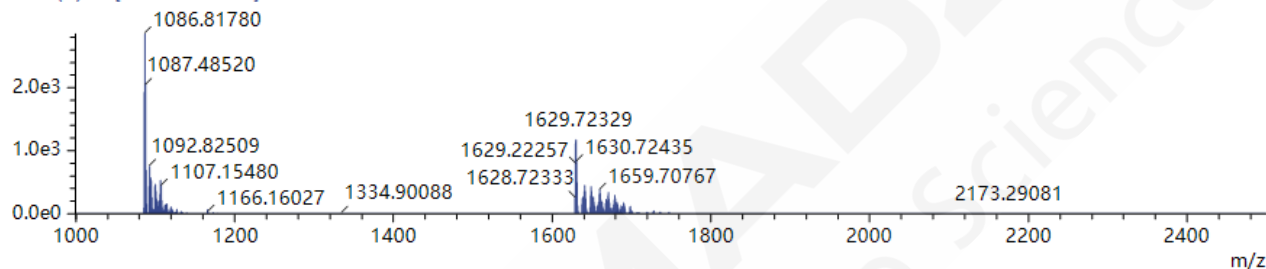
1.36e4



b.2个电荷质谱图

1:MS(+) RT:[16.692-16.952]

2.86e3

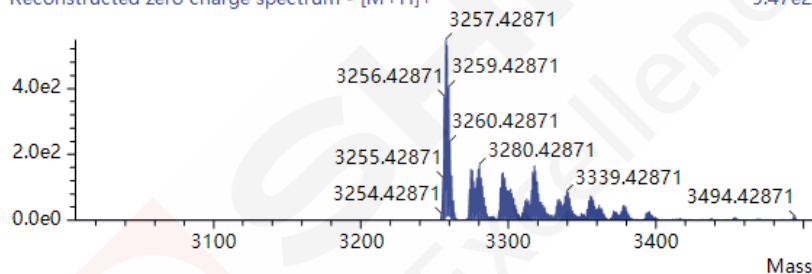


Charge Deconvoluted components

#	Mass	# of peaks	Intensity	Stdev
1	3257.42876	2	546.66	0.0029

Mass: 3257.42876

Reconstructed zero charge spectrum - [M+H]⁺



5.47e2

#	m/z	Charge	Mass	Weight
1	1629.72082	2	3257.42708	0.692
2	1086.81812	3	3257.43252	0.308

c.解卷积结果图

图 6. 共价二聚体色谱峰的质谱图和解卷积结果

2.2.5 四个聚集体色谱峰解析汇总

表 1. 四个聚集体色谱峰解析汇总

峰号	m/z	同位素峰间隔 (Da)	电荷数	分子量	聚集体
1#	1638.98576	0.25	4	6550.90	四聚体
2#	1229.30295	0.25	4	4913.17	三聚体
	1638.73398	0.33	3		
3#	1092.82588	0.33	3	3275.45	非共价二聚体
	1638.73517	0.50	2		
4#	1086.81756	0.33	3	3257.43	共价二聚体
	1629.72276	0.50	2		

3. 结论

本文使用岛津LCMS-Q-TOF液质联用系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种定性检测多肽类药物生长抑素中聚集体的方法。实验结果显示，该方法可以分离多肽类药物生长抑素的主成分和聚集体，通过LabSolutions Insight Explore软件对色谱峰进行解析，并对多电荷结果进行解卷积分析可知，分离出的4个色谱峰分别为生长抑素的四聚体，三聚体，非共价二聚体和共价二聚体。该方法可为多肽类药物的聚集体分析提供参考。

Trap-Free 2DLC Q-TOF 定性分析宫缩抑制剂阿托西班中的多聚体杂质

摘要： 本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 对多肽药物阿托西班中的单体和多聚体杂质进行定性分析。测试结果使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对杂质的分子式进行预测，结果显示阿托西班单体、二聚体和三聚体的 MS^1 的离子质荷比同理论值均小于 1 mDa。使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测目标物的分子量，预测分子量和理论分子量的误差小于 3 ppm。

关键词： Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 阿托西班 多聚体杂质

技术特点：

- ❖ 利用 Trap-Free 2DLC Q-TOF 联用系统分析阿托西班中的多聚体杂质，可实现一维和二维不同流动相直接转换，也能避免液相色谱直接分析浓度过高而导致的质谱信号饱和的问题。
- ❖ LCMS-9030 在分析中拥有高分辨率和准确的质量数，为目标化合物的鉴定提供可靠信息。

阿托西班是一种合成的多肽类物质，其作用机制是与催产素竞争子宫肌层、蜕膜、胎膜上的催产素受体，拮抗催产素作用，从而达到抑制子宫收缩的作用可在受体水平对人催产素产生竞争性抑制作用。在临床中，常用于治疗孕期早产。

杂质研究是药物质量研究的一项重要内容，是药物质量保证的关键因素之一。为了提高临床用药安全，需对合成过程中产生的工艺杂质和储存过程中产生的降解杂质进行了详细的研究。由于托西班化学结构特性，其在生产和储存过程中可能产生杂质，而这些杂质可能引起过敏反应、毒性及其他不良反应。

针对多肽药物中的由两个或多个多肽组成的稳定的多聚体杂质，可利用体积排阻色谱法 (SEC) 分离相关杂质。本文采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-free 2DLC+LCMS-9030，既能避免 SEC 的色谱条件于质谱离子源不匹配，也能有效解决液相色谱分析浓度过高而导致的质谱信号饱和的问题。本文成功对阿托西班多肽药物中的多聚杂质进行定性确证，为相关检测人员提供参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 Trap-free 2DLC+LCMS-9030 四极杆飞行质谱联用仪系统。具体配置为

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-20AD XR × 4	自动进样器：	SIL-20ACXR
柱温箱：	CTO-20AC	质谱仪：	LCMS-9030

检测器 A： SPD-M20A
切换阀 FCV-32AH₂×2

检测器 B： SPD-20A
色谱工作站： LabSolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

一维液相色谱条件：

色谱柱：SHIMSEN Ankylo SEC-150 (300 mm×7.8 mm I.D., 3.0 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01215-04)
流动相：水：异丙醇：乙酸 (150/150/200, V/V/V)
流速：0.3 mL/min
柱温：30°C
进样量：10 μL
洗脱方式：等度洗脱

二维液相色谱条件：

色谱柱：Shim-Pack GISS C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30048-02)
流动相：A相-0.5%乙酸水 B相-乙腈
流速：0.3 mL/min
柱温：30°C
洗脱方式：梯度洗脱, B相初始浓度为10%, 时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
31.60	柱温箱	CTO.RVR	0*
31.70	柱温箱	CTO.RVR	1*
34.50	泵	B.Conc3	10
50.00	泵	B.Conc3	90
52.00	泵	B.Conc3	90
52.10	泵	B.Conc3	10
60.00	控制器	Stop	

注：* “0” 表示流路切换至捕集定量环, 流路切换的时间根据一维液相色谱的保留时间变化;
“1” 表示一维流路直接进废液,

LCMS-9030 质谱条件：

离子源：ESI(+)
加热模块温度：400°C
D L 温度：300°C
接口温度：300°C
碰撞气：氦气
接口电压：4.5 kV
雾化气流速：3.0 L/min
干燥气流速：10.0 L/min
加热气流速：10.0 L/min
扫描模式：MS

1.3 样品前处理方法

准确称取多肽样品约5 mg，加入一维流动相1.6 mL振摇溶解后，上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 Trap-Free 2DLC 系统介绍

Trap-Free 2DLC 系统是一套支持在线流动相转换的二维液相与色谱-质谱联用仪的组合系统，系统结构示意图见图 1。本系统的第一维液相色谱系统，可使用非挥发性流动相或者与质谱分析不匹配的流动相体系，通过系统中切换阀、程序命令的组合，对第一维液相色谱系统分离的组分进行分馏。本系统的第二维液相色谱系统，可以采用适合 LCMS 分析的液相色谱条件，针对分馏的组分，进行针对性的质量分析。

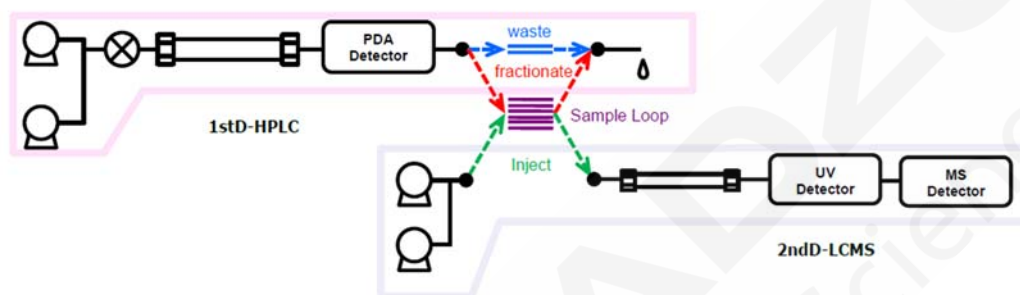


图 1. Trap-free 2DLC Q-TOF 系统的原理图

样品分析过程：

- 1) 第一维 HPLC，使用 PDA 检测器检测杂质，已杂质峰的保留时间为指标，将目标组分分馏至样品环。
- 2) 样品环，在样品环 1-5 内保留分馏后的组分。样品环 6 用于第一维与第二维的流动相置换。
- 3) 第二维 LCMS，利用第二维的色谱柱分离样品环内的组分后，使用 UV 检测器和 MS 检测器进行检测。

2.2 多肽样品一维 SEC 色谱图

首先样品通过一维液相色谱分析，确认各目标物的出峰时间。根据分子排阻色谱的原理，目标化合物依据分子的体积大小而分离，样品按照分子量由大到小的顺序出峰。在阿托西班牙样品的一维液相色谱图中可以看到单体及多聚体的色谱峰，其中单体（峰 3）的出峰时间最晚，出峰时间更早的峰 1、2 为不同分子量的杂质。

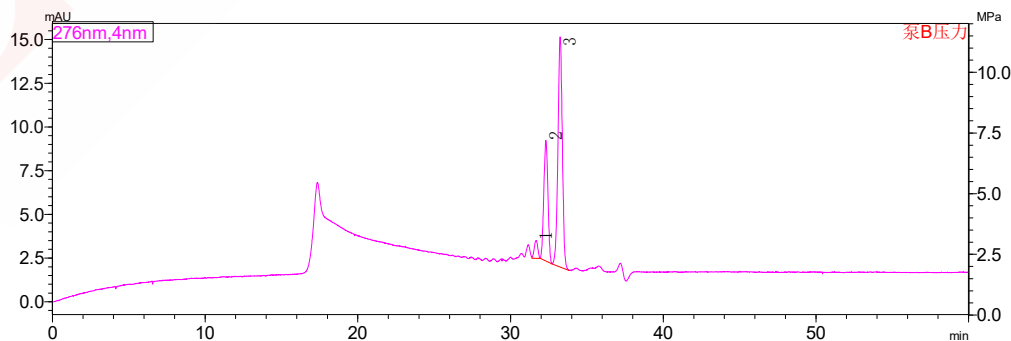


图 2. 阿托西班牙样品一维液相色谱图

2.3 通过 MS¹ 质谱图定性多聚体杂质

由于一维 SEC 分析的流动相中含有 40%乙酸，不能直接应用于质谱分析中。使用 Trap-free

2DLC 系统，可以针对性分馏目标组分，然后用于质谱匹配的流动相条件进行分离分析，并于质谱联用进行质量分析。针对不同分馏组分，需要根据分析目标峰的一维 SEC 分离的保留时间修改对应的时间程序。

2.3.1 阿托西班二聚体杂质

根据阿托西班二聚体在一维液相色谱中的保留时间，更新时间程序中的阀切换使时间。二维液相 UV 色谱图和 MS¹ 总离子流色谱图如图 3 所示，二聚体杂质的出峰时间约为 42.5 min。因为一维色谱的流动相中异丙醇和乙酸的比例较高，二维液相色谱峰出现了明显的前沿峰。阿托西班二聚体平均质谱图见图 4，可以分别观察到带双电荷和三电荷的分子离子峰。

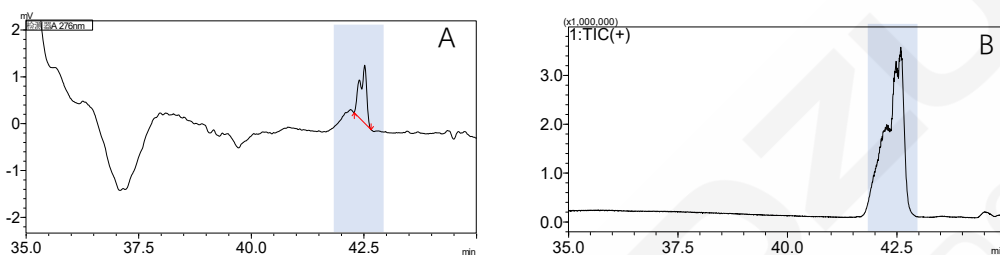


图 3. 阿托西班二聚体二维液相 UV 色谱图 (A) 和 MS¹ 总离子流色谱图 (B)

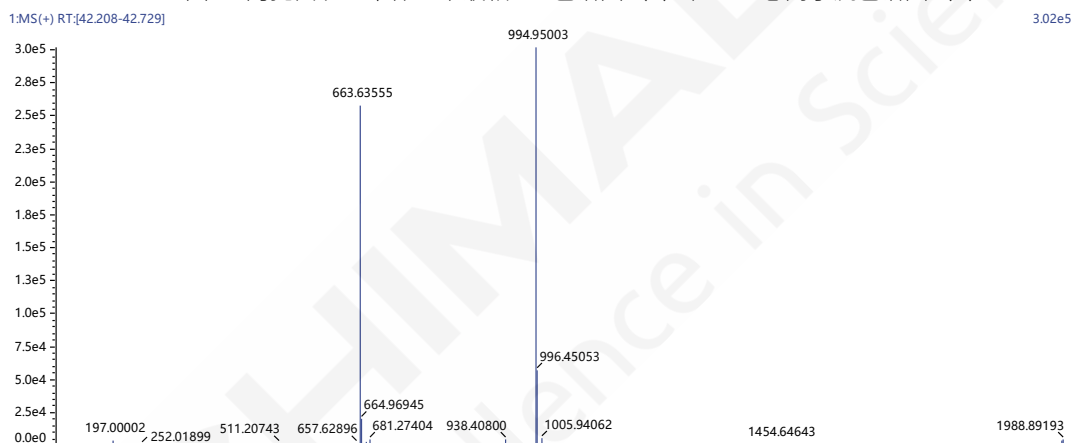


图 4. 阿托西班二聚体的平均质谱图

使用Insight Explore软件中分子式预测功能对分子离子峰基于准确分子量和同位素丰度比进行预测，预测结果显示，阿托西班二聚体的[M+2H]²⁺的质荷比误差为0.09 mDa，[M+3H]³⁺的质荷比误差为-0.19 mDa，相对偏差均小于1 ppm。

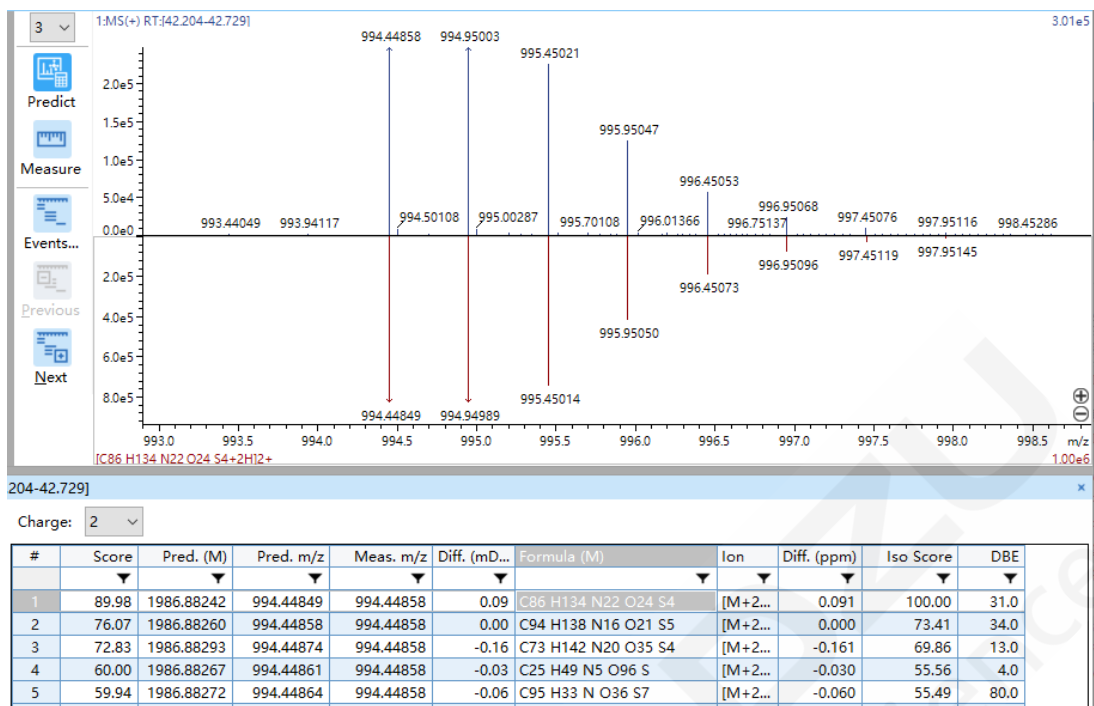


图 5. 阿托西班二聚体的[M+2H]²⁺ 峰分子式预测结果

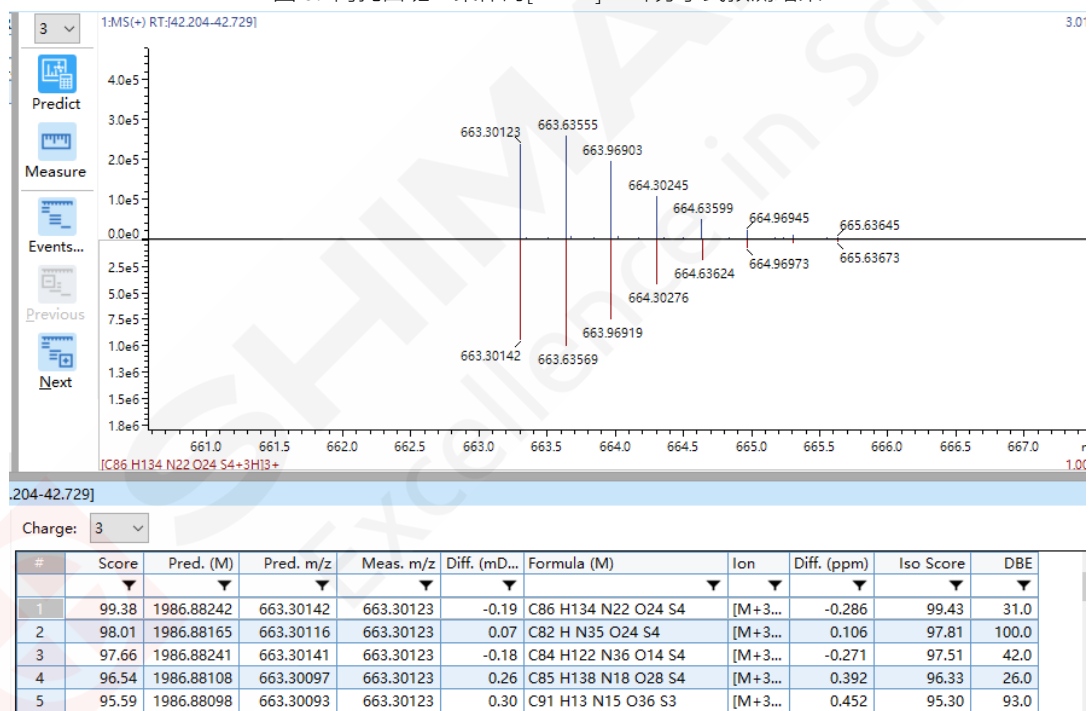


图 6. 阿托西班二聚体的[M+3H]³⁺ 峰分子式预测结果

使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测阿托西班二聚体的分子量，如图 7 所示，预测结果显示，阿托西班二聚体的预测分子量为 1987.88611，误差为-3.58 mDa，相对偏差为-1.80 ppm。

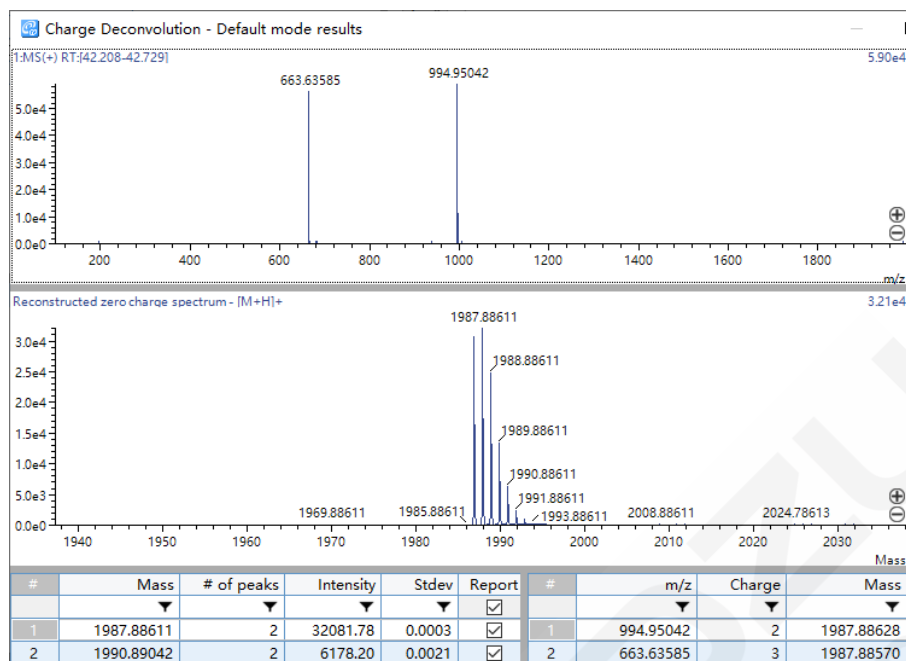


图 7. 阿托西班二聚体解卷积分析结果

2.3.2 阿托西班三聚体

根据阿托西班二聚体在一维液相色谱中的保留时间，更新时间程序中的阀切换使时间。二维液相色谱和 MS¹ 总离子流色谱图如图 8 所示，三聚体杂质的保留时间约为 42.7 min。因为一维色谱的流动相中异丙醇和乙酸的比例较高，二维液相色谱峰出现了前沿峰。阿托西班三聚体杂质的平均质谱图见图 9，可以分别观察到带双电荷、三电荷的分子离子峰。

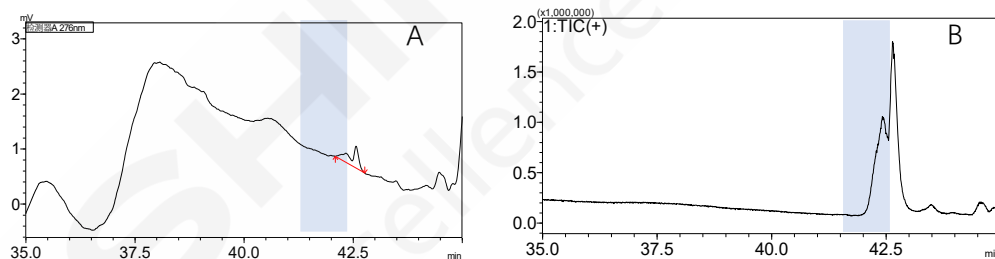


图 8. 阿托西班三聚体二维液相色谱图 (A) 和 MS¹ 总离子流色谱图 (B)

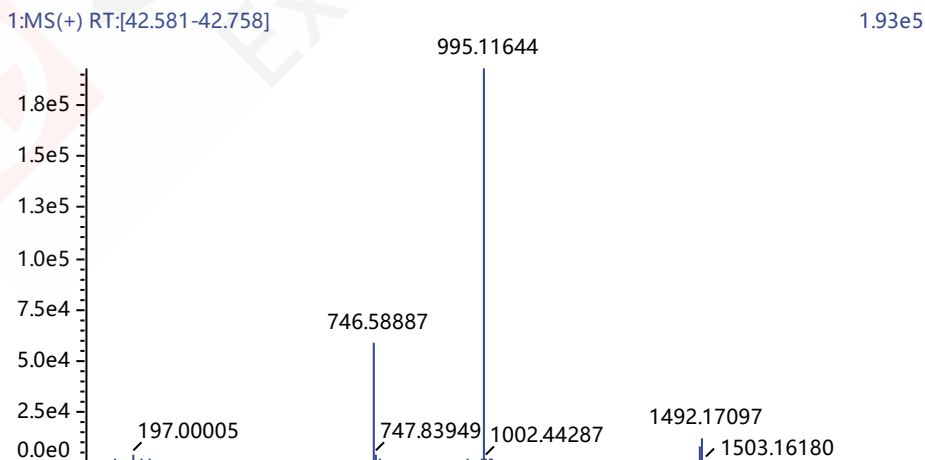


图 9. 阿托西班三聚体的 MS¹ 质谱图

使用Insight Explore软件中分子式预测功能对分子离子峰基于准确分子量和同位素丰度进行预测，预测结果显示，阿托西班三聚体的 $[M+2H]^{2+}$ 的质荷比误差为-0.087mDa， $[M+3H]^{3+}$ 的质荷比误差为-0.151mDa，相对偏差均小于1ppm。

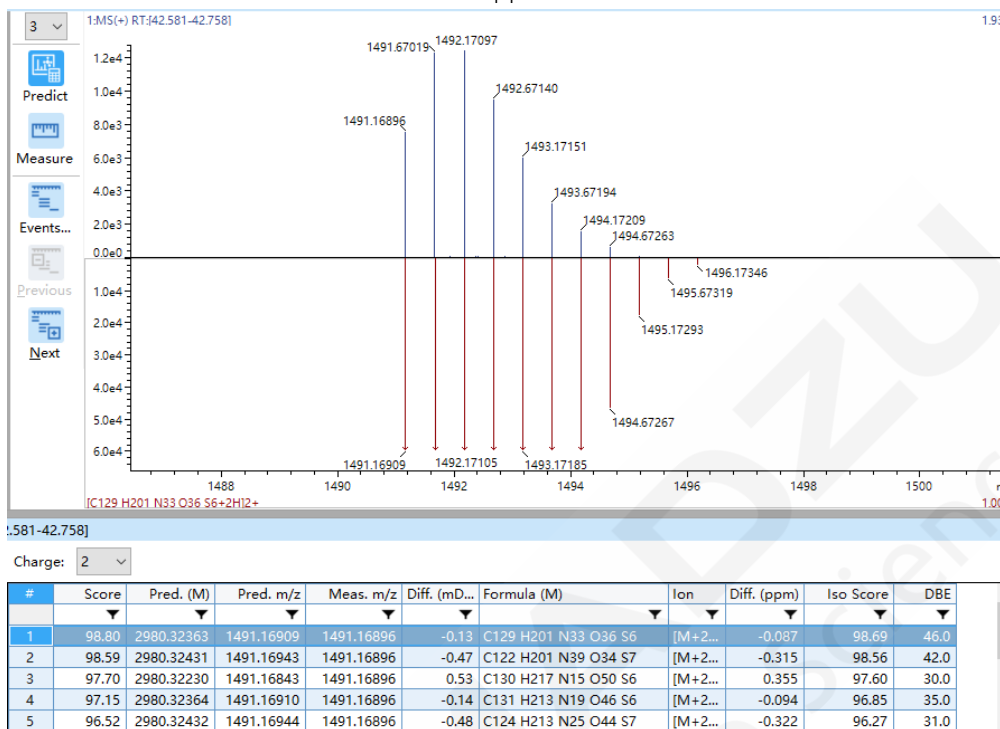


图 10. 阿托西班三聚体的 $[M+2H]^{2+}$ 峰分子式预测结果

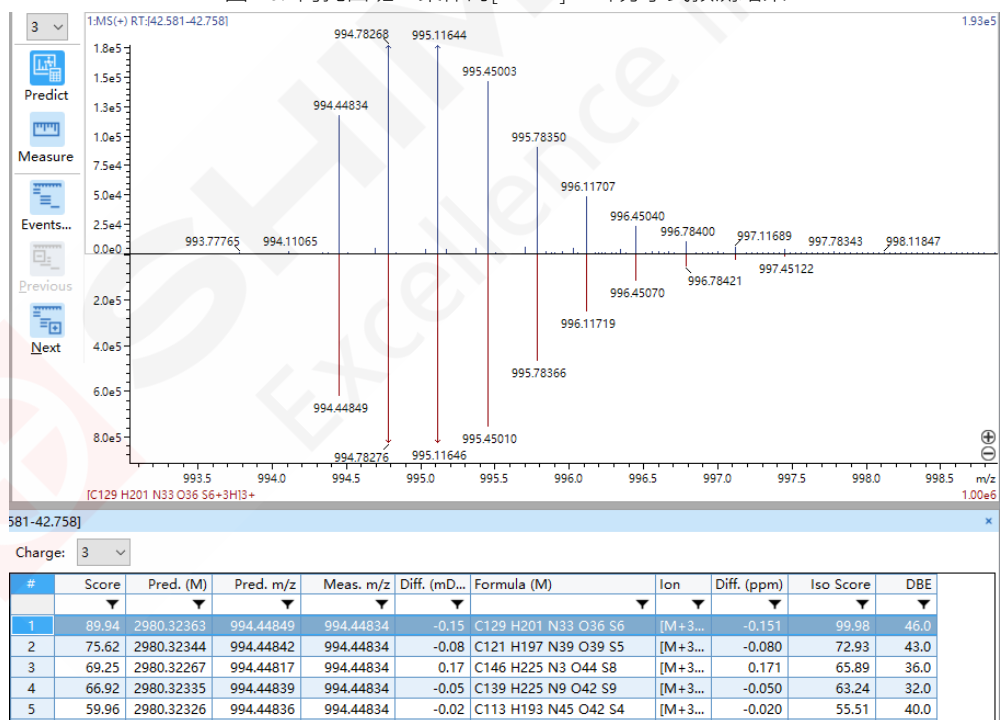


图 11. 阿托西班三聚体的 $[M+3H]^{3+}$ 峰分子式预测结果

使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测阿托西班三聚体的分子量，如图 17 所示，预测结果显示，阿托西班三聚体的预测分子量为 2980.32690，误差为 3.27 mDa，相对偏差为 1.10 ppm。

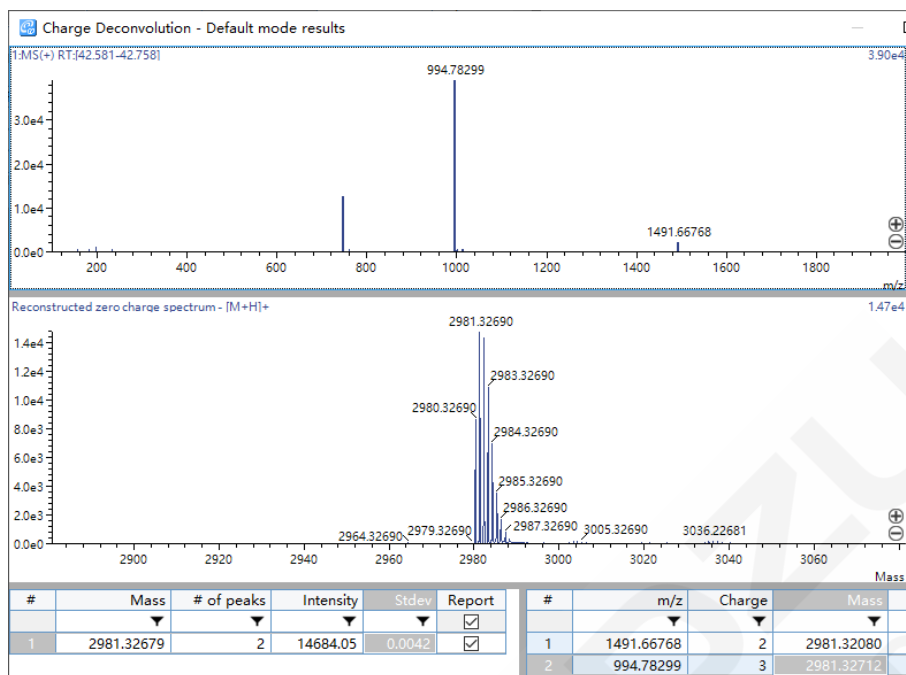


图 12. 阿托西班三聚体解卷积分析结果

3. 结论

本实验采用岛津二维液相和四极杆飞行时间质谱联用仪 Trap-Free 2DLC+LCMS-9030 对多肽药物阿托西班中的多聚体杂质进行定性分析。测试结果使用岛津 Labsolutions Insight Explore 软件对杂质的分子式进行预测，结果显示阿托西班二聚体和三聚体的 MS¹ 的离子质荷比同理论值均小于 1 mDa。使用 Insight Explore 软件中解卷积功能预测目标物的分子量，预测分子量和理论分子量的误差小于 3 ppm。

高效液相色谱法测定司美格鲁肽注射液中主成分及抑菌剂的含量

摘要：本文采用岛津超高效液相色谱仪建立了司美格鲁肽注射液中主成分及抑菌剂含量的测定方法。该方法中，司美格鲁肽和苯酚标曲分别在6.09~243.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，27.5~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好，相关系数均大于0.999，准确度为90.2 ~ 105.2%；重复性实验中，重复分析6次，各目标化合物保留时间RSD为0.05 ~ 0.08%，峰面积RSD为0.15 ~ 0.69 %，重复性良好。分析实际样品，司美格鲁肽标示量为105.0%，满足药典要求。加标实验中，各目标化合物低、中、高浓度加标回收率为97.1~112.7%，准确度较好。实验结果表明，该方法能准确地测定司美格鲁肽注射剂中的主成分和抑菌剂含量。

关键词：司美格鲁肽 含量测定 抑菌剂

技术特点：

- ❖ 可以一针法检测司美格鲁肽注射剂中主成分及抑菌剂的含量；
- ❖ 此方法重复性佳，操作简单。

司美格鲁肽是一种长效胰高血糖素样肽-1类似物 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)，其作用机制是激活胰岛素受体，促进胰岛素分泌，减少胰高血糖素分泌，主要应用于2型糖尿病的治疗，也有研究显示可以用于控制体重。此外，司美格鲁肽注射剂作为多剂量包装的注射剂，其中添加了一定含量的苯酚，来抑制微生物的生长。中国药典对药物制剂中抑菌剂的含量也有一定的要求，通常苯酚含量在0.5%左右，目前司美格鲁肽制剂的质量分析方法相关参考文献较少，为了监控产品质量，提高患者用药安全性和稳定性，开发关于司美格鲁肽制剂的质量分析方法具有非常重要的现实意义。

本文采用高效液相色谱建立了司美格鲁肽注射剂中司美格鲁肽及其中抑菌剂苯酚的检测方法，并进行了全面的验证，供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津液相色谱仪 Nexera LC-40D X3，配置信息如下：

系统控制器	： SCL-40	脱气机	： DGU-405
输液泵	： LC-40D X3×2	进样器	： SIL-40C X3
柱温箱	： CTO-40C	检测器	： SPD-M40
色谱工作站	： LabSolutions Ver. 5.106		

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 2 μ m)
岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30001-04

流动相：流动相A: 0.1% 三氟乙酸水溶液
流动相B: 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液

柱温：35 $^{\circ}$ C 流速：0.3 mL/min

检测波长：280 nm 进样体积：5 μ L

洗脱方式：梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 时间程序见表 1。

表 1. 梯度洗脱程序

时间	单元	处理命令	值
2.00	泵	B.conc	20
10.00	泵	B.conc	70
10.10	泵	B.conc	90
12.00	泵	B.conc	90
12.10	泵	B.conc	20
16.00	控制器	Stop	

1.3 标准溶液配制

标准储备液：称取苯酚和司美格鲁肽标准品适量，用水溶解，稀释，得到苯酚 5.5 mg/mL，司美格鲁肽 1.22 mg/mL 的混合溶液。

苯酚和司美格鲁肽标准溶液：分别取适量混合标准储备液，用水逐级稀释，浓度如表 2 所示。

表 2. 混合标准溶液浓度表 (μ g/mL)

化合物	司美格鲁肽和苯酚混合标准溶液					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
司美格鲁肽	6.0	12.1	24.3	60.	121.	243.
苯酚	9	8	6	9	8	6
苯酚	27.	55	110	27	550	110
司美格鲁肽	5			5		0

1.4 样品前处理

取司美格鲁肽注射液适量，用水稀释 50 倍，混匀即得。

2. 结果与讨论

2.1 司美格鲁肽及苯酚标准溶液色谱图

按照 1.2 分析条件，分析标准溶液（苯酚浓度为 27.5 μ g/mL，司美格鲁肽浓度为 6.09 μ g/mL），得到色谱图如图 1 所示，相关化合物信息见表 3。

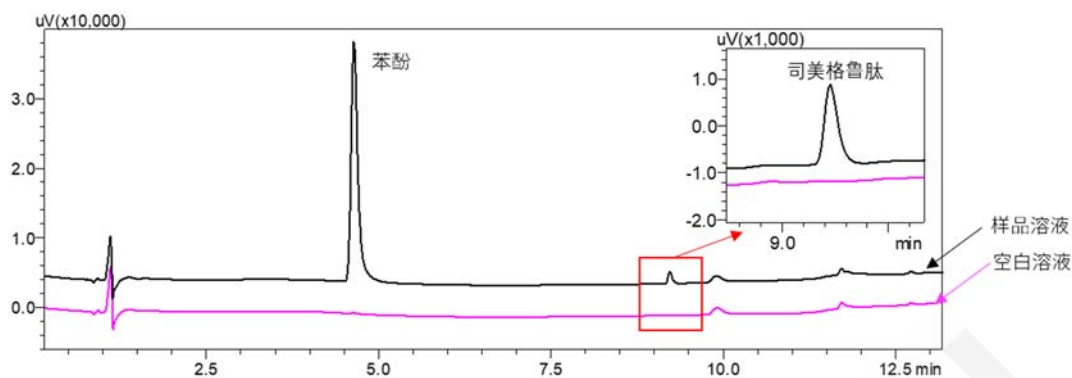


图 1. 标准溶液色谱图

(苯酚: 27.5 $\mu\text{g/mL}$, 司美格鲁肽: 6.09 $\mu\text{g/mL}$)

表 3. 混合标准溶液中化合物信息

编号	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间(min)
1	苯酚	Phenol	108-95-2	4.644
2	司美格鲁肽	Semaglutide	910463-68-2	9.212

2.2 校准曲线

按照 1.2 分析条件, 测定司美格鲁肽和苯酚标准溶液, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 采用外标法建立校准曲线, 如图 2 所示。线性方程、相关系数及准确度如表 4 所示。

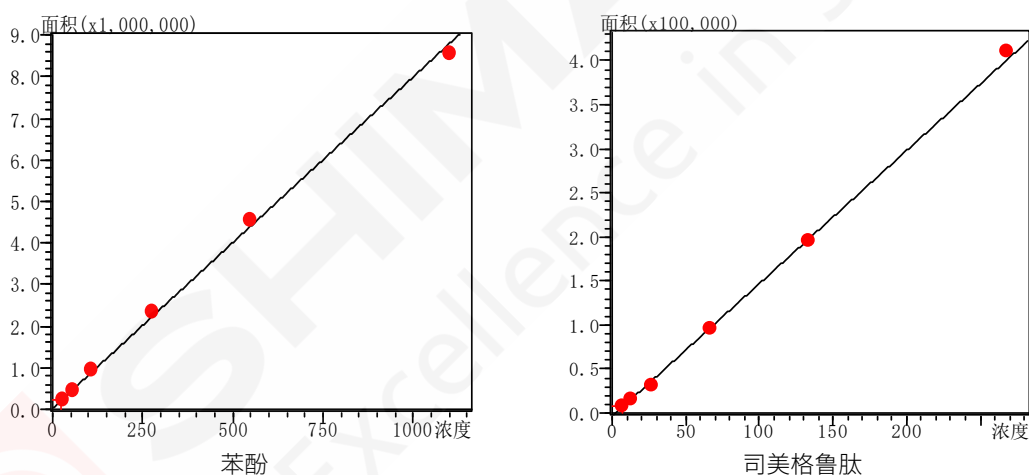


图 2. 苯酚和司美格鲁肽校准曲线

表 4. 苯酚和司美格鲁肽校准曲线信息

编号	化合物	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数	准确度 (%)	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
1	苯酚	27.5~1100	$Y=7972.55X+32415.2$	0.9993	91.5~105.1	0.03	0.09
2	司美格鲁肽	6.09~243.6	$Y=1636.76X-4068.52$	0.9994	90.2~105.2	0.16	0.47

2.3 仪器重复性考察

按照 1.2 分析条件, 将校准曲线最低点标准溶液 (苯酚: 27.5 $\mu\text{g/mL}$, 司美格鲁肽: 6.09 $\mu\text{g/mL}$) 重复分析 6 次, 两目标化合物保留时间 RSD 分别为 0.08%、0.05%, 峰面积 RSD 为 0.15%、0.69%, 精密度良好, 图 3 为苯酚和司美格鲁肽重复性色谱图。

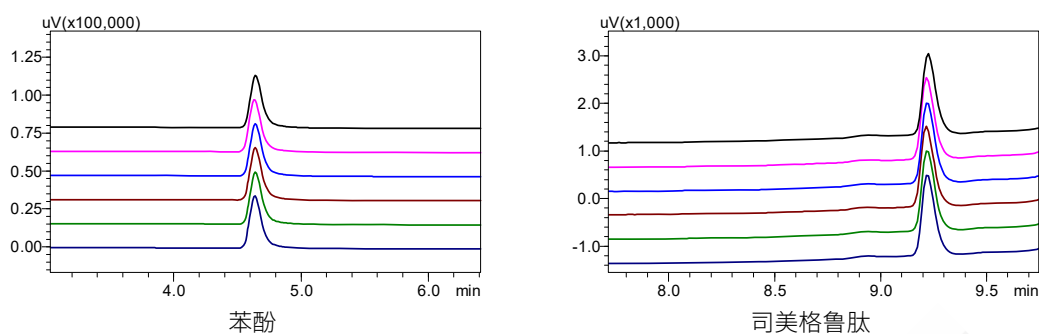


图3. 苯酚和司美格鲁肽重复性色谱图

2.4 样品含量及加标实验

按照 1.4 样品前处理方法对样品进行处理，上机分析，测得样品中司美格鲁肽含量为 1.41 mg/mL，苯酚含量为 5.76 mg/mL，样品说明书中司美格鲁肽和苯酚的标示量分别为 1.34 mg/mL 和 5.50 mg/mL，经计算两目标化合物测量值为标示量的 104.7%和 105.0%。此样品体积为 3 mL，司美格鲁肽含量为 4.02 mg，药典规定制剂标示量为 0.1g 以下时，要求测量值为标示量的 90.0%-110.0%，本实验测量结果满足药典要求。

对上述样品进行加标实验，司美格鲁肽加标量分别为 0.31、1.22 和 6.10 mg/mL，苯酚加标量分别为 1.38、5.50 和 27.50 mg/mL，回收率结果如表 5 所示。

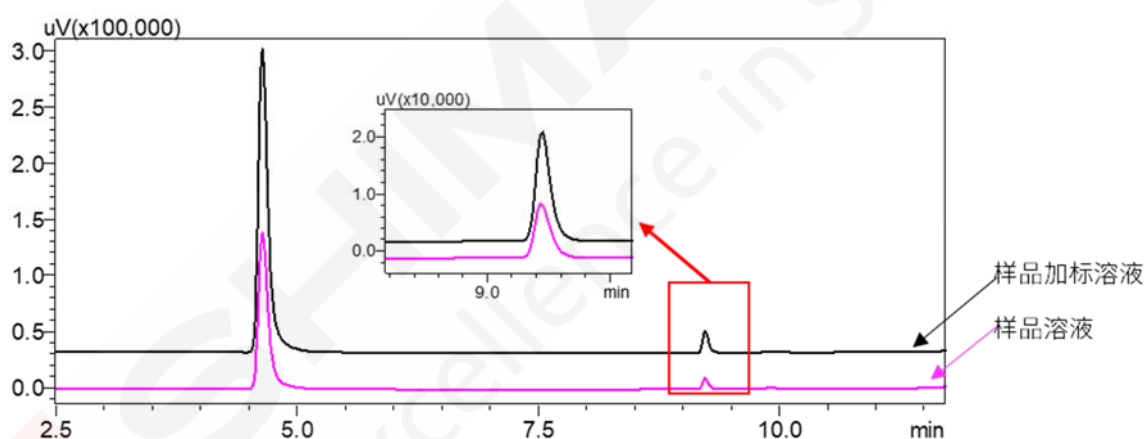


图 4. 实际样品溶液和样品加标溶液色谱图

(加标浓度：苯酚 5.50 mg/mL，司美格鲁肽：1.22 mg/mL)

表 5. 样品中苯酚和司美格鲁肽测定结果 (mg/mL)

编号	化合物	标示量	实测值	准确度 (%)	加标量	加标后浓度	回收率 (%)
1	苯酚	5.50	5.76	104.7	1.38	7.67	109.2
					5.50	11.99	112.7
					27.50	33.56	105.2
2	司美格鲁肽	1.34	1.41	105.0	0.31	1.68	97.1
					1.22	2.64	100.7
					6.10	7.55	102.8

3. 结论

本文建立了液相色谱法测定司美格鲁肽注射剂中主要成分司美格鲁肽以及抑菌剂苯酚含量的分析方法。分析结果表明：该方法准确度高，重复性佳，操作简单，适用于司美格鲁肽注射剂中主成分和抑菌剂同时检测。



生物兼容性液相结合尺寸排阻色谱法分析司美格鲁肽制剂中聚集体

摘要: 本文采用岛津生物兼容性液相系统结合尺寸排阻色谱法, 开发了一种检测司美格鲁肽注射液制剂中聚集体的方法。优选的流动相条件和 SEC 色谱柱可以实现司美格鲁肽主成分、聚集体和制剂中抑菌剂的有效分离, 分离度均大于 2.5。连续六次进样, 司美格鲁肽保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 在 0.044% 以内, 重复性良好。

关键词: 生物兼容性液相 尺寸排阻色谱法 司美格鲁肽 聚集体

技术特点:

- ❖ 样品前处理简单, 采用尺寸排阻色谱法, 对多肽类药物中聚集体进行分离分析。
- ❖ 分析速度快、稳定性高, 非常适用于制药相关行业对多肽类药物的分析检测工作。

多肽药物是由 2 个到 50 个氨基酸残基通过肽键连接而成的生物大分子, 可以在生物体内执行多种生理或药理功能, 具有高特异性和低毒性等特点。然而多肽药物在外部因素的作用下, 如温度变化、机械剪切等, 容易发生结构变化和聚集现象^[1]。这种聚集现象可能会改变多肽的生物活性、影响药物稳定性, 甚至是产生免疫原性, 引起免疫系统的反应^[2]。因此在多肽药物开发过程中, 需要特别关注聚集体杂质的分析, 以确保药物的安全性、有效性和稳定性。

司美格鲁肽是一款胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂, 适应症为 2 型糖尿病的血糖控制以及成人肥胖/超重的体重管理^[3]。司美格鲁肽注射液中除了主要成分司美格鲁肽之外, 还包括磷酸盐、盐酸、氢氧化钠和苯酚等辅料, 其中, 苯酚被用作抑菌剂。

本文采用生物兼容性液相系统结合尺寸排阻色谱法, 开发了一种检测司美格鲁肽制剂中聚集体的方法, 该方法分离度好、稳定可靠, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津生物兼容性高效液相色谱系统 Nexera Bio 具体配置为:

系统控制器	: CBM-20	脱气机	: DGU-20A 5R
输液泵	: LC-20AD XR	自动进样器	: SIL-20AC XR
柱温箱	: CTO-20A	检测器	: SPD-20A
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.120		

1.2 分析条件

色谱柱 : SHIMSEN Ankylo SEC-120 (300 × 7.8 mm I.D., 3.0 μm)
岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-01215-41
流动相 : 详见下方 “结果与讨论” 部分

洗脱方式：等度洗脱
洗脱时间：30 min
柱温：30°C

流速：0.8 mL/min
进样体积：10 μ L
检测波长：280 nm

1.3 样品前处理

取司美格鲁肽注射液，直接上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 流动相中乙腈含量对分析结果的影响

首先我们探究了在 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200mM 氯化钠，pH 6.8）中添加不同比例乙腈对样品分离的影响。从图 1 可以看出，在不添加乙腈的情况下，司美格鲁肽峰展宽严重，峰高较低，几乎不可见；随着乙腈比例的提高，司美格鲁肽峰宽逐渐变窄且峰高相对较高，但是在过高比例有机相条件下多肽中氢键会发生破坏，疏水键削弱，还会降低介电常数，使分子内斥力增加，造成肽链伸展、变性，因此我们最终选择 20% 乙腈添加量。在这种流动相条件下，司美格鲁肽二聚体和单体峰分离效果较好，但是单体峰有“前延”现象（图 2）。

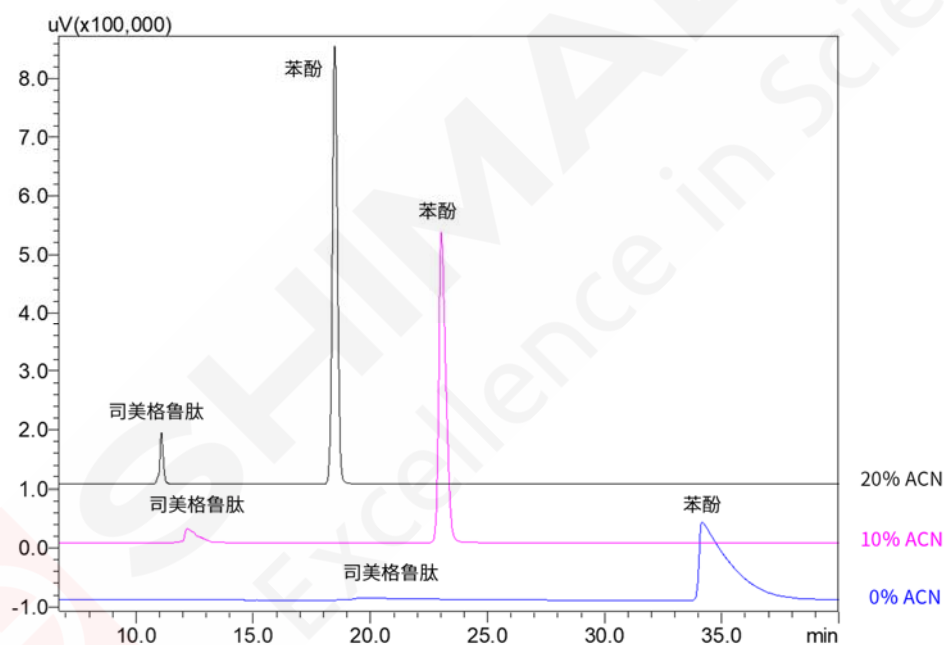


图 1. 流动相中含有不同比例乙腈的分离色谱图

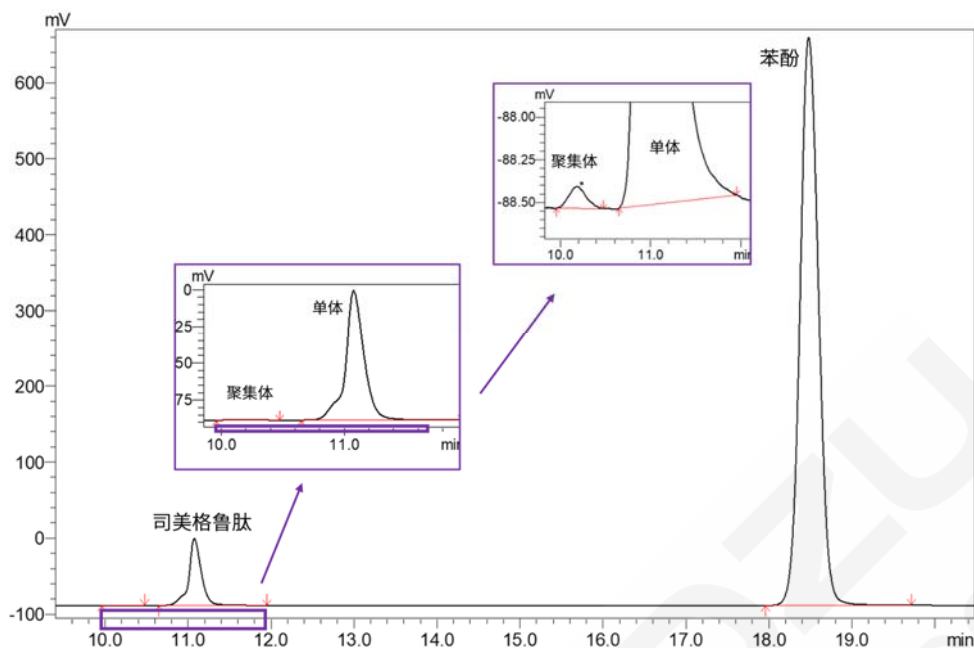


图 2. 流动相中含 20%乙腈的分离色谱图

2.2 流动相中精氨酸含量对分析结果的影响

据文献报道，在流动相中添加一定浓度精氨酸可以改善多肽和蛋白类物质的峰型，改善分离效果^[4]。随后我们在 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200mM 氯化钠、20%乙腈，pH 6.8）流动相中添加了不同浓度的精氨酸，分别为 5mM、10mM 和 20mM。图 3 结果显示，加入精氨酸后单体峰的峰型得到明显的改善，但同时我们观察到基线波动随着精氨酸浓度的升高而增大；综合考虑以上因素，最终确定在流动相中加入 5mM 精氨酸。

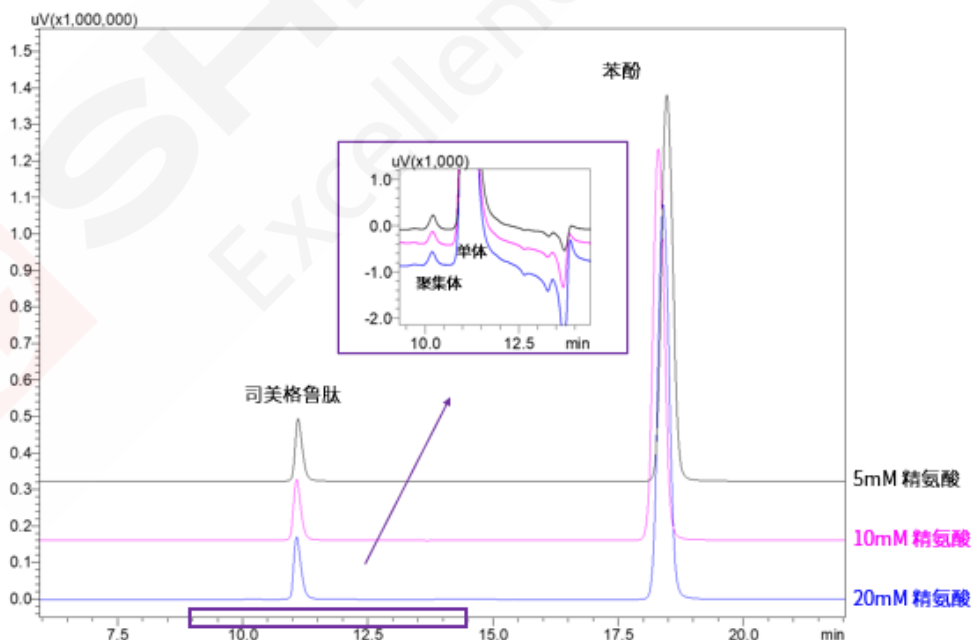


图 3. 流动相中含有不同浓度精氨酸的分离色谱图

2.3 优选条件下分离度评价

使用 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200mM 氯化钠、5mM 精氨酸和 20%乙腈，pH 6.8）作为流动相，按照 1.2 分析条件，以评价分离度；同时与未优化的流动相（50 mM 磷酸盐水溶液（含 200mM 氯化钠、20%乙腈，pH 6.8））进行峰型对比，色谱图和分离结果分别见图 4 和表 1，司美格鲁肽与聚集体分离度大于 1.5，分离良好。

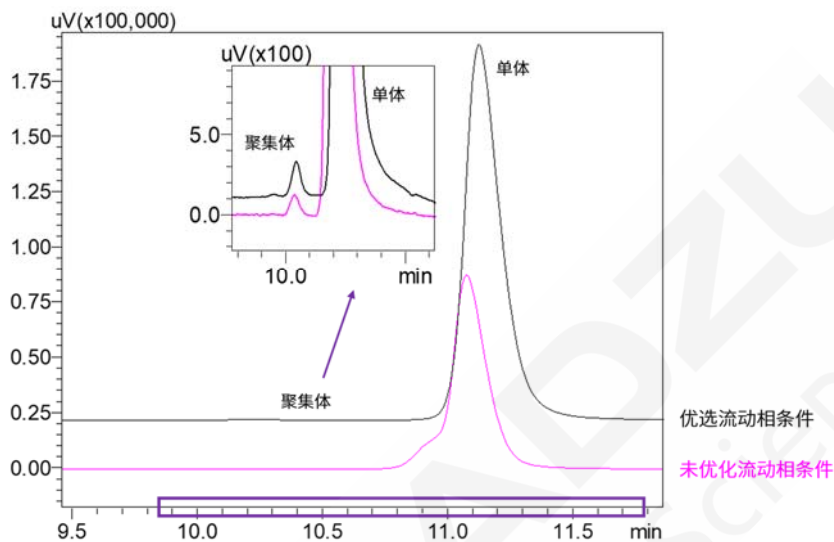


图 4. 优化前后分离色谱图

表 1. 优选条件分离度结果

#	目标物名称	保留时间 (min)	分离度 (USP)
1	司美格鲁肽聚集体	10.232	-
2	司美格鲁肽单体	11.137	2.921
3	苯酚	18.543	20.526

2.4 优选条件下重复性考察

将司美格鲁肽注射液重复进样 6 次，考察仪器重复性（图 5）。司美格鲁肽及其聚集体保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）分别在 0.022~0.044 %和 0.035~0.457 %之间，重复性良好。

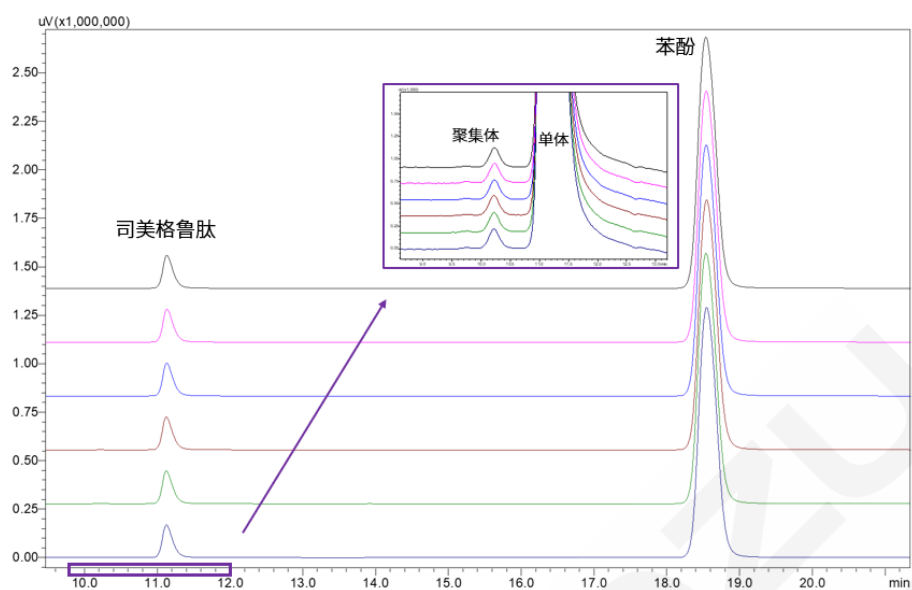


图 5. 优选条件下重复性色谱图 (n=6)

表 2. 优选条件下重复性结果

#	目标物名称	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	司美格鲁肽二聚体	0.044	0.457
2	司美格鲁肽单体	0.035	0.035
3	苯酚	0.022	0.201

3. 结论

使用岛津生物兼容性液相色谱系统结合尺寸排阻色谱，建立了多肽药物制剂中聚集体杂质分析方法。优选的岛津尺寸排阻色谱柱 SHIMSEN Ankylo SEC-120 和流动相 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200mM 氯化钠、5mM 精氨酸和 20%乙腈，pH 6.8）作为流动相组成可最大程度地减少聚集体杂质和色谱柱之间的非特异性作用，获得良好的分析稳定性。本方法分离度高、重复性好，适用于多肽药物中聚集体杂质的测定。

参考文献

- [1]. Zapadka KL, Becher FJ, Gomes Dos Santos AL, Jackson SE. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus*. 2017;7(6):20170030. doi:10.1098/rsfs.2017.0030
- [2]. Fernandez L, Bustos RH, Zapata C, Garcia J, Jauregui E, Ashraf GM. Immunogenicity in Protein and Peptide Based-Therapeutics: An Overview. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(10):958-971. doi:10.2174/1389203718666170828123449
- [3]. Chao AM, Tronieri JS, Amaro A, Wadden TA. Semaglutide for the treatment of obesity. *Trends Cardiovasc Med*. 2023;33(3):159-166. doi:10.1016/j.tcm.2021.12.008
- [4]. Gupta MN, Uversky VN. Biological importance of arginine: A comprehensive review of the roles in structure, disorder, and functionality of peptides and proteins. *Int J Biol Macromol*. 2024;257(Pt 1):128646. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.128646

第 5 章 多肽类药物 DMPK 分析

药物的 DMPK（药代动力学）分析是药物研发和临床应用中的关键环节。该分析通过综合评估药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄等过程，为药物设计提供重要依据。了解药物的药代动力学特性，有助于指导药物设计的优化，提高药物的生物利用度和药效。通过采用液相色谱质谱联用等技术，对药物在体内的吸收过程进行监测，能够准确了解药物在体内的动态变化，进而优化药物设计。

其次，DMPK 分析对评估药物的安全性至关重要。通过分析药物的代谢途径和代谢产物，可以评估药物的毒性和不良反应风险，确保药物的安全性。提前发现潜在的药物毒性问题，能够减少药物开发过程中的不确定性。利用液相色谱质谱联用等技术，对血浆中多肽药物浓度进行测定，能够及时监测药物的血浆浓度，评估药物的毒性和安全性，为药物的临床应用提供安全保障。

最后，DMPK 分析还能指导给药方案的制定。通过评估药物的药代动力学特性，确定最佳的给药途径、剂量和给药频率，为临床治疗提供依据。这有助于提高药物的治疗效果，降低药物的不良反应发生率，增强临床治疗的成功率。因此，多肽药物的 DMPK 分析在药物研发和临床应用中具有重要意义，可以确保药物的安全性、有效性和临床应用的成功。岛津超高效液相色谱串联三重四极杆质谱 LCMS-8050，能够实现在生物基质中快速分离磷脂分子、内源性物质和多肽类目标药物，从而避免了复杂的内源性物质对目标化合物准确定量带来的干扰。该技术具备高灵敏度分析多肽物质的能力，其离子源同轴加热技术能够促进雾化过程，提高离子化效率，从而降低基质干扰和噪音水平。借助该技术，能够对血浆中多肽药物浓度进行精确测定，为临床治疗提供实时监测，进一步保障了药物的临床应用效果。

LC-MS/MS 法测定血浆中利拉鲁肽的浓度

摘要: 本文使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪,建立了血浆中利拉鲁肽测定方法,对方法的线性范围、准确度及精密度进行了考察。结果显示该方法线性良好,质控品测定准确度结果与理论值接近,该方法前处理简便、分析速度快、灵敏度高,可用于血浆中利拉鲁肽含量测定。

关键词: 三重四极杆液质联用仪 利拉鲁肽 血浆

技术特点:

- ❖ 前处理简便快速,仅需简单蛋白沉淀即可上机分析。
- ❖ 血浆中内源性干扰物与目标物在 Shim-pack GISS-HP 色谱柱上分离良好。

利拉鲁肽(Liraglutide)是一种人体内源性物质胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的结构类似物,能够结合并激活 GLP-1受体,以葡萄糖浓度依赖的方式促进胰岛素的分泌,抑制胰高血糖素释放,此外利拉鲁肽还可减缓胃排空,减少能量摄入而发挥减肥作用。虽然利拉鲁肽在临床使用较广,但该物质定量检测方法的发展却相对滞后。传统的免疫学方法自开发以来因其操作简单、快速,在普通实验室即可操作而应用广泛。然而当待测物分子量相对较小时,免疫学方法的特异性就会因交叉反应等原因变差。免疫学方法一次实验只能检测一种化合物,如果联合用药,一个样本则需要多次实验。目前,国内外越来越多的实验室采用LC-MS/MS方法替代免疫学方法开展血药浓度检测。

本文使用串联质谱 LCMS-8050,建立了血浆中利拉鲁肽测定方法,该方法前处理简便,分析速度快,灵敏度高,专属性强,可供相关检测人员参考。

1 实验部分

1.1 仪器

本实验使用串联质谱 LCMS-8050 联用系统。具体配置为:

系统控制器	: SCL-40	输液泵	: LC-40B X3
自动进样器	: SIL-40C X3	柱温箱	: CTO-40C
质谱仪	: LCMS-8050	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.120

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: Shim-pack GISS-HP C18 Metal free column (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μ m); 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30922-02		
流动相	: A相-0.1%甲酸水溶液, B相-乙腈		
流速	: 0.3 mL/min	清洗模式	: 清洗泵>清洗口

柱 温 : 50°C
 清洗泵溶液 : 乙腈/异丙醇/DMSO/水/甲酸
 =30: 35: 10: 24.5: 0.5
 进样体积 : 20 μL
 清洗口溶液 : 甲醇/水=1:1
 洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 30%, 时间程序如表 1 所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	30
2.00	泵	B.Conc	45
5.00	泵	B.Conc	60
5.10	泵	B.Conc	95
6.00	泵	B.Conc	95
6.10	泵	B.Conc	30
10.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI+
 雾化气流速 : 3.0 L/min
 接口电压 : 4.5 kV
 干燥气流速 : 5.0 L/min
 接口温度 : 250 °C
 加热气流速 : 15.0 L/min
 D L 温度 : 200 °C
 碰撞气 : 氦气
 加热模块温度 : 500 °C
 扫描模式 : 多反应监测(MRM)
 M R M 参数 : 见表2

表 2. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
利拉鲁肽	938.5	1128.6*	-34	-31	-40
		1064.0	-34	-29	-38
格列苯脲 (内标)	494.1	369.1	-34	-34	-36

注: *为定量离子

1.3 校准品及样品制备

标准样品: 精密称取利拉鲁肽适量, 用 50%乙腈溶解配制成 1 mg/mL 储备液。用空白血浆溶液稀释成浓度为 200、100、50、20、10、5、2、1 ng/mL 的系列标准样品溶液;

内标溶液: 精密称取格列苯脲适量, 用甲醇溶解配制成 1 mg/mL 储备液。用甲醇溶液稀释为 200 ng/mL 内标溶液。

样品制备: 取 200 μL 标准样品或血浆样本, 加入 20 μL 内标溶液及 400 μL 乙腈 (含 1%甲酸), 涡旋混匀 3 min, 12000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液上机测定。

2 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

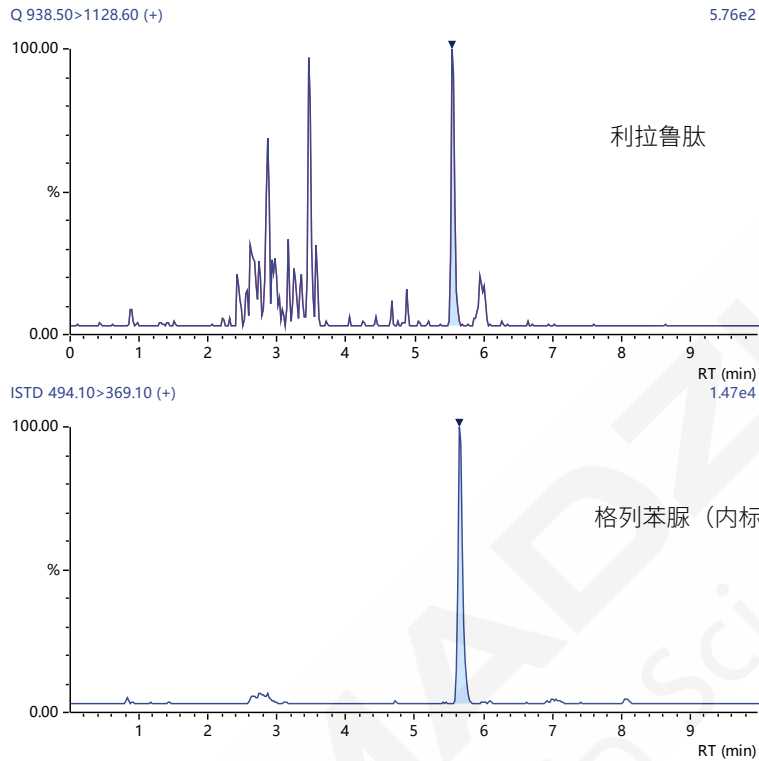


图 1. 校准曲线最低点色谱图

2.2 校准曲线

对标准曲线溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，内标法制作校准曲线。校准曲线结果见图 2 及表 3, 利拉鲁肽在校准曲线浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.9993, 准确度在 94.7%~104.7% 之间。

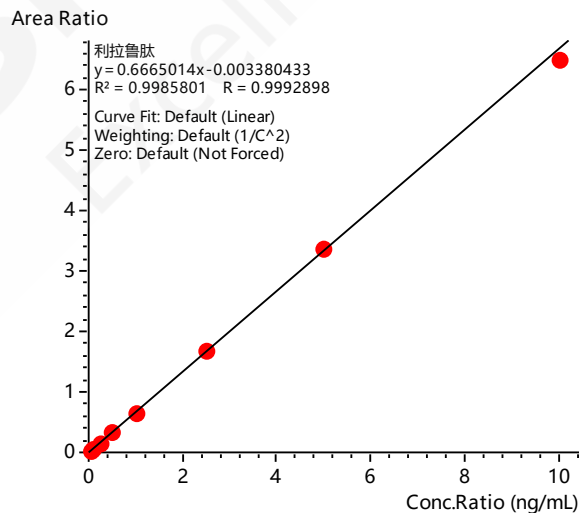


图 2. 校准曲线图谱

表 3. 校准曲线信息

名称	线性方程	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度(%)
利拉鲁肽	$Y = (0.666501)X + (-0.00338043)$	1.00~200.00	0.9993	94.7%~104.7%

2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中的前处理方法对定量下限以及低、中、高浓度质控品进行前处理，每个浓度重复制备 6 份，按 1.2 中的分析条件对定量下限以及低、中、高浓度质控品进行分析，准确度及精密度测定结果如表 4 所示，结果显示测定结果与理论值接近，回收率在 95.5%~99.8%之间，RSD 在 2.91%~9.60%之间。

表 4. 质控准确度考察结果(n=6, 浓度单位 ng/mL)

化合物	项目	LLOQ	LQC	MQC	HQC
利拉鲁肽	理论浓度	1.00	2.50	15.00	150.00
	测定浓度	0.97	2.39	14.97	143.41
	回收率%	96.9	95.5	99.8	95.6
	RSD%	9.60	7.59	9.02	2.91

3. 结论

使用超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8050，建立了血浆中利拉鲁肽测定方法。该方法采用内标法定量，在 1.00~200.00 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数为 0.9993；定量下限以及低、中、高浓度质控品测定准确度结果与理论值接近，回收率在 95.5%~99.8%之间，RSD 在 2.91%~9.60%之间。该方法操作简单且灵敏可靠，可供相关行业人员参考使用。

LCMS-8050 测定大鼠血浆中的艾塞那肽

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中艾塞那肽的方法。该多肽化合物的线性良好，判定系数大于 0.993；重复性实验结果表明：其保留时间和峰面积相对标准偏差分别为 0.03%和 4.21~4.67%之间，仪器精密度良好；其仪器检出限为 0.01 ng/mL，定量限为 0.03 ng/mL；样品加标相对回收率在 30.4~34.8% 之间。该方法在血浆基质中灵敏度高分析速度快可以快速、灵敏地测定大鼠血浆中的艾塞那肽。

关键词：艾塞那肽 血浆 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

糖尿病，尤其是 II 型糖尿病是威胁人类健康的重大疾病，传统的治疗药物磺酰脲类和双胍类不仅副作用较大，而且对某些患者治疗效果有限；人体分泌的胰高血糖素样肽(GLP-1)在血糖浓度较高的情况下能促进胰岛素分泌，而在血糖正常时则无此作用，而且其很容易被体内的二肽酶降解，体内半衰期不足 2 分钟，因此其作为临床药物使用受到了限制。后来人们发现一种从墨西哥巨蜥的毒液中分离得到的含 39 个氨基酸的多肽艾塞那肽与胰高血糖素样肽具有同源性，而且有同样的促胰岛素分泌的功能，稳定性好，在 II 型糖尿病治疗方面具有良好的临床应用前景。

由于该类多肽药物的市场前景及由此带来的巨额利润，目前国内多家制药企业对此进行了多类剂型的仿制药的研发。为了满足用户对此类药物快速、高灵敏度的要求本文建立了一种快速灵敏的大鼠血浆中艾塞那肽的检测方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2（输液泵），DGU-20A5R（在线脱气机），SIL-30AC（自动进样器），CTO-30AC（柱温箱），CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Inertsil Sustain GISS C18 Column (2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm)

流动相：A 相：(0.3%甲酸+1 mM 乙酸铵) 水， B 相：(0.3%甲酸+1 mM 乙酸铵) 乙腈

流速：0.40 mL/min

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，初始比例 10%B

表 1. 通用梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
3.50	Pumps	Pump B Conc.	85
5.50	Pumps	Pump B Conc.	85
5.51	Pumps	Pump B Conc.	10
8.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器:	LCMS-8050	接口温度:	300°C
离子源:	ESI+	DL 温度:	150°C
雾化气流速:	3.0 L/min	加热模块温度:	400°C
加热气流速:	10.0 L/min	干燥气流速:	10.0 L/min
扫描模式:	多反应监测(MRM), MRM 参数见表 2		

表 2. 化合物信息及 MRM 参数

序号	化合物	英文名	CAS	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias(V)	CE	Q3Pre Bias(V)
1	艾塞那肽	Exenatide	141758-74-9	1047.60	396.10*	-40.0	-40.0	-19.0
					299.20	-40.0	-54.0	-30.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：用甲醇配制 5 mg/mL 的混合标准贮备液，用乙腈+水溶液+0.2%BSA(V/V/M, 80:20:0.2)逐步稀释成 4、20、40、200、400 和 800 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：取空白 SD 大鼠血浆 100 μ L 加入 10 μ L 标准溶液，再加入 290 μ L 纯乙腈，振荡后高速离心取上清。

2. 结果讨论

2.1 标准样品扫描质谱图

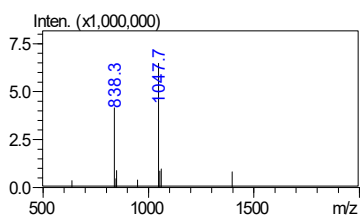


图 1. 艾塞那肽全扫描质谱图

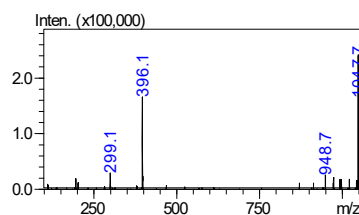


图 2. 艾塞那肽产物离子扫描质谱图

2.2 基质加标样品的 MRM 色谱图

基质加标样品的 MRM 色谱如图 3 所示。

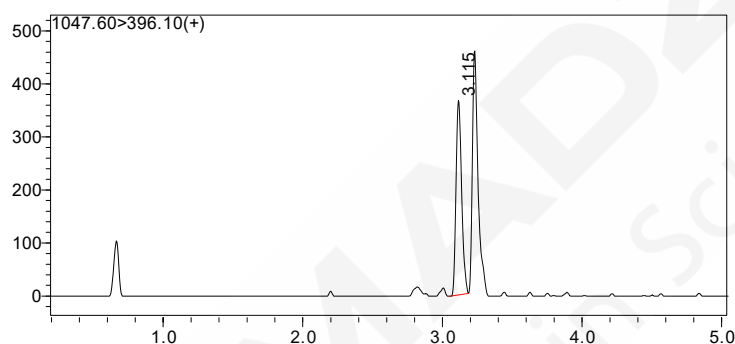


图 3. 基质加标样品的 MRM 色谱图 (0.1 ng/mL)

2.3 线性关系

配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10 和 20 ng/mL 的基质加标工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，标线如下图所示。在 0.1~20 ng/mL 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和判定系数见表 3。

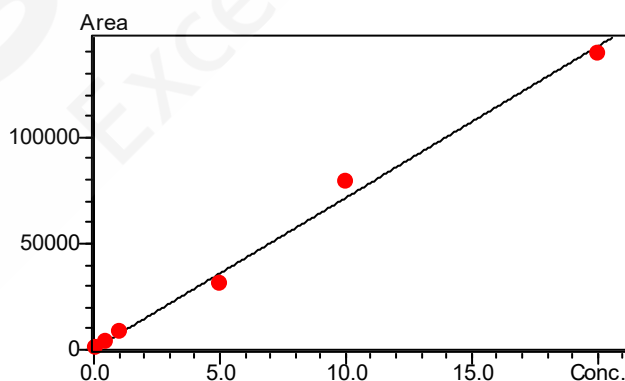


图 4. 标准工作曲线

表 3. 艾塞那肽校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ng/mL	准确度 (%)	判定系数 r^2
1	艾塞那肽	$Y = (7123.10)X + (359.992)$	0.1~20	86.2~110.4%	0.9931

2.4 检出限和定量限

对浓度为 0.5 ng/mL 的基质溶液进样分析,艾塞那肽的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 4 所示。

表 4. 艾塞那肽的检出限和定量限

编号	名称	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	艾塞那肽	0.01	0.03

2.5 重复性实验

对二个浓度的混合标准溶液连续 6 次进样,考察仪器的重复性,保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。2 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.03 和 4.21~4.67%之间,仪器重复性良好。

表 5. 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

编号	化合物	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)	
		R.T	Area	R.T	Area
1	艾塞那肽	0.03	4.67	0.03	4.21

2.6 回收率和专属性实验

大鼠血浆按照 1.3 方法进行处理获得浓度为 0.5、5 ng/mL 的样品各三份;另取适量大鼠血浆加入纯乙腈(V/V, 1:3)振荡后高速离心,取上清加标准品配制成 0.5、5 ng/mL 的样品各三份。以前加标样品测得的峰面积为 A,后加标样品测得的峰面积为 A₁测定相对回收率,回收率=A/A₁。具体结果如表 6,回收率在 30.4~34.8%之间。比较基质加标色谱图和空白基质色谱图可知该分析方法专属性良好。空白基质的色谱图如图 4 所示,样品的色谱图如图 5 所示。

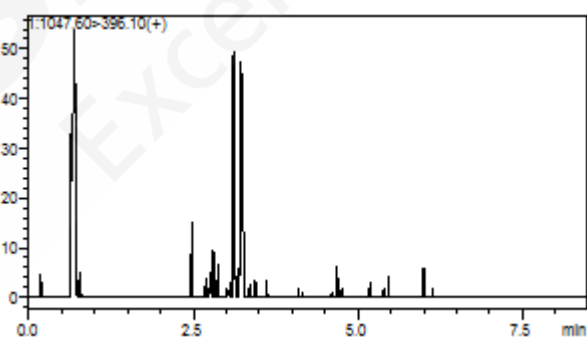


图 5. 空白基质色谱图

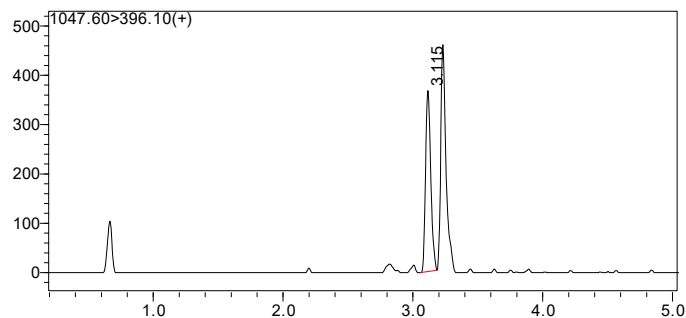


图 6. 加标回收色谱图 (0.1 ng/mL)

表 6. 加标样的回收率结果(n=3)

浓度水平	浓度 (ng/mL)	平均回收率%
1	0.5	30.4
2	5.0	34.8

2.7 样品残留考察

根据药品非临床药代动力学研究指导规则要求, 在 20 ng/mL 的样品分析完成后对空白样品进行分析, 结果如表 7 所示。残留面积和定量下限 0.1 ng/mL 的面积比为 7.2%, 小于药品非临床药代动力学研究指导规则的 20% 的要求。该方法符合标准要求。

表 7. 残留考察结果

样品类型	峰面积	面积比%
空白	68	7.2
定量下限	952	

3. 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定大鼠血浆中的艾塞那肽。该多肽化合物的线性良好, 判定系数大于 0.993; 其仪器检出限为 0.01 ng/mL, 定量限为 0.03 ng/mL; 样品加标相对回收率在 30.4 ~ 34.8% 之间, 样品残留结果符合药品非临床药代动力学研究指导规则要求。

此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高, 满足艾塞那肽体内药物分析要求, 可作为血浆中艾塞那肽的有效检测方法。

超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法测定人血浆中多肽类药物戈舍瑞林含量

摘要: 本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中戈舍瑞林的方法。人血浆样品采用固相萃取法进行前处理制备, 取上清液进样分析, 可在 8.5 min 内快速、准确地检测血浆中戈舍瑞林含量。本实验对方法选择性、线性范围、定量下限、精密度、回收率、基质效应、残留等项目均进行考察。结果表明该方法满足生物样品方法学验证要求, 具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点, 适合人血浆中戈舍瑞林含量的快速准确检测, 可用于人体内戈舍瑞林浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词: 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 人血浆 多肽类药物 戈舍瑞林

以往蛋白多肽研究主要依赖光谱法、生物检定和免疫分析等方法, 但这些分析方法分别具有专属性差、灵敏度低或成本较高等多方面局限性。LC-MS/MS 对多数药物结构的通用性、检测的专属性和灵敏度等各方面的优势, 已迅速成为药物代谢与药物动力学研究中采用的主要分析方法, 而利用 LC-MS/MS 从事蛋白质多肽类药物药代动力学研究已成为未来发展的趋势。

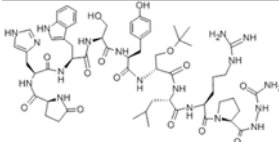
戈舍瑞林是一种注射用的促黄体生成素释放激素类似物, 属于用来治疗乳癌和前列腺癌的多肽类药物。资料显示, 样本医院数据统计得出醋酸戈舍瑞林用药金额从 2005 年的 2771 万元增长到 2015 年的 3.96 亿元, 而近几年使用量以 23.6% 的增长率不断提升。

针对以上应用需求, 为保障临床用药安全合理, 准确测定人体用药血药浓度, 实验采用 LCMS-8060 建立灵敏、高效的人血浆中戈舍瑞林含量的检测方法, 实现血浆基质中多肽药物的准确测定, 对临床精准用药提供技术支撑, 供相关人员参考。

1. 实验部分

1.1 化合物信息

表 1. 化合物信息

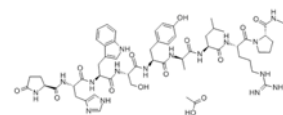
化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
戈舍瑞林	Goserelin	145781-92-6	$C_{59}H_{84}N_{18}O_{14}$	

阿拉瑞林
(IS)

Alarelin

79561-22-1

C₅₆H₇₈N₁₆O₁₂



1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A_{5R} 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GISS C18 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 2.0 μm)

流动相: A 相-0.1%乙酸水溶液; B 相-甲醇

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 5 μL

洗针方式: Rinse pump→Rinse port

外置洗针液: 甲醇: 异丙醇: 丙酮: 水:
(含 0.5%甲酸) 为 1:1:1:1

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 2。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 3.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 9.0 L/min

干燥气: 氮气 9.0 L/min

碰撞气: 氦气

接口温度: 350°C

DL 温度: 200°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 47 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 3

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	泵	B.Conc	60
3.50	泵	B.Conc	60
5.00	泵	B.Conc	80
5.20	泵	B.Conc	80
5.50	泵	B.Conc	98
5.80	泵	B.Conc	98
5.90	泵	B.Conc	20
8.50	Controller	Stop	

表3. MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
戈舍瑞林	635.60	607.55*	-32.0	-19.0	-28.0
	635.60	249.00	-32.0	-33.0	-24.0
阿拉瑞林	584.60	249.10	-28.0	-26.0	-24.0

注：*表示定量离子

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份戈舍瑞林适量，用纯甲醇溶解配制两份 1.0 mg/mL 戈舍瑞林储备液。取其中一份储备液用稀释液（0.2%甲酸水溶液/甲醇溶液 = 40/60, v/v）逐级稀释成浓度为 10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL 的标准工作曲线；另一份储备液用稀释液分别稀释成浓度为 30、250、4000 ng/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 10 μ L 加入 990 μ L 人空白血浆（含抑肽酶）中，依次配制成标准曲线 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL；分别取三个不同浓度质控溶液 10 μ L 加入 990 μ L 人空白血浆中，依次配制成 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品。

精密称取阿拉瑞林适量，用纯甲醇溶液溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的阿拉瑞林储备液用稀释液（0.2%甲酸水溶液/甲醇溶液 = 40/60, v/v）稀释为 3 ng/mL 内标溶液，待用。

1.5 人血浆样品前处理方法

取含有抑肽酶的人血浆样品 100 μ L，依次加入 3 ng/mL 内标溶液 100 μ L、稀释液 100 μ L，涡旋混合 2 min。加入甲醇 500 μ L，涡旋 2 min 后，13000 rpm/min 离心 10 min。吸取上清液与等体积纯水进行混匀，并取混合液加入已活化好的 96 孔固相萃取板，分别用 1.0 mL 纯水与 60%甲醇水溶液进行清洗除杂，再用 1.0 mL 甲醇（含 0.01%甲酸）进行洗脱，并压干，收集全部洗脱溶液至蛋白低吸附 96 孔板中，50°C 水浴，进行氮气吹干。吹干后，向孔板内加入 100 μ L 稀释剂进行复溶，涡旋 3 min 后，13000 rpm/min 离心 10 min，取上清液转入低吸附进样小瓶进样分析，进样体积 5 μ L。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

戈舍瑞林在一级质谱扫描下主要生成 $[M+2H]^{2+}$ 准分子离子峰 m/z 635.60，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 607.55、 m/z 249.00；阿拉瑞林在一级质谱扫描下主要生成 $[M+2H]^{2+}$ 准分子离子峰 m/z 584.60，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 249.10，其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1-4。

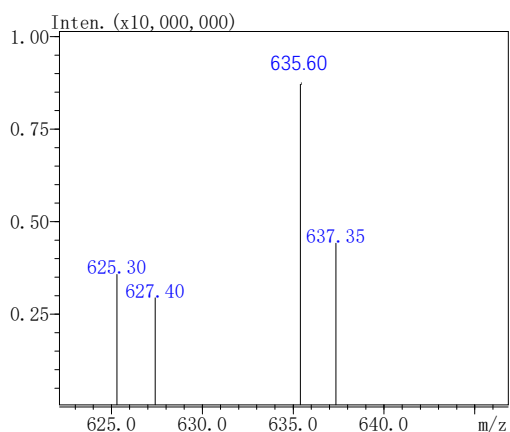


图 1. 戈舍瑞林一级质谱图

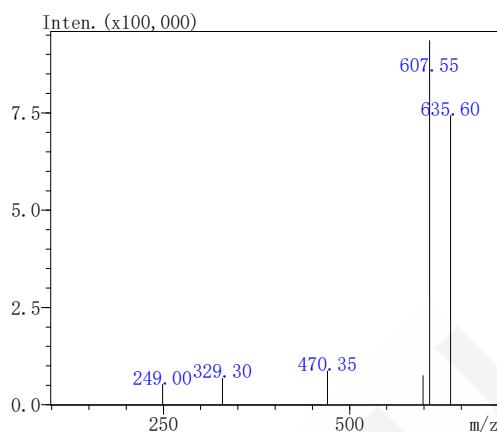


图 2. 戈舍瑞林产物离子扫描图 (CE 值-19 V)

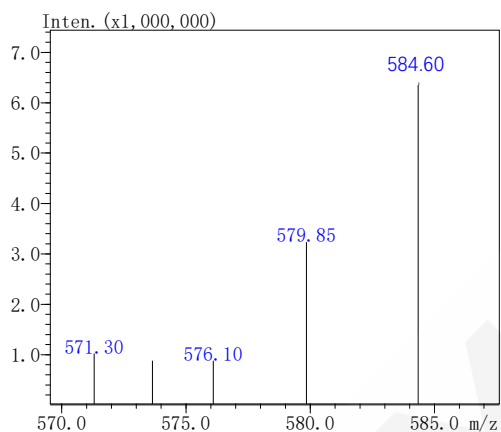


图 3. 阿拉瑞林一级质谱图

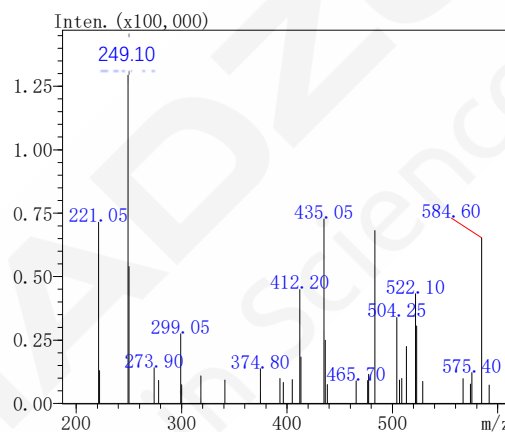
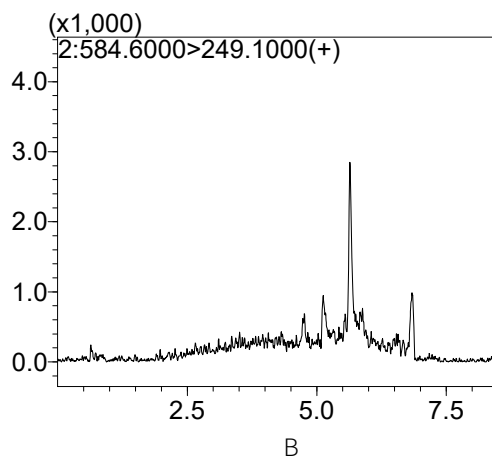
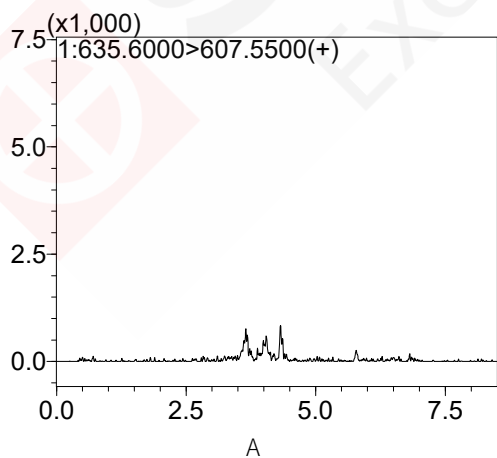


图 4. 阿拉瑞林产物离子扫描图 (CE 值-24 V)

2.2 方法选择性

取含抑肽酶的人空白血浆,按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定,得人空白血浆、0.1 ng/mL 人血浆基质加标样品的 MRM 色谱图,见图 5。结果表明,戈舍瑞林与内标物的保留时间 t_R 分别为 3.40 min、2.92 min。人空白血浆中的内源物质干扰,对样品检测无明显影响,方法具有较强选择性。



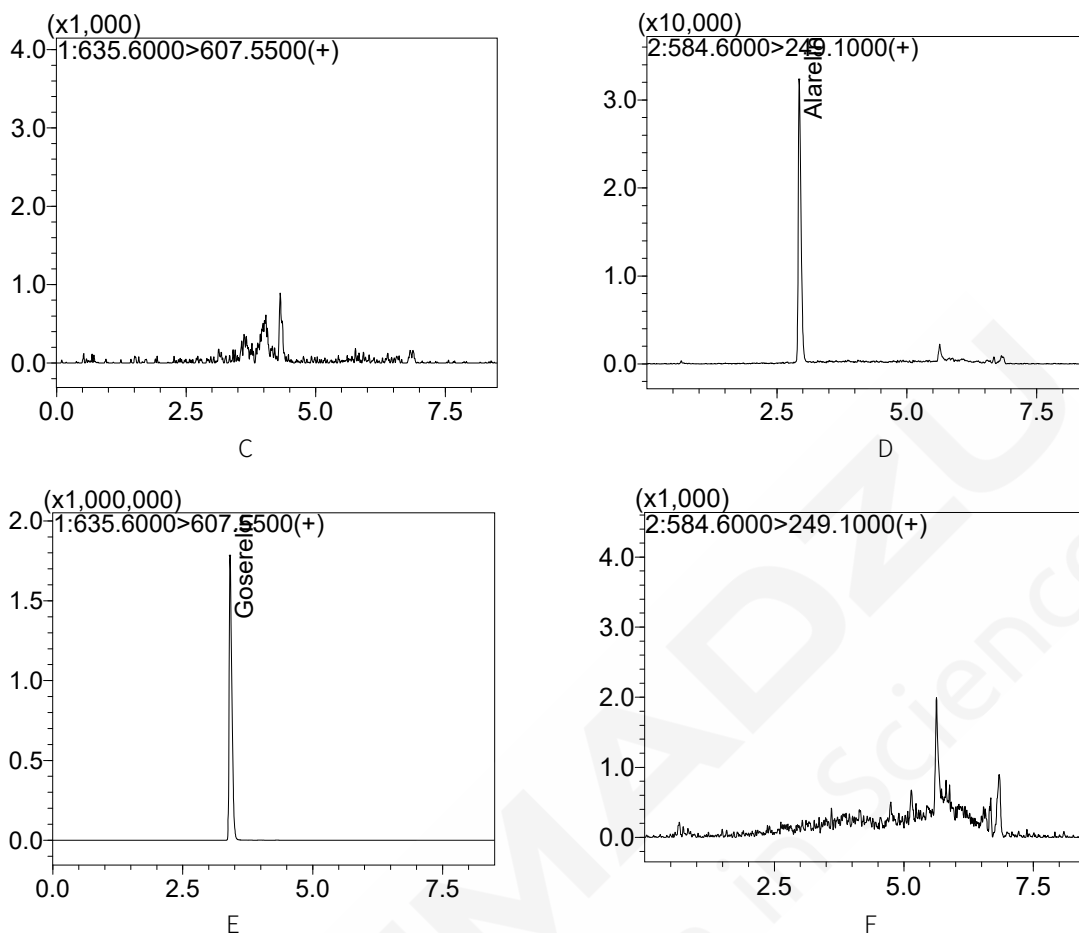


图 5. 戈舍瑞林与阿拉瑞林 MRM 色谱图 (A、B: 人空白血浆; C、D: 空白血浆含 3 ng/mL 内标血浆; E、F: 50 ng/mL 戈舍瑞林血浆样品不含内标)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下人血浆样品配制方法制备 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL 人血浆标准工作曲线, 按照 1.5 项中血浆样品前处理方法处理人血浆样品, 建立标准曲线, 并用同位素内标法进行分析测定。以人血浆中戈舍瑞林浓度与内标浓度 (以 1 计) 的比值 X 为横坐标, 以戈舍瑞林峰面积与阿拉瑞林峰面积的比值 Y 为纵坐标, 权重系数为 $1/C^2$, 进行线性回归分析, 所得标准曲线见图 6, 人血浆中戈舍瑞林线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明戈舍瑞林在 0.1-50 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

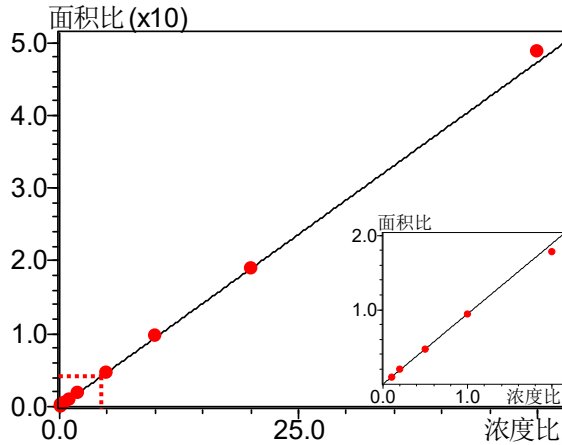


图 6. 戈舍瑞林标准曲线

表 4. 戈舍瑞林标准曲线参数 (线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
戈舍瑞林	$Y = (0.946223)X + (0.00105868)$	0.1-50	94.1~103.1	0.9995

表 5. 标准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	准确度(%)
1	0.1	0.099	99.1
2	0.2	0.206	103.1
3	0.5	0.491	98.2
4	1	0.998	99.8
5	2	1.881	94.1
6	5	4.974	99.5
7	10	10.263	102.6
8	20	20.120	100.6
9	50	51.499	103.0

2.4 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品以及定量下限 0.1ng/mL 样品, 按照 1.5 方法制备, 每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析, 连续测定 3 天, 每日随标准曲线, 用测得质控样品中戈舍瑞林峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异, 结果见表 6。其中戈舍瑞林最低定量限 S/N 平均值为 26.85。结果表明, 各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内, 并已满足生物样品检测要求。

表 6. 戈舍瑞林日内精密度与日间精密度 (3 天, 每天 n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度%
LLOQ	0.1	4.03	6.67	87.70-109.10
LQC	0.3	3.05	3.82	93.60-107.50
MQC	2.5	1.44	3.21	96.50-107.80
HQC	40	2.08	3.54	101.90-113.70

2.5 回收率

取浓度为 0.3、2.5、40 ng/mL 质控样品 (每个浓度重复 6 次), 按照 1.5 方法制备, 以人血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与人空白血浆按照 1.5 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比, 即 $A1/A2 \times 100\%$, 考察人血浆样本处理方法的提取回收率。实验结果见表 7, 各浓度水平戈舍瑞林回收率均大于 74%、RSD 小于 4%。

表 7. 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率%	RSD%
LQC	0.3	74.05	3.32
MQC	2.5	82.08	2.53
HQC	40	88.32	1.29

2.6 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品 (每个浓度重复 6 次), 通过比较人空白血浆后加标样品与浓度一致的标准溶液, 两者的目标化合物面积平均值所得比值即为基质效应, 并计算内标归一化基质效应。结果见表 8, 各浓度水平基质效应因子均大于 97%。

表 8. 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应%	内标基质效应%	A/A _{IS} 基质效应
LQC	0.3	97.59	97.49	100.10
MQC	2.5	101.38	101.41	99.97
HQC	40	99.74	97.93	101.85

2.7 稳定性试验

为评价生物样品在周围环境 (如室温、光照) 下的稳定性, 将低、中、高三浓度水平质控样品 (n=6) 在室温桌面放置 12 h 以上, 按照 1.5 方法制备并进行测定, 将测定值浓度与理论值进行比较。结果显示, 三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 $\pm 10.2\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测 (偏差 $\pm 15\%$ 以内) 法规要求。人血浆中戈舍瑞林在室温下放置 12 h 以上具有良好稳定性。

考察生物样品在处理、制备等过程中反复冻融的稳定性, 将高、中、低质控样品 (n=6) 反复冻融三个周期, 每一周期大于 12 h, 经制备后同法测定, 与理论值进行比较。结果显示, 测定值与理论值的差异均在 $\pm 10.4\%$ 以内, 满足生物样品稳定性检测 (偏差 $\pm 15\%$ 以内)

法规要求,说明人血浆中戈舍瑞林的浓度在三次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

考察生物样品经制备后,在待测环境中的稳定性,将低、中、高三浓度水平质控样品(n=6)在待测环境下放置 96 h,将测定值与理论值进行比较。结果显示,测定值与理论值的差异均在±13.7%以内,满足生物样品稳定性检测(偏差±15%以内)法规要求。说明人血浆中戈舍瑞林的浓度在待测环境中放置后,其含量可保持稳定。

2.8 系统残留考察(Carryover)

考察系统残留的影响,完成浓度最高点分析后,其后分析空白样品中戈舍瑞林的峰面积,空白样品中戈舍瑞林及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰,见图 7。

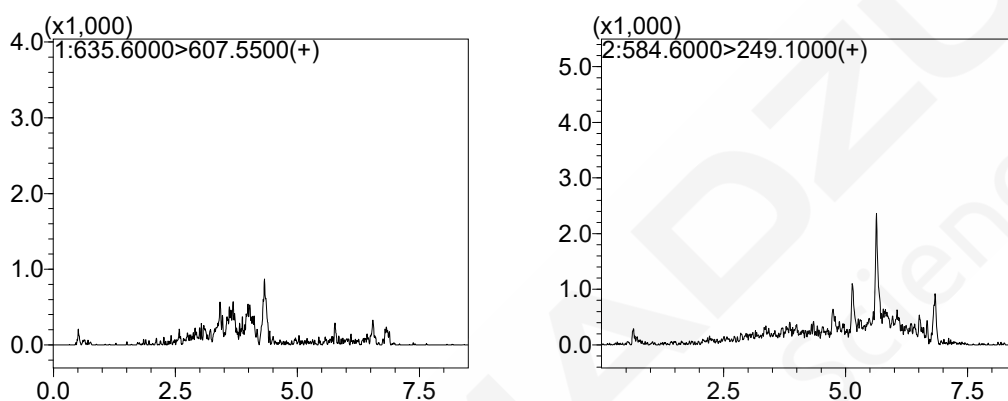


图 7. 系统残留考察空白样品色谱图 (左: 戈舍瑞林; 右: 阿拉瑞林)

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中戈舍瑞林的方法。该方法在 8.5 min 内完成人血浆中戈舍瑞林的检测,采用同位素内标法定量,方法定量下限 0.1 ng/mL,线性范围 0.1-50 ng/mL,相关系数在 0.9995。选择性考察结果表明人空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。方法中定量下限日内、日间精密度 4.03%与 6.67%,S/N 平均值为 26.85;低中高三水平质控浓度日内精密度 1.44-3.05%,日间精密度 3.21-3.82%,准确度 87.7-113.7%;各浓度水平质控样品中戈舍瑞林回收率均大于 74%,RSD 小于 4%,基质效应大于 74%;稳定性实验结果显示样品在室温下放置 12 小时稳定,3 次冻融循环戈舍瑞林浓度无显著变化,人血浆样品提取液待测环境下放置 96 h 稳定。方法具有分析方法简单、分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点,满足戈舍瑞林体内药物分析要求,为戈舍瑞林仿制药生物等效性评价。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中多肽类药物奥曲肽

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中多肽类药物奥曲肽的方法。方法采用类似物亮丙瑞林作为内标物, 方法定量限 5 pg/mL, 线性范围为 5~2000 pg/mL, 相关系数 0.9993。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质, 并且奥曲肽和内标物亮丙瑞林之间无相互干扰。方法的日内精密度 3.30~6.01%, 日间精密度 2.43~6.44%, 各浓度水平质控样品的准确度 86.2~109.7%, 能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求; 各浓度水平亮丙瑞林的回收率大于 70%, 基质效应因子均大于 80%, 内标归一化基质效应因子大于 90%; 系统残留考察结果表明在实验条件下奥曲肽无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点, 适合血浆中奥曲肽含量的快速检测, 可用于人体内多肽类药物奥曲肽浓度的测定及其人体药代动力学研究。

关键词: 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 多肽类药物 奥曲肽

奥曲肽是一种人工合成的八肽环状化合物, 具有与天然内源性生长抑制素类似的作用。奥曲肽具有多种生理活性, 如抑制生长激素、促甲状腺素、胃肠和胰内分泌激素的病理性分泌过多等。奥曲肽的给药剂量较低, 在体内具有较长的半衰期, 药物在体内的浓度低。

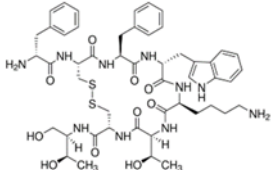
目前关于生物基质中奥曲肽的血药浓度测定方法的文献报道较少, 缺少能够快速、高灵敏度地检测该药物血药浓度的方法。本工作利用岛津的超高效液相色谱, 实现血浆基质中磷脂分子、内源性物质和多肽类目标药物的快速分离, 避免血浆中复杂的内源性物质对目标化合物的准确定量带来的干扰。串联三重四极杆 LCMS-8050 能够实现目标多肽物质的高灵敏度分析, 并且离子源同轴加热技术能够促进雾化, 提高离子化效率, 降低基质干扰和噪音水平, 实现血浆基质中多肽药物的准确、稳定检测。

1. 实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1。

表 1. 化合物信息

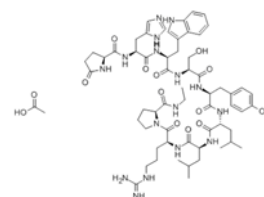
化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
奥曲肽	Octreotide	83150-76-9	C ₄₉ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	

亮丙瑞林
(内标)

Leuprolide

74381-53-6

C₅₉H₈₄N₁₆O₁₂



1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Inertsil Sustain Swift C18 Column (2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm)

流动相: A 相-0.1% 甲酸水溶液 B 相-乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 20 μL

自动进样器温度: 10°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 2。

洗针方式: Rinse Pump>Rinse Port, Rinse Pump 洗针液为乙腈/异丙醇/丙酮/水/甲酸=25:25:25:24.5:0.5 (v/v/v/v); Rinse Port 洗针液为 50% 甲醇

表 2. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.50	Pumps	Pump B Conc.	80
3.60	Pumps	Pump B Conc.	20
5.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

DL 温度: 200°C

离子源: ESI, 正离子模式分析

加热模块温度: 400°C

雾化气流速: 3.0 L/min

干燥气流速: 5.0 L/min

加热气流速: 15.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

接口温度: 400°C

驻留时间: 50 ms

MRM 参数: 见表 3

表 3. MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
奥曲肽	510.3	120.00	-36.0	-31.0	-21.0
	0	501.15	-36.0	-15.0	-36.0
亮丙瑞林 (内标)	605.4	249.05	-22.0	-29.0	-26.0

1.4 标准样品和质控样品的配制

用纯水配制两份 1.0 mg/mL 奥曲肽储备液。一份储备液用 50% 甲醇逐级稀释成浓度为 0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL 的工作曲线；另一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 0.3 ng/mL、3.0 ng/mL、30 ng/mL 的质控溶液。取 20 μ L 标准工作曲线加入 980 μ L 空白血浆中，依次配制成标准曲线；取 20 μ L 质控溶液加入 980 μ L 空白血浆中，依配制成低浓度 (LQC)、中浓度 (MQC)、高浓度 (HQC) 质控样。

用纯水配制 1.0 mg/mL 亮丙瑞林备液，用 50% 甲醇稀释成 1.0 ng/mL，配制成内标工作液。

1.5 样品前处理方法

200 μ L 血浆样品加入 50 μ L 的内标溶液，用 4% 磷酸稀释至 450 μ L 后上样至预先活化好的 96 孔板式 μ Elution WCX SPE 小柱上，先用 400 μ L 5% 氨水溶液淋洗，再用 400 μ L 20% 乙腈淋洗，最后用 50 μ L 1% TFA 75% 乙腈溶液洗脱，加入 150 μ L 水稀释后，20 μ L 上机分析。

1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。最低定量限 (LLOQ) 的考察，分别处理 6 份 LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20%，测量误差不超过理论值的 80~120%，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。

线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的标准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 1/x。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (15 pg/mL、150 pg/mL、1500 pg/mL)，日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度/理论浓度 \times 100% 计算。准确度在 85~115% 范围内，精密度不超过 15%。

奥曲肽回收率考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，通过

比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液, 两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

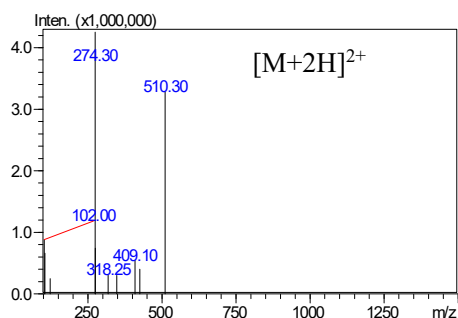


图 1. 奥曲肽的一级质谱图

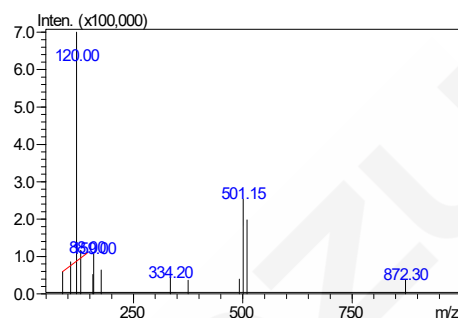


图 2. 奥曲肽的产物离子扫描图(CE 值-20 V)

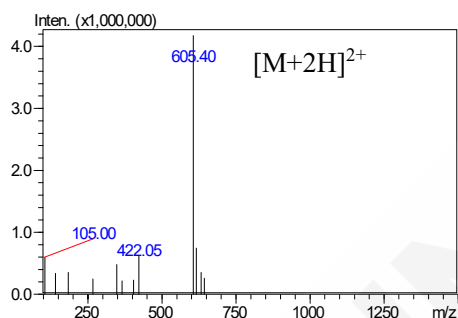


图 3. 亮丙瑞林的一级质谱图

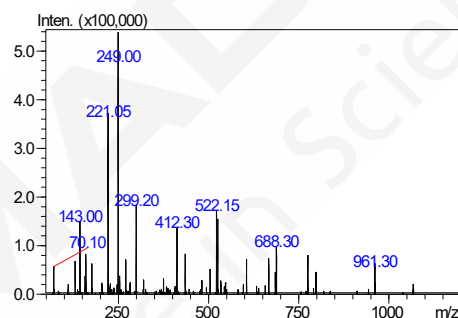


图 4. 亮丙瑞林的产物离子扫描图(CE 值-25 V)

2.2 方法选择性

考察空白血浆基质和 5 pg/mL 血浆基质加标样品, 结果如图 5、6 所示, 奥曲肽及其内标亮丙瑞林检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

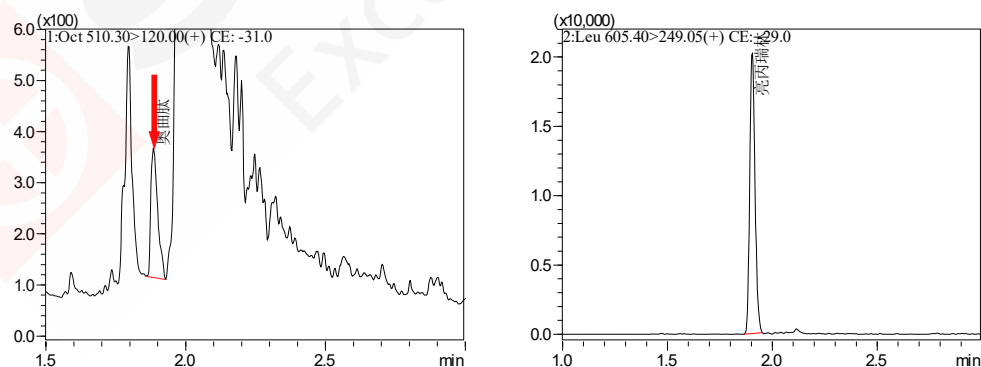


图 5. 5 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

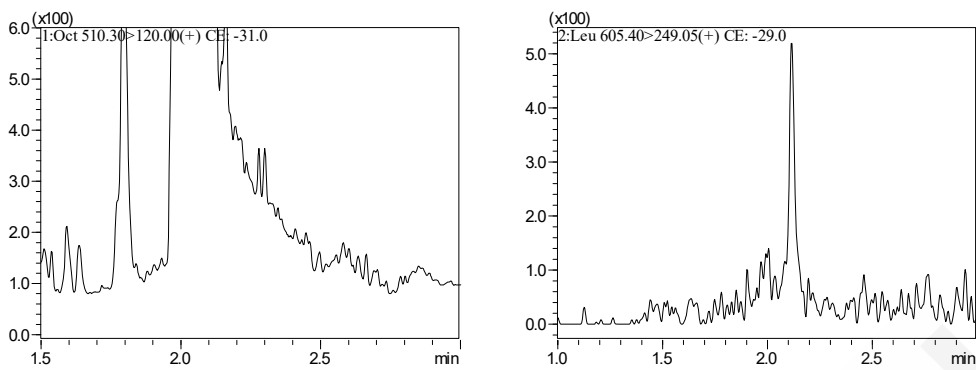


图 6. 空白血浆样品的 MRM 色谱图

由于空白血浆中奥曲肽检测通道中存在较多干扰峰，通过梯度优化获得合适的色谱分离，图 7 为 400 pg/mL 血浆基质中检测到奥曲肽色谱图，图中奥曲肽和干扰峰依然得到很好的分离。

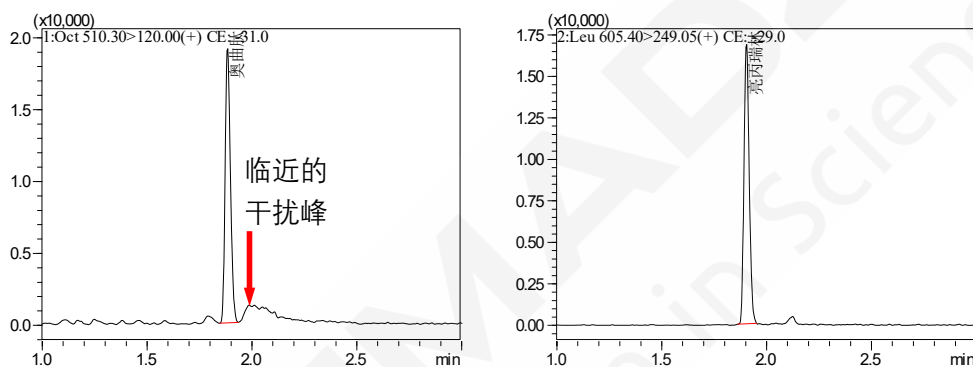


图 7. 400 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

考察内标物亮丙瑞林对奥曲肽测定结果的影响，处理过程加入内标的空白样品（QC0 样品）如图 8 所示，与图 5 5 pg/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图比较，内标物亮丙瑞林不会对奥曲肽的准确测定造成干扰。

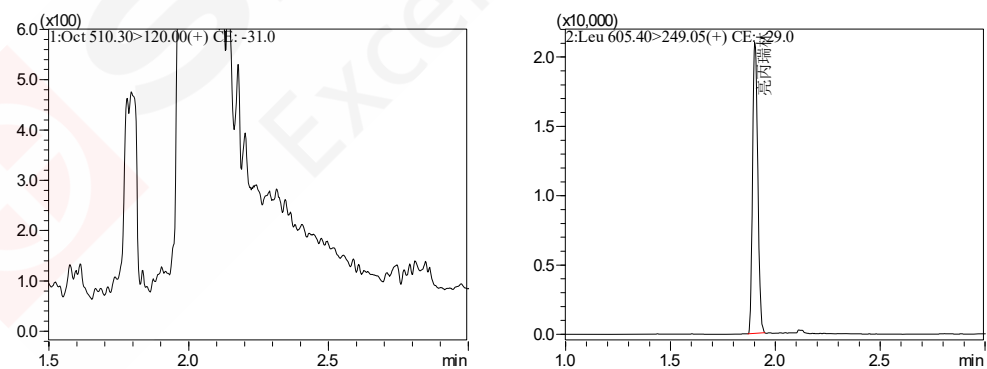


图 8. QC0 的 MRM 色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 5 pg/mL、10 pg/mL、20 pg/mL、40 pg/mL、100 pg/mL、200 pg/mL、400 pg/mL、1000 pg/mL、2000 pg/mL 的血浆加标样品，按 1.5 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，内标法定量。所得校准曲线如图 9 所示，线性

方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表奥曲肽峰面积与亮丙瑞林峰面积的比值，x 值代表血浆中亮丙瑞林浓度。方法定量限确定为 5 pg/mL，在此浓度水平，精密度和准确度均在接受标准内，6 次重复分析 RSD 为 6.22%，准确度为 96.9~111.1%，S/N 平均值为 10.6。

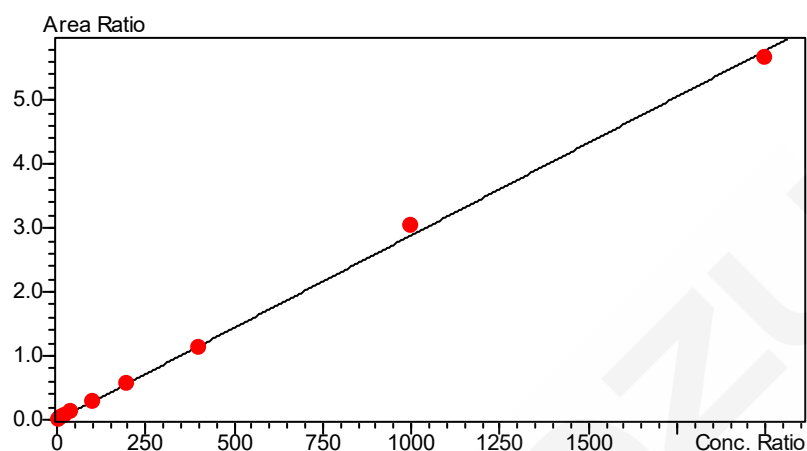


图 9. 奥曲肽标准曲线

表 4. 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

化合物	校准曲线	线性范围 (pg/mL)	准确度(%)	相关系数 r
奥曲肽	$Y = (2.89 \times 10^{-3})X + (-6.34 \times 10^{-3})$	5~2000	89.6~112.3%	0.9993

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度的结果如表 5 所示。方法的日内精密度的 3.30~6.01%，日间精密度的 2.43~6.44%，各浓度水平质控样品的准确度的 86.2~109.7%。

表 5. 方法日内精密度和日间精密度的结果(3 天, 每天重复 6 次)

理论浓度 (pg/mL)	日内精密度的 CV%	日间精密度的 CV%	准确度%
15	6.01	6.44	87.8~109.7
150	4.67	4.25	86.2~99.6
1500	3.30	2.43	87.7~95.4

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 的回收率, 结果如表 6 所示, 各浓度水平奥曲肽的回收率分别为 70.6±7.8%, 71.5±1.8% 和 70.1±1.9%。实验结果表明奥曲肽的各质控浓度回收率一致, CV% 的变化也满足准确度的要求。

表 6. 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度 (pg/mL)	平均回收率%
LQC	15	70.6
MQC	150	71.5
HQC	1500	70.1

2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次), 分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应, 结果见表 7, 各浓度水平基质效应因子均大于 80%, 内标归一化基质效应因子均大于 90%。

表 7. 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	15	82.1%	90.5%
MQC	150	87.6%	96.6%
HQC	1500	89.7%	98.9%
内标基质效应因子		90.7%	

2.7 Carryover 考察

考察系统残留的影响, 完成浓度最高点分析后, 其后分析空白样品中奥曲肽的峰面积, 空白样品中奥曲肽及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰, 色谱图见图 10。

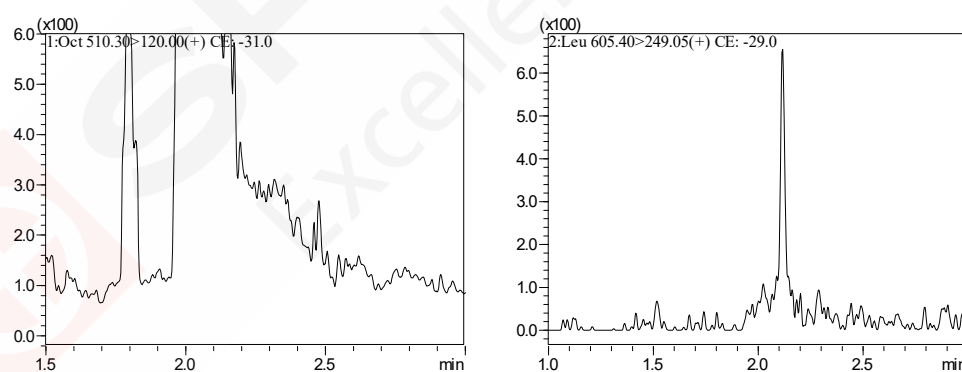


图 10. 高浓度样品后分析空白样品的 MRM 色谱图

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中多肽类药物奥曲肽的方法。该方法在 5.5 min 内完成血浆中奥曲肽的检测，采用亮丙瑞林作为内标定量，方法定量限 5 pg/mL，线性范围为 5~2000 pg/mL，相关系数在 0.9993。方法特异性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质，并且奥曲肽和内标物亮丙瑞林之间无相互干扰。方法的日内精密度 3.30~6.01%，日间精密度 2.43~6.44%，各浓度水平质控样品的准确度 86.2~109.7%，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平奥曲肽回收率大于 70%，基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子大于 90%；高浓度样品分析后考察空白样品中的残留，结果表明在 5~2000 pg/mL 线性范围内无明显系统残留。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中多肽类药物奥曲肽含量的快速准确检测。



SHIMADZU
Excellence in Science

附录：快速索引

多肽类药物研发、制剂和临床阶段所涉及的检测项目

药物研发阶段			
检测项目	使用仪器	岛津应用案例	快速索引
氨基酸构型分析	LC-MSMS	使用超高效液相色谱-质谱法分析缩宫素 D/L 氨基酸构型	P10
氨基酸序列分析	PPSQ	1.应用蛋白测序仪 PPSQ-53A 进行醋酸格拉替雷仿制药与原研药 N 端相对氨基酸水平一致性评价	P38
	MALDI-TOF LC-MS	2.应用蛋白测序仪 PPSQ-53A 测定多黏菌素 B 的氨基酸序列	P42
分子量测定	LC-MS MALDI-TOF	1.MALDI-TOF 分析多肽药物化学合成起始物料分子量	P19
		2.LCMS-2050 在多肽分子量定性分析检测中的应用	P23
		3.台式 MALDI-8030 用于司美格鲁肽的快速合成质控	P27
		4.MALDI-TOF 快速分析聚乙二醇化多肽药物及原料分子量	P31
		5.使用双极性台式 MALDI-TOF MS MALDI-8030 进行合成肽的质量控制	P34
制剂处方阶段			
检测项目	使用仪器	岛津应用案例	快速索引
多肽聚集体分析	LC (SEC) MALDI-TOF Q-TOF	1. 应用台式 MALDI-TOF MS 对注射用胸腺法新进行聚集体分析	P48
		2. 生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法分析多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质	P52
		3. 利用 Q-TOF 定性分析多肽类药物生长抑素中的聚集体	P55
		4. Trap-Free 2DLC Q-TOF 定性分析宫缩抑制剂阿托西班中的多聚体杂质	P62
		5. 生物相容性液相结合尺寸排阻色谱法分析司美格鲁肽制剂中聚集体	P75
制剂中辅料分析	LC	高效液相色谱法测定司美格鲁肽注射液中主成分及抑菌剂的含量	P70
临床前、临床试验			
检测项目	使用仪器	岛津应用案例	快速索引
DMPK 分析	LC-MSMS	1. LC-MS/MS 法测定血浆中利拉鲁肽的浓度	P81
		2. LCMS-8050 测定大鼠血浆中的艾塞那肽	P85
		3. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法测定人血浆中多肽类药物戈舍瑞林含量	P90
		4. 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中多肽类药物奥曲肽	P98

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本公司在此对中国地图标注信息的行为仅限于表明本公司在中国各地分支机构区域分布状况, 不作为任何测绘、绘制或其他用途。

本产品资料所宣传的内容, 以本版本为准, 资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知。

印刷日期: 2024

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
邮政编码: 518040
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI, KOWLOON, HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所
的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。