

MALDI-TOF: 生物药分析的新工具与策略



前言

MALDI-TOF，即基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，是一种软电离生物质谱。在 MALDI-TOF 出现之前，利用质谱进行生物大分子分子量和结构的解析比较困难。上世纪 80 年代，日本岛津公司的资深工程师田中耕一以及德国科学家 Hillenkamp 和 Karas 开发了适合于生物大分子检测的基质，使 MALDI-TOF 质谱法成功检测到生物大分子的分子量。田中耕一因此与电喷雾电离的发明人 John Fenn 共同获得了 2002 年的诺贝尔化学奖，以表彰他们“开发用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”。

当今被广泛应用的 MALDI-TOF 质谱技术实际上是两个核心技术的结合，即基质辅助激光解吸电离与飞行时间质量分析器技术。尽管基质辅助激光解吸电离源还能与四级杆、离子阱等其他离子分离技术相连接，但脉冲式的激光解吸电离方式与飞行时间质谱中采用的脉冲离子提取技术在耦合方面展现出诸多优势，从而催生了 MALDI-TOF 这一卓越的质谱技术。MALDI-TOF 质谱仪的原理为，样品分子与基质分子形成共结晶薄膜，当受到激光照射时，基质吸收激光能量并传递给样品分子，使其瞬间气化并离子化，随后进入飞行管飞行，并到达检测器，根据离子到达检测器的飞行时间不同，可以测定离子的质荷比。在应用方面，MALDI-TOF 既可以用于蛋白质、多肽、核酸、多糖等生物样品的分子量及序列检测，也可以用于聚合物、有机合成材料等非生物样品的质量分析。

生物药领域近年来发展迅速，狭义的生物药指利用生物体、生物组织、细胞及其成分，综合应用化学、生物学和医药学各学科原理和技术方法制得的用于预防、诊断、治疗和康复保健的制品，包括激素、酶、生长因子、疫苗、单克隆抗体、反义寡核苷酸或核酸、细胞治疗或组织工程产品等。生物药物的质量研究主要包括分析方法的开发建立、理化特性分析、生物学活性测定、生产工艺的优化及稳定性评价、残留杂质检测、制剂相关的安全性研究、产品的配方及保存运输条件的确定等几个方面，其中任何环节的疏忽都可能对终产品的安全性和有效性产生影响。通过质量研究可以对产品的性质有更全面的了解，确定产品的关键质量属性，并根据产品本身的变异及检测方法的精密度和稳定性确定相应的质控标准。在生物药物生产质控实验室，MALDI-TOF 由于其前处理简单、分析速度快、质谱图信息直观等优势，被广泛应用于产品及合成原料分子量的快速检测、蛋白质/多肽/寡核苷酸定性分析、辅料质量控制等领域。

本册应用文集收录了 26 篇代表性的 MALDI-TOF 分析生物药样品及辅料的应用数据，供相关用户参考。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

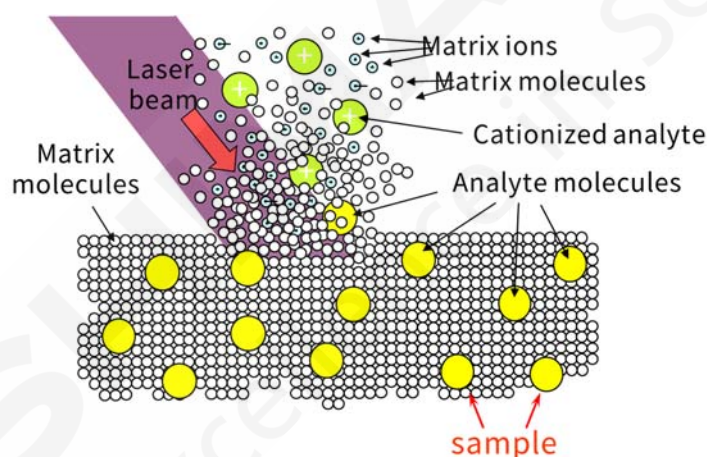
第 1 章 MALDI-TOF 简介	1
第 2 章 MALDI-TOF 生物药分析应用方案	6
2.1 蛋白类药物	7
牛血清白蛋白和抗体分子量检测	8
糖蛋白质分子量检测	10
病毒蛋白类疫苗亚基组成分析	12
重组人粒细胞刺激因子分子量检测	15
使用 MALDI-TOF 的源内裂解 (ISD) 功能分析蛋白质序列	17
基于肽指纹图谱 (PMF) 技术分析蛋白质序列	19
磷酸化蛋白质序列分析及修饰位点检测	22
2.2 多肽类药物	24
司美格鲁肽的合成质控	25
应用 MALDI-8020 和 QC Reporter 软件对合成肽进行质量控制分析	29
多肽药物化学合成起始物料的分子量检测	35
聚乙二醇化多肽药物及原料的分子量检测	37
注射用胸腺法新聚集体分析	40
使用台式 MALDI-TOF 的源内裂解 (ISD) 功能检测甲硫氨酸氧化修饰	43
2.3 核酸类药物	47
寡核苷酸药物的分子量及杂质分析	48
寡核苷酸化学合成原料亚磷酰胺单体的分子量及杂质检测	51
共转录加帽后 mRNA 的帽子端的定性分析	55
mRNA 酶法加帽反应产物的定性分析	57
mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料的分子量及组成分析	60
ASO 药物福米韦生的核苷酸序列分析	63
肽核酸 (PNA) 的分子量检测	65
2.4 药用辅料	67
mRNA 药物递送基质 DMG-PEG2000 的分子量分布及组成分析	68
mRNA 药物递送系统脂质纳米粒的原料分子量检测	71
PEG6000 的分子量及分布分析	74
乙交酯丙交酯共聚物 (PLGA) 的分子量及分布检测	76
多西他赛注射剂中吐温 80 的分子量及分布检测	79
注射剂中辅料吐温 80 的降解评价	82
附录 分析应用案例快速索引	85

第 1 章 MALDI-TOF 简介

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 自20世纪80年代后期提出,如今已经30余年。从那时起,通过应用这一“软电离”技术与飞行时间质谱的结合,成功地实现了生物大分子的快速和高度可靠检测,同时也为生命科学领域提供了全新的分析方法。相比其它质谱技术, MALDI-TOF操作简便,不需要接受专业的分析化学培训就可以使用。2002年, 岛津制作所的田中耕一先生与电喷雾电离法的发明人John Fenn博士共同获得了诺贝尔化学奖,奖励他们“开发了用于生物大分子质谱分析的软电离方法”。

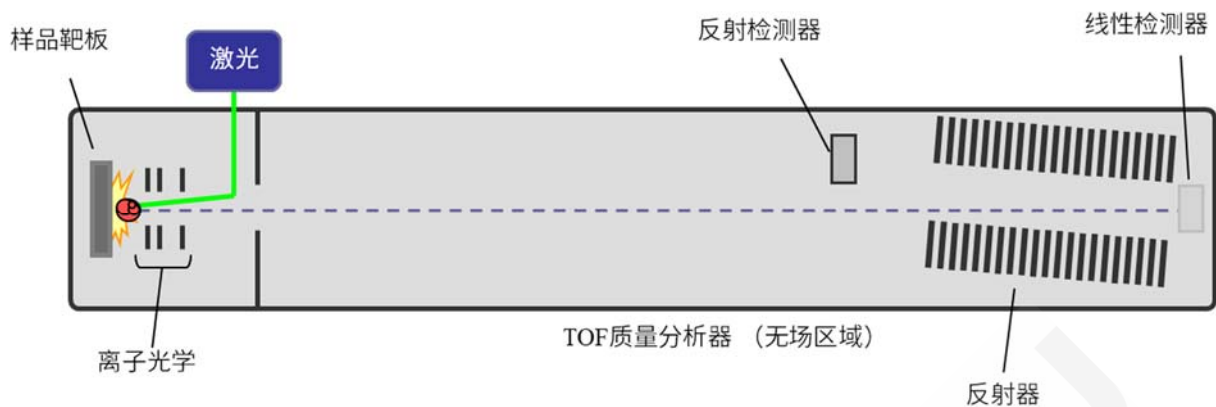
1.1 MALDI-TOF的原理及特点

MALDI全称为基质辅助激光解吸电离 (Matrix-assisted laser desorption/ionization), 在离子化过程中, 基质发挥了关键作用。首先, 基质与样品均匀混合在一起, 形成一层共结晶薄膜, 基质分子的数量一般远远大于样品分子的数量, 基质分子可以将样品分子隔开并包裹住。当激光照射时, 基质吸收激光能量, 避免了能量对样品分子结构的破坏, 同时在激光照射的瞬间提供卷流及反应离子, 使样品分子气化并带上电荷, 在电场的作用下进入飞行管飞行。在进入飞行管以后, 离子的质荷比与飞行时间的平方成正比, 不同大小的离子根据飞行时间不同依次被检测器检测到, 生成质谱图。



MALDI 离子化示意图

在样品分子离子化过程中, 相同质量的离子受离子化时空间分散、时间分散、能量分散等的影响, 使其初始动能有一定差异, 不能同一时间到达检测器, 致使质量分辨率不佳。为了改善分辨率, 离子延迟引出 (Delay Extraction) 技术被引入到MALDI-TOF质谱仪中, 通过补偿离子的初始动能分散, 显著提高了线性MALDI-TOF质谱仪的分辨率。MALDI-TOF改善分辨率的另一技术是引入反射器, 通过不同动能的离子飞入反射器的深度不同以及增加离子的飞行距离, 大大提高了质谱仪的分辨率。因此, MALDI-TOF的分析模式包括线性模式与反射模式两种, 线性模式下离子飞行时没有经过反射器。配备反射器的质谱仪一般体积较大, 价格昂贵。随着技术的发展, 越来越多更高分辨率的质谱仪被开发出来。



MALDI-TOF 结构示意图

作为一种软电离技术，MALDI-TOF可以直接获取样品分子量信息。与其他质谱技术相比，MALDI-TOF分析样品的特点包括：1) 质谱图上以单电荷峰为主，图谱简单，易于解析；2) 分析质量范围宽，从几十到几十万道尔顿都可以分析。配备大分子量检测器，最高可以检测150 kDa的大分子；3) 前处理简单，能容忍少量盐、缓冲剂和其他难挥发成分，降低了样品前处理的要求，且无需分离；4) 适用样品种类范围广，样品消耗量少，对样品溶解性要求低，既可以分析水溶、脂溶性样品，又能分析固体、混悬液等样品，适用多种溶剂；5) 分析速度快，几秒到几十秒即可完成样品质谱图采集，可以进行高通量快速检测；6) 分析成本低（几乎无耗材），日常维护及使用简单，易于操作。

1.2 MALDI-TOF的分析流程和常用基质

MALDI-TOF的分析流程包括：准备样品，吸取0.5-1 μL 样品溶液和基质溶液依次点在靶板的靶点上，自然干燥，将靶板送入仪器进行质谱采集和分析。点样时，也可以将样品、基质溶液、辅助盐溶液（如果需要）按照一定比例混合后取1 μL 点在靶板上。对某些样品而言，如高分子量聚乙二醇，混合后点样有可能取得更好的离子化效果。



靶板

干燥后送入质谱



MALDI-8020

样品靶板及仪器样品室

针对不同的样品类型，选择适合的基质非常重要。实验室可以用于辅助样品离子化的基质种类非常多，文献报道过的基质可能有上百种之多，研究者也可以根据关注的化合物的性质开发专用的基质。在众多基质中，实验室使用频率较高的基质有CHCA, DHB, SA, 3-HPA, 葱三酚、DCTB等。基质的选择一般遵循“相似相容”原则，通常选择与待测样品极性相似、溶解度相近的基质，这样可以使样品与基质形成良好的共结晶。除了基质外，有时还需要添加盐离子辅助试剂，如Na、K、Ag、Li等，帮助样品更好地离子化。聚合物样品基质的选择可以参考网站<https://maldi.nist.gov/>进行查询。不同类型样品常用的基质种类如下：

多肽: CHCA
 蛋白: SA、super-DHB、HABA
 核酸: 3-HPA、THAP
 脂质: DHB、CHCA、9-AA、DHAP、1,5-DAN、DPH、DMAN等
 多糖: DCTB、DHB、DHAP等
 聚合物: 葱三酚、DCTB、DHAP、CHCA、DHB、IAA、SA、TCNQ等
 有机小分子: CHCA、DHB、DCTB、DHAP、葱三酚、IAA、9-AA等
 金属团簇: DCTB

各类型样品常用基质

1.3 岛津MALDI-TOF产品

岛津公司目前拥有 AXIMA 系列 Assurance、Confidence、Performance，以及台式机系列 EasyCare-ready MALDI-8020、EasyCare-ready MALDI-8030、MALDI-8020 EasyCare、MALDI-8030 EasyCare、OmegaTOF 等多款 MALDI-TOF 仪器，满足不同用户多元化需求。



岛津 MALDI-TOF 机种

本文集中应用开发主要涉及台式机 MALDI-TOF。台式机 MALDI-8020/8030 系列产品作为线性 MALDI-TOF 质谱仪，兼具卓越的性能与小巧的体积，是当今对仪器要求日益严苛的实验室的理想选择。具体产品特点见下表。

表1 MALDI-8020/8030系列产品特点

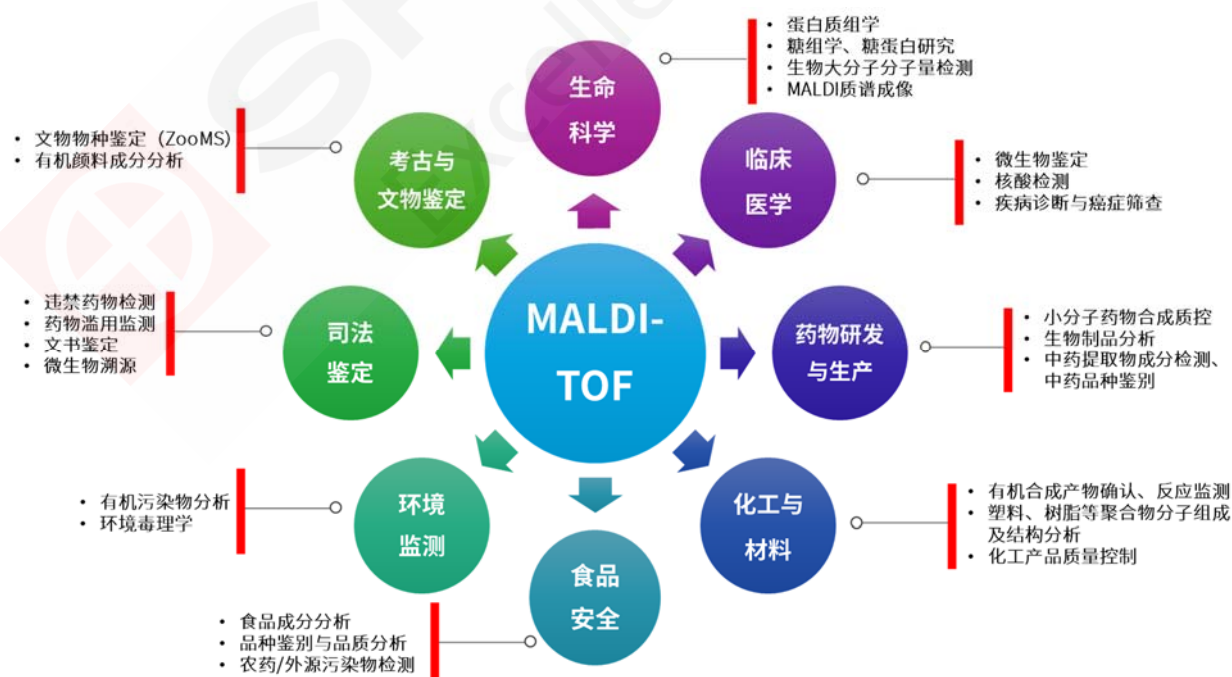
No.	部件或功能	特点
1	台式机	体积紧凑，占位面积小，450×745×1055mm，86kg
2	双极性离子源 (8030)	MALDI-8020 为正离子模式，MALDI-8030 具有正负两种离子模式，可以在正离子和负离子模式下分析样品。 质量范围广，可以分析 m/z 1-500,000 范围内从小分子到高质量抗体的样品
3	固态激光器	355 nm，最高 200 Hz，轰击次数 2×10^9
4	加载锁定室	快速进样，通过负载锁定样品室，卸载/加载样品进行分析 < 3 分钟
5	无油隔膜泵	避免传统油泵的噪音及更换泵油，噪音低至 55 分贝以下
6	离子源自动清洗	基于紫外激光器的源清洁功能（专利技术），8 分钟即可完成自动清洗

7	WideBore™ 离子光学技术	专利技术使用 MALDI 激光束的近法线（同轴）入射和宽孔口，以从离子光学器件中产生出色的效率和性能（灵敏度和分辨率），减少解吸 MALDI 样品对离子光学器件的污染
8	软件合规	MALDI Solutions™软件，具有审计追踪等功能，保证数据的完整性和安全性，符合 21 CFR part 11 法规要求

岛津 2024 年新发布的 MALDI-8020/8030 EasyCare 另外还支持用户进行自动调谐及手动清洗离子源，减少工程师上门维护成本，提高生产效率。岛津 OmegaTOF 搭配大分子检测器，质量范围最高测定 150 万 Da，使大蛋白、抗体多聚体的检测成为可能，满足生物药用户大分子蛋白分析的需要。

1.4 MALDI-TOF 的应用

MALDI-TOF 质谱仪经过持续的技术创新和发展，广泛应用于蛋白质、多肽、寡核苷酸、多糖等生物样本以及有机合成分子、聚合物、材料等生物样本的分子量检测及定量分析，极大推动了科学技术的发展，它在生命科学、临床医学、医药研发与生产、化工与材料、食品安全、环境监测、法医鉴定、考古与文物鉴定等多个领域展现了巨大的应用潜力。例如，在临床领域，MALDI-TOF 是应用最成功的质谱仪之一，它在微生物鉴定、核酸检测中应用广泛，在疾病诊断与癌症筛查中也展现出巨大的潜力和价值。在医药领域，从新药筛选到最终产品的质量控制，MALDI-TOF 都是不可或缺的工具。它可以用于小分子药物的快速确认，确保药物的一致性。对于多肽、蛋白、寡核苷酸等复杂生物制品，MALDI-TOF 提供了高效的原料质量控制手段，同时也可用于成品的快速分子量测定和序列分析，保证产品质量。在生命科学领域，MALDI-TOF 技术可以用于蛋白质组学、糖组学研究，也可以通过分子质谱成像技术揭示生物体中各种内源性代谢物及外源性药物在生物组织内的空间分布信息。在化工及材料领域，MALDI-TOF 无样品溶解性要求，使其适用于广泛的化学物质分析，包括凡士林、沥青、胭脂虫红染料等天然提取物，以及塑料、树脂、钛菁颜料等有机合成材料。MALDI-TOF 能够迅速揭示样品的分子组成并对其结构特征进行描述，这对于新材料的设计和改性具有重要意义。MALDI-TOF 在各领域的应用见下图。根据检测的样品类型及应用场景，MALDI-TOF 的常见应用见表 2。



MALDI-TOF 的应用领域

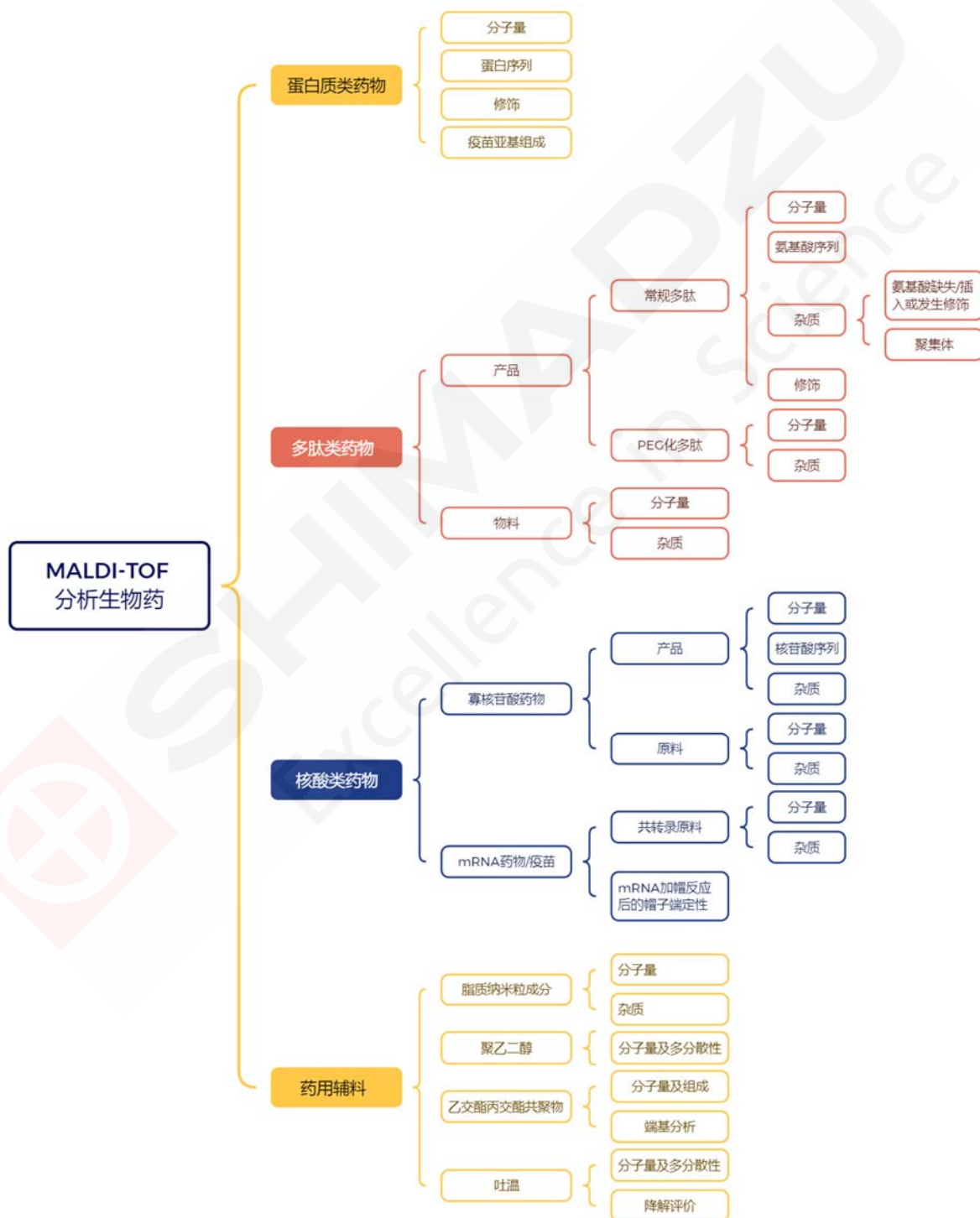
表2 MALDI-TOF应用方向

No.	应用领域	详细描述
1	蛋白质检测	蛋白质分子量检测、氨基酸序列分析/蛋白质种类鉴定、修饰位点确认及修饰类型检测、疫苗亚基分析。
2	多肽分析	多肽的分子量检测、杂质分析、氨基酸序列分析、修饰种类及修饰位点检测、多肽化学合成物料质控。
3	核酸检测	寡核苷酸分子量确认、序列解析、杂质检测、合成原料质控、单核苷酸位点检测(SNP)。
4	多糖分析	多糖修饰位点检测、糖型分析、多糖分子量检测等。
5	聚合物	选择合适的聚合物样品溶剂、基质、阳离子化试剂,采集质谱数据,导入聚合物分析软件(Polymerix),快速得到聚合物的平均分子量及分布、单体质量、聚合度等信息。
6	微生物鉴定	对微生物中的核糖体蛋白分子量进行快速测定,与数据库中的标准谱图进行匹配检索,给出精确到种的鉴定结果,主要用于致病菌的快速鉴定。
7	有机合成确认	对有机合成的小、中、大分子进行合成产物及原料的确认、有机合成反应监控。
8	分子质谱成像	通过二维切片样本的质谱采集结合数据软件分析,获得生物组织各种内源性代谢物及外源性药物成分的空间分布信息以及非生物样本内有机分子的空间分布情况。
9	拓展应用	食用油蜂蜜/牛奶品种鉴别、疾病诊断、癌症筛查、动物毛发纤维定性定量检测等。

无论是基础科学研究还是实际应用层面, MALDI-TOF质谱技术都展现出了其独特的优势和广泛的应用价值。随着技术的不断进步,我们可以预见, MALDI-TOF将在更多领域发挥更大的作用,为科学研究和社会发展带来新的突破。

第 2 章 MALDI-TOF 生物药分析应用方案

生物技术药物（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）。本章将根据生物药的类别，从蛋白质药物、多肽药物、核酸药物、辅料等方面一一展示相应的应用方案。



MALDI-TOF 生物药分析速览

2.1 蛋白类药物

蛋白质是由氨基酸以“脱水缩合”的方式组成的多肽链经过盘曲折叠形成的具有一定空间结构的物质。蛋白质是构成人体组织器官的支架和主要物质，在人体生命活动中起着重要作用，没有蛋白质就没有生命活动的存在。蛋白质类药物是以蛋白质为基础的治疗药物，包括动物、植物来源和应用生物技术研究开发的具有一定生物活性，用于防治和诊断人类、动物和植物疾病的蛋白质产品。常见的蛋白质类药物包括抗体药物、血液制品、疫苗、重组蛋白药物（利用重组DNA技术生产的蛋白质药物）、融合蛋白药物、细胞因子等。与以往的小分子药物相比，蛋白质药物具有高活性、特异性强、低毒性、生物功能明确、有利于临床应用的特点。

蛋白类药物的制备方法包括从动物、植物、微生物等生物体中提取分离、化学合成法以及基因工程法。药物的生产涉及诸多生物学过程，如发酵、细胞培养、目的产物的分离纯化等，在这些生产过程中，目标产品容易受到各种生物或理化条件等的影响，因此质量控制标准与检测方法在生物技术药物研发中占有举足轻重的位置。基于质量源于设计（QbD）的理念，在蛋白质类药物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。在产品质量研究与控制方面，完整蛋白分子量的检测、疫苗亚基分子量、氨基酸序列分析、杂质分析、糖型分析是重要的研究内容。

常见蛋白质分子量测定的方法有粘度法、凝胶过滤层析法、凝胶渗透色谱法、SDS-PAGE凝胶电泳、质谱法（LC-MS、MALDI-TOF）等，MALDI-TOF MS检测蛋白分子量比其他方法更快捷方便，通常几十秒到几分钟即可给出质谱图。在蛋白质氨基酸序列分析及修饰位点检测方面，基于Q-TOF、Orbitrap等高分辨质谱仪的LC-MS/MS技术应用广泛，MALDI-TOF MS因无需液相分离、操作简便等特点，亦可以用于蛋白质序列解析及修饰位点分析，是LC-MS/MS技术的补充。本节介绍了应用MALDI-TOF MS分析蛋白质分子量、氨基酸序列分析、修饰位点检测的应用例子。

牛血清白蛋白和抗体分子量检测

MALDI-TOF MS在蛋白质检测中的适用性在生命科学领域得到了广泛的认可。在这一领域，SDS-PAGE和尺寸排除色谱法一直被使用，然而，它们存在诸如耗时或在分子量测定中缺乏准确性等缺点。MALDI-TOF MS可提供更准确的分子量信息，已成为分析蛋白质一级结构的强大工具。另外，近年来人们经常需要在飞摩尔和亚飞摩尔级别上对蛋白质进行分析，因此对MALDI-TOF MS的灵敏度检测寄予较高的期望。

MALDI-TOF MS能检测的质量范围原理上是无限广的，并且实际应用中也是从低分子量到抗体等高分子量都能覆盖。单克隆抗体（参见图1）应用于诊断和治疗，在其开发和质量控制过程中采用快速可靠的分析方法是非常重要的。

台式MALDI-TOF MS（MALDI-8020）拥有卓越的性能，使用这台仪器能够高通量，高灵敏地检测出蛋白质。

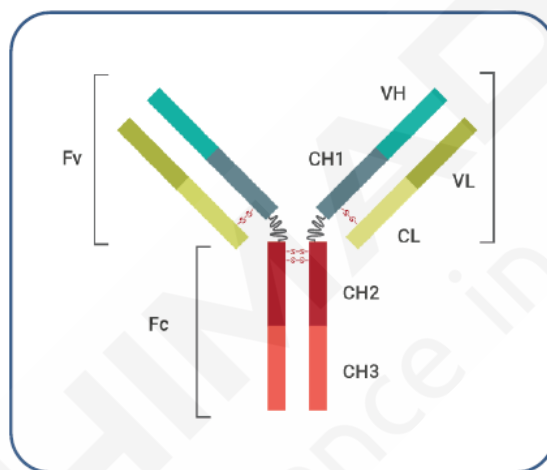


图1 抗体的结构

1. 样品制备和检测条件

牛血清白蛋白 (BSA) 和免疫球蛋白A (IgA) 是从Sigma-Aldrich购买的，分别以500 fmol/ μ L和20 pmol/ μ L的浓度溶解。得到的样品溶液与MALDI基质（芥子酸，20 mg/mL，1:1乙腈/0.1%三氟乙酸水溶液）混合后进行了分析。

数据是以本仪器最大激光速度（200 Hz）和线性模式（正离子）下采集的。设定50 shots/profile，累积计算200 profiles，取其平均值作为一个质谱图。

2. 分析结果

图2为BSA完整蛋白的质谱图，充分显示了MALDI-8020的灵敏度。图中可观察到一价（约66 kDa），二价（约33 kDa），三价（约22 kDa）的离子，信噪比良好，其分辨率与普通的MALDI-TOF的线性模式相比毫不逊色。

图3显示IgA完整蛋白的质谱图，从中可观察到预计约160 kDa的一价离子与二价离子（约80 kDa）。另外，在54 kDa左右检测到的信号与重链分子量是一致的（预计约55 kDa）。

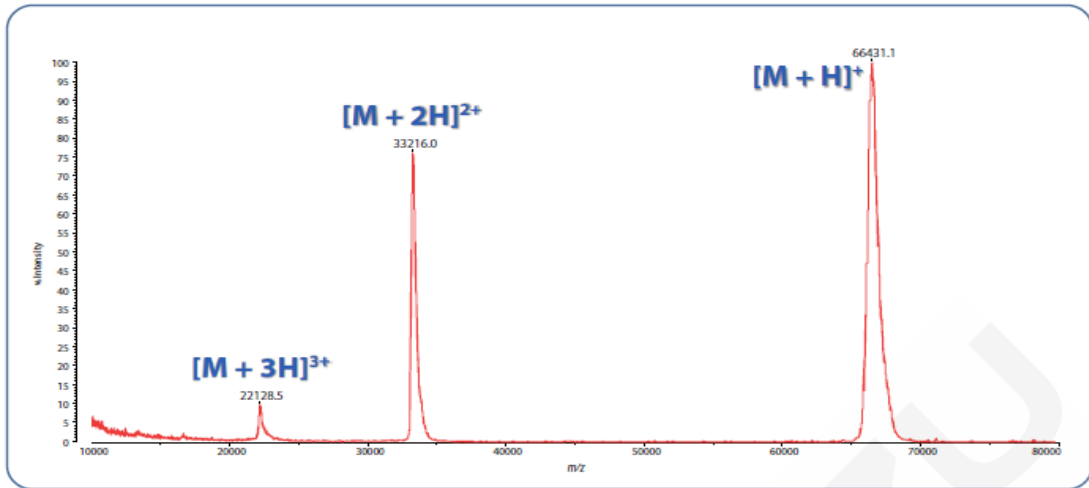


图 2 BSA 完整蛋白的质谱图 (500 fmol/ μ L, 250 fmol on-target)

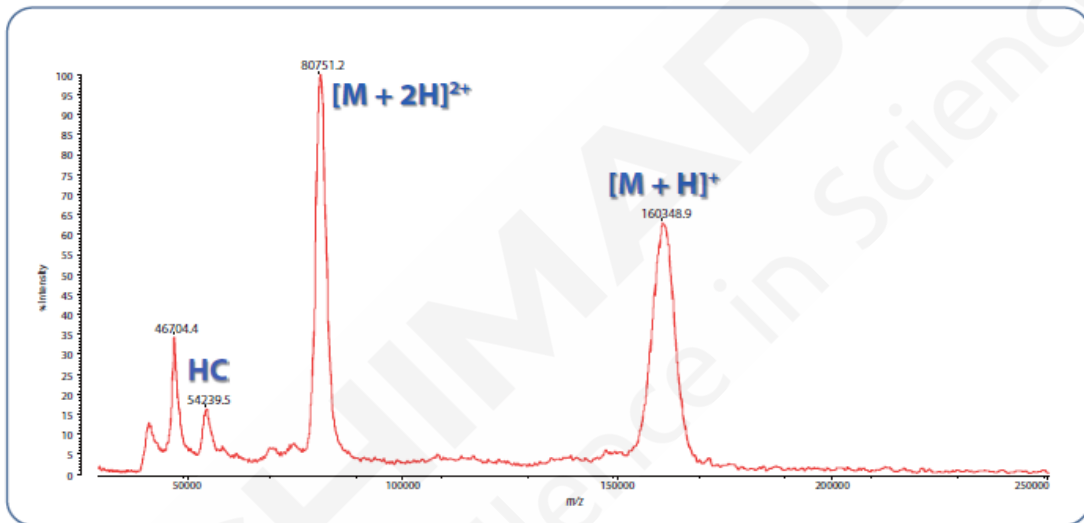


图 3 IgA 完整蛋白的质谱图 (20 pmol/ μ L, 10 pmol on-target) HC=heavy chain

糖蛋白质分子量检测

MALDI-TOF质谱分析法具有高通量和高灵敏度，与LCMS法一样在众多领域中得到广泛应用。特别是近年来越来越多地应用于合成化合物和高分子量化合物的分子量检测和结构分析。这是由于此类质谱仪具有容易生成一价离子、便于确认分子量、可检测的质量范围广、样品干燥后进行检测故而可选择的溶剂种类多等优点。

此外，由于近几年社会形势的变化，无论是政府、大学还是民营企业，都强烈希望此类设备在引进和运行方面都降低成本。台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020正是一款可充分满足这一市场需求的新产品。值得关注的一点是，本产品有一个较短的飞行管，虽然比传统机型尺寸小，但仍保留同等以上的性能。

用MALDI-TOF质量仪测定翻译后修饰蛋白质的分子量，属于生物化学和分子生物学等领域最基本的应用之一。特别是糖蛋白分子量，由于糖链结构不同而产生的不均一性，导致糖蛋白分子量为多分子量群分布。

本文介绍了应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020，检测糖蛋白分子量的实例。

1. 台式MALDI-TOF MS MALDI-8020

MALDI-8020（图1）虽然是一款拥有目前世界最小尺寸和安装面积的线性MALDI-TOF MS，但其线性检测模式（正离子）的性能与传统机型该模式的性能是相同的。通过采用200 Hz固态激光器以及在保持检测部位真空度的情况下更换样品靶板（加载锁定室），可进行快速检测。



图1 台式 MALDI-8020

2. 糖蛋白质的分子量测定

核糖核酸酶B的氨基酸序列如图2所示。已知这种蛋白质通过高甘露糖型的N型糖链修饰后，可以在主要成分中检测出比原蛋白质分子量高约1217 Da的修饰体。将5 pmol的牛来源核糖核酸酶B与阿魏酸（10 mg/mL、50%乙腈/0.1%甲酸水溶液）混合，通过MALDI-8020线性模式测定的结果如图3所示。在 m/z 14890处检测到核糖核酸酶B的单电荷离子，这与理论值（14899.3）一致。此外，糖链不均一性分布也通过hexose的质量差异（理论值162）检测到。

综上所述，MALDI-8020线性模式的分辨率、质量精度等不逊色于传统MALDI-TOF MS的相同模式。

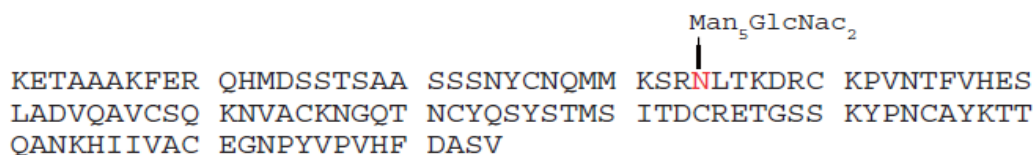


图 2 核糖核酸酶 B 的氨基酸序列和糖链修饰

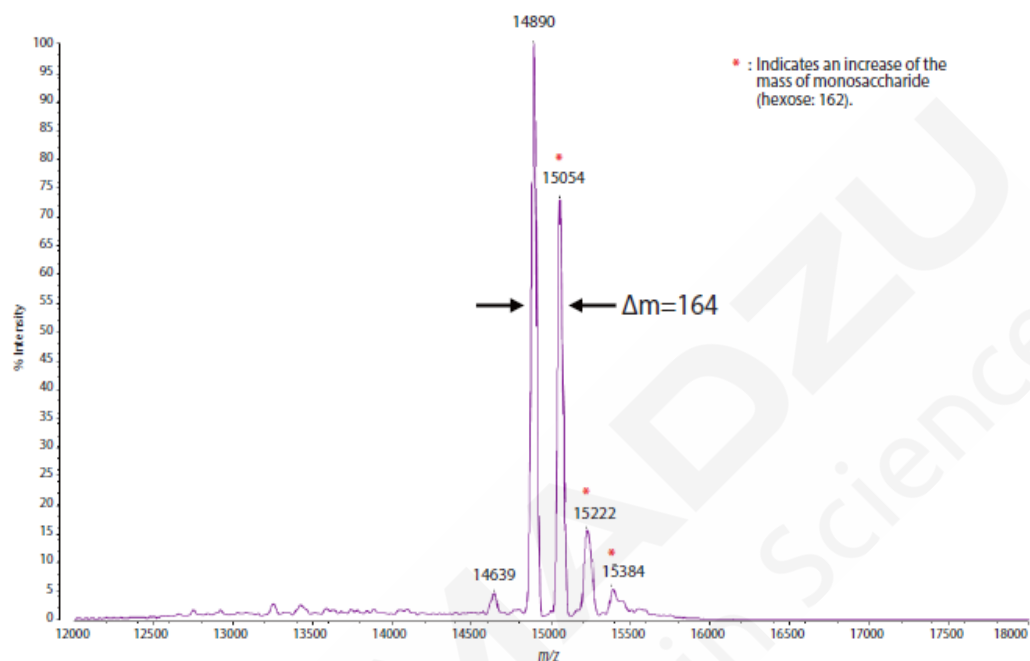


图 3 核糖核酸酶 B 的质谱图

3. 总结

台式MALDI-TOF MS MALDI-8020与大型MALDI-TOF MS一样，能检测糖蛋白质的分子量和不均一的糖链修饰分布。

近年来，MALDI-TOF MS的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此对于大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常被过度指定。而且产品尺寸和初始/运行成本也构成了引进这些仪器的一个很大的障碍。

MALDI-8020是世界上最小的线性MALDI-TOF MS，可满足线性模式下蛋白质分析的需求，并有望在这个领域中广泛应用。

病毒蛋白类疫苗亚基组成分析

摘要：本文应用岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪（MALDI-TOF）检测疫苗蛋白组分，检测各亚基的分子量信息、分布与比例。结果显示标准品具有完整亚基组成，疫苗样品也具有较好的亚基完整性。该结果与疫苗样品的活性结果匹配。本例表明此方法无需样品前处理、快速简便、可靠性强，可为疫苗亚基组成分析提供有力参考。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF） 疫苗 亚基

接种疫苗可以预防许多流行疾病的发生，是保护婴幼儿、年老体弱者免于病痛的重要手段。蛋白类疫苗是品种最多，接种率最高的疫苗品种，据2016年统计数据显示，病毒和蛋白类疫苗占全球疫苗销量48.9%。亚基是病毒和蛋白类疫苗的微小结构单元，这些亚基按照一定的比例与构象结合形成完整的蛋白，蛋白与核酸结合形成病毒，成为具有免疫活性的疫苗成分（图1）。因此，疫苗蛋白质各亚基的组分完整性与含量是衡量疫苗免疫能力的重要指标。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF）是一种软电离方式，适合蛋白质等大分子的离子化，且具有分析质量范围宽、数据精确、通量高、速度快的优势，可以填补LCMS/MS的空白，对疫苗内生物活性大分子成分进行精确地定性分析。

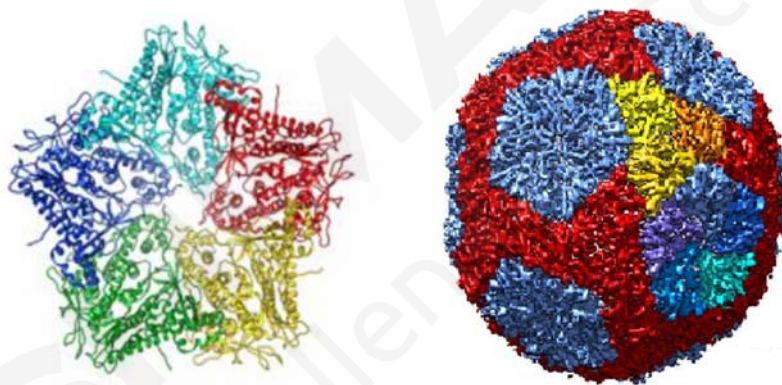


图1 亚基、蛋白与病毒（图片来自网络）。以某病毒为例，不同颜色代表的各亚基以一定比例与构象结合形成蛋白质（左）；蛋白质排列并结合核酸最终形成完整病毒（右）。

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MALDI-8020, AXIMA-Performance

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 5000-30000

激光能量：130

1.3 试剂和样品

基质：芥子酸（SA）

样品：疫苗标准品与样品

1.4 样品前处理

取0.5 μL 样品与0.5 μL SA基质（浓度为20 mg/mL），按照“三明治”法点靶（点靶顺序为：基质-样品-基质），自然干燥后将靶板放入质谱进行分析。

2 结果讨论

2.1 疫苗标准品测试

疫苗质谱检测结果如图2-4所示，显示检测到了标准品中所有亚基，其中A与B亚基的信号峰强度接近2:1，C与D亚基的信号峰强度接近1:1。检测到的分子量精确，与理论相符，质谱图信噪比良好。

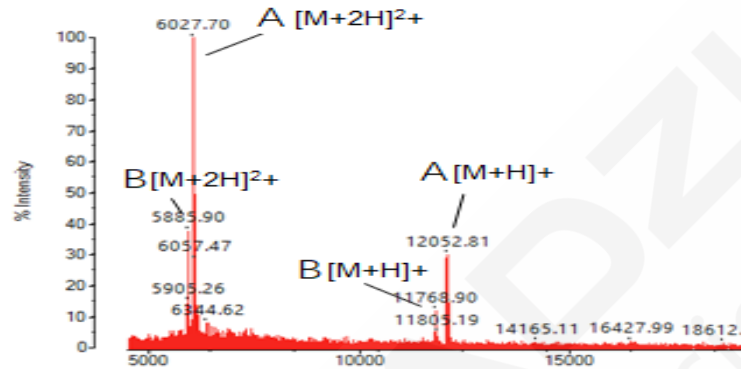


图 2 MALDI-TOF 检测标准品 A、B 亚基的一级质谱图

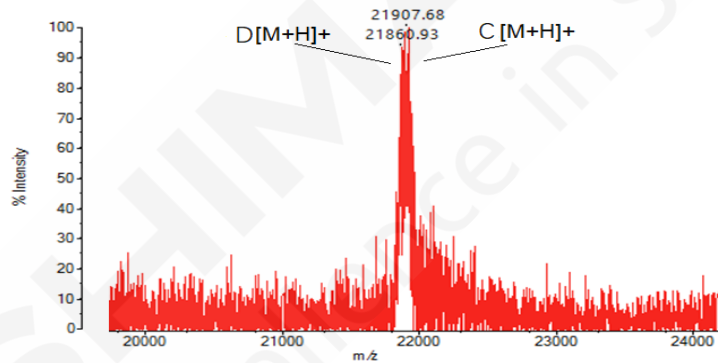


图 3 MALDI-TOF 检测标准品 C、D 亚基的一级质谱图

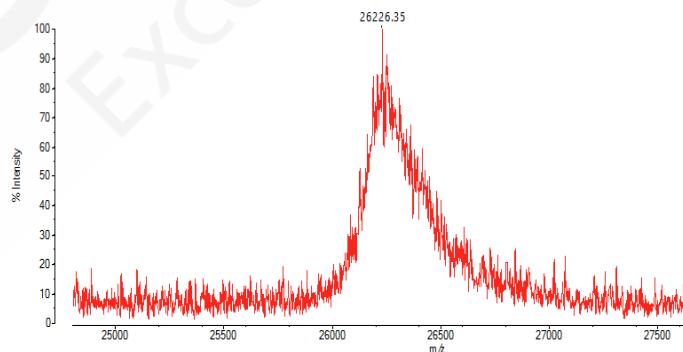


图 4 MALDI-TOF 检测标准品 E 亚基的一级质谱图

2.2 疫苗样品测试

将优化所得的MALDI-TOF方法用于疫苗样品亚基的测定（典型谱图如图5-7），结果显示疫苗样品具有较好的亚基完整性。各亚基全部检测到，其中A与B亚基的信号峰强度接近2:1，C与D亚基的信号峰强度接近1:1。该结果与疫苗样品的活性结果匹配。

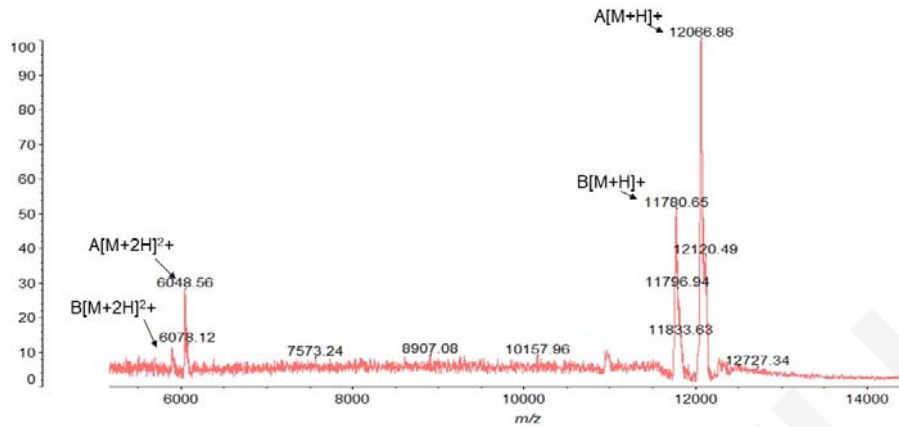


图 5 MALDI-TOF 检测样品 A, B 亚基的一级质谱图

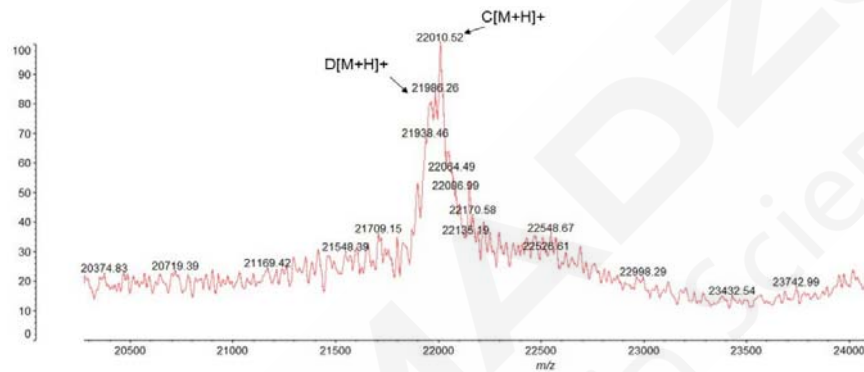


图 6 MALDI-TOF 检测样品 C, D 亚基的一级质谱图

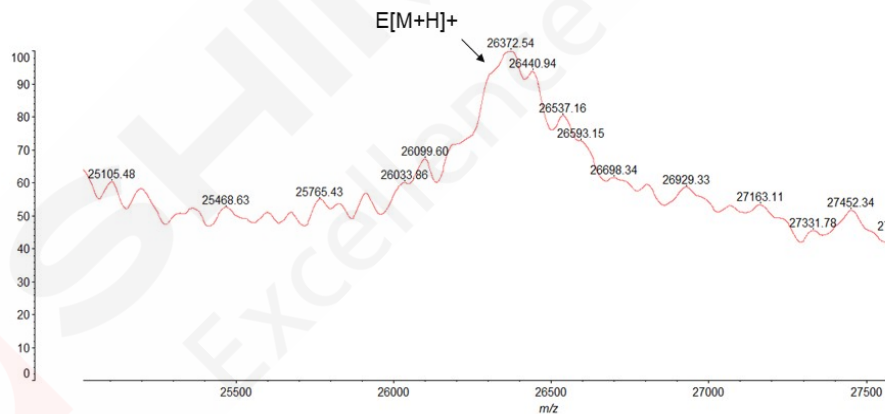


图 7 MALDI-TOF 检测样品 E 亚基的一级质谱图

检测结果表明，利用MALDI-TOF检测到了该疫苗的所有亚基，得到了样品单电荷离子、二电荷离子的分子量信息，结果与理论一致。

3 结论

本文应用岛津基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测疫苗各亚基存在分布与比例，直接得到了样品单电荷离子、二电荷离子的分子量信息，结果与理论一致。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，分析速度快、仪器维护方便、性能卓越，是蛋白类疫苗亚基分析的有力工具。

重组人粒细胞刺激因子分子量检测

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仪 MALDI-8020，在线性正离子模式下，以芥子酸 (SA) 为基质，分析蛋白质类药物重组人粒细胞刺激因子的分子量，不仅得到了精确的分子量信息，还观察到了不同电荷离子及蛋白质多聚体的存在和分布。本例可为蛋白质类药物分子量及分布分析提供参考。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 蛋白质类药物 重组人粒细胞刺激因子

重组人粒细胞因子注射液用于预防和治疗癌症化疗等原因导致的中性粒细胞减少症，促进中性粒细胞数量的增加。作为直接注射给药的基因工程药物，药品的分子量及分布为其纯度和物理化学性质的质控依据，对药品质量及安全性的判定尤为重要。MALDI-TOF MS因其分析通量高、速度快、样品用量少、分析的质量范围宽（原理上无上限）、提供的分子量准确，在蛋白质分子量分析方面应用广泛。

本文以SA（芥子酸）为基质，应用体积紧凑小巧的台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪MALDI-8020分析重组人粒细胞刺激因子，直接得到了样品带不同电荷离子和蛋白质多聚体的分子量和分布信息，展示了MALDI-8020的卓越性能。

1. 实验部分

1.1 仪器

MALDI-8020台式飞行时间质谱仪

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 2000-60000

激光器：355 nm 固态激光器

激光能量：120

1.3 试剂和样品

基质：芥子酸 (SA)

样品：重组人粒细胞刺激因子注射液原液

1.4 样品前处理

取0.5 μL样品与0.5 μL SA基质（浓度为20 mg/mL），按照“三明治”法点靶（点靶顺序为：基质-样品-基质），自然干燥后将靶板放入质谱进行分析。

2. 结果讨论

重组人粒细胞刺激因子注射液原液的质谱检测结果如图1所示。从结果来看，样品不仅检测到单电荷（约18.8 kDa）、二电荷（约9.4 kDa）、三电荷（约6.27 kDa）的离子，还可以观察到蛋白质二聚体（约37.6 kDa）和三聚体（约56.4 kDa）的信号峰。样品检测到的分子量精确，与理论相符，质谱图信噪比良好。

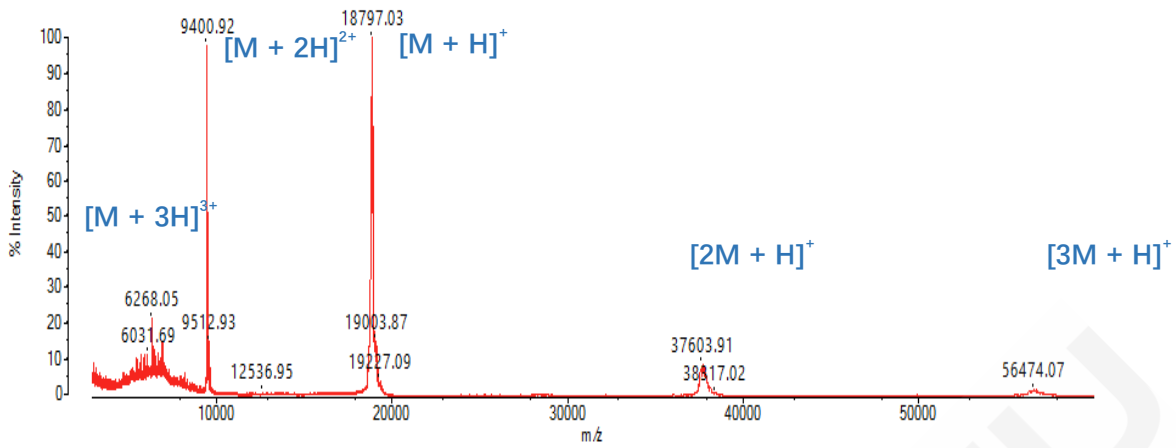


图 2 重组人粒细胞刺激因子注射液原液的一级质谱图

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 MALDI-8020 检测蛋白质类药物重组人粒细胞刺激因子注射液原液的蛋白质分子量，直接得到了样品单电荷离子、二电荷离子、三电荷离子、蛋白质二聚体和三聚体的分子量信息，结果与理论一致。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱，体积小、分析速度快、仪器维护方便、软件满足 21 CFR Part11 合规性，性能卓越，是蛋白质类药物分子量分析的有力工具。

使用 MALDI-TOF 的源内裂解 (ISD) 功能分析蛋白质序列

MALDI-TOF质谱仪被广泛用于蛋白质的分子量测定和结构鉴定。通常使用质谱仪鉴定蛋白质，需进行胰蛋白酶酶解作为预处理，但若蛋白质已经分离提纯，则无需进行胰蛋白酶酶解，可直接通过离子的源内裂解 (ISD, In-Source Decay) 来检测，由此进行完整蛋白质的序列分析。

通过MALDI来测定蛋白质的分子量时，通常会使用芥子酸作为基质，但通过ISD进行序列分析时，会使用1,5-二氨基萘 (DAN) 作为基质。ISD产生的碎片离子可通过Mascot等数据库检索来进行蛋白质鉴定。此外，还可通过对碎片离子质量所获得的氨基酸序列信息进行同源性搜索，从而推测出在数据库中没有鉴定到的蛋白质。

本文将介绍使用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020进行的蛋白质分子量的测定以及通过ISD进行的序列分析。

1. 台式MALDI-TOF MS “MALDI-8020”

MALDI-8020是一款体积小，占地少的线性MALDI-TOF MS，在线性模式（正离子）下与传统的MALDI-TOF MS具有同等性能。该质谱仪配备了200 Hz的固态激光器和一个负载锁定室，在保持真空度的状态下更换靶板，实现了迅速的检测。

2. 蛋白质分子量测定

将250 fmol (约17 ng) 的牛血清白蛋白 (BSA) 与芥子酸 (10 mg/mL、50 %乙腈水溶液/0.1%三氟乙酸水溶液) 混合，通过MALDI-8020的线性模式进行检测。如图1所示，在m/z 66430处检测出S/N大于100的BSA的单价离子峰。

正如该检测例子所示，线性模式的灵敏度、质量精度、分辨率等与传统的MALDI-TOF MS相同模式比较也并无太大差异。

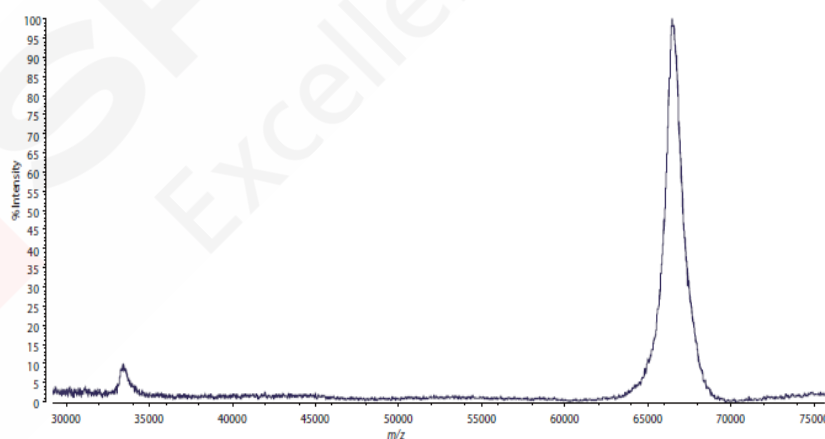


图1 微量蛋白质 (牛血清白蛋白) 的质谱图

3. 基于ISD的蛋白质序列分析

将5 pmol的BSA与1,5-DAN (10 mg/mL、50 %乙腈水溶液/0.1%三氟乙酸水溶液) 混合，在MALDI-8020的线性模式下进行检测。如图2所示，检测出了由ISD产生的BSA的N末端碎片离子—c系列离子c9~c44 (c34、c39、c42除外)。

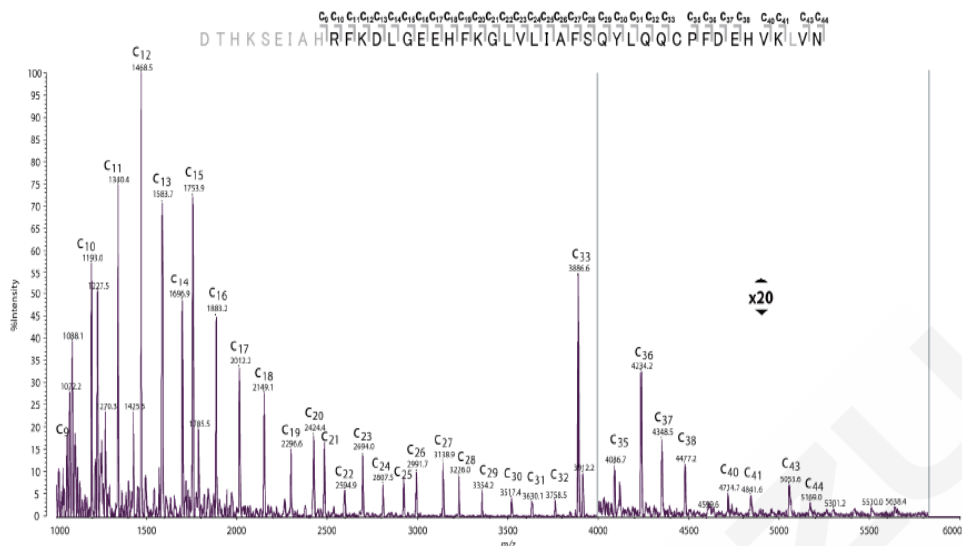


图 2 基于 ISD 的牛血清白蛋白序列分析

此外关于图2的质谱图，假设它是某c离子作为前体离子时产生的MS/MS谱图，也可以通过数据库搜索来鉴定该蛋白质。这与使用胰蛋白酶酶解后获得的肽段的MS/MS图谱的检索方法相同。关于图3的碎片离子信息，将C33离子 (m/z 3886) 作为伪前体离子，仪器类型选择MALDI- ISD，通过Mascot (Matrix Science) 数据库进行MS/MS离子搜索。数据库搜索的结果显示，牛血清白蛋白被鉴定为第一候选蛋白质 (图3)。

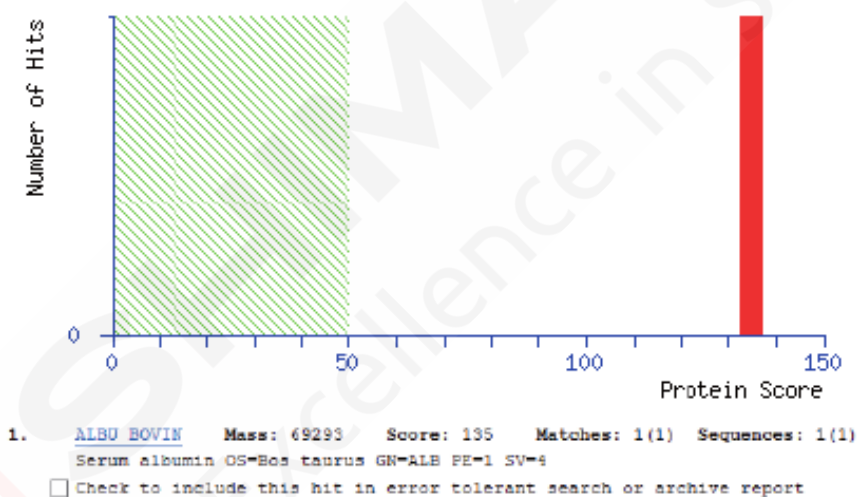


图 3 MS/MS Ion Search 结果

4. 结论

本文阐明了台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 与体积更大的MALDI-TOF MS相同，能进行蛋白质的分子量测定，并能通过ISD进行序列分析。

近年来，MALDI-TOF MS的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此对于大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常被过度指定。而且产品尺寸和初始/运行成本也构成了引进这些仪器的一个很大的障碍。

MALDI-8020是世界上最小的线性MALDI-TOF MS，可满足线性模式下蛋白质分析的需求，并有望在这一领域中广泛应用。

基于肽指纹图谱 (PMF) 技术分析蛋白质序列

摘要: 本文将牛血清白蛋白酶解并脱盐后, 以 CHCA (α -氰基-4-羟基肉桂酸) 为基质, 应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8020 分析, 得到了酶解产物的肽指纹 (PMF) 图谱。以 PMF 图谱检索 Mascot 数据库, 匹配到了有效的肽段序列信息, 这些肽段归属于牛血清白蛋白 (BSA)。这表明此方法可以鉴定数据库中的蛋白质。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 蛋白质序列 牛血清白蛋白

MALDI-TOF-MS因其分析速度快、通量高, 是分析蛋白质序列的常用手段之一。传统分析蛋白质序列的MALDI-TOF体积较大, 价格昂贵, 而MALDI-8020作为台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 占地面积小, 价格相对较低, 性能与同等模式的大型质谱相比毫不逊色, 同样可以较为方便地进行分析蛋白质序列。本文以牛血清白蛋白BSA为例, 使用胰蛋白酶酶解后, 采用MonoSpin[®] C18除盐, 以CHCA为基质, 应用MALDI-8020检测酶解产物, 通过Mascot软件检索数据库, 搜库结果与理论相符, 匹配到了BSA的肽段序列, 验证了MALDI-8020的检测结果, 表明MALDI-8020可以满足蛋白质序列分析的要求。

1. 实验部分

1.1 仪器

MALDI-8020 台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪

1.2 分析条件

调谐模式: 线性正离子模式

激光器: 355 nm 固态激光器

扫描范围: m/z 600-4000

激光能量: 75

1.3 样品前处理

取100 μ g样品, 应用5 mM DTT (二硫苏糖醇) 和20 mM IAA (碘乙酰胺) 进行还原烷基化处理后, 加入2 μ L胰蛋白酶 (0.5 μ g/ μ L) 37 $^{\circ}$ C酶解过夜。酶解完成后采用MonoSpin C18按照说明书进行脱盐。吸取0.5 μ L样品溶液和0.5 μ L CHCA (5 mg/mL) 基质溶液点靶, 自然干燥后送入质谱进行分析。

2. 结果与讨论

BSA酶解产物的一级质谱检测结果如图1所示。从结果来看, 酶解产物在m/z 600-2100之间检测到显著信号峰。将样品一级肽指纹图谱 (PMF) 通过Mascot软件检索数据库SwissProt (2018_12, 558898条序列) (参数设置见图2), 结果如图3所示, 成功匹配到蛋白质ALBU_BOVIN (牛血清白蛋白) 的部分肽段序列, 与理论一致。

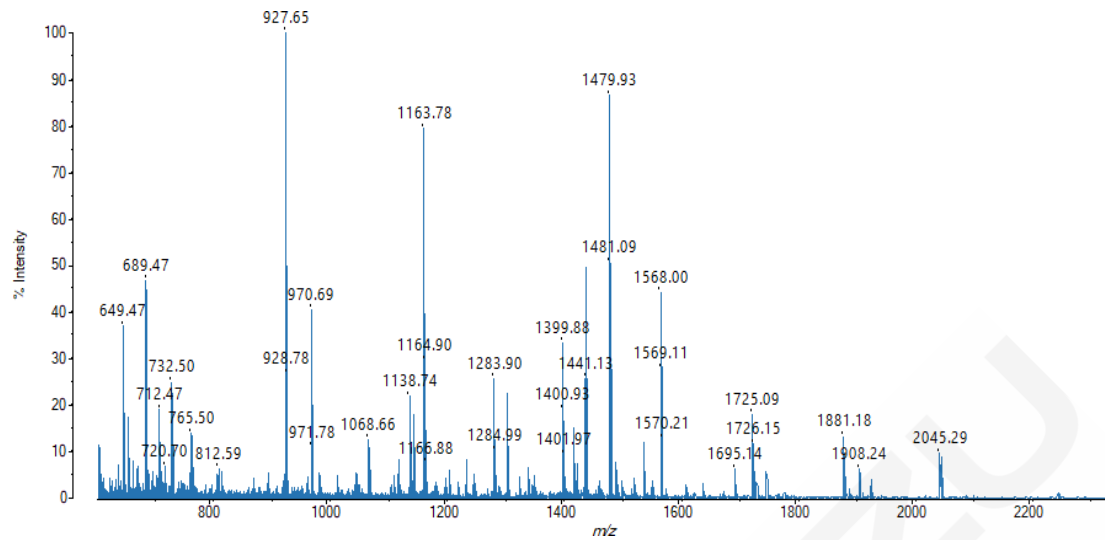


图 1 牛血清白蛋白的胰蛋白酶酶解产物的一级质谱图

Modifying parameters [protein-pep]

New Load Save Edit attributes (rename)

Mascot Search Parameters

Server parameters
Please specify a server URL to be used to submit searches
Server URL: Update

Search Parameters
Database: Enzyme:
Taxonomy: Hits:
 Decoy Missed cleavages:

Fixed modifications: Display all modifications

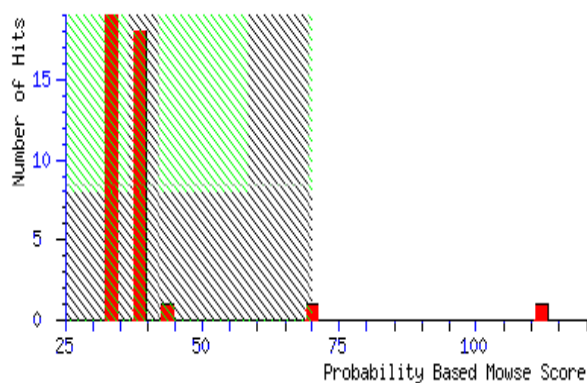
Variable modifications: Display all modifications

Peptide tolerance:
 Monoisotopic Average
Mass type:

Instrument:

OK Cancel

图 2. Mascot 检索参数



1. [sp|P02769|ALBU_BOVIN](#) Mass: 71244 Score: 112 Expect: 3.5e-006 Queries matched: 21
Serum albumin OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss Sequence
29 - 34	712.4700	711.4627	711.3664	0.0964	0 K.SEIAHR.F
66 - 75	1163.7800	1162.7727	1162.6234	0.1494	0 K.LVNELTEFAK.T
89 - 100	1419.9900	1418.9827	1418.6864	0.2963	0 K.SLHTLFGDELCK.V
118 - 122	658.4600	657.4527	657.3082	0.1445	0 K.QEPEP.N
156 - 160	665.5300	664.5227	664.3697	0.1530	1 K.KFWGK.Y
161 - 167	927.6500	926.6427	926.4861	0.1566	0 K.YLYEIAH.R
168 - 183	2045.2900	2044.2827	2044.0206	0.2621	1 R.RHPYFYAPELLYYANK.Y
205 - 209	649.4700	648.4627	648.3265	0.1362	0 K.IETMR.E
236 - 241	689.4700	688.4627	688.3656	0.0971	0 K.AWSVAR.L
347 - 359	1568.0000	1566.9927	1566.7354	0.2573	0 K.DAFLGSLYEYSR.R
360 - 371	1439.9800	1438.9727	1438.8045	0.1683	1 R.RHPEYAVSVLLR.L
361 - 371	1283.9000	1282.8927	1282.7034	0.1894	0 R.HPEYAVSVLLR.L
402 - 412	1306.0200	1305.0127	1304.7088	0.3039	0 K.HLVDEPQNLIK.Q
413 - 420	1068.6600	1067.6527	1067.4342	0.2185	0 K.QNCDQFEK.L
421 - 433	1479.9300	1478.9227	1478.7881	0.1346	0 K.LGEYGFQNALIVR.Y
460 - 468	1166.8800	1165.8727	1165.4856	0.3871	0 R.CCTKPESER.M
469 - 482	1725.0900	1724.0827	1723.8273	0.2554	0 R.MPCTEDYLSLILNR.L
499 - 507	1138.7400	1137.7327	1137.4907	0.2420	0 K.CCTESLVNR.R
508 - 523	1881.1800	1880.1727	1879.9138	0.2589	0 R.RPCFSALTPDETYVPEK.A
524 - 528	609.4600	608.4527	608.2806	0.1721	0 K.AFDEK.L
569 - 580	1399.8800	1398.8727	1398.6853	0.1874	0 K.TVMENFVAFVDK.C

图 3. 牛血清白蛋白酶解产物的一级 PMF 搜库结果

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检测牛血清白蛋白的酶解产物，搜库结果与理论相符，成功匹配到了牛血清白蛋白的肽段序列。MALDI-8020作为台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，体积紧凑、分析速度快、仪器维护方便，性能卓越，是蛋白质序列分析的有力工具。

磷酸化蛋白质序列分析及修饰位点检测

MALDI-TOF 质谱分析法具有高通量和高灵敏度，与 LCMS 法一样在众多领域中得到广泛应用。特别是近年来越来越多地应用于合成化合物和高分子量化合物的分子量检测和结构分析。由于此类质谱仪具有容易生成一价离子，便于确认分子量，可检测的质量范围广，样品干燥后进行检测，可选择的溶剂种类多等优点。

此外，由于近几年社会形势的变化，无论是政府、大学还是民营企业，都强烈希望此类设备在引进和运行方面都降低成本。台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 正是一款可充分满足这一市场需求的新产品。值得关注的一点是，本产品有一个较短的飞行管，虽然比传统机型尺寸小，但仍保留同等以上的性能。

近年来，仪器研发均趋向于高端技术，MALDI-TOF 质谱仪的反射模式因其高分辨率和结构分析功能而备受关注。相比之下，线性模式在一些领域的应用早被受到重视，但近年来未见到技术上的大幅进展。蛋白质翻译后修饰特别是磷酸化修饰的鉴定，不稳定化合物的分子量鉴定等都是以线性模式为更有效的方法。

本文介绍了应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 检测磷酸化蛋白质的酶解产物，并对磷酸化修饰进行了分析。

1. 台式MALDI-TOF MS: MALDI-8020

MALDI-8020虽然是一款拥有目前世界最小尺寸和安装面积的线性MALDI-TOF MS，但其线性检测模式（正离子）的性能与传统机型该模式的性能是相同的。通过采用200 Hz固态激光器以及在保持检测部位真空度的情况下更换样品靶板（加载锁定室），可进行快速检测。

本产品的飞行管虽然只有0.85 m，但质谱分辨率并不亚于传统机型，在m/z 4000附近也可进行同位素分离。

2. 线性模式的有效性

线性模式对具有高分子量化合物和不稳定官能基的化合物检测是有效的。MALDI法离子化的化合物有时会在自由飞行空间内因过剩的内部能量被分解。由于在这个过程中产生的片段离子的速度与原化合物相同，它们在线性模式下被认为是相同的分子量。另一方面，在反射模式下，这些片段离子的分离取决于动能，检测到的分子量是不同的。因此，在反射模式下可以获得质谱的高分辨率和高精度，但是当官能基脱离时导致被脱离官能基的离子信号变得很强，或者可能无法检测到目标化合物。

如图1所示，磷酸化肽段的磷酸基在飞行过程中容易脱离，可以说是一种适合在线性模式下检测的化合物。

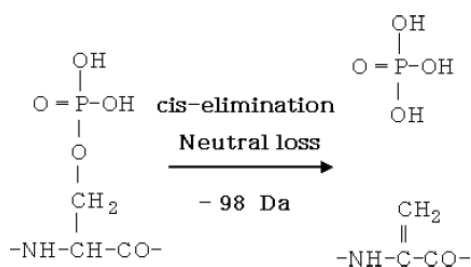


图 1 Ser 的磷酸化修饰和中性丢失

3. 磷酸化蛋白质序列分析例

用胰蛋白酶酶解磷酸化蛋白质（牛 α -酪蛋白），然后大约1 pmol（用蛋白质换算）的量滴到薄层的CHCA基质上并干燥。如图2所示，用MALDI-8020的线性模式对该酶解物进行检测。通过Mascot检索，从m/z 900至2500的范围内检测到的肽段的质荷比，鉴定出了 α -酪蛋白。另外，通过线性模式检测出多个磷酸化肽段，通过数据库检索还鉴定了修饰位点（图3）。结果表明，该仪器具有足够的分辨率，可用于酶解肽段的分析。尽管MALDI-8020是一款出色的线性模式专用仪器，但并不适合大规模蛋白质组学的分析。然而，在以非组学方法分离提纯的蛋白质的鉴定以及翻译后修饰的分析，通过本仪器可以快速获得有效信息。

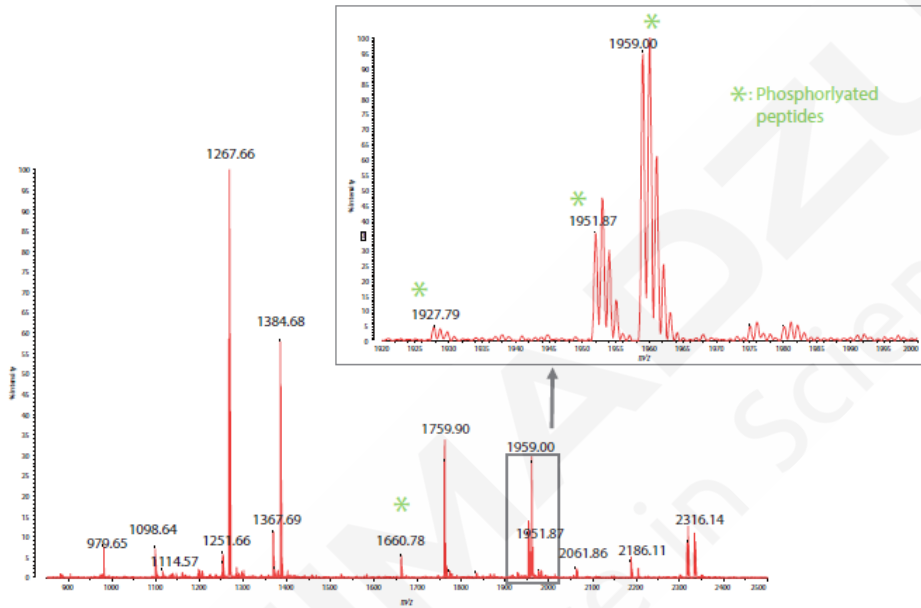


图 2 α -酪蛋白的胰蛋白酶酶解物的质谱图

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Peptide
2 - 18	1959.0000	1957.9927	1958.1513	-0.1588	M.KLLILTCLVAVALAEK.H + Phospho (ST)
23 - 37	1759.9000	1758.8927	1758.9377	-0.0449	K.HQGLPQEVLNENLIR.F
38 - 49	1384.6800	1383.6727	1383.7227	-0.0500	R.PFVAFFPEVFGK.E
58 - 73	1927.7900	1926.7827	1926.6843	0.0985	K.DIGSESTEDQMEDIK.Q + 2 Phospho (ST)
106 - 115	1267.6600	1266.6527	1266.6972	-0.0445	R.YLOYLQQLR.L
119 - 134	1951.8700	1950.8627	1950.9452	-0.0824	K.YKVPQLKIVPWSAEER.L + Phospho (ST)
121 - 134	1660.7800	1659.7727	1659.7869	-0.0142	K.VPQLEIVPWSAEER.L + Phospho (ST)
140 - 166	2316.1400	2315.1327	2315.1296	0.0031	K.EFMIGNQSLAYFPPELKR.Q

图 3 mascot 搜库的结果

4. 总结

通过台式MALDI-TOF MS MALDI-8020进行了序列分析，并获得了大型MALDI-TOF MS质谱仪相媲美的数据，证明了鉴定磷酸化蛋白质以及磷酸化位点的有效性。

近年来，MALDI-TOF MS的发展越来越高端化，同时体积变大，结构更复杂。因此大多数需要线性模式分析的常规应用，这些仪器通常是多余的。而且产品尺寸，购买和维护成本也构成了一个很大的障碍。

MALDI-8020是世界上最小的线性MALDI-TOF MS，可满足线性模式下蛋白质分析的需求，并有望在生物化学和分子生物学中广泛应用。

2.2 多肽类药物

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。

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。

MALDI-TOF MS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，可以快速确认多肽药物以及聚乙二醇化多肽药物精确分子量、合成效果及杂质组成情况。搭配QC reporter软件，岛津MALDI-TOF可以为合成多肽药物的高通量和自动化质量控制分析提供完整的工作流程解决方案。在多肽药物的合成环节，MALDI-TOF可以对多肽药物化学合成的起始物料进行快速质量控制。应用MALDI-TOF的源内裂解（ISD）功能，还可以检测多肽药物中含有的特殊修饰。

司美格鲁肽的合成质控

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 分析了司美格鲁肽在研合成中间体及制剂产品，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

司美格鲁肽 (Semaglutide, 又叫索马鲁肽) 是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对某种按照半重组制备法生产的在研司美格鲁肽合成中间体及制剂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。

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	离子门限值	: 1000
扫描范围	: m/z 1000-10000	脉冲引出质量(Da)	: 4000

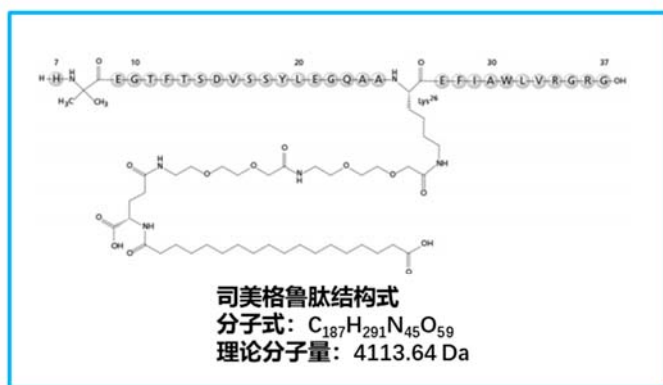
1.3 样品前处理

样品: 司美格鲁肽合成中间体及制剂。

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

司美格鲁肽通常按照半重组法合成, 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 端氨基酸突出端进行偶联, 获得偶联后终产物; 4. 对司美格鲁肽进行分离纯化, 做成制剂。司美格鲁肽合成过程见图 1, 应用 MALDI-8030 对某企业提供的在研司美格鲁肽合成中间体分子量及杂质进行检测的统计结果见表 1, 质谱图见图 2-图 5。



注: 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)

图1 司美格鲁肽合成过程

表1 司美格鲁肽合成中间体、制剂分子量及杂质检测结果

#	名称	分子式	理论 [M+H]	实测 [M+H] ⁺	杂质
1	前体分子	$C_{142}H_{216}N_{38}O_{45}$	3176.52	3176.23	-
2	前体分子 衍生物	$C_{177}H_{277}N_{41}O_{57}$	3892.40	3891.99	m/z 3275.49、m/z 3354.49、m/z 3621.47、m/z 2135.24 等
3	偶联后终 产物	$C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$	4114.65	4114.66	m/z 3821.02、m/z 3598.14、m/z 4215.26、m/z 2107.81 等
4	司美格鲁 肽制剂	$C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$	4114.65	4114.38	-

2.1 GLP-1 类似物前体分子

由酵母重组表达的 GLP-1 类似物前体分子应用 MALDI-8030 检测到 m/z 3176.23 信号峰 (图 2), 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。

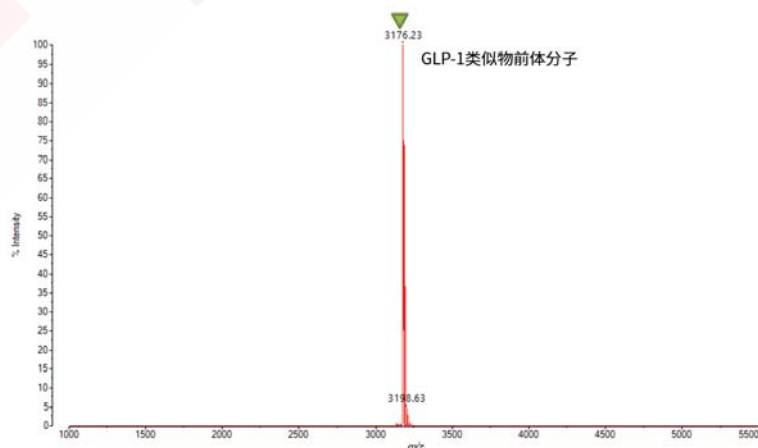


图2 GLP-1 类似物前体分子的质谱图

2.2 前体分子衍生物

GLP-1 类似物前体分子经酰化后检测到前体分子 (m/z 3176.28) 与前体分子衍生物的离子峰 (m/z 3891.99) (图 3),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。

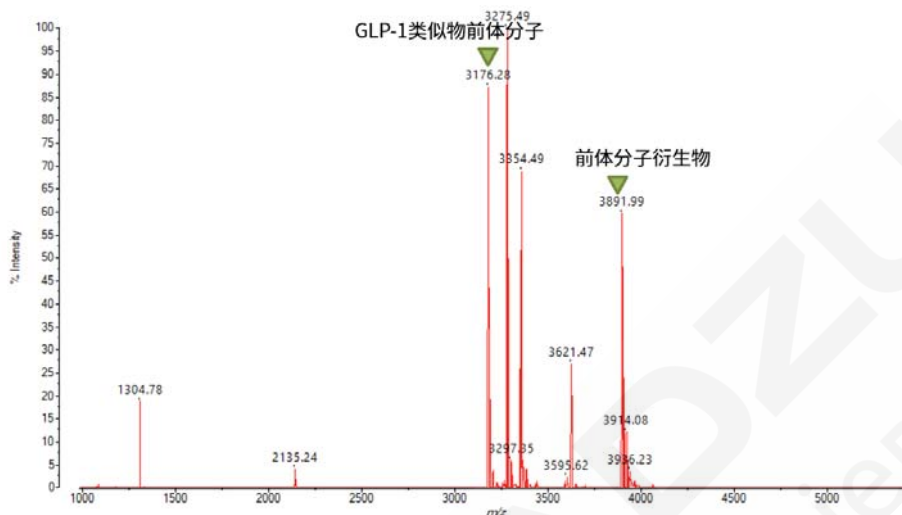


图 3 前体分子衍生物的质谱图

2.3 偶联终产物

图 4 中,前体分子衍生物与 N 端氨基酸突出端偶联后的产物检测到前体分子衍生物 (m/z 3892.54) 与偶联后目标产物的离子峰 (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 3821.02、 m/z 3598.28、 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。

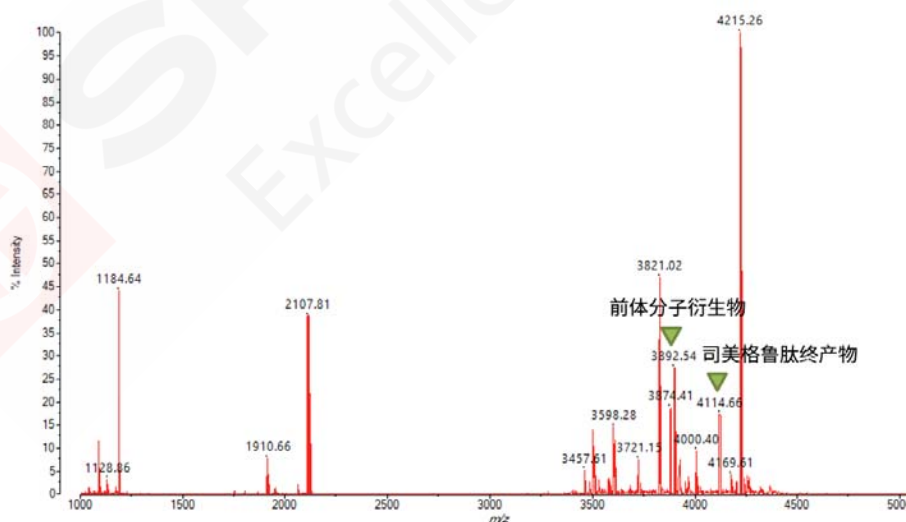


图 4 偶联后终产物的质谱图

2.4 司美格鲁肽制剂

司美格鲁肽制剂应用 MALDI-8030 检测到 m/z 4114.38、 m/z 2057.88、 m/z 8228.42 的离子峰 (图 5)，分别对应化合物的 $[M+H]^+$ 、 $[M+2H]^{2+}$ 与 $[2M+H]^+$ 形式。图谱上未观测到明显杂质信号，样品纯度较好。

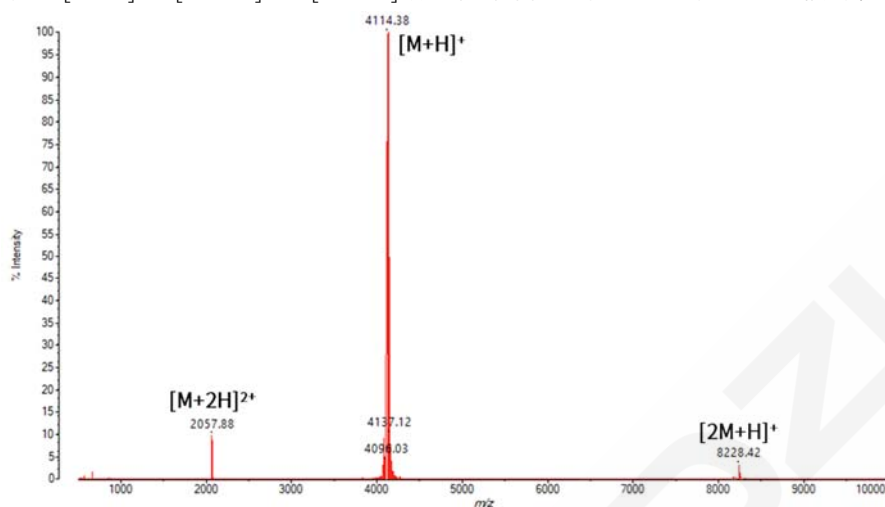


图 5 司美格鲁肽制剂的质谱图

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 对司美格鲁肽在研合成中间体及制剂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。

应用 MALDI-8020 和 QC Reporter 软件对合成肽进行质量控制分析

生物制药相关制剂生产过程中, 质量控制(QC)在保证高质量产品方面起着至关重要的作用。制剂组分的改变或降解可能会影响治疗作用, 导致活性丧失或毒性的发生。在一些可用于生物制品质控的分析技术中, MALDI-TOF 质谱以其快速简单的操作, 低运行成本, 高灵敏度, 而且能提供某种化合物及其杂质/加合物和修饰产物的分子量信息、序列和结构信息, 因而被广泛使用。

由于制剂降解而导致制剂变化的一个例子是肽或蛋白质的甲硫氨酸残基的氧化, 该氨基酸对氧化非常敏感。

本文使用 Shimadzu MALDI-8020 台式线性 MALDI-TOF 质谱仪和 QC Reporter 软件为合成肽的高通量和自动化质量控制分析提供完整的工作流程解决方案 (图 1)。

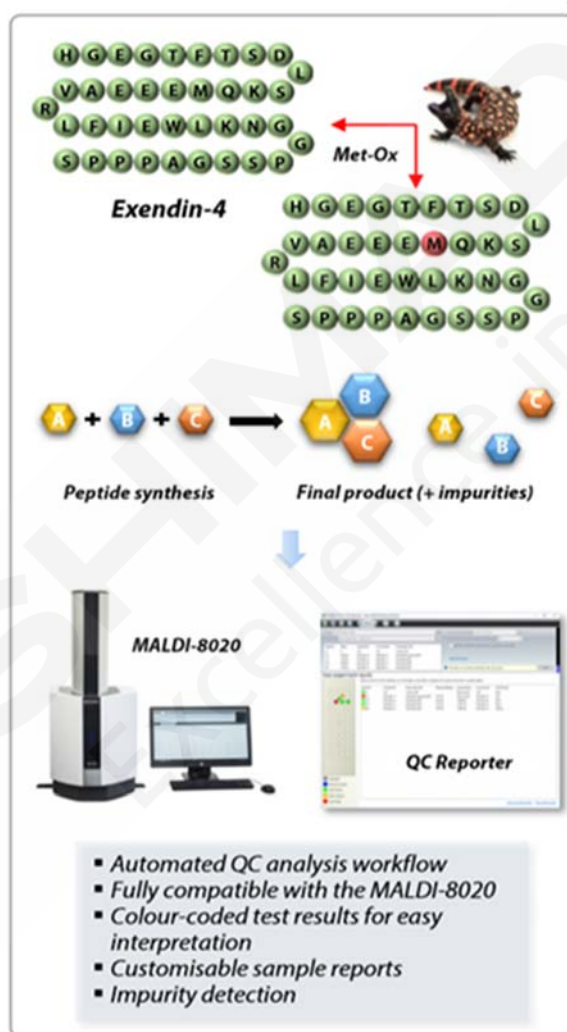


图 1 用于合成肽的 QC 分析的工作流程

1. 样本和方法

Bachem (英国)慷慨地提供了 4 种杂质含量不同的合成肽样品。Exendin-4 购自 Sigma-Aldrich。蛋氨酸的氧化使用 1%过氧化氢在 37°C (15 分钟)下进行。氧化之后, 采用 ZipTip® C18 微柱(Millipore)对样品进

行纯化。对于 MALDI 分析，所有样品都和 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA、5 mg/mL、等体积的乙腈/0.1%三氟乙酸)一起点在靶板上。

2. 结果

Exendin-4 是存在于吉拉毒蜥(图 1, *Heloderma suspectum*)唾液中的天然肽。它的合成物-艾塞那肽可用于治疗 2 型糖尿病。

使用 QC Reporter 软件进行 Exendin-4 及其修饰物的分析是一个典型的质控分析流程。为了模拟 Exendin-4 的降解，对它进行化学氧化，之后单甲硫氨酸残基发生磺化形式的改变，并且通常观察到+16 Da 的质量变化。为了模拟部分分解，制备天然 Exendin-4 和 Met-Ox Exendin-4 的混合物。

图 2 显示了 QC Reporter 软件的结果展示窗口，不同颜色代表了 QC 实验的不同结果。目标峰设定为 4186.6 Da,即天然 Exendin-4 的中性平均分子量。软件计算目标物的质子化([M+H]⁺)分子量，然后在所获得的谱图中进行搜索。图 2 右下方的插图显示了用于计算和生成样本结果的用户自定义质量标准设置，包括：相对于目标峰的质量容差、最高容许的加合物及杂质水平(设置为目标峰面积的 50%)。

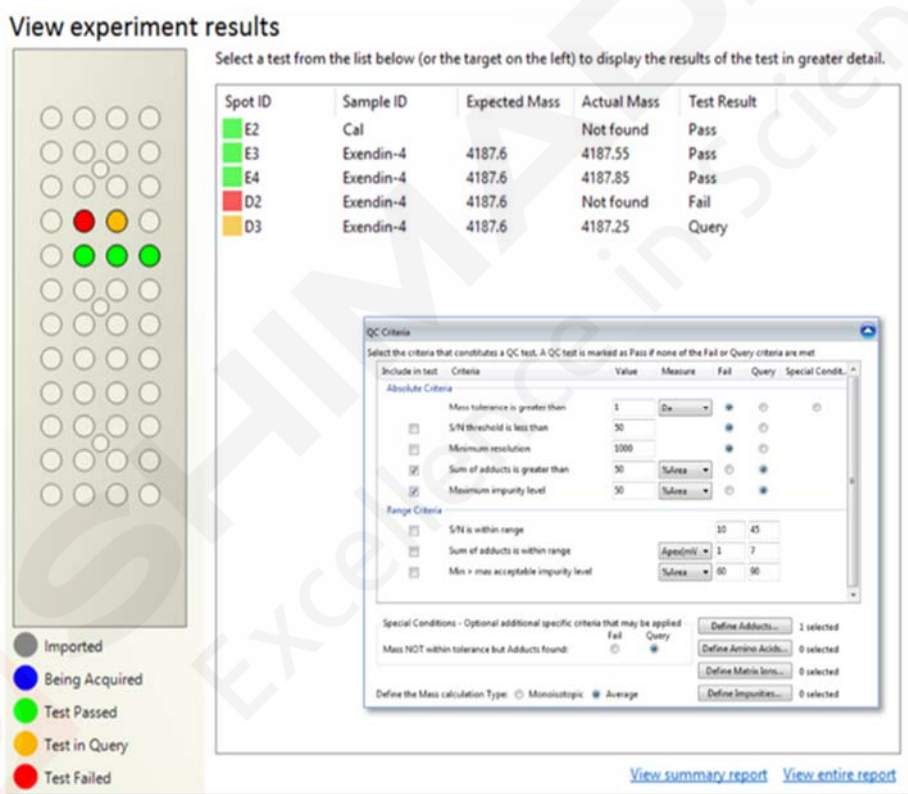
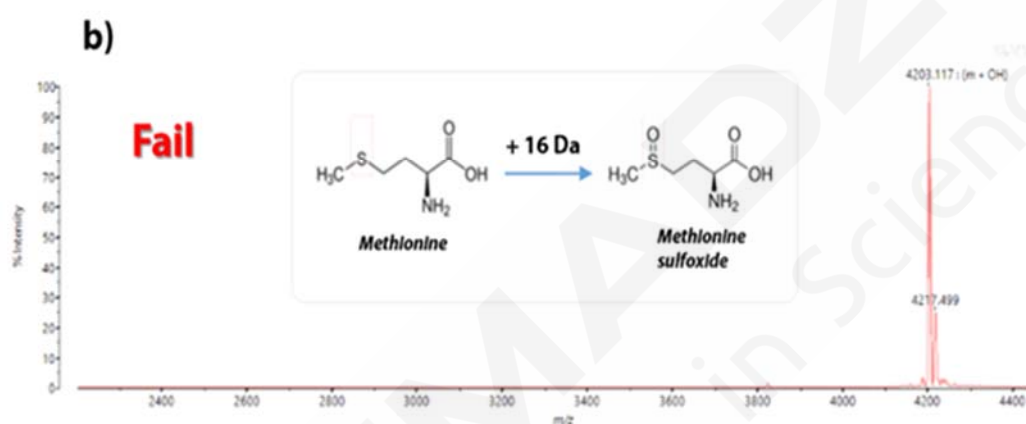


图 2 蛋白质质谱 QC Reporter 软件窗口显示了 exendin -4 QC 实验的不同颜色标记的结果。

右下方的插图显示了用于计算结果的质量标准设置。

在图 3a 中，成功检测到目标峰 m/z 4187.6 ([M+H]⁺)，并且样品(图 2 中的 E3)被报告为“合格”。图 3a 中的插图显示了一部分的报告详细结果。在图 3b 中，未观察到 Exendin-4 的目标峰，然而检测和报告了(图 3c) Exendin-4 的氧化型峰(+16 Da; m/z 4203.6, [M+H]⁺)。因此，样本(图 2 中的 D2)被报告为“不合格”。图 3b 显示了一种由于氧化而发生完全降解的情况。



c)

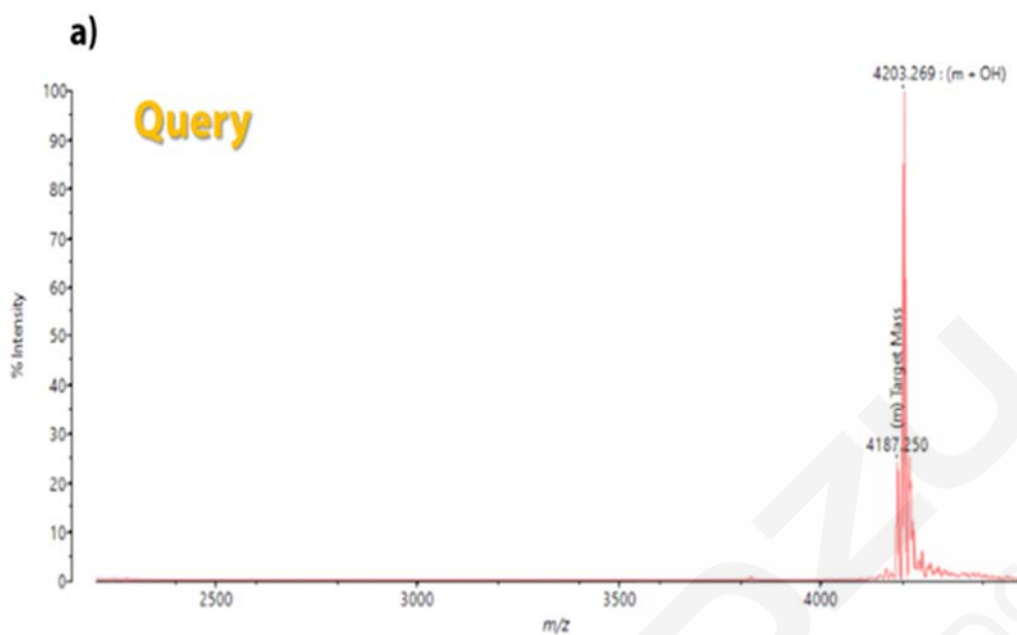
Target Ion			
The target ion was not detected within the given tolerance.			
Detected Ions			
Ion Type	Description	Non-Ionised	Ionised
Target Adduct	OH	4202.12	4203.12
Test criteria			
Criterion	Required value	Actual value	Result
Mass not within tolerance but adducts found	4203.61	4203.12	Fail

图 3a) QC 实验谱图显示成功检测出目标峰 m/z 4187.6 ($[M+H]^+$), 并且得到了“合格”结果。插图:部分样本结果生成报告的详细信息。

b) QC 实验谱图显示没有检测到目标峰 m/z , 而得到“失败”结果; 插图: 甲硫氨酸残基的氧化机制。

c) 生成报告中样本详细结果显示检测到了目标峰的加合物 m/z 4203.61 ($[M+H]^+$)。为了计算质子化 ($[M+H]^+$) 氧化肽类型, OH 被认为是加合物。在这里“O”对应于氧元素,“H”对应于电离质子。

在图 4a 中, 天然 Exendin-4 和 Met-Ox Exendin-4 混合物的 QC 实验的结果被报告为“查询”。这表明, 虽然检测到了天然型 (m/z 4187.6, $[M+H]^+$) 的目标峰, 但是 Met-Ox 型的标志峰 (m/z 4203.61, $[M+H]^+$) 超过了天然型峰面积的 50% (图 2, 图 4b), 参考 QC 标准设置 (图 2), 结果显示在样本报告中 (图 4b)。



b)

Detected Ions			
Ion Type	Description	Non-Ionised	Ionised
Target Adduct	OH	4202.27	4203.27
Impurities detected			
Non-Ionised	Ionised	Percent of target by area	Percent of target by intensity
4216.80	4217.80	146.88%	105.38%
2100.95	2101.95	10.78%	34.80%
4246.25	4247.25	5.39%	24.45%
Test criteria			
Criterion	Required value	Actual value	Result
Sum of adducts greater than/within range	50	557.45	Query
Maximum impurity level	50	163.04	Query

图 4a) QC 实验谱图显示不仅检测到天然型目标峰，还检测到显著的氧化型峰，因此得到“查询”结果。

b) 生成报告中样本结果的详细信息显示氧化型峰面积超过目标峰面积的设定值 50%。

图 5a 至 c 显示了三个肽合成产物的 QC 实验结果。如图所示，成功检测到三个目标峰(m/z 1287.73、1503.82 和 1740.94; $[M+H]^+$)。从插图的样本报告中，可以看到三个肽都达到了 QC 质量标准：目标质量峰的最小信噪比(设置为 10)、加合物(钠和钾)和杂质的最大量 (都设置为目标峰面积的 50%)。

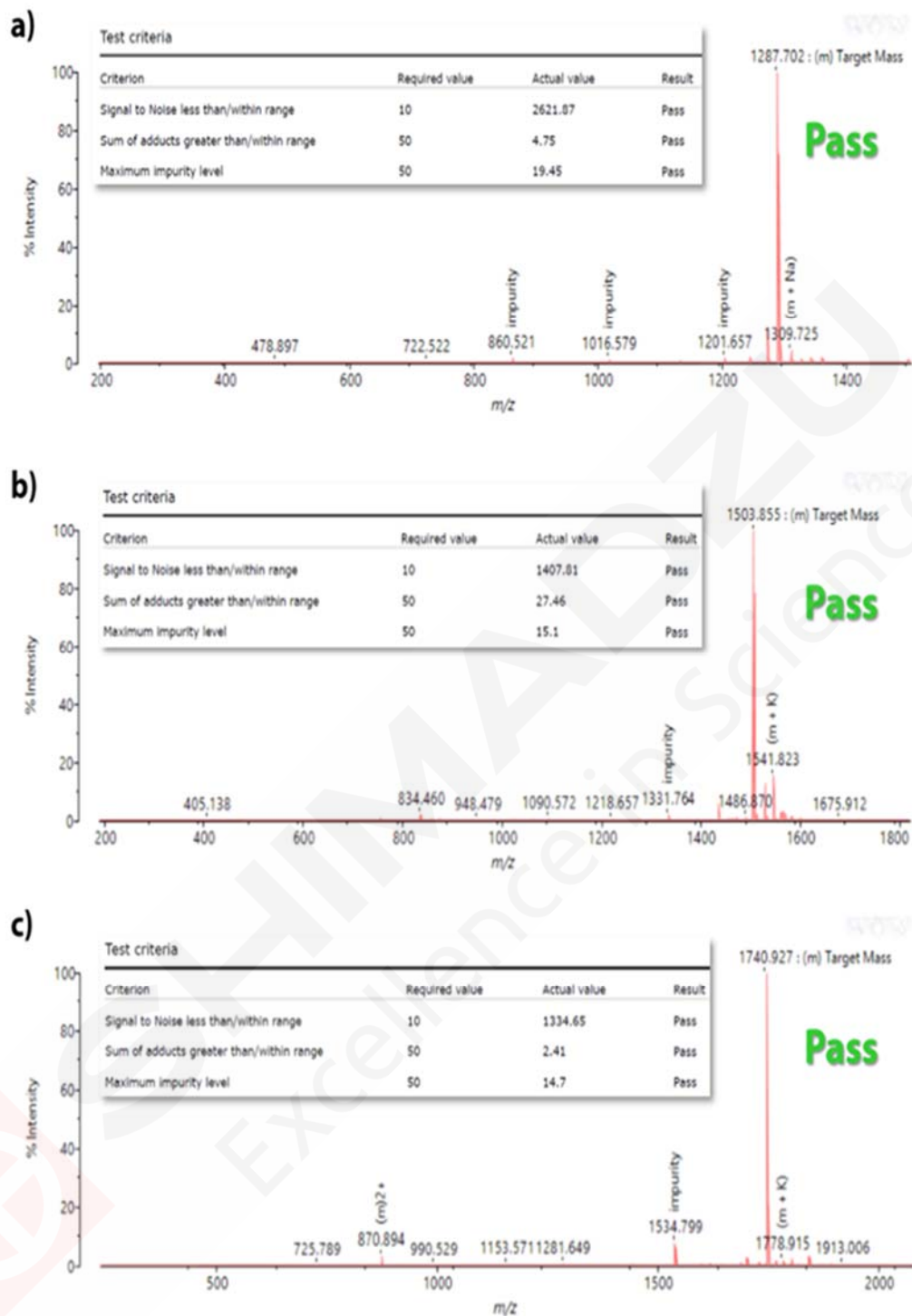
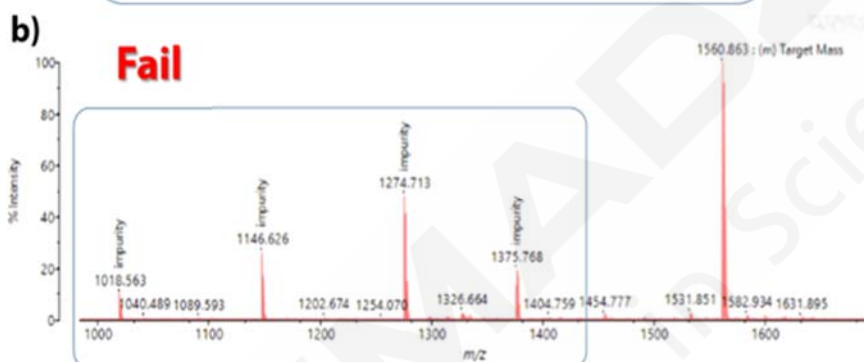
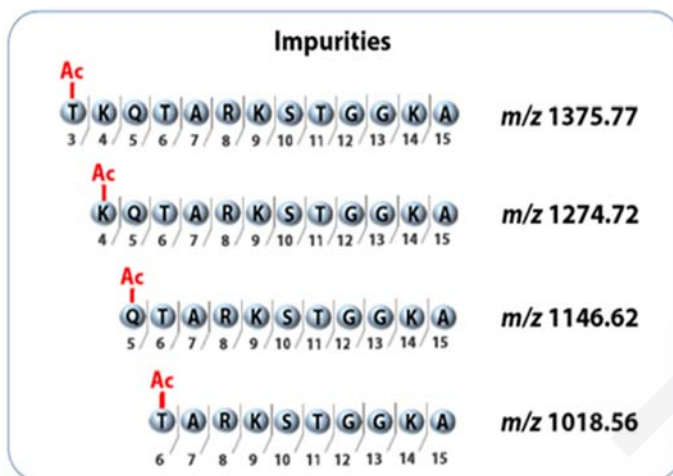


图 5a-c QC 实验的谱图显示成功检测到三个目标质量峰 (m/z 1287.73、1503.82 和 1740.94; $[M+H]^+$), 而且得到了“合格”结果。

插图: 报告的样本结果详细信息显示所有样本达到了设定的 QC 标准。

图 6a-c 展示了其中一个合成肽的 QC 实验结果, 该肽含有显著水平的杂质, 由带有乙酰基的合成的截短中间体组成 (图 6a 显示预估的分子量)。如图 6b 所示, 成功检测到目标质量峰 (m/z 1560.89, $[M+H]^+$) 以及与杂质峰理论值一致的峰。图 6c 生成的样本报告显示, 由于不满足杂质水平标准设置, 故报告为“不合格”。

a) **A R T K Q T A R K S T G G K A** Target mass $[M+H]^+$ monoisotopic:
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 **m/z 1560.89**



c) Test criteria

Criterion	Required value	Actual value	Result
Signal to Noise less than/within range	10	791.05	Pass
Sum of adducts greater than/within range	50	1.55	Pass
Maximum impurity level	50	100.53	Fail

图 6a) 最终肽产物及其杂质(被切断的乙酰化中间体)的序列和分子量计算值。

b) QC 实验谱图显示目标质量峰 m/z 1560.89 ($[M+H]^+$)，由于杂质峰占目标峰面积的 50%以上，导致“不合格”结果。

c) 生成的报告中样本结果的详细信息，显示杂质峰面积超过目标峰面积的 50%。

多肽药物化学合成起始物料的分子量检测

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

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（苄氧羰基）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	$C_{26}H_{32}N_2O_6$	491.22	491.11
2	Fmoc-His(Trt)-OH	109425-51-6	$C_{40}H_{33}N_5O_4$	642.24	642.29
3	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	154445-77-9	$C_{34}H_{40}N_4O_5S$	671.25	671.25
4	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	132327-80-1	$C_{39}H_{34}N_2O_5$	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

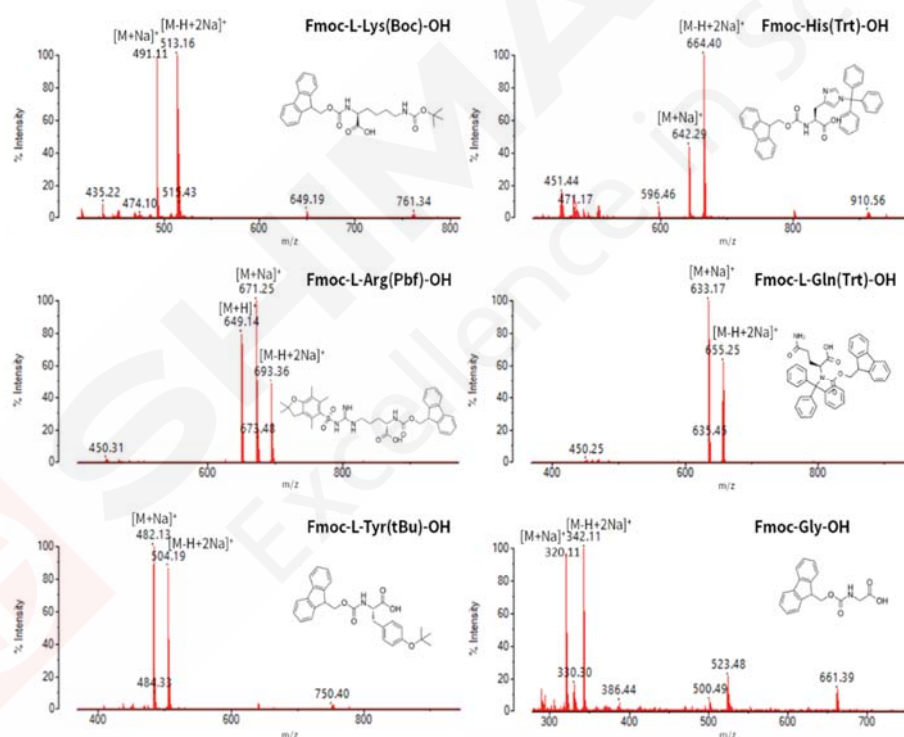


图 1 Fmoc 保护氨基酸质谱图

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。

聚乙二醇化多肽药物及原料的分子量检测

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

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。

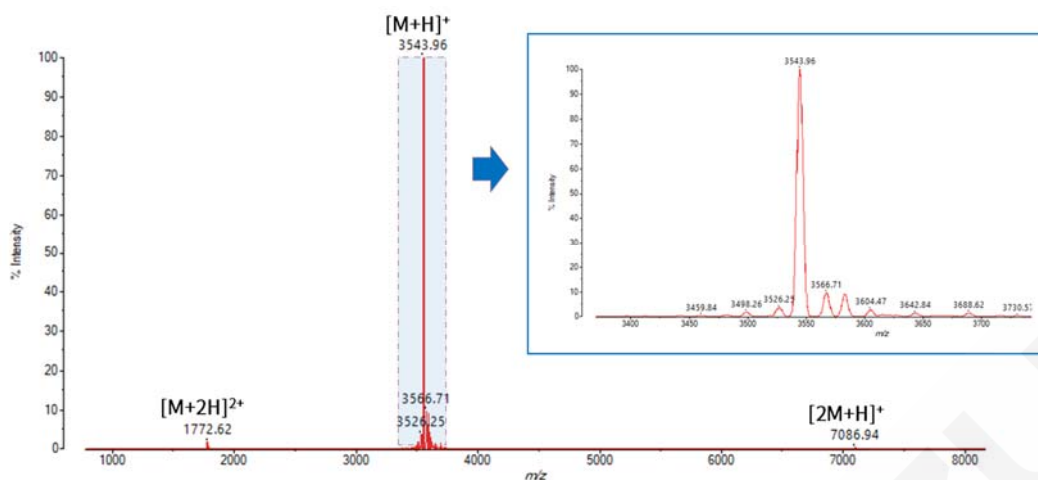


图 1 多肽原料质谱图

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。

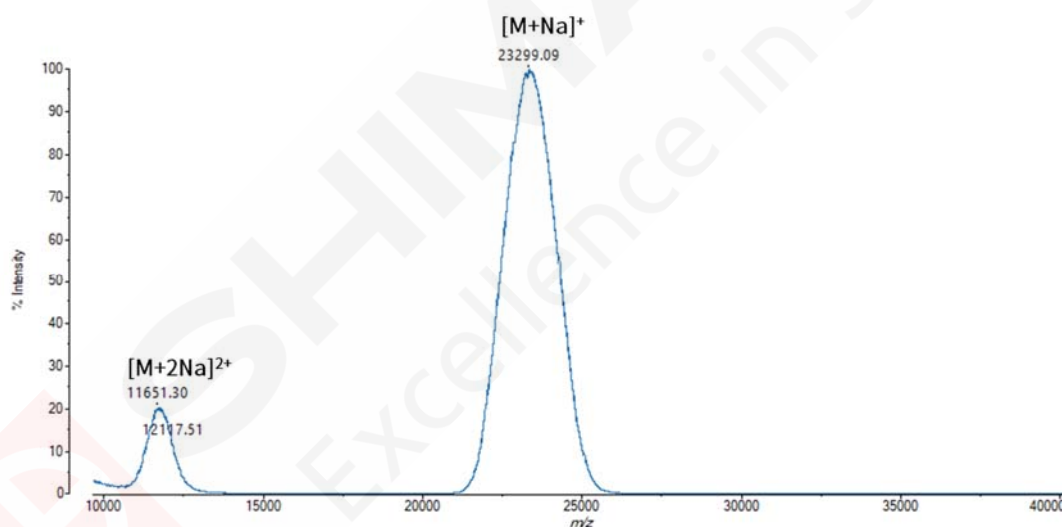


图 2 mPEG-PPMA (-23k) 原料质谱图

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。

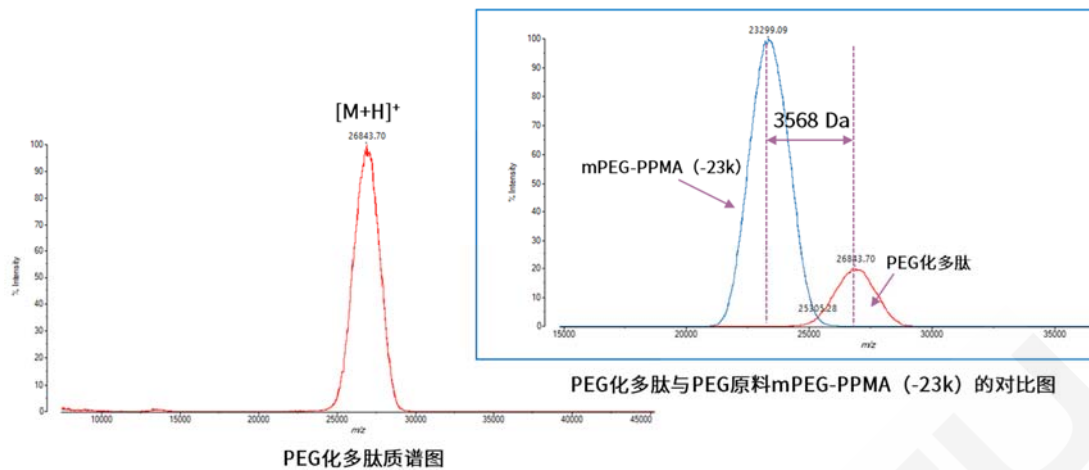


图3 聚乙二醇化多肽质谱图

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。

注射用胸腺法新聚集体分析

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

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 1。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。

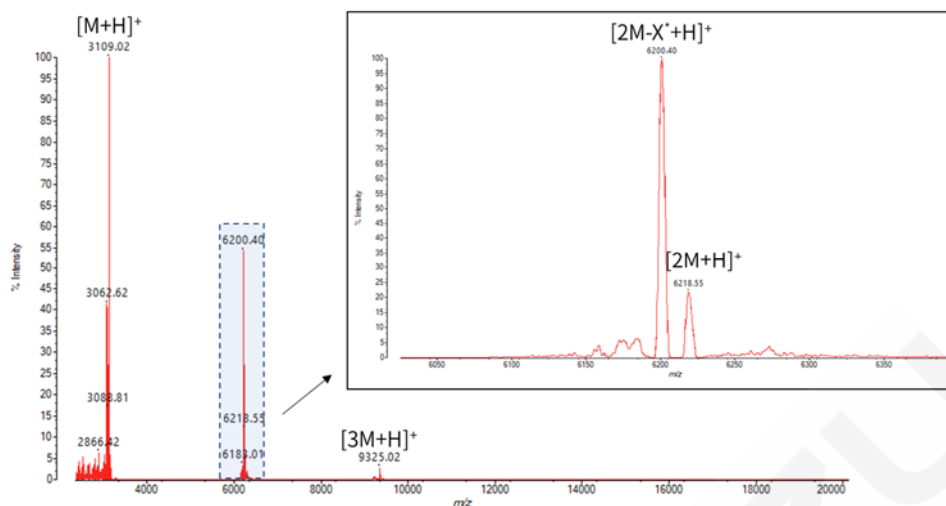


图1 商品化注射用胸腺法新质谱图 (m/z 2000-20000) (注: X*代表分子量为 17 Da 的基团)

将胸腺法新的二聚体质谱图进行局部放大 (图 1), 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 2a, 2b)。

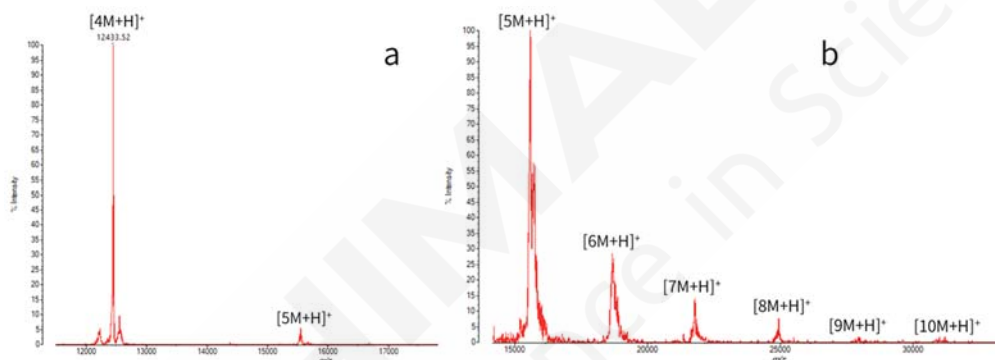


图2 商品化注射用胸腺法新质谱图. a. m/z 12000-20000; b. m/z 15000-35000

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 3)。

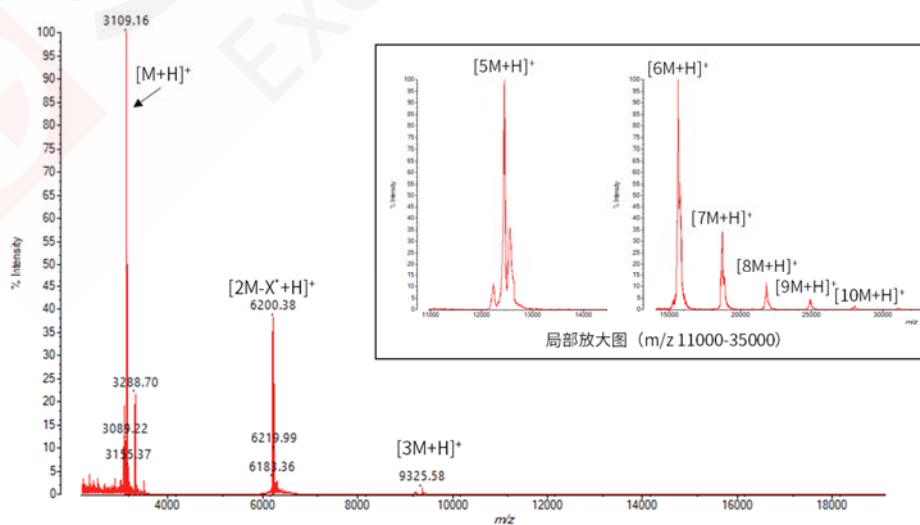


图3 另一品牌注射用胸腺法新产品的质谱图 (m/z 12000-20000)

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体分析

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 4。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。

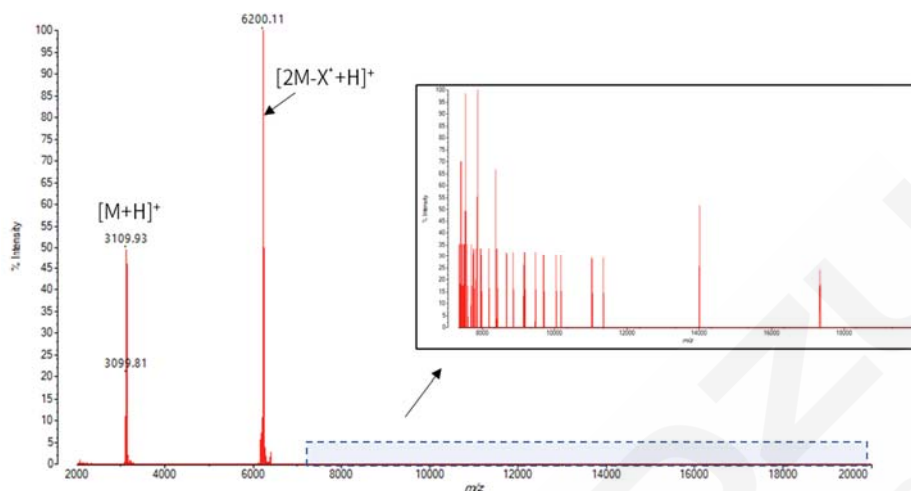


图 4 胸腺法新原料药质谱图（注：X*代表分子量为 17 Da 的基团）

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 5）。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。

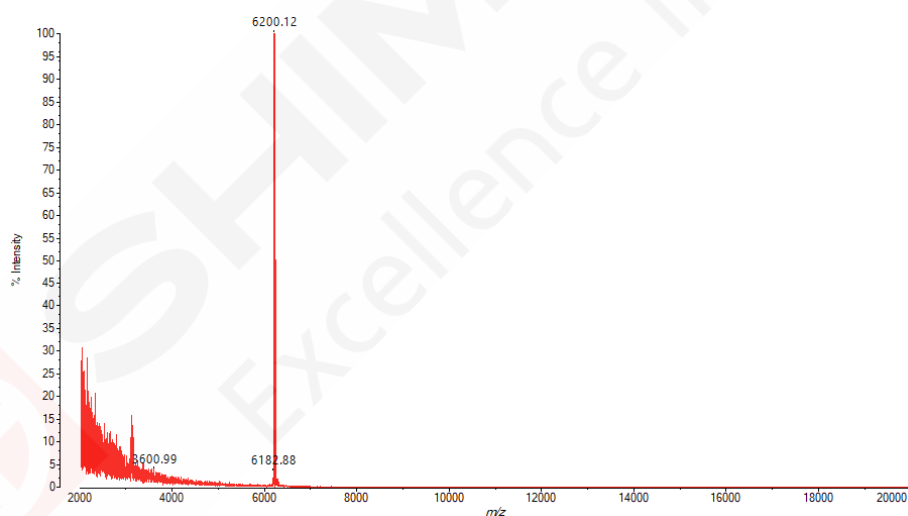


图 5 经分离纯化的胸腺法新二聚体质谱图（m/z 15000-35000）

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。

使用 MALDI-TOF 的源内裂解 (ISD) 功能检测甲硫氨酸氧化修饰

MALDI-TOF MS 是获得肽或蛋白质分子量及一级结构相关信息的一种迅速而又简便的方法。在各种裂解方法中, 源内分解 (ISD) 可以用于“自上而下”蛋白质组学, 得到蛋白质序列。它可利用氢自由基迁移生成 c-及 z-碎片离子系列。与源后裂解 (PSD) 相比, ISD 的一大优势在于理论上不受样品质量的限制, 无需进行酶消化, 直接对较大的蛋白质进行测序。MALDI-ISD 工作流程的概要如图 1 所示。

在制药行业的生物相关药品开发过程中, 为了对失活、毒性等对治疗带来影响的可能性进行监控, 作为质量管理过程的一个组成部分, 对制剂配方或降解等导致的变化进行跟踪是非常重要的。其中, 肽或蛋白质的甲硫氨酸残基氧化就是一个伴随降解出现修饰的例子。甲硫氨酸同其他氨基酸相比, 非常容易氧化。

在这里我们为您介绍通过使用台式 MALDI-TOF 质谱 MALDI-8020 通过进行精确的完整分子量分析和自上而下的序列解析, 确定 Exendin-4 肽的甲硫氨酸氧化 (Met-O) 修饰的实例。可以说, 在生物相关药品的 QC 中, 这种方法对确定不希望在生产工艺中出现的变化来说是一种有效的方法。

1. 样品和方法

Exendin-4 肽购自 Sigma-Aldrich。甲硫氨酸的氧化按照以下方法进行: Exendin-4 与 1%过氧化氢 (H₂O₂, pH 中性) 在 37°C 条件下孵育 15 分钟。对样品溶液进行酸化处理, 使用 ZipTip® C18 (Millipore 公司生产) 对肽进行纯化。

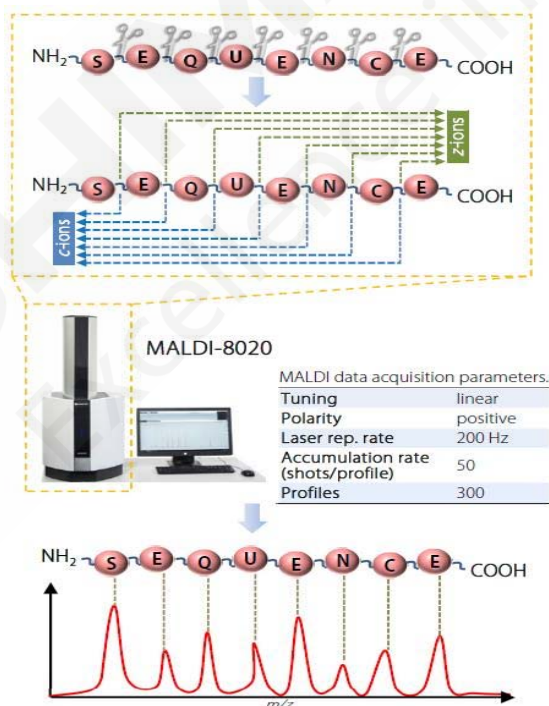


图 1 MALDI-ISD 的工作流程及质谱采集参数

将天然肽及 Met-O 肽与 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA, 5 mg/mL, 50%乙腈/0.1%三氟乙酸) 混合, 取 1 μ L 滴在靶标上并干燥。为了进行 ISD 分析, 将天然肽及氧化型肽与 1,5-二氨基萘 (溶解在 50%乙腈/0.1%三氟乙酸中的 1,5-DAN 饱和溶液) 混合, 取 1 μ L 滴在靶板上并干燥。

装置使用台式 MALDI-TOFMS 中的 MALDI-8020, 按照图 1 中所述的测定条件进行分析。

2. 结果

Exendin-4 是存在于吉拉毒蜥 (*Heloderma suspectum*) 唾液中的天然肽。它的合成形式-Exenatide, 用于治疗 2 型真性糖尿病。

天然 Exendin-4 的 MALDI-MS 谱图如图 2a) 所示。图中质量标签与检测到的单同位素峰相对应。

从图 2b) 的摄像机图像中可以看出, 通过优化的样品制备方法而得到的样品具有非常良好的均一性。在质谱的放大区域 (图 2c) 及 2d)) 中, 显示出碎片离子 (m/z 1200-2800 范围) 单同位素峰的良好分辨率。

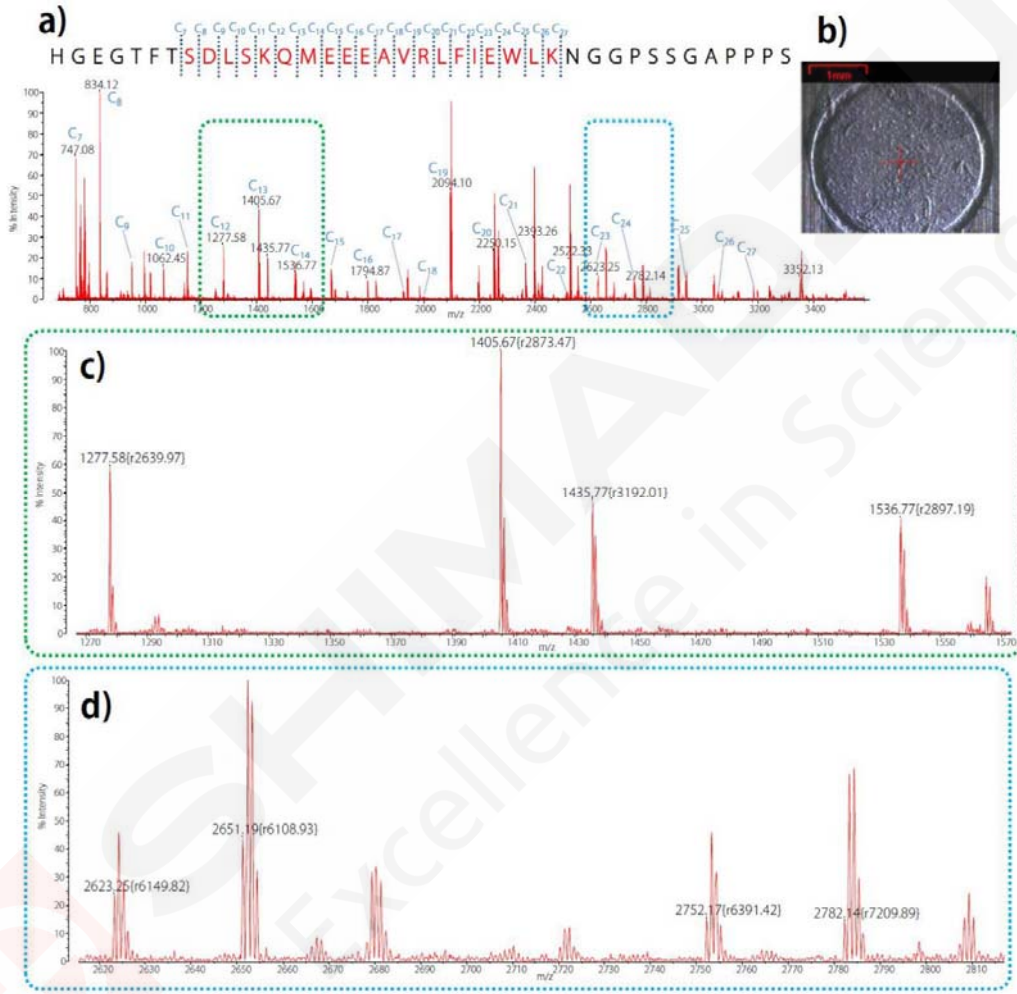


图 2 a) 天然 Exendin-4 的 MALDI-MS 谱图; b) 使用 1,5-DAN 作为基质的良好的摄像机图像; c) & d) MS 谱图的放大图

为了进行 Mascot-MS 数据库检索, 创建了添加 Exendin-4 序列的定制版 Swiss-Prot 数据库, 然后, 使用 MALDI Solutions 软件的检索工具进行了 Mascot-MS 检索。结果如图 3 所示, 得到了有效的得分 (图 3a)) 和序列覆盖率 (72%; 图 3b)) 。

完成氧化反应后, 进行了肽分子量的测定, 确认成功发生了氧化反应。在使用 CHCA 基质得到的图 4 的谱图中, 天然型 (红线) 及氧化型 (蓝线) Exendin-4 的质谱表现出非常好的质谱精度和分辨率。正如预测所示, 在 Exendin-4 中有一处甲硫氨酸支链被氧化, 检测到了与生成的亚砷相对应的+16Da 的质量迁移。

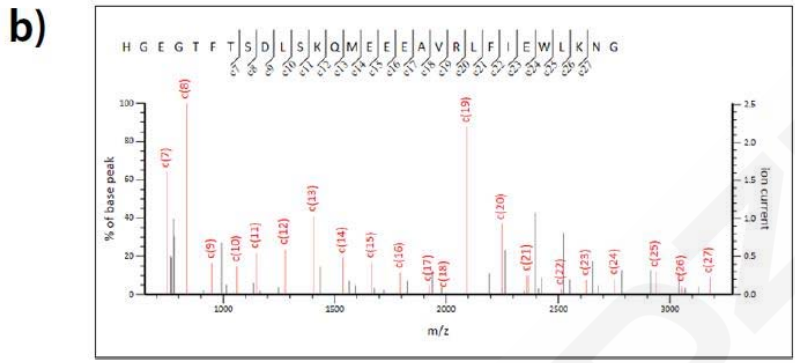


图 3 a) MALDI-MS/MS 的 Mascot 检索结果; b) Mascot 碎片离子匹配图

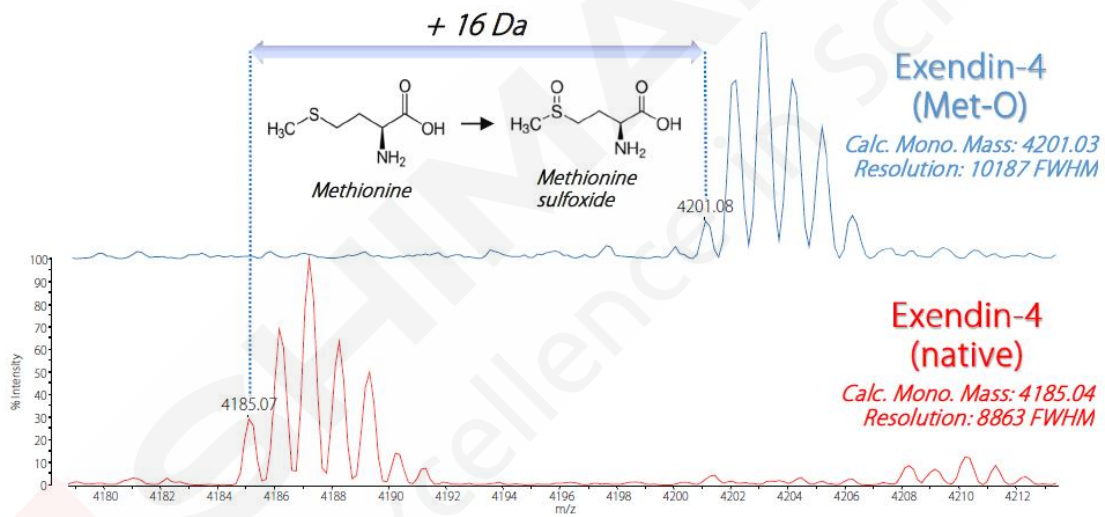


图 4 天然型 Exendin-4 (红线) 及 Met-O (蓝线) Exendin-4 的一级质谱图 (基质: CHCA)

氧化型 Exendin-4 的 MALDI-MS/MS 谱图如图 5a) 所示。通过 MS/MS 检测到了在 N 末端生成的 c-ion 系列 (c9-c13) 及 16 Da 迁移的 c-离子 (c14-c29)。c14 离子 (用绿色显示) 是与含甲硫氨酸残基的氧化部位相对应的碎片离子。

在图 5b) 中对天然 (红线) 和氧化体 (蓝线) Exendin-4 的碎片离子 (m/z 1400-1650) 进行了比较。这里显示的碎片离子信号也表现出良好的同位素分离。

正如所期待的那样, c14 离子 (HGEGTFTSDLSKQME) 显示了与甲硫氨酸的氧化相对应的 16 Da 的质量迁移。Exendin-4 (Met-O) MS/MS 图谱的 Mascot 检索采用了先前创建的定制数据库, 并指定甲硫氨酸氧化为固定修饰, 其结果如图 5c) 所示, 获得了有效的 Mascot 得分。

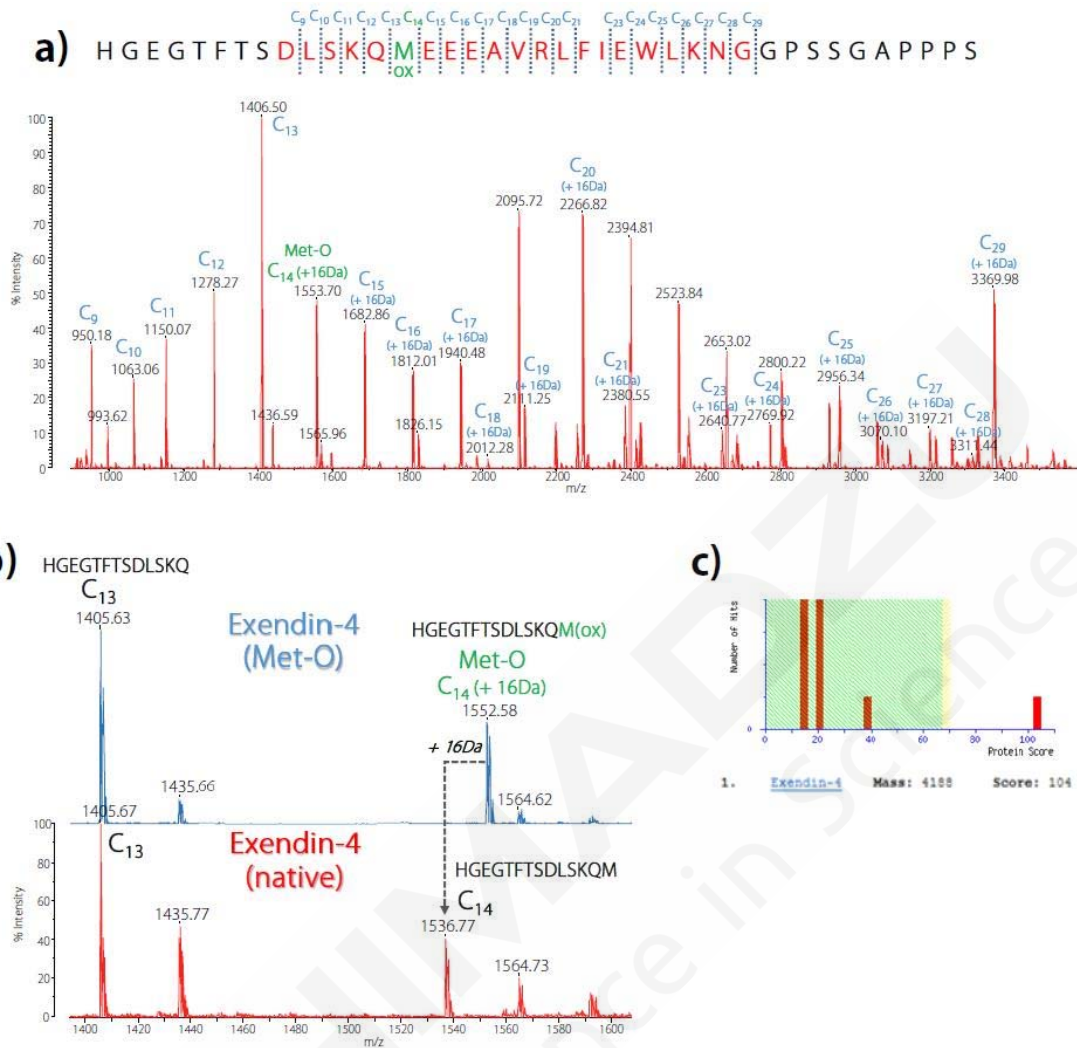


图 5 a) Exendin-4 (Met-O) 的 MALDI-MS/MS 谱图; b) 显示甲硫氨酸氧化导致质谱迁移的碎片离子 (c14) 的局部放大图; c) Exendin-4 (Met-O) 的 Mascot-MS/MS 得分

2.3 核酸类药物

核酸是由核苷酸单体聚合而成的生物大分子化合物，为生命的基本物质之一。核酸分为脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA），主要负责储存和传递遗传信息。核酸药物是具有特定碱基序列的药物，可以凭借其翻译或调控功能，治疗疾病。与小分子和抗体药物靶向蛋白质不同，核酸药物通常作用于蛋白质合成上游，即基因转录后、蛋白质翻译前的信使核糖核酸（mRNA）阶段，是一种从源头进行干预，抑制疾病相关基因表达为病理性蛋白，或引入能够表达正常蛋白的基因弥补功能蛋白的不足，“治标又治本”。此外，核酸药物还具有疗效显著、特异性强、开发周期短等优点，已经成为医药市场的热点，在治疗遗传性疾病、代谢疾病、肿瘤以及预防感染性疾病等领域有着巨大的潜力，被誉为继小分子化药和抗体药物后的新一代治疗药物。

核酸药物主要分为寡核苷酸和mRNA两大类。寡核苷酸药物是由十几个到几十个核苷酸组成的短链核酸，主要包括反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide, ASO）、小干扰核糖核酸（small interfering RNA, siRNA）、微小核糖核酸（microRNA, miRNA）、核酸适配体（aptamer）等。目前研究较多的是反义寡核苷酸（ASO）和小干扰RNA（siRNA），通过干预靶标基因表达来治疗疾病。mRNA是由几千个核苷酸组成的长链核酸，分为mRNA疫苗和mRNA药物。mRNA疫苗可在人体内表达抗原蛋白，诱导机体产生特异性免疫应答，达到预防免疫的作用。mRNA药物可以通过特定序列的mRNA，在病人体内细胞中生产需要的药物，如补偿缺少的基因或蛋白质，或转化成单克隆抗体、酶和细胞因子等蛋白质药物，从而实现治疗目的。

寡核苷酸药物通常经固相化学合成生产，mRNA疫苗通常通过基因工程生产，在开发和生产中均需要进行产品和工艺相关杂质的检测和评估，以保证药物质量可靠并且安全有效。寡核苷酸药物目前主要参照小分子药物质量研究的相关要求进行质量分析。mRNA疫苗质量评估已有一系列的指南可参考，例如国家药品监督管理局（NMPA）药品审评中心于2020年8月颁布的《新型冠状病毒预防用mRNA疫苗药学研究技术指导原则（试行）》和美国药典（USP）于2022年2月发布的“mRNA疫苗质量分析方法”指南草案。

MALDI-TOF MS在核酸药物的生产质控中发挥了重要作用。本节展示了应用MALDI-TOF MS快速检测寡核苷酸药物及其化学合成原料亚磷酰胺单体的分子量及杂质、对寡核苷酸药物的序列进行快速确认、对mRNA药物及mRNA疫苗的合成原料及mRNA加帽的帽子进行定性分析的例子。

寡核苷酸药物的分子量及杂质分析

摘要： MALDI-TOF 质谱技术具有前处理简单、分析速度快、分析质量范围宽、图谱简单易解析等优点，本文介绍了应用岛津台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 快速检测寡核苷酸药物的分子量及杂质的案例，该方法除直接测定样品精确分子量外，还可对可能含有的杂质情况进行监测。

关键词： MALDI-TOF 寡核苷酸 分子量 杂质

MALDI-TOF质谱技术因其前处理简单、分析速度快、检测通量高、分析质量范围宽、提供的分子量准确、图谱简单易解析等优点，被广泛用于蛋白质、多肽、核酸、聚合物等样品的分子量检测工作。传统的MALDI-TOF质谱仪体积较大、价格昂贵，限制了该类设备的普及。岛津台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020体积小、在线性正离子模式下与传统的MALDI-TOF质谱仪具有同等性能。该质谱仪配备了200 Hz的固态激光器和一个快速进样的负载锁定室，实现了样品的快速检测。

本文介绍了应用MALDI-8020快速测定寡核苷酸药物分子量及杂质的案例。取0.5 μL 样品溶液直接点在MALDI靶板上并在其上覆盖基质，使用MALDI-8020进行检测，最快几秒钟即可完成一份样品的检测分析，除精确分子量外，还可获得含有的杂质相关信息，结果直接可靠，可作为寡核苷酸药物合成快速质控的参考。

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

1.2 分析条件

调谐模式	： 线性正离子模式	激光能量	： 95
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)	： 8000

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为100 μM ，作为样品工作液。吸取0.5 μL 3-HPA基质溶液 (50 mg/mL)、0.5 μL 样品工作液依次点靶，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。

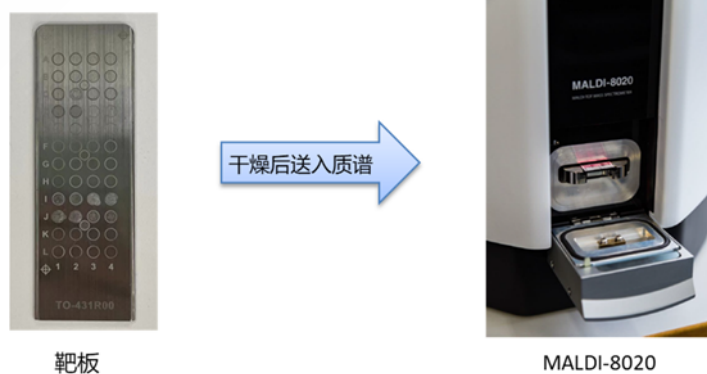


图 1 样品靶板及仪器样品室

2. 结果与讨论

2.1 单链 DNA 药物分子量及杂质检测

应用 MALDI-8020 对 4 份不同长度的单链 DNA 药物进行分子量检测，结果见图 2，样品的理论分子量及实测分子量见表 1。4 份样品均检测到寡核苷酸药物的带一个正电荷 $[M+H]^+$ 及带两个正电荷 $[M+2H]^{2+}$ 的离子形式，其中 $[M+H]^+$ 具有较高信号强度。质谱图信噪比良好，实测分子量与理论值一致。杂质方面，4 份样品均未检测到明显杂质。

表 1. 单链 DNA 药物分子量及杂质情况检测结果

样品链长	$[M+H]^+$ 理论值	$[M+H]^+$ 实测值	杂质检测情况
15nt	4553.05	4553.18	-
16nt	4882.26	4881.84	-
20nt	6118.06	6118.68	-
25nt	7667.06	7666.23	-

备注：“-”代表未检测到明显杂质

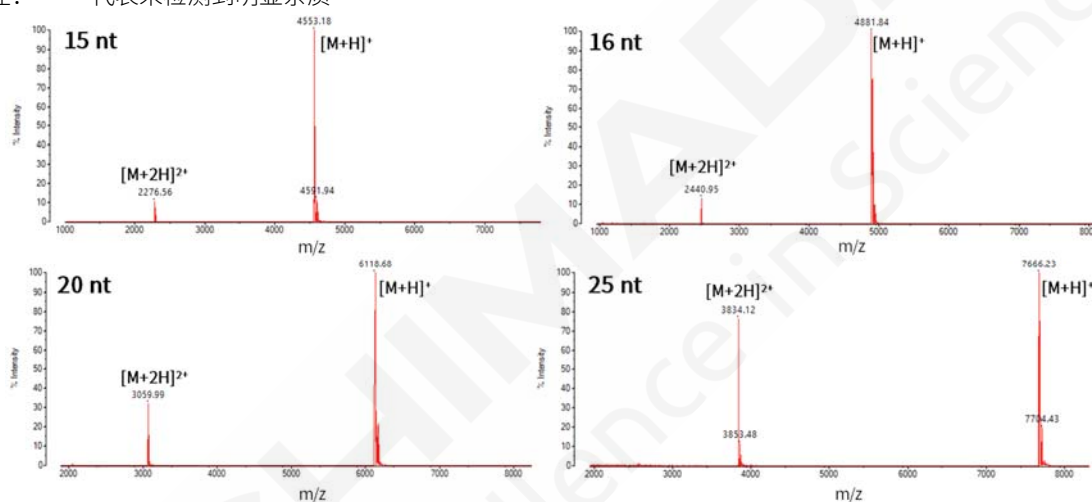


图 2 单链 DNA 药物的质谱图

2.2 单链 RNA 药物分子量及杂质检测

应用 MALDI-8020 对 4 份单链 RNA 药物进行分子量检测，结果见图 3，样品的理论分子量及实测分子量见表 2。4 份样品均检测到寡核苷酸药物的带一个正电荷 $[M+H]^+$ 及带两个正电荷 $[M+2H]^{2+}$ 的离子形式，其中 $[M+H]^+$ 具有较高信号强度。质谱图信噪比良好，实测分子量与理论值一致。

杂质方面，样品 S1 未检测到明显杂质信号；样品 S2 检测到微弱 m/z 5159.67 与 m/z 5464.81 信号；样品 S3 质谱图上检测到 m/z 3805.81、 m/z 4480.03、 m/z 4786.22、 m/z 5092.05 等多个质谱峰；样品 S4 检测到微弱 m/z 5678.67 信号。

表 2. 单链 RNA 药物分子量及杂质情况检测结果

名称	$[M+H]^+$ 理论值	$[M+H]^+$ 实测值	可能的杂质 (m/z)
S1	6299.00	6299.88	-
S2	5771.39	5770.92	5159.67, 5464.81
S3	6031.70	6031.60	3805.81、4480.03、4786.22、5092.054
S4	6008.66	6007.63	5678.67

备注：“-”代表未检测到明显杂质

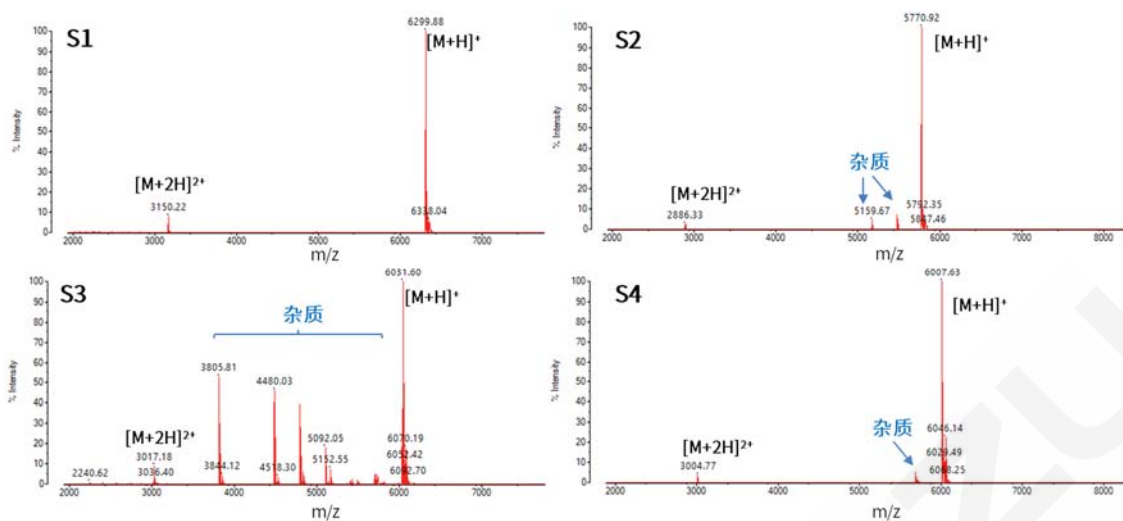


图 3 单链 RNA 药物的质谱图

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-8020 对 4 份不同长度的单链 DNA 药物及 4 份单链 RNA 药物进行分析，可以直接测定样品的精确分子量，并对杂质含有情况进行监测。本方法前处理简单，分析速度快，可以在几分钟时间内完成数十个样品的批量检测，结果直接、准确、可靠，可作为寡核苷酸药物合成快速质控的参考。

寡核苷酸化学合成原料亚磷酰胺单体的分子量及杂质检测

摘要：亚磷酰胺单体是寡核苷酸药物化学合成的关键物料，对亚磷酰胺单体进行分子量及杂质分析是寡核苷酸药物生产质量控制的重要内容。本文应用台式 MALDI-8030 分析了 16 种常见的亚磷酰胺单体，包括 8 种用于合成 DNA 的亚磷酰胺单体及 8 种用于合成 RNA 的亚磷酰胺单体，可以快速获得样品的精确分子量及杂质组成情况，为寡核苷酸药物化学合成物料的质量控制提供直接依据。

关键词： MALDI-TOF 亚磷酰胺单体 分子量 杂质

寡核苷酸药物的合成主要是在固相上进行的基于亚磷酰胺单体的四步化学合成法：脱保护、偶联、氧化和加帽。亚磷酰胺单体是寡核苷酸原料药的关键物料，符合质量要求的亚磷酰胺单体的供应是寡核苷酸药物商业化的关键因素。在实际应用中，亚磷酰胺单体会引入各种修饰以提高体内稳定性，但经过修饰后的分子结构变得复杂多样，杂质种类繁多，因此在质量控制上具有极大的挑战。对亚磷酰胺单体的分子量及杂质进行分析是寡核苷酸药物物料质控的重要内容。本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8030对16种常用的亚磷酰胺单体的分子量及杂质进行了分析，该方法操作简单、分析速度快、结果直观，可作为亚磷酰胺单体日常快速质控的参考。

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：40
激光器：355 nm 固态激光器 离子门限值：500
扫描范围：m/z 500-5000 脉冲引出质量(Da)：1800

1.3 样品前处理

表 1. 亚磷酰胺单体信息

序号	名称	简写	CAS	分子式	分子量 ^{mono} (Da)
1	DMT-dA(Bz)亚磷酰胺	DMT-dA	98796-53-3	C ₄₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ P	857.37
2	DMT-dC(bz)亚磷酰胺	DMT-dC	102212-98-6	C ₄₆ H ₅₂ N ₅ O ₈ P	833.36
3	DMT-dG(ib)亚磷酰胺	DMT-dG	93183-15-4	C ₄₄ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	839.38
4	DMT-dT 亚磷酰胺	DMT-dT	98796-51-1	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₈ P	744.33
5	DMT-2'-F-dA(Bz)亚磷酰胺	fdA	136834-22-5	C ₄₇ H ₅₁ FN ₇ O ₇ P	875.36
6	DMT-2'-F-dC 亚磷酰胺	fdC	159414-99-0	C ₄₁ H ₄₉ FN ₅ O ₈ P	789.33
7	DMT-2'-F-dG(iBu)亚磷酰胺	fdG	144089-97-4	C ₄₄ H ₅₃ FN ₇ O ₈ P	857.37
8	DMT-2'-F-dU 亚磷酰胺	fdU	146954-75-8	C ₃₉ H ₄₆ FN ₄ O ₈ P	748.30
9	DMT-2'-O-TBDMS-A(Bz)亚磷酰胺	rA	104992-55-4	C ₅₃ H ₆₆ N ₇ O ₈ PSi	987.45
10	DMT-2'-O-TBDMS-C(Ac)亚磷酰胺	rC	121058-88-6	C ₄₇ H ₆₄ N ₅ O ₉ PSi	901.42
11	DMT-2'-O-TBDMS-G(iBu)亚磷酰胺	rG	147201-04-5	C ₅₀ H ₆₈ N ₇ O ₉ PSi	969.46
12	DMT-2'-O-TBDMS-U 亚磷酰胺	rU	118362-03-1	C ₄₅ H ₆₁ N ₄ O ₉ PSi	860.39
13	DMT-2'-OMe-Bz-A 亚磷酰胺	OMe-A	110782-31-5	C ₄₈ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	887.38

14	DMT-2'-OMe-C(Ac)亚磷酰胺	OMe-C	199593-09-4	C ₄₂ H ₅₂ N ₅ O ₉ P	801.35
15	DMT-2'-OMe-G(ibu)亚磷酰胺	OMe-G	150780-67-9	C ₄₅ H ₅₆ N ₇ O ₉ P	869.39
16	DMT-2'-OMe-U 亚磷酰胺	OMe-U	110764-79-9	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₉ P	760.32

使用甲醇溶解以上样品，配制为1 mg/mL的样品工作液。取0.5 μ L NaTFA溶液 (1 mg/mL)、0.5 μ L样品工作液和1 μ L葱三酚基质溶液 (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。最快5-10秒钟完成一个样品的质谱图采集。

2. 结果与讨论

16种亚磷酰胺单体根据修饰类型的不同分为4组，质谱图见图1-图4。图1-图2为用于合成DNA的8种常见亚磷酰胺单体，图3-图4为用于合成RNA的8种常见亚磷酰胺单体。除fdU、DMT-dT、rU、OMe-U外，其他12种亚磷酰胺单体均检测到样品的加氢峰、加钠峰和加钾峰等三种离子加合形式，实测分子量与理论分子量一致，以加钠峰为例，测试误差在0.2 Da以内。fdU、DMT-dT、rU、OMe-U等4种亚磷酰胺单体检测到的离子加合峰为加钠峰、加钾峰两种，未检测到明显的加氢峰，这可能与化合物的性质有关。

各样品质谱图中主要的信号峰为亚磷酰胺单体的加合峰，但除此之外，每份亚磷酰胺单体均检测到少量杂质，杂质含量不等，样品亚磷酰胺单体和部分杂质的测试分子量信息见表2。

表 2. 16种亚磷酰胺单体测试结果统计

序号	简写	分子式	[M+Na] ⁺	[M+Na] ⁺	杂质 (m/z)
			理论	实测	
1	DMT-dA	C ₄₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ P	880.36	880.29	619.13、797.18、835.19、902.45等
2	DMT-dC	C ₄₆ H ₅₂ N ₅ O ₈ P	856.35	856.23	878.36、811.10、616.13、641.21等
3	DMT-dG	C ₄₄ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	862.37	862.25	884.33、780.33、801.99、901.64等
4	DMT-dT	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₈ P	767.32	767.26	684.18、692.29、722.28、805.40等
5	fdA	C ₄₇ H ₅₁ FN ₇ O ₇ P	898.35	898.25	920.42、892.19、853.23、637.59等
6	fdC	C ₄₁ H ₄₉ FN ₅ O ₈ P	812.32	812.21	914.43、729.06、967.52、612.12等
7	fdG	C ₄₄ H ₅₃ FN ₇ O ₈ P	880.36	880.28	902.37、797.10、819.19、918.37等
8	fdU	C ₃₉ H ₄₆ FN ₄ O ₈ P	771.29	771.17	793.23、929.19、809.23、687.95等
9	rA	C ₅₃ H ₆₆ N ₇ O ₈ P	1010.44	1010.38	927.28、749.36、965.35、1032.77等
10	rC	C ₄₇ H ₆₄ N ₅ O ₉ P	924.41	924.37	749.30、841.31、946.72、879.31等
11	rG	C ₅₀ H ₆₈ N ₇ O ₉ P	992.45	992.42	1014.53、1030.52、906.42、1147.72等
12	rU	C ₄₅ H ₆₁ N ₄ O ₉ P	883.38	883.32	838.28、905.51、749.30、921.55等
13	OMe-A	C ₄₈ H ₅₄ N ₇ O ₈ P	910.37	910.22	888.18、932.39、649.12、865.10等
14	OMe-C	C ₄₂ H ₅₂ N ₅ O ₉ P	824.34	824.34	649.24、741.26、779.22、846.46等
15	OMe-G	C ₄₅ H ₅₆ N ₇ O ₉ P	892.38	892.42	809.26、930.41、994.48、692.20等
16	OMe-U	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₉ P	783.31	783.26	700.11、821.34、738.23、692.14等

备注：以上分子量为单同位素分子量

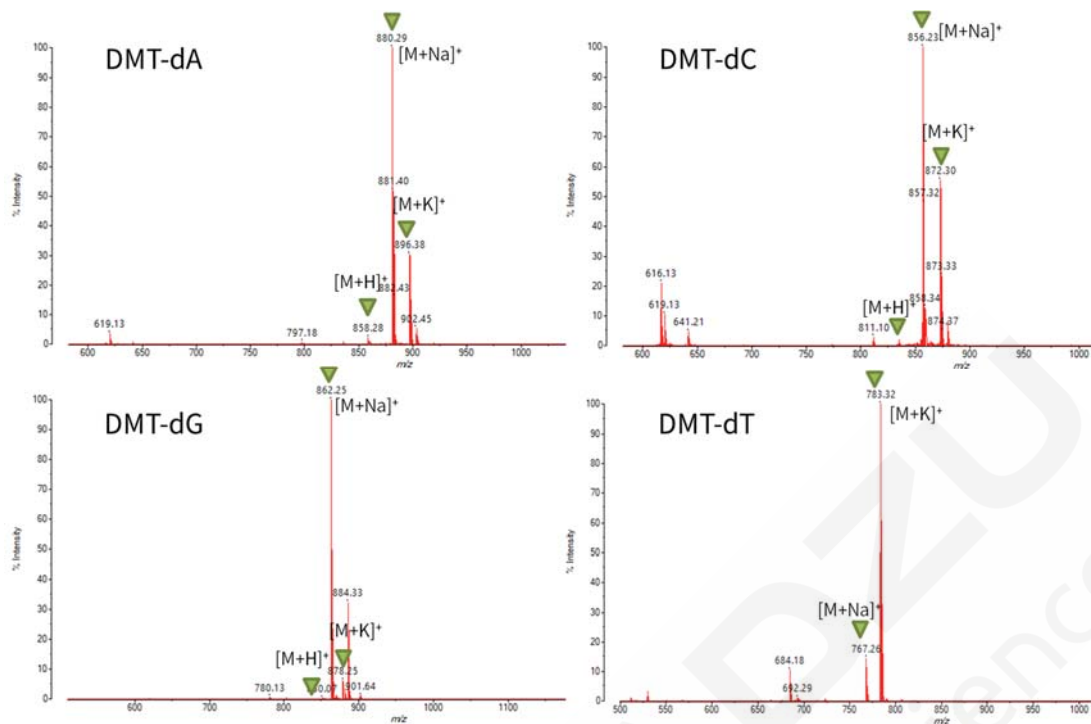


图 1 DMT-dA、DMT-dC、DMT-dG、DMT-dT 的质谱图

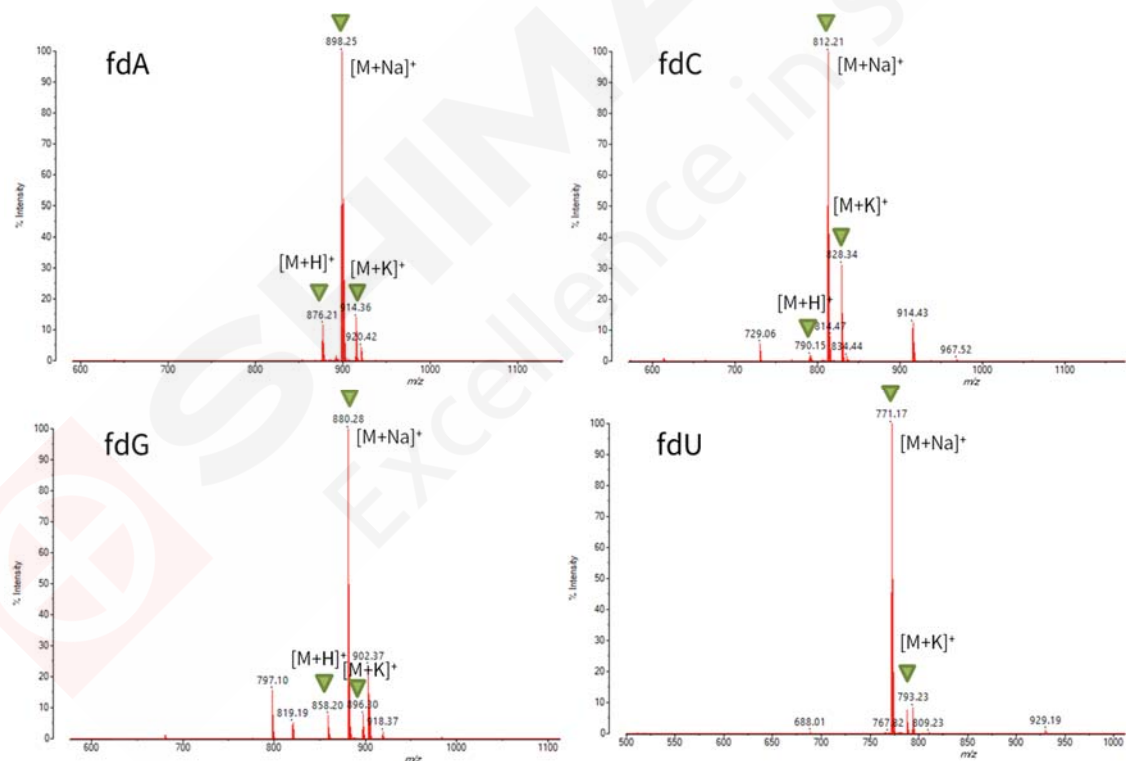


图 2 fdA、fdC、fdG、fdU 的质谱图

共转录加帽后 mRNA 的帽子端的定性分析

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 mRNA 加帽样品进行质谱分析, 可直接检测到样品中帽子的形式及相对含量, 表明台式 MALDI-8020 可以简便、快捷地对共转录加帽后的 mRNA 进行帽子端的分析, 为 mRNA 药物和疫苗的质量控制提供方法参考。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF mRNA 加帽

mRNA 药物和疫苗的生产流程包括质粒 DNA 的扩增纯化、mRNA 体外转录、体外修饰 (加帽、加尾)、脂质体包被等过程。mRNA 的帽结构能保护 mRNA 的 5' 端不被降解, 并能促使翻译的起始, 因此 mRNA 的加帽率是 mRNA 原液质控的重要标准之一。

mRNA 的帽子指 m⁷GPPPN 结构的甲基鸟苷帽子, 包括 cap0、cap1、cap2 三种形式。cap0 主要存在于单细胞生物中, 结构为 m⁷GPPPN (G 的第 7 位碳原子被甲基化); 如果 RNA 的第一位核苷酸的 2'-O 发生甲基化, 形成 m⁷GPPPNm 的结构, 则为 cap1, cap1 在真核生物中普遍存在; 如果 RNA 的第 1、2 位核苷酸的 2'-O 位均甲基化 (第 2 位必需是 A), 成为 m⁷G-PPPNmNm, 则为 cap2, cap2 的发生较少。常见的 mRNA 的加帽方法包括共转录加帽以及单独使用加帽酶进行转录后加帽两种。共转录加帽为一步法加帽, 在转录时加入帽子类似物, 可直接生成 cap1 的帽子结构。

本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对共转录加帽获取的 mRNA 进行了帽子端的分析。

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

1.2 分析条件

调谐模式: 线性正离子模式

扫描范围: m/z 5000-10000

激光器: 355 nm 固态激光器

激光能量: 135

1.3 样品前处理

将 mRNA 按照标准前处理流程, 将含有帽子结构的 5' 端核苷酸序列进行酶解和纯化, 得到待分析的样品溶液。吸取 1 μL 样品溶液和 1 μL 3-HPA (3-羟基吡啶甲酸) 基质溶液 (50 mg/mL) 依次点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

对两份处理好的 mRNA 样品应用 MALDI-8020 进行质谱检测, 质谱图见图 1-图 2。质谱图中均观测到 cap1 离子峰, 质荷比约 7678, 与理论值 (m/z 7678.6) 一致, 未检测到 uncap (m/z 7384.5) 的离子峰, 表明 mRNA 样品的加帽效率非常高, 不含 uncap 或者 uncap 的含量低于 MALDI 的检测限。同时, 未检测到 cap0 (m/z 7664.6), 与样品中帽子的结构形式为 cap1, 不含 cap0 一致。检测结果统计见表 1。

除帽子外, 样品中还检测到探针的离子峰 (m/z 8086), 为前处理过程中引入。另外, 还检测到 m/z 6238、m/z 7938 等离子峰, 可能是样品在前处理环节产生的杂质。两份样品质谱图中离子分布模式相似, 平行性较好, 表明加帽及酶切等前处理实验环节重复性较好、质谱检测稳定可靠。

表 1. mRNA 加帽样品检测结果

帽子	[M+H] ⁺ 理论值	样品 1 检测值	样品 2 检测值
uncap	7384.5	-	-
cap0	7664.6	-	-
cap1	7678.6	7678.0	7677.8

cap1 序列: m7GpppmAGGAAAUAGAGAGAAAACUCU, 平均分子质量 7677.6 Da。

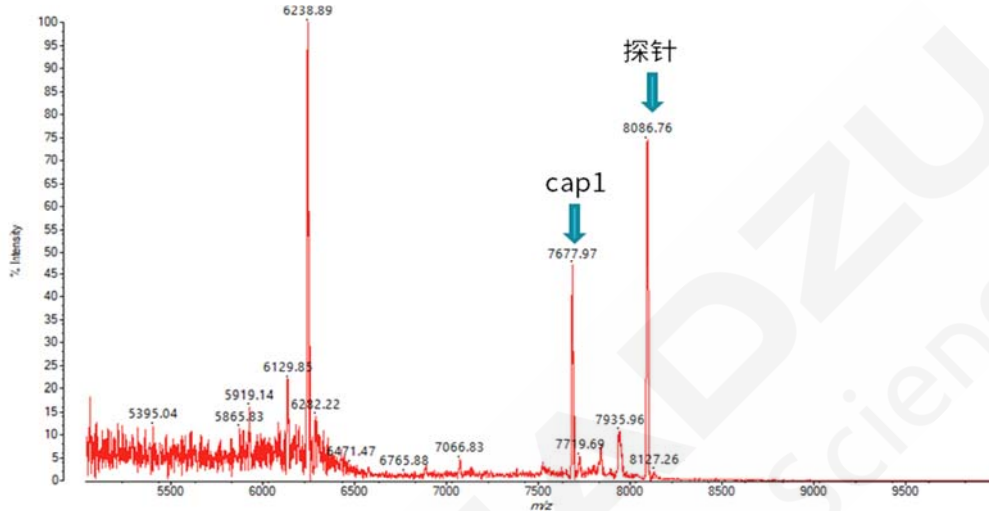


图 1 mRNA 样品 1 质谱图

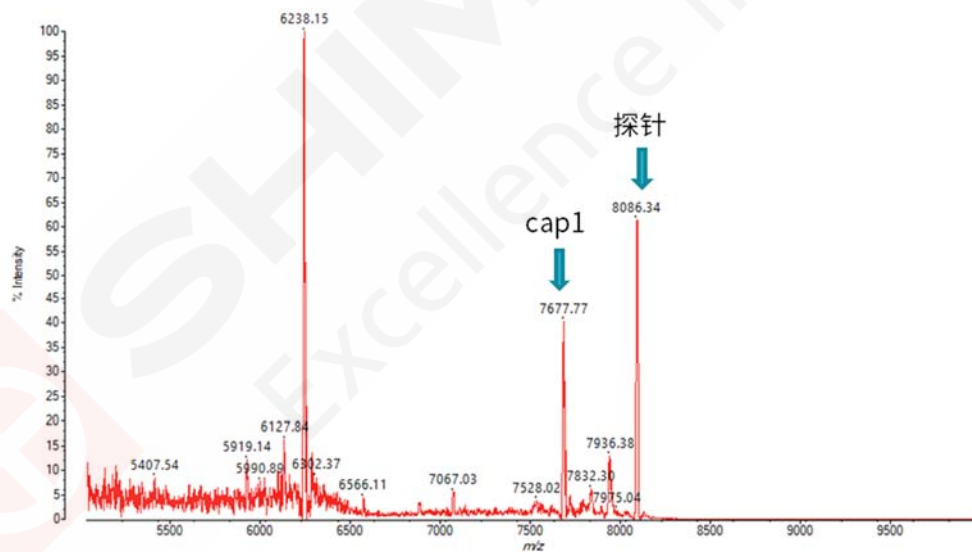


图 2 mRNA 样品 2 质谱图

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-8020 对共转录加帽后的 mRNA 样品进行帽子端的分析, 可直接检测到样品中帽子的形式及相对含量。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 有望在 mRNA 药物和疫苗生产质控方面有更加广泛的应用。

mRNA 酶法加帽反应产物的定性分析

摘要: 本文使用岛津双极性台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱MALDI-8030对酶法加帽反应后mRNA加帽产物进行质谱分析, 4个mRNA样品均成功检出目标离子峰, 并根据分子量推断出mRNA的加帽类型, 与理论相符。分析过程具有前处理流程简单、分析成本低、结果准确可靠的特点。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF mRNA 加帽

随着COVID-19在全球肆虐, mRNA疫苗和疗法成为生物医药研发领域中的“新星”。mRNA疫苗可将编码抗原的mRNA通过递送系统引入体内合成蛋白从而触发免疫应答。mRNA疗法也逐渐用于多种疾病的治疗。然而, mRNA需要递送至病患的靶向器官并有效生成蛋白质, 才能发挥功能。

为保证mRNA的递送和蛋白质的有效生成, 通常在构建体的5'端进行加上帽子结构。帽子结构, 指在真核生物中转录后修饰形成的成熟mRNA在5'端的一个特殊结构。根据甲基化程度不同可形成3种类型的帽子: CAP 0型、CAP 1型和CAP 2型。mRNA工艺生产中通常采用酶法加帽和共转录加帽2种方式进行加帽。帽子结构可以防止mRNA的降解并促进mRNA的翻译。检测mRNA加帽率是mRNA生产工艺质量分析的关键指标。

MALDI-8030是岛津MALDI家族最新型号台式机, 极性双全, 正负离子模式快速切换, 领先的负离子模式分辨率, 在核酸分析方面具有明显优势。本文应用MALDI-8030的负离子模式对酶法加帽mRNA产物进行了加帽类型定性分析, 成功检出目标离子峰并推断出mRNA产物的加帽类型。

1. 实验部分

1.1 仪器

双极性台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-8030。

1.2 试剂与样品

基质: 3-羟基-2-吡啶甲酸 (3-HPA)。

样品: 酶法加帽反应后的 mRNA 样品信息如表 1。

表 1 样品信息表

样品名称	理论加帽类型
样品 1	UNCAP
样品 2	CAP 0
样品 3	CAP 1
样品 4	CAP 0 和 CAP 1

1.3 分析条件

调谐模式: 线性负离子模式

扫描范围: m/z 6000-10000

激光器: 355 nm 固态激光器

激光能量: 80-100

1.4 样品前处理

将酶法加帽反应后的mRNA作为待分析的样品溶液。取1 μ L样品溶液点样到靶板, 自然晾干后, 再取1 μ L 3-HPA (3-羟基-2-吡啶甲酸) 基质溶液 (浓度为40 mg/mL) 覆盖在样品上, 自然晾干后将靶板送入仪器分析。

2. 结果与讨论

4 个 mRNA 样品包含的加帽类型有 3 种 (UNCAP 型、CAP 0 型和 CAP 1 型), 不同加帽类型对应的理论分子量不同, 具体分子量信息如表 2。因此可根据质谱实测分子量的差异对不同的加帽类型进行区分。

表 2 不同加帽类型的理论分子量信息

加帽类型	理论分子量	[M-H] ⁻ 理论值
UNCAP	7883.71	7882.70
CAP 0	8165.98	8164.97
CAP 1	8179.98	8178.97

使用 MALDI-8030 对 4 个 mRNA 样品进行检测, 样品的质谱分析结果汇总如表 3。质谱图见图 1-图 4。样品 1 检测到目标离子峰 m/z 7882.25, 对应表 2 中 UNCAP 型的 [M-H]⁻ 离子峰。样品 2 检测到目标离子峰 m/z 8164.89, 对应表 2 中 CAP 0 型的 [M-H]⁻ 离子峰。样品 3 检测到目标离子峰 m/z 8178.35, 对应表 2 中 CAP 1 型的 [M-H]⁻ 离子峰。样品 4 检测到 2 个目标离子峰 m/z 8164.86 和 m/z 8178.64, 分别对应表 2 中 CAP 0 型和 CAP 1 型的 [M-H]⁻ 离子峰。4 个样品加帽类型分析结果均与理论值 (表 1) 相符。

此外, 样品 3 和样品 4 除目标峰外, 还分别检测到 m/z 7807.55、 m/z 7807.99 离子峰, 可能为 mRNA 酶法加帽反应过程中产生的中间产物。

表 3 mRNA 样品质谱分析结果

样品名称	目标峰实测值	加帽形式推断结果
样品 1	7882.25	UNCAP
样品 2	8164.89	CAP 0
样品 3	8178.35	CAP 1
样品 4	8164.86 和 8178.64	CAP 0 和 CAP 1

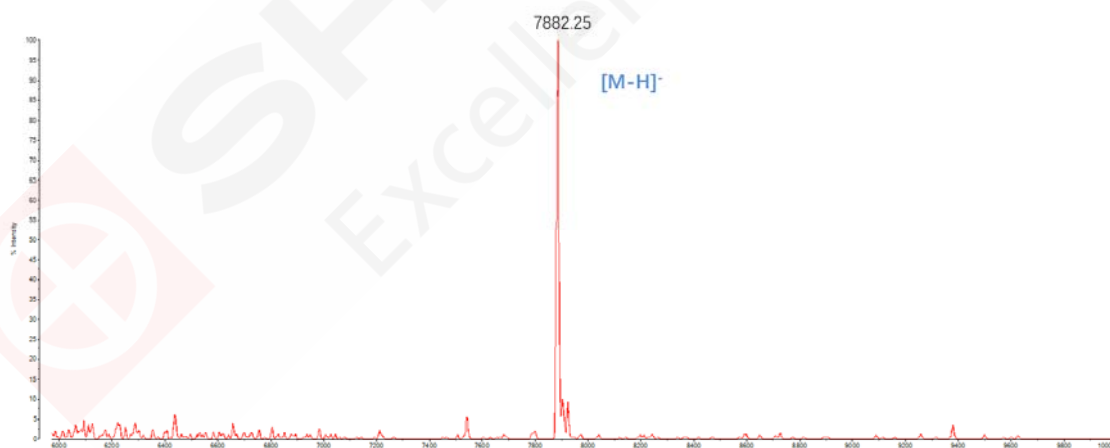


图 1 mRNA 样品 1 质谱图

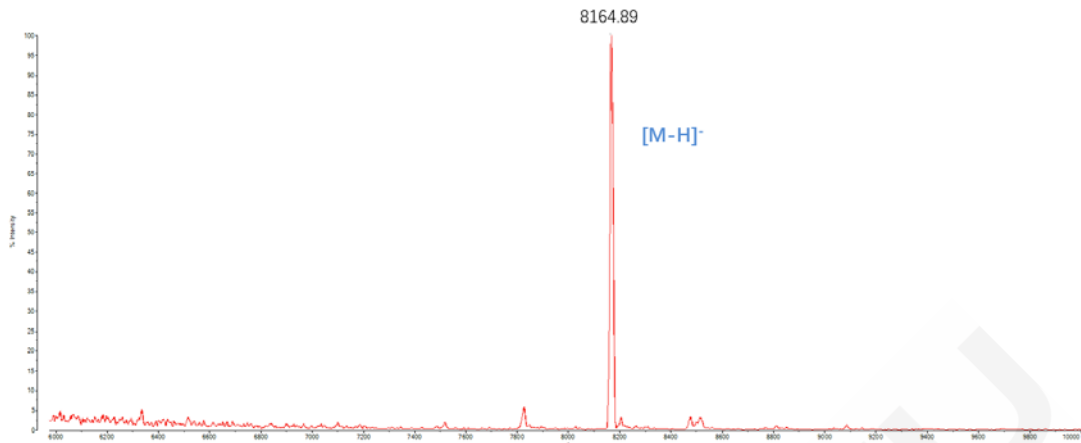


图 2 mRNA 样品 2 质谱图

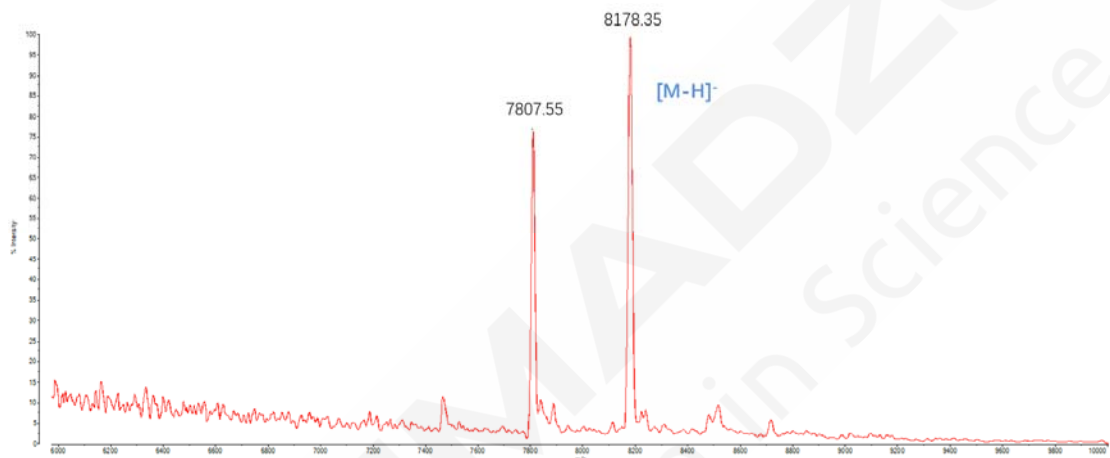


图 3 mRNA 样品 3 质谱图

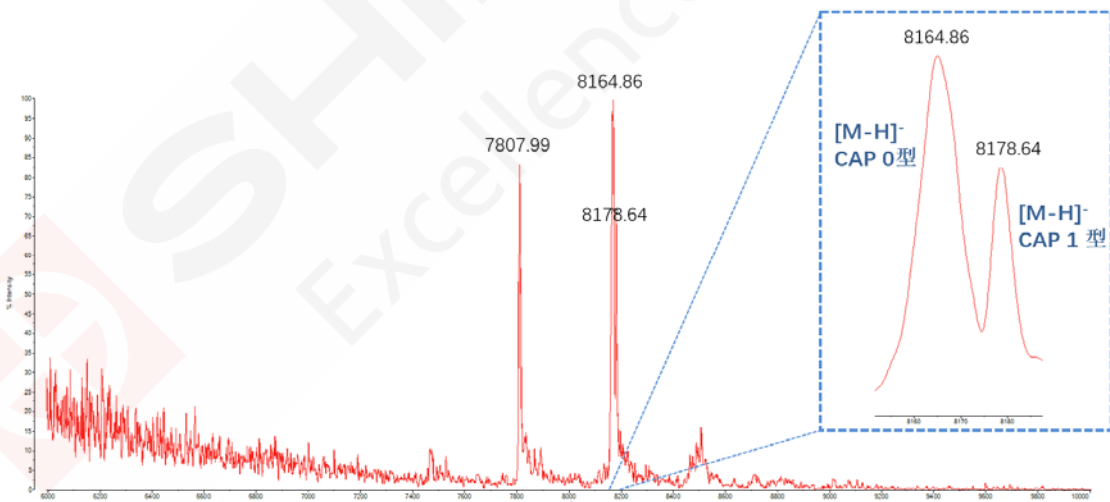


图 4 mRNA 样品 4 质谱图

3. 结论

本文使用双极性台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱MALDI-8030对酶法加帽反应后mRNA加帽产物进行定性分析，可直接检测到目标离子峰并根据分子量推断出mRNA加帽类型。本方法简便快捷、结果准确可靠，为mRNA生产制造过程中的加帽分析提供一种新的思路，为mRNA疫苗和mRNA药物的生产质量控制提供方法参考。

mRNA 和 DNA 生产用核苷酸原料的分子量及组成分析

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 mRNA 和 DNA 生产所用的 NTP 和 dNTP 原料进行质谱分析，可直接检测到核苷酸原料的分子量及组成形式。本方法操作简便、分析速度快，结果直接可靠，为 mRNA 和 DNA 生产相关原料的质量控制提供了参考。

关键词： MALDI-TOF mRNA DNA 原料 NTP dNTP

mRNA和DNA生产过程中需要用到多种核苷酸类原料。例如，mRNA生产时，体外转录的直接原料为NTP（ATP、UTP、CTP、GTP），DNA聚合酶生产DNA时的直接原料为dNTP（dATP、dTTP、dCTP、dGTP）。核苷酸原料的检测与分析是mRNA和DNA生产物料质控的重要一环。

本文应用台式MALDI-TOF质谱仪MALDI-8020对NTP、dNTP原料进行了分析，直接检测到了原料的分子量及分子组成形式。该检测方法无需复杂的样品前处理、操作简单、分析速度快，检测通量高，结果直接可靠，可作为核酸原料质控的日常检测手段。

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

1.2 分析条件

调谐模式	： 线性正离子模式	激光能量	： 75-80
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门限值	： 300
扫描范围	： m/z 300-2000	脉冲引出质量(Da)	： 1500

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为100 μ M，作为样品工作液。吸取0.5 μ L NaTFA溶液（1 mg/mL）、1 μ L DHB基质溶液（30 mg/mL）、0.5 μ L样品工作液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 mRNA 体外转录原料 NTP 分子量及组成分析

应用 MALDI-8020 对 mRNA 体外转录原料 ATP、GTP、CTP、UTP 进行检测，结果见图 2，核苷酸的分子式、理论分子量、实测分子量见表 1。以图 2A 为例，ATP 检测到 m/z 530.12、m/z 552.16、m/z 574.13、m/z 596.11 的离子峰，依次对应 ATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式^[1,2]，可能为 ATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地，GTP、CTP、UTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式，结果见表 1 及图 2。除核苷酸目标峰外，样品还检测到基质背景峰，如 m/z 551。

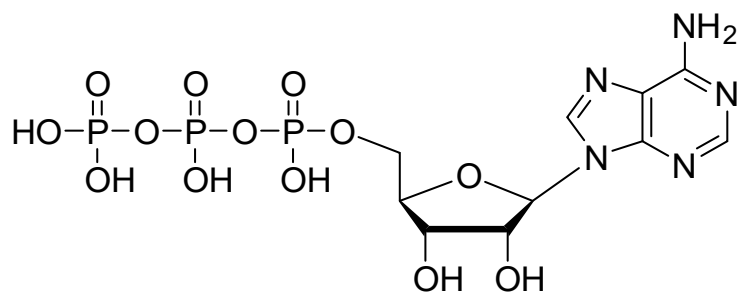


图 1 ATP（三磷酸腺苷）结构式（核苷酸结构式示例）

表1 NTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+Na]^+_{mono}$		$[M+2Na-H]^+_{mono}$		$[M+3Na-2H]^+_{mono}$		$[M+4Na-3H]^+_{mono}$	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	529.99	530.12	551.97	552.16	573.95	574.13	595.93	596.11
GTP	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	545.98	546.15	567.96	568.10	589.94	590.08	611.93	612.05
CTP	$C_9H_{16}N_3O_{14}P_3$	505.97	506.12	527.96	527.94	549.94	549.83	571.92	571.88
UTP	$C_9H_{15}N_2O_{15}P_3$	506.96	507.02	528.94	528.85	550.92	550.93	572.90	--

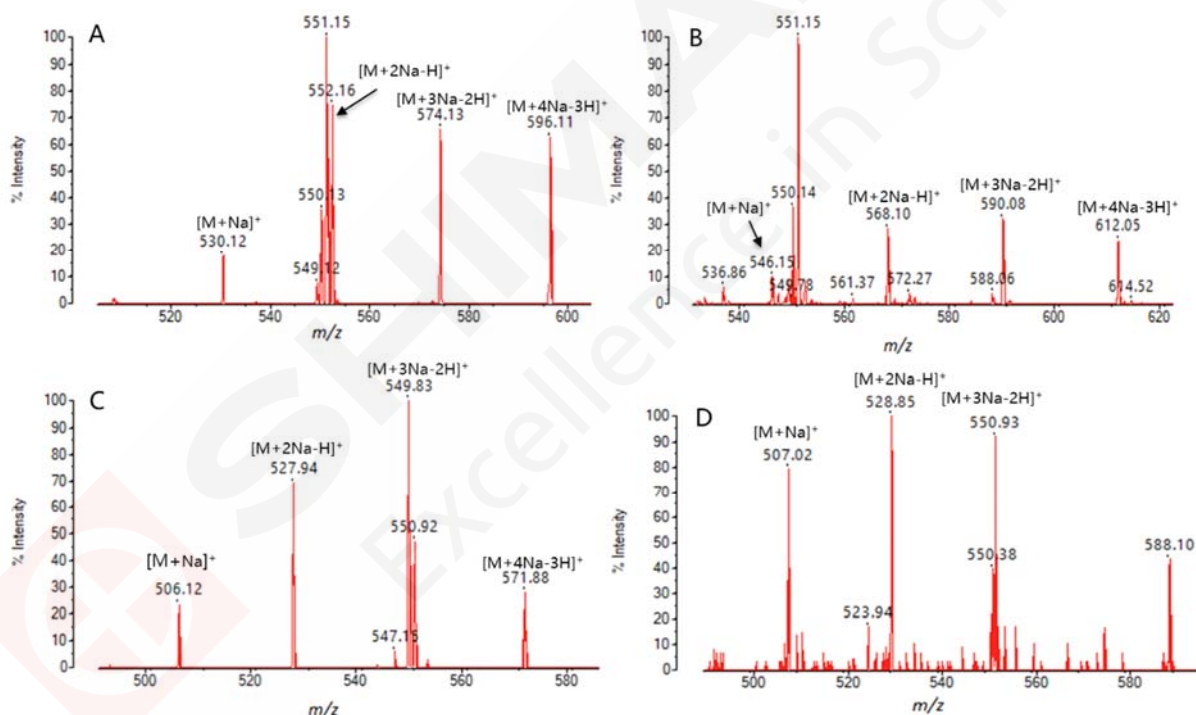


图 2 RNA 药物生产原料 NTP 一级质谱图 (A: ATP, B: GTP, C: CTP, D: UTP)

注: m/z 551 为基质背景峰

2.2 聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dNTP 分子量及分析

应用 MALDI-8020 对聚合酶链式反应生产 DNA 药物原料 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 进行检测, 结果见图 3。如图 3A 所示, dATP 检测到 m/z 514.16、 m/z 536.04、 m/z 558.03、 m/z 579.99 的离子峰, 依次对应 dATP 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+3Na-2H]^+$ 以及 $[M+4Na-3H]^+$ 的化合物形式, 可能为 dATP 中三磷酸基团上 H 离子被 Na 离子部分或全部取代后的产物。同样地, dGTP、dCTP、dTTP 也依次检测到了结合 1-4 个 Na 离子的化合物离子形式, 结果见表 2 及图 3。

表2 dNTP分子式及分子量检测结果

名称	分子式	[M+Na] ⁺ _{mono}		[M+2Na-H] ⁺ _{mono}		[M+3Na-2H] ⁺ _{mono}		[M+4Na-3H] ⁺ _{mono}	
		理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值
dATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₂ P ₃	513.99	514.16	535.97	536.04	557.95	558.03	579.94	579.99
dGTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	529.99	530.08	551.97	552.09	573.95	574.04	595.93	596.04
dCTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₃ P ₃	489.98	489.98	511.96	511.98	533.94	533.90	555.93	555.95
dTTP	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₁₄ P ₃	504.98	505.23	526.96	526.98	548.94	548.91	570.92	570.95

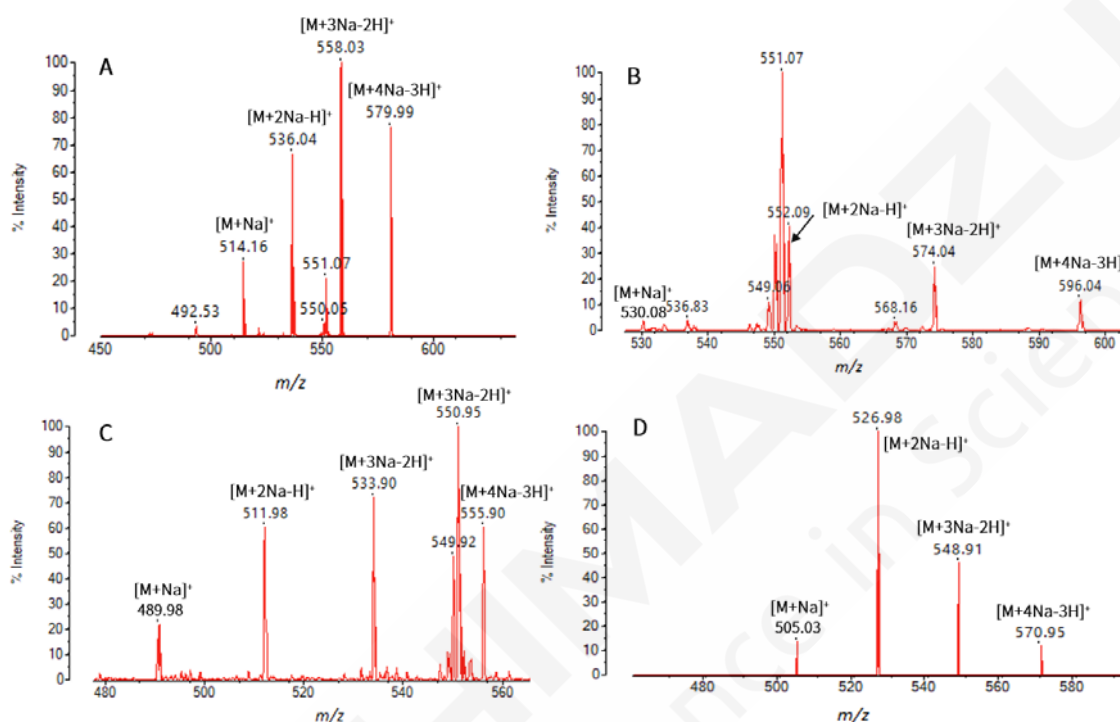


图3 DNA 药物生产原料 dNTP 一级质谱图(A: dATP, B: dGTP, C: dCTP, D: dTTP)

注: m/z 551 为基质背景峰

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 mRNA 体外转录原料 NTP 以及 DNA 原料 dNTP 进行了分析, 所有原料均检测到了显著的加钠峰, 可以对结果进行快速确证。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 有望在 mRNA 体外转录原料和 DNA 原料质控方面有更加广泛的应用。

[参考文献]

- Eric Largy, Alexander König, Anirban Ghosh, Debasmita Ghosh, Sanae Benabou, Frédéric Rosu, and Valérie Gabelica. Mass Spectrometry of Nucleic Acid Noncovalent Complexes. *Chemical Reviews*. 2022, 122, 7720-7839
- Noah P. Christian, Steven M. Colby, Lori Giver, Chris T. Houston, Randy J. Arnold, Andrew D. Ellington and James P. Reilly. High Resolution Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Analysis of Single-stranded DNA of 27 to 68 Nucleotides in Length. *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*, 1995, VOL. 9,1061-1066

ASO 药物福米韦生的核苷酸序列分析

摘要：核苷酸序列的确认是寡核苷酸药物生产质控中非常重要的环节，本文介绍了应用台式双极性基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 快速测定反义寡核苷酸 (ASO) 药物福米韦生的核苷酸序列的案例，通过对 ISD (源内裂解) 产生的 a 离子与 w 离子进行分析，实现核苷酸序列的确认。该方法操作简便，图谱简单易解析。

关键词： MALDI-TOF 寡核苷酸 ISD 序列

反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 是一类通过碱基互补原理特异性结合靶基因 DNA 或 mRNA 而抑制基因表达，在基因水平上调控细胞生长、分化的药物，也是目前获批药物数量最多的一类寡核苷酸药物。在寡核苷酸药物合成的质量控制中，核苷酸序列的确认是非常重要的环节。本文以全球获批的第一个反义寡核苷酸药物-福米韦生 (Fomivirsen) 为例，展示了应用台式双极性基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 MALDI-8030 快速测定寡核苷酸药物核苷酸序列的案例。本方法基于 MALDI-TOF MS 源内裂解 (ISD) 的碎裂方式，通过简单提高激光能量，即可实现寡核苷酸的源内裂解，并倾向生成 a 离子与 w 离子。与 CID (碰撞诱导解离) 相比，MALDI-ISD 产生的图谱更加简单，易于解析。

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	： 线性负离子模式	激光能量	： 110
激光器	： 355 nm 固态激光器	离子门阈值	： 500
扫描范围	： m/z 500-10000	脉冲引出质量 (Da)	： 10000

1.3 样品前处理

取样品加水稀释为 100 μM ，作为样品工作液。吸取 0.5 μL 3-HPA 基质溶液 (50 mg/mL)、0.5 μL 样品工作液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

福米韦生 (fomivirsen, ISIS2922) 是 FDA 批准上市的第 1 个反义药物，由 21 个硫代脱氧核苷酸组成。应用 MALDI-8030 在负离子模式下对福米韦生进行分析，以 3-HPA 为基质，通过提高质谱采集的激光能量，实现寡核苷酸药物的源内裂解 (ISD)，结果见图 2。寡核苷酸经源内裂解后，倾向产生 a 离子与 w 离子 (图 1)，质谱图上观测到规律性分布的 a 系列离子与 w 系列离子，除 5'-末端的 a1、a2 与 3'-末端的 w1 等与基质干扰信号重叠的离子外，检测到其他全部 a 离子与 w 离子，并与核苷酸序列正确匹配。除 a 离子与 w 离子外，样品还检测到未裂解的福米韦生带一个负电荷 [M-H]⁻ 及带两个负电荷 [M-2H]²⁻ 的离子形式，质谱图信噪比良好，实测分子量与理论值一致。以上结果表明，应用 MALDI-8030 的负离子模式，可轻松实现合成寡核苷酸的分子量确认，并可通过 ISD 碎片 a 离子与 w 离子的匹配快速确认核苷酸序列。

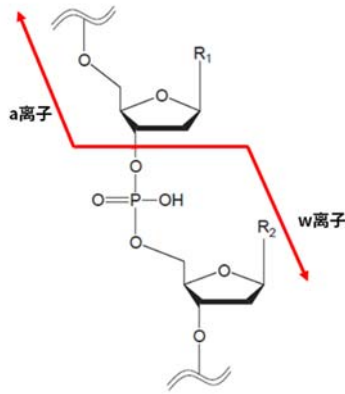


图1 合成寡核苷酸负离子模式下的ISD裂解位点

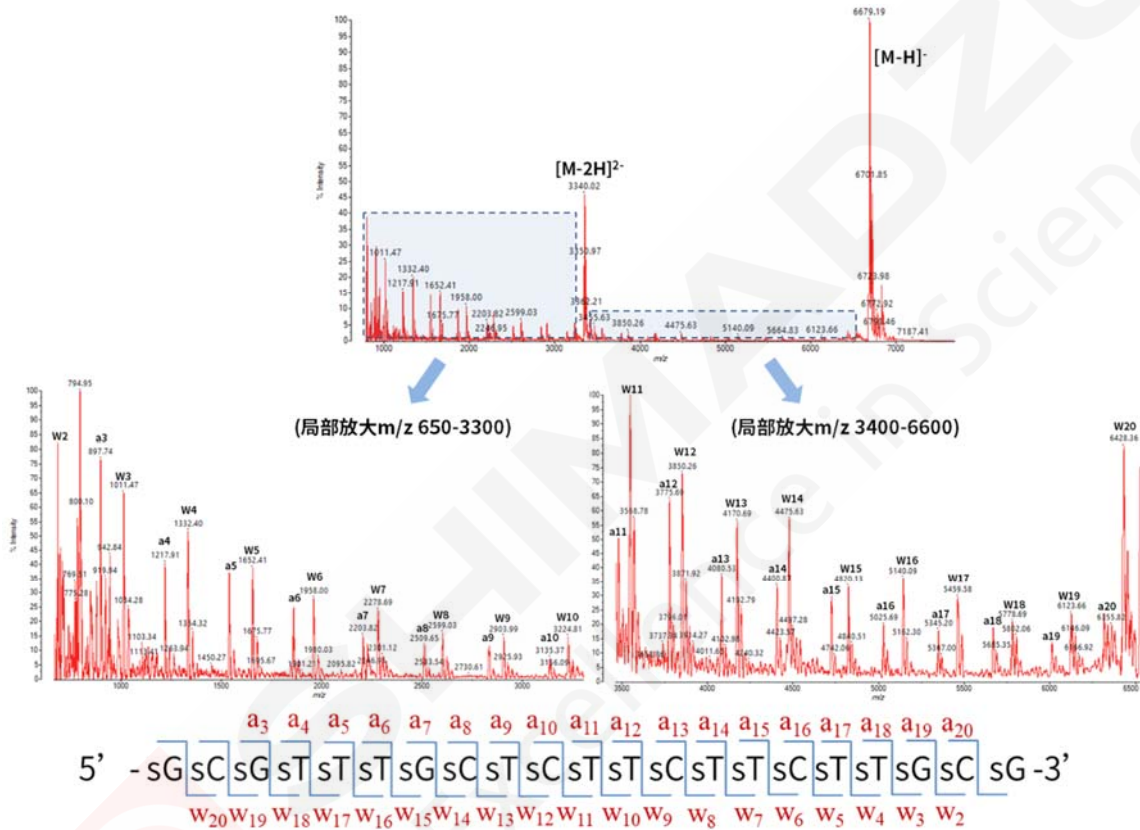


图2 福米韦生的ISD质谱图及a离子、w离子的归属（注：核苷酸序列中的s代表硫代修饰）

3. 结论

本文应用台式双极性基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8030 在负离子模式下通过源内裂解方式分析 ASO 药物福米韦生，可轻松测定药物的分子量，并通过质谱图中 a 离子、w 离子与核苷酸序列的匹配，实现合成寡核苷酸药物序列的快速确认。本方法前处理简单，图谱简单易解析，可作为合成寡核苷酸药物质量控制中序列分析的参考。

肽核酸(PNA)的分子量检测

基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF MS) , 因其简单的前处理方法和准确的分子量信息得到好评。本款 MALDI-TOF MS 在品质管理以及研究开发领域中对肽核酸 (PNA) 寡聚体的合成支援和合成品确认是非常有效的。本文介绍了应用台式 MALDI-TOF MS 分析 3 种 PNA 的例子。

肽核酸 (PNA) 是模拟 DNA 的人工合成聚合物, DNA 的核酸碱基 (A/G/C/T) 没有改变, 只是用肽结构取代了主链的脱氧核糖和磷酸基团的部分 (图 1)。主链的结构, n-(2-aminoethyl) glycyI 单元是由一个酰胺结合的, 带有中性电荷以及光惰性的, 不同于带负电荷糖磷酸为主链的 DNA。

由于电荷状态的不同, PNA 强烈地结合到互补的 DNA/RNA 序列。与 DNA 相比, PNA 的重要作用在于具有较强的结合力以及杂交特性。因此, PNA 在分子诊断和研究领域中广泛被应用, 比如, 单核苷酸多态性 (SNP) 检测, 荧光原位杂交 (FISH) 和分子生物传感器等技术。

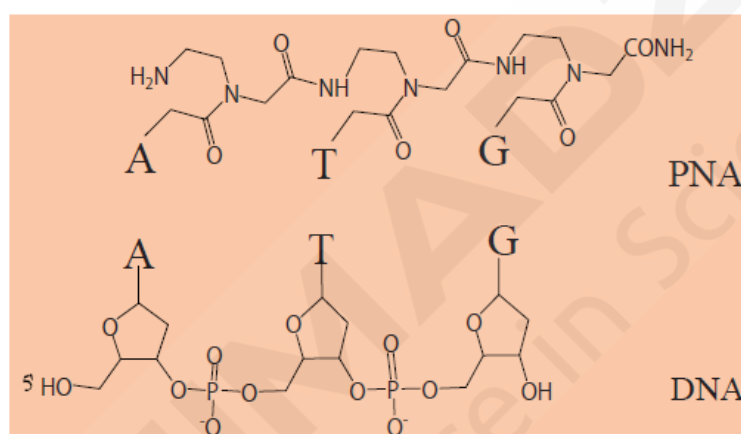


图 1 比较 PNA 和 DNA 的主链结构

这些应用中, 具有序列特异性和生物稳定性的 PNA, 被用作一种高选择性的分子探针, 在一个碱基突变以及相关的遗传疾病中辨别 “几乎相同但只是几个不同的序列”。另外, PNA 也有可能作为反义药物 (anti-sense drugs) 应用于治疗人体免疫缺陷病毒 (艾滋病病毒; HIV-1)。

1. 材料与方法

PNA 样品由 DestiNA Genomica S.L. (Spain) 公司提供。样品溶液 (4-15 $\mu\text{mol/L}$, 0.1% TFA 水溶液) 和基质溶液等量点在 MALDI 的不锈钢靶板上, 干燥后进行检测。基质使用 α -氰-4-羟基肉桂酸 (CHCA、5 mg/mL) 或者芥子酸 (SA、20 mg/mL), 溶解于乙腈/0.1% TFA 水溶液=1/1。质谱分析使用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020”, 根据表 1 的参数进行检测。

表 1 MALDI 质谱仪数据采集参数

Tuning	linear
Polarity	positive
Mass range	100-12000 Da
Laser rep. rate	200 Hz
Accumulation rate (shots/profile)	50
Profiles	200
Sampling method	Dither

2. 结果

PNA 样品 A 的质谱图如 (图 2 上) 所示。包括 Base Peak 在内的同位素簇中单同位素峰的测定值为 m/z 4510.9, 在放大图上可看出同位素峰分离的非常好。虽然是在线性模式下检测, 但分辨率充分满足了要求 (>8000 FWHM)。同时还举了分子量更大的 PNA 的检测例子, 样品 B 和样品 C 的质谱图如 (图 2 下) 所示。

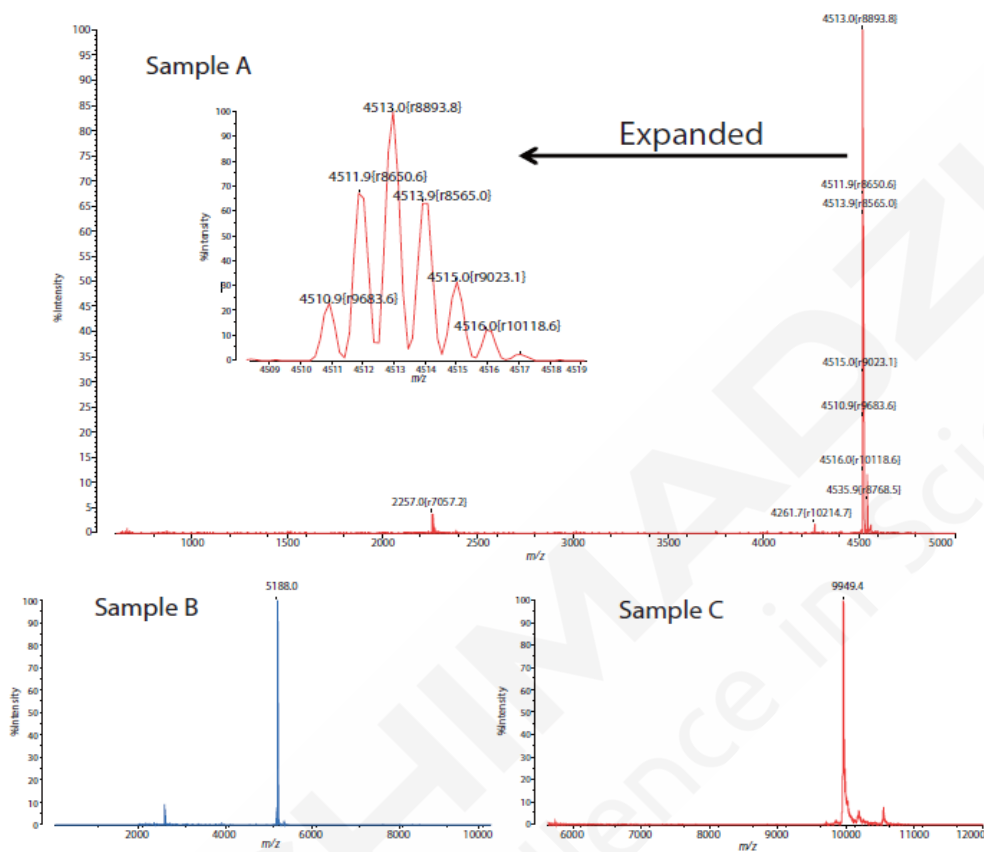


图 2 台式 MALDI-TOF MS 应用于 PNA 分析例

样品 A (2pmol, 基质 CHCA) 的分析结果表明, 在线性模式下也能检测到 >8000 FWHM 的高分辨率。样品 B / 样品 C (5.5 pmol / 7.5 pmol, 基质 SA) 的高分子量区域的分析结果用平均分子量标记。

2.4 药用辅料

药用辅料是指在制剂处方设计时，为解决制剂的成型性、有效性、稳定性、安全性加入处方中除主药以外的一切药用物料的统称，具有赋形、充当载体、提高稳定性、增溶、助溶、缓控释等重要功能。药用辅料不仅赋予药物一定剂型，充当药物制剂的基础材料和重要组成部分，也对提高药物的疗效、降低不良反应有重要影响，与药物的临床疗效、生物利用度、毒副作用等密切相关。因此，生物制品制造过程中所使用的原辅材料的质量是实现药品安全、高效的基础，对制品的安全性和稳定性有直接的影响。

为保证药用辅料的安全，加强药用辅料的质量控制，我国自1953年第一版《中国药典》收载药用辅料品种开始，至2020年版药典将药用辅料按制剂用途、辅料作用和给药途径共分三类，收录药用辅料335种，修订212种，我国对药用辅料监管的重视程度不断提高，在产品研制、生产、使用、检验、监督管理以及流通等环节要求更加严格。2020年版《中国药典》三部在人用聚乙二醇化重组蛋白及多肽制品总论中，推荐使用MALDI-TOF-MS及其他方法对聚乙二醇的分子量及多分散性进行测定。随着MALDI-TOF质谱仪的普及，将有更多的聚合物类辅料成分以及非聚合物类成分使用MALDI-TOF-MS方法进行分析。

为迎合国家药用辅料质量与管理要求，岛津发挥产品技术优势，不断推进新技术、新产品应用，助力加快推进药用辅料行业高质量发展。本章节介绍了应用MALDI-TOF-MS对聚乙二醇、乙交酯丙交酯共聚物、吐温、mRNA递送系统脂质纳米粒原料进行质控的例子。

mRNA 药物递送基质 DMG-PEG2000 的分子量分布及组成分析

摘要：本文应用岛津台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 mRNA 药物及疫苗生产所用的脂质纳米粒 (LNPs) 成分 DMG-PEG2000 进行质谱分析，可直接检测到不同来源原料样品的分子量分布及组成信息。本方法操作简便、分析速度快，结果直接可靠，为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料的质量控制提供了参考。

关键词： MALDI-TOF 脂质纳米粒 DMG-PEG2000 分子量

脂质纳米粒 (LNPs) 是目前 mRNA 药物和疫苗研究应用最多的递送系统，通常由辅助性中性脂质，胆固醇，PEG 修饰脂质，阳离子脂质四种成分组成。LNP 组装时，PEG 修饰脂质位于脂质纳米粒表面，它的疏水端与阳离子脂质的疏水端结合，亲水端 (PEG 链) 则向外形成脂质纳米粒的保护性外壳，可以阻止血清蛋白吸附和单核吞噬细胞系统的摄取，延长了体内的循环时间，同时防止 LNP 颗粒聚集，提高 LNP 的稳定性。常用的 PEG 修饰脂质包括 DMG-PEG2000，DSPE-mPEG2000 等，其中 DMG-PEG2000 (1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇2000) 随着新冠肺炎 mRNA 疫苗的火热研制而迅速蹿红。

不同来源的 DMG-PEG2000 原料样品的分子量分布可能有所不同，而这些分子组成上细小的变化可能会造成 LNP 形态及 mRNA 包裹效果的差异，最终对 mRNA 药物和疫苗的有效性 & 作用发挥的稳定性产生影响。因此，对作为 LNP 主要原料的 DMG-PEG2000 的分子量分布进行监测，保证原料批次间的一致性与稳定性，对保障 mRNA 药物临床效果的有效性 & 稳定性具有重要意义。

本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 5 份不同来源的 DMG-PEG2000 原料样品的分子量组成进行检测，结合聚合物分析软件 Polymerix，获得了各原料样品的分子量信息，确认了样品间分子量组成差异的存在。该检测方法操作简单、分析速度快，结果直接可靠，可作为核酸药物和疫苗 PEG 类辅料质控的参考。

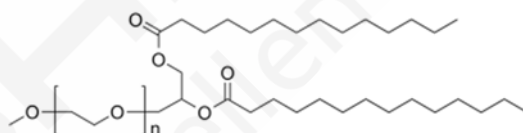


图 1 DMG-PEG2000 的结构式

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-8020

1.2 分析条件

调谐模式	: 线性正离子模式	激光能量	: 80
激光器	: 355 nm 固态激光器	离子门阈值	: 500
扫描范围	: m/z 500-10000	脉冲引出质量 (Da)	: 2500

1.3 样品前处理

将称取好的样品使用甲醇溶解，配制为 1 mg/mL 的样品溶液。取 0.2 μ L NaTFA 溶液、1 μ L 样品溶液和 1 μ L 萘三酚基质溶液依次点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

应用 MALDI-8020 对 5 份不同来源的 DMG-PEG2000 原料进行检测，质谱图见图 2。由图可见，样品在 m/z 1800-3300 范围内检测到一系列分子量依次相差 44 Da 的聚合物离子峰。使用聚合物软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析样品，分析结果示例见图 3，样品由两个离子峰系列组成，主峰系列 (S1) 的化学式为 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_n \cdot Na$ ，副峰系列 (S2) 的化学式为 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_n \cdot K$ ，分别对应 DMG-PEG2000 (分子式 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_n$) 的钠离子与钾离子加合峰。Polymerix 软件自动计算得到的数均分子量 M_n 、重均分子量 M_w 、质均分子量 M_z 、多分散度 PD、聚合度 DP 等相关信息见表 1，5 份样品的分子量分布存在一定差异。

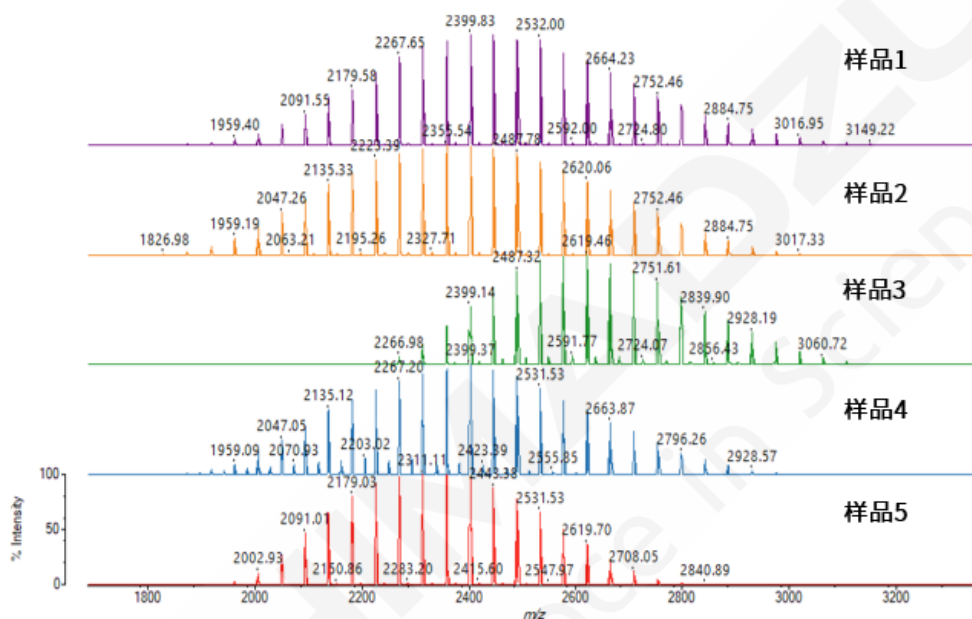


图 2 DMG-PEG 样品质谱图

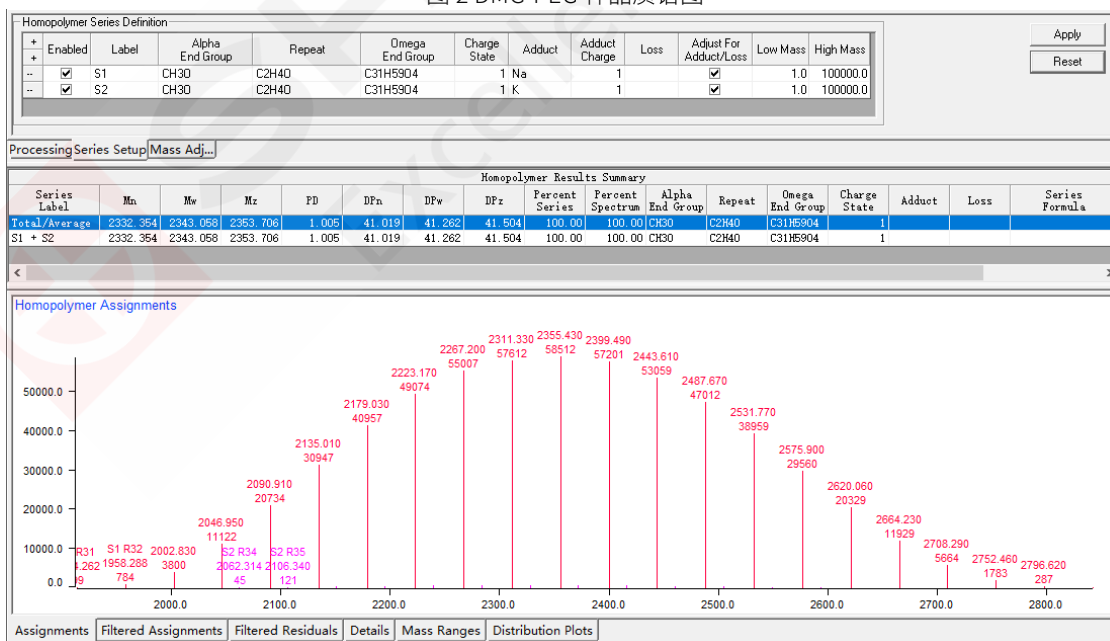


图 3 Polymerix 分析界面示例 (样品 5)

表 1 样品分子量统计信息 (分析软件: Polymerix)

名称	M _n	M _w	M _z	PD	DP _n	DP _w	DP _z
样品 1	2462.05	2480.54	2498.95	1.008	43.97	44.39	44.80
样品 2	2390.19	2409.59	2428.78	1.008	42.33	42.77	43.21
样品 3	2610.60	2620.92	2631.28	1.004	47.34	47.57	47.81
样品 4	2391.86	2407.48	2422.98	1.007	42.37	42.73	43.08
样品 5	2332.35	2343.07	2353.71	1.005	41.02	41.26	41.50

将样品质谱图局部放大 (图 4), 可以观察到样品 1、2、3、5 均由 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_n$ 的钠离子与钾离子加合峰组成, 样品 4 检测到比 S1 依次大 24 Da 的离子峰, 表明样品中可能存在端基结构与主峰不同的聚合物形式, 该聚合物形式也可能是主成分一定程度的降解产物。

由以上结果可知, 每种样品的 PEG 组成成分有所不同, 而这些成分上的差异可能会对 LNP 形态及 mRNA 药物包裹的效果造成影响, 因此, 对 DMG-PEG2000 的分子量分布及组成进行监测是 mRNA 药物和疫苗生产重要的质量控制依据。

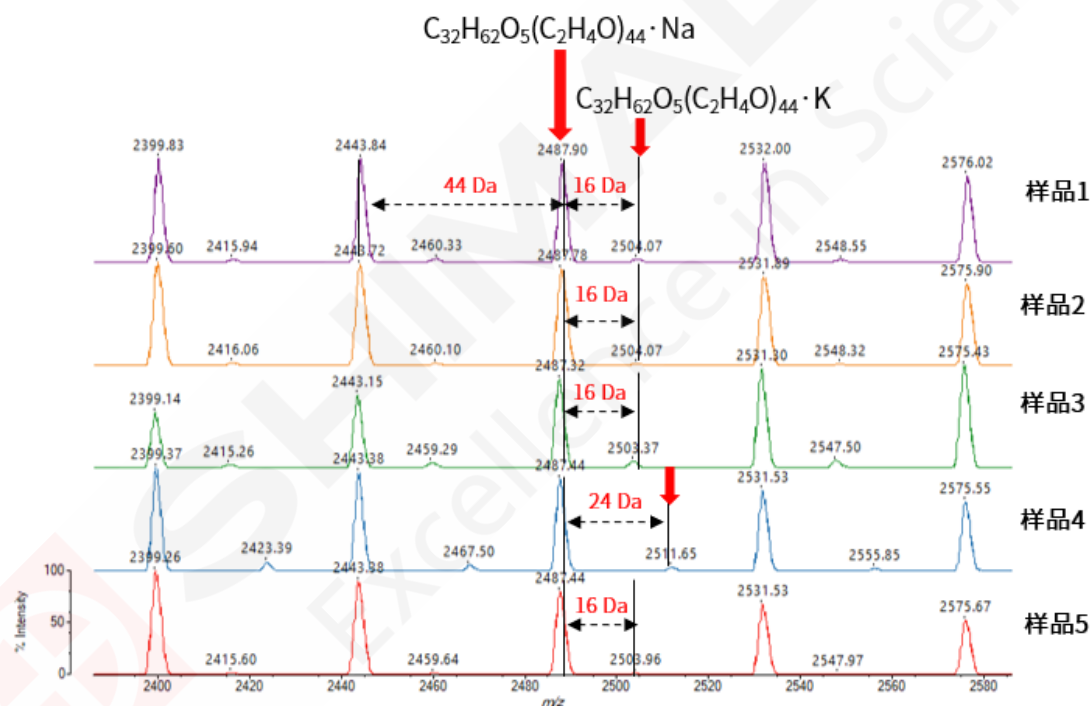


图 4 DMG-PEG 样品质谱局部放大图

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-8020 检测了 5 份不同来源的 DMG-PEG2000 原料样品, 得到了具体的分子量分布及组成信息, 为 DMG-PEG2000 的质量控制提供了依据。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快, 结果直接、准确、可靠, 可作为 mRNA 药物及疫苗递送介质中 PEG 类原料质控的参考。

mRNA 药物递送系统脂质纳米粒的原料分子量检测

摘要：本文应用岛津台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对 mRNA 药物及疫苗生产所用的脂质纳米粒 (LNPs) 的四种原料 (可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇和 PEG 修饰脂质) 进行质谱分析, 可以快速检测原料样品的分子量及组成信息。本方法操作简便、分析速度快, 结果直接可靠, 为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料的质量控制提供了参考。

关键词： MALDI-TOF 脂质纳米粒 原料 分子量

脂质纳米粒 (LNPs) 是目前 mRNA 药物和疫苗研究应用最多的递送系统, 也可用于递送寡核苷酸药物, 通常由可电离脂质、胆固醇、中性辅助脂质和 PEG 修饰脂质四种成分组成。可电离脂质的头部氨基在酸性条件下会质子化并带正电荷, 这使其对 RNA 有很强的包载能力, 增强体内逃逸。胆固醇常作为 LNP 配方的结构脂质, 可以增强 LNP 的稳定性, 介导 LNP 内吞, 并有利于确保 LNP 的双层结构及脂质的流动性。辅助性中性脂质一般为饱和磷脂, 可以自发地组织形成脂质双层。PEG 修饰脂质位于脂质纳米粒表面, 其亲水端 (PEG 链) 向外形成脂质纳米粒的保护性外壳, 可以阻止血清蛋白吸附和单核吞噬细胞系统的摄取, 同时防止 LNP 颗粒聚集, 提高 LNP 的稳定性。

不同供应商的 LNPs 原料质量不一, 原料质量的细小变化可能会造成 LNP 形态及 mRNA 包裹效果的差异, 最终对 mRNA 药物和疫苗的有效性及其作用发挥的稳定性产生影响。因此, 对作为 LNPs 主要原料的分子量进行监测, 保证原料批次间的一致性与稳定性, 对保障 mRNA 药物临床效果的有效性及其稳定性具有重要意义。本文应用台式 MALDI-TOF 质谱仪 MALDI-8020 对可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 与 SM-102、中性辅助脂质 DSPC、胆固醇、PEG 修饰脂质 DMG-PEG2000 等 5 种 LNPs 常见的原料样品进行分子量检测, 同时可以对样品的纯度进行确认, 可作为核酸药物和疫苗辅料质控的参考。

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

1.2 分析条件

调谐模式	: 线性正离子模式	激光能量	: 70-80
激光器	: 355 nm 固态激光器	离子门阈值	: 300
扫描范围	: m/z 300-4000	脉冲引出质量 (Da)	: 1800

1.3 样品前处理

称取样品使用甲醇溶解, 配制为 1 mg/mL 的样品溶液。取 0.5 μ L NaTFA 溶液 (1 mg/mL)、1 μ L 样品溶液和 1 μ L 基质溶液 (30 mg/mL) 依次点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。各样品对应的基质信息见下表。

表 1 各样品对应的基质及辅助盐信息

样品	Dlin-MC3-DMA	SM-102	Cholesterol	DSPC	DMG-PEG2000
基质	DHB	DHB	9-AA	DHB	葱三酚
盐	NaTFA	NaTFA	-	NaTFA	NaTFA

2. 结果与讨论

2.1 可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇分子量检测

应用 MALDI-8020 检测可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 与 SM-102、中性辅助脂质 DSPC、结构脂质胆固醇的分子量，结果如图 1 所示，分子量检测信息见表 2。

图 1A 为可电离脂质 Dlin-MC3-DMA 的质谱图，样品检测到 m/z 642.51、 m/z 690.47 的离子峰，其中 m/z 642.51 为 Dlin-MC3-DMA 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 642.62)， m/z 690.47 推测为杂质。

图 1B 为可电离脂质 SM-102 的质谱图，样品检测到 m/z 710.55 的离子峰，对应 SM-102 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 710.67)。

图 1C 为中性辅助脂质 DSPC 的质谱图，样品检测到 m/z 790.56 与 m/z 1580.22 的离子峰，前者对应 DSPC 的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 790.63)，后者对应 DSPC 的二聚体加氢峰 ($[2M+H]^+$ ，理论值为 m/z 1580.26)。

图 1D 为胆固醇的质谱图，样品检测到 m/z 387.28 的离子峰，对应胆固醇的加氢峰 ($[M+H]^+$ ，理论值为 m/z 387.36)。样品整体纯度较好，质谱图上杂质峰较少。

表 2 样品分子式及分子量检测结果

名称	分子式	$[M+H]^+$ mono 理论值	实测值 (m/z)
Dlin-MC3-DMA	$C_{43}H_{79}NO_2$	642.62	642.51
SM-102	$C_{44}H_{87}NO_5$	710.67	710.55
DSPC	$C_{44}H_{88}NO_8P$	790.63	790.56
胆固醇	$C_{27}H_{46}O$	387.35	387.28

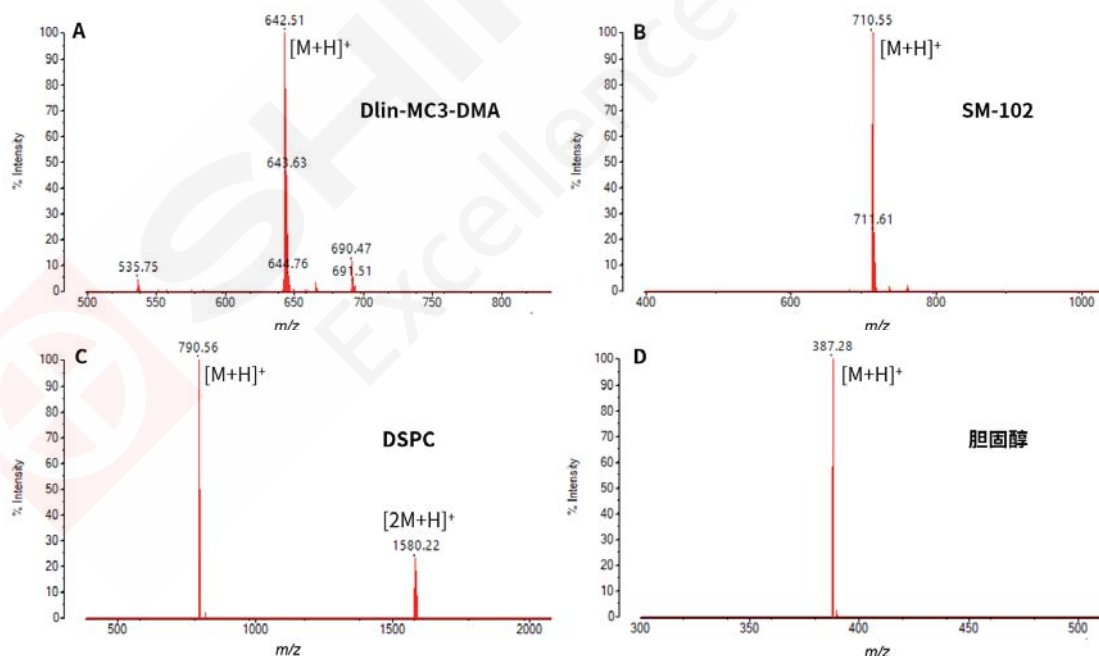


图 1 样品检测质谱图. A: Dlin-MC3-DMA; B: SM-102; C: DSPC; D: 胆固醇

2.2 PEG修饰脂质DMG-PEG2000分子量检测

应用 MALDI-8020 对 PEG 修饰脂质 DMG-PEG2000 原料进行检测，质谱图见图 2。由图可见，样品在 m/z 1900-3100 范围内检测到一系列分子量依次相差 44 Da 的聚合物离子峰。使用聚合物软件 Polymerix (Sierra Analytics) 分析样品，分析结果示例见图 3，样品化学式为 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_nNa$ ，对应 DMG-PEG2000

(分子式 $C_{32}H_{62}O_5(C_2H_4O)_n$) 的钠离子加合峰。Polymerix 软件自动计算得到的数均分子量 M_n 、重均分子量 M_w 、质均分子量 M_z 、多分散度 PD、聚合度 DP 等相关信息见图 3。

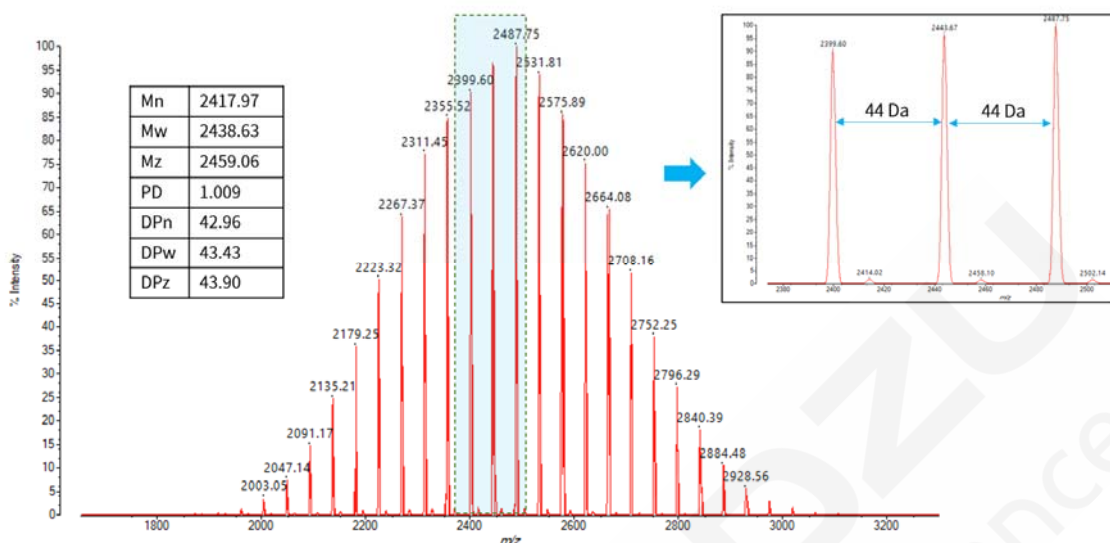


图 2 DMG-PEG2000 样品质谱图

Monopolymer Results Summary																
Series Label	M_n	M_w	M_z	PD	DPn	DPw	DPz	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/Average	2417.966	2438.629	2459.058	1.009	42.963	43.433	43.897	100.00	100.00	CH3O	C2940	C31H59O4	1 Na			CH3O [C2940] _n C31H59O4 + Na
S1	2417.966	2438.629	2459.058	1.009	42.963	43.433	43.897	100.00	100.00	CH3O	C2940	C31H59O4	1 Na			CH3O [C2940] _n C31H59O4 + Na

图3 Polymerix软件分析结果

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 检测了 4 类不同类型的 LNPs 原料样品，包括可电离脂质、中性辅助脂质、胆固醇与中性辅助脂质，得到了具体的分子量分布及组成信息，为 LNPs 原料的质量控制提供了依据。本方法操作简单、检测成本低、分析速度快，结果直接、准确、可靠，可作为 mRNA 药物及疫苗递送介质原料质控的参考。

PEG6000 的分子量及分布分析

摘要：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）是进行聚合物分子量检测及结构分析的常用手段之一，它可以快速给出聚合物的质量分布，单体结构等信息，并可以有效对聚合物的端基结构进行分析。本文使用岛津台式 MALDI-TOF MS，以葱三酚为基质，分析聚乙二醇 6000（PEG6000），得到了分子量的分布及单体结构信息。

关键词：台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF 聚乙二醇 分子量

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）具有简单、快速获取从低分子到高分子各种样品的分子量信息的优点，广泛应用于研究开发以及质量控制领域中各种合成材料及天然产物的分子量测定，聚合物的分子量测定及结构分析便是其典型应用之一。

MALDI-8020 是岛津的台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有体积紧凑（长 0.45 米宽 0.745 米高 1.055 米）、分析速度快（200 Hz 355 nm 固态激光器采集）、仪器维护方便（True Clean 自动 UV 激光源清洗）和软件满足 21 CFR Part 11 合规性的特点。本文以葱三酚为基质，应用 MALDI-8020 及聚合物分析软件 Polymerix（Sierra Analytics）分析了常用药用辅料聚乙二醇 6000（PEG6000）的分子量分布及单体信息，可作为聚合物样品分析时的参考。

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

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 1000-10000

激光器：355 nm 固态激光器

激光能量：90

1.3. 样品前处理

取样品加水溶解，配成 5 mg/mL 的样品工作液。取 1 μ L 的样品溶液和 1 μ L 葱三酚基质溶液（10 mg/mL，溶剂为四氢呋喃）点靶，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

PEG6000 的质谱检测结果如图 1 所示。样品检测到聚合物离子峰系列，相邻聚合单元分子量相差 44 Da，其中信号强度较高的离子峰系列的分子量分布与结构式 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 相符，另外一个离子峰系列信号强度较低，聚合单元比另一系列的相邻聚合单元大 28 Da，可能两者端基结构有所不同。样品的分子量分布信息由聚合物软件 Polymerix（Sierra Analytics）分析计算。Polymerix 软件分析结果见图 2。

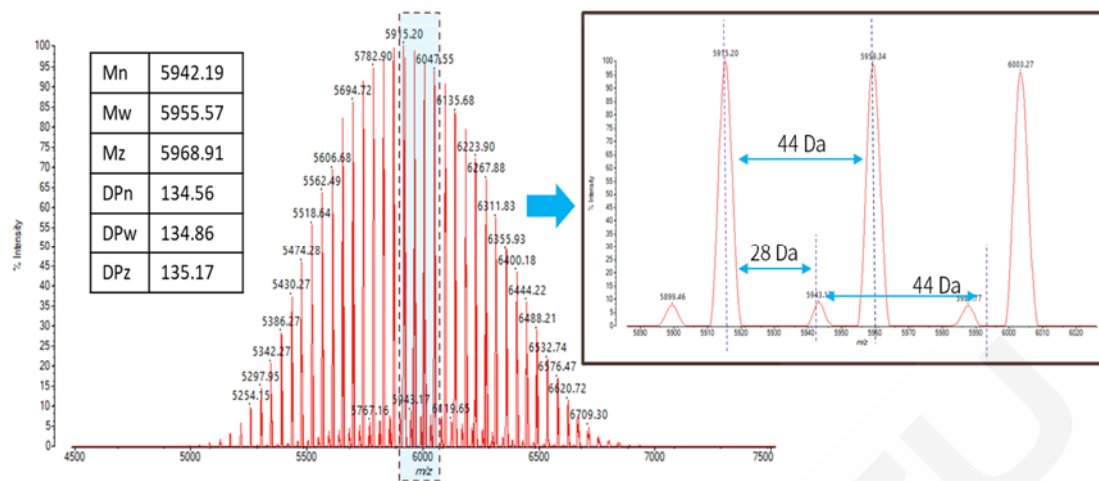


图 1 PEG6000 的一级质谱图

Homopolymer Results Summary																
Series Label	Mn	Mw	Mz	PD	DPn	DPw	DPz	Percent Series	Percent Spectrum	Alpha End Group	Repeat	Omega End Group	Charge State	Adduct	Loss	Series Formula
Total/A	5942.191	5955.566	5968.905	1.002	134.560	134.864	135.167	100.00	99.37	OH	C2H4O	H	1	H		OH [C2H4O] _n H + H
S1	5942.191	5955.566	5968.905	1.002	134.560	134.864	135.167	100.00	99.37	OH	C2H4O	H	1	H		OH [C2H4O] _n H + H

图 2 Polymerix 软件分析结果

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 分析 PEG6000，直接得到了样品的分子量分布、单体质量的信息。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有体积紧凑、分析速度快、仪器维护方便和软件合规的特点，是聚合物分析的有力工具。

乙交酯丙交酯共聚物 (PLGA) 的分子量及分布检测

摘要: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 是进行聚合物分子量检测及结构分析的常用手段之一, 它可以快速给出聚合物的质量分布, 单体结构等信息, 并可以有效对聚合物的端基结构进行分析。本文使用岛津 AXIMA-Performance, 以葱三酚 (Dithranol) 为基质, 分析乙交酯丙交酯共聚物 (PLGA), 得到了分子量的分布及单体结构信息。

关键词: MALDI-TOF MS AXIMA-Performance 乙交酯丙交酯共聚物 分子量

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 具有操作简便、能够快速获取各类样品分子量信息等优点, 聚合物的分子量测定及结构分析便是其典型应用之一。岛津的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AXIMA-Performance, 具有飞行距离长 (线性模式1.2米、反射模式2.0米)、充分利用真正的高能CID条件 (20 keV碰撞能量+氦气) 和独特弯曲场反射管等特点。以上特点适合于包括聚合物在内的高分子物质分析。

聚合物是由称为单体的次级单元重复连接而成的分子, 由于其物理和化学性质, 在医学、药学等各个领域发挥着重要的作用。聚合物的分析可以使用SEC/GPC分析、NMR/FT-IR分光法等的各种分析手法, 其中, MALDI-TOF MS由于可以快速得到聚合物的分子量分布、多分散性以及端基结构信息, 因此, 广泛应用于制造业和质量控制实验室。

乙交酯丙交酯共聚物 (PLGA) 为丙交酯、乙交酯的环状二聚物在亲核引发剂催化作用下的开环聚合物。一般用作药用辅料和缓释材料。本文以葱三酚 (Dithranol) 为基质, 应用AXIMA-Performance分析了药用辅料乙交酯丙交酯共聚物 (PLGA) 的分子量分布及单体信息, 可作为聚合物样品分析时的参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 AXIMA-Performance

1.2 分析条件

调谐模式: 线性正离子模式

扫描范围: m/z 10-20000

激光器: 337 nm 氮气激光器

激光能量: 70-120

脉冲引出质量: 2000 Da

1.3 样品前处理

将PLGA样品加四氢呋喃配制为10 mg/mL的样品工作液。取10 μ L的样品工作液、10 μ L的葱三酚基质溶液 (20 mg/mL)、5 μ L辅助盐溶液NaTFA (5 mg/mL) 预混合, 再取1 μ L混合液点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。样品前处理流程如图1所示。

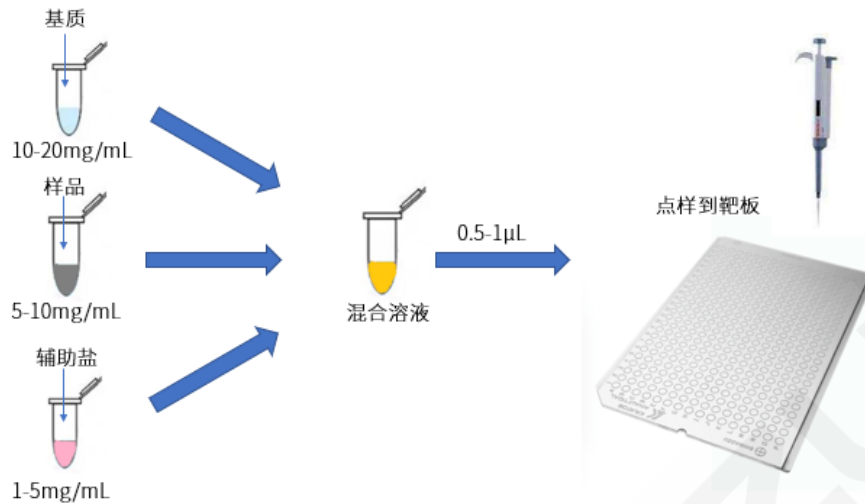


图1 聚合物样品点样方法

2. 结果与讨论

合适基质的选择等前处理过程是影响 MALDI-TOF MS 信号表现的主要方面。本实验过程中使用聚合物分析常用基质 CHCA、DCTB、THAP 等进行测试，结果表现为样品离子化效果较差而致无明显目标信号。经过多次筛选，最后选定葱三酚基质，质谱图信号良好。

PLGA 样品的质谱检测结果如图 2 所示。PLGA 样品在 m/z 200-1100 Da 检测到一系列离子峰。其中，335.64 Da、451.71 Da、571.71 Da、686.00 Da、801.76 Da、917.70 Da（用红色虚线标识）每两个相邻峰分子量差值约为 116 Da，与乙交酯单体 $C_4H_4O_4$ 分子量相符。其中，如图 3 所示，309.66 Da、451.71 Da、599.74 Da、743.77 Da、889.72 Da（用红色虚线标识）每两个相邻峰分子量差值约为 144 Da，与丙交酯单体 $C_6H_8O_4$ 的分子量相符。

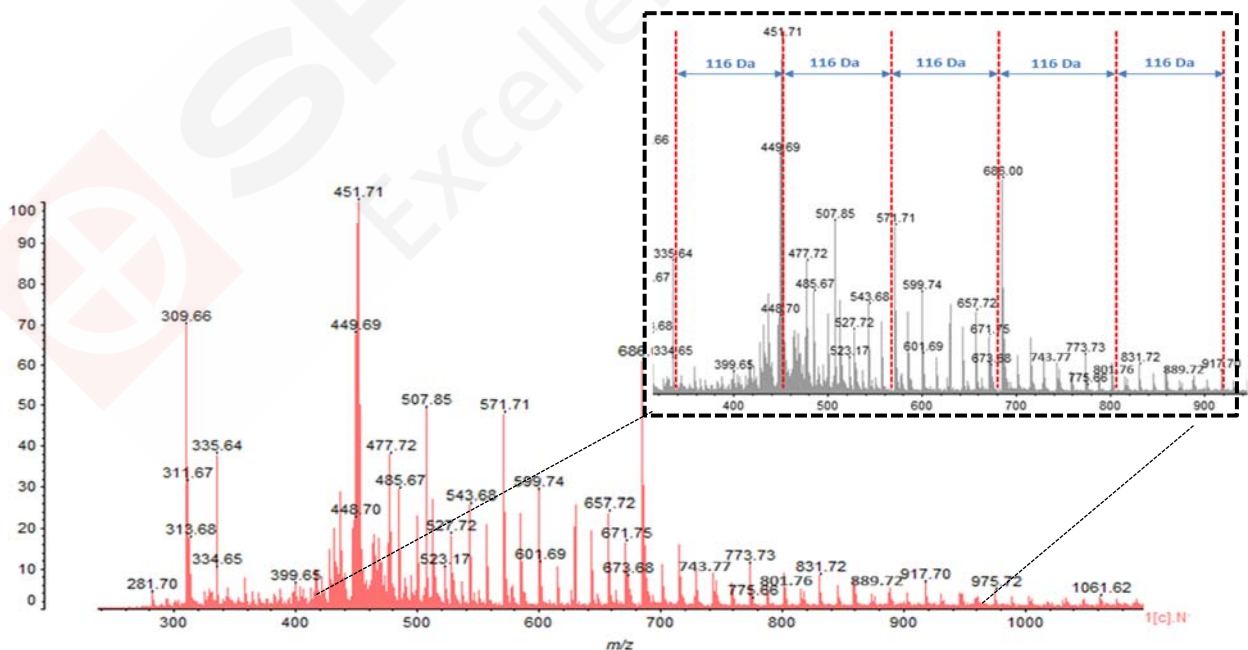


图2 PLGA 样品一级质谱图 (m/z 200-1100)。插图：局部放大图 (m/z 330-920)

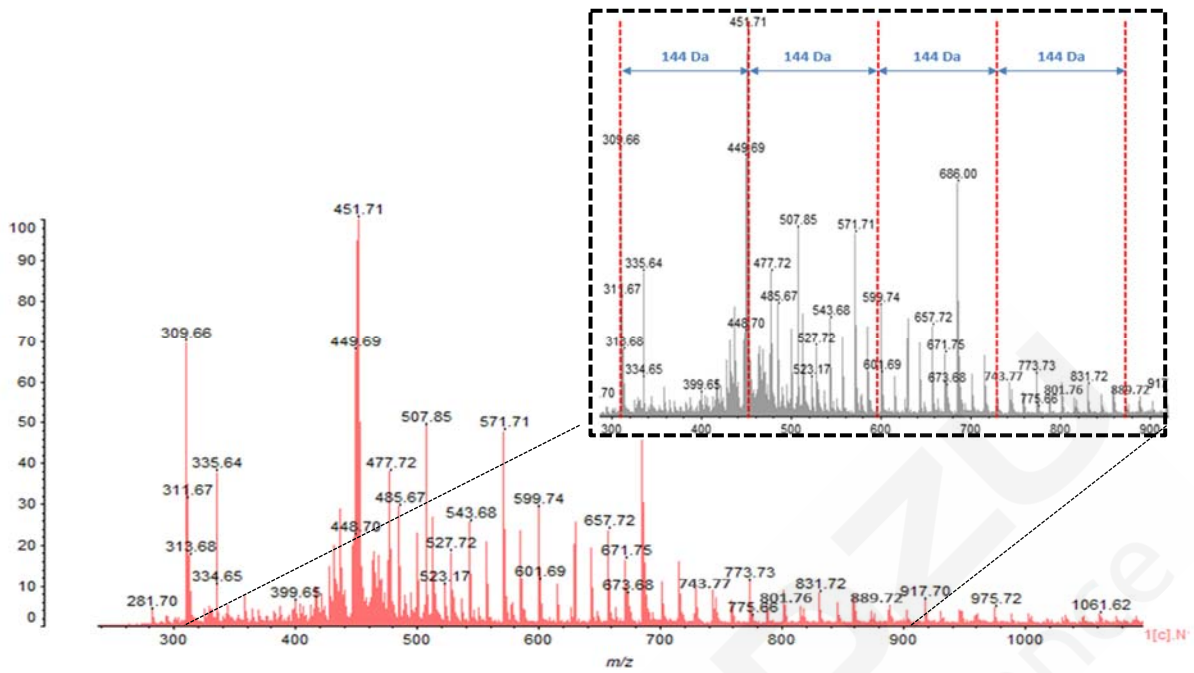


图3 PLGA 样品一级质谱图 (m/z 200-1100)。插图：局部放大图 (m/z 300-900)

3. 结论

本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AXIMA-Performance 分析乙交酯丙交酯共聚物 (PLGA)，直接得到了样品的分子量分布、单体质量的信息。AXIMA-Performance 作为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱，具有飞行距离长、分析速度快、仪器维护方便的特点，是聚合物分析的有力工具。

多西他赛注射剂中吐温 80 的分子量及分布检测

摘要: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 是进行聚合物分子量检测及结构分析的常用手段之一, 它可以快速给出聚合物的质量分布和单体结构等信息, 并可以有效对聚合物的端基结构进行分析。本文使用岛津 AXIMA-Performance, 以葱三酚 (Dithranol) 为基质, 分析多西他赛注射剂中的吐温 80, 得到了分子量的分布及单体结构信息。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AXIMA-Performance 吐温80 分子量

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 是进行聚合物分析的常用工具, 可以快速进行聚合物分子量检测及结构分析。岛津的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AXIMA-Performance, 支持高能 CID 模式、具备独特弯曲场反射管、飞行距离长, 非常适合进行聚合物等高分子物质的分析。岛津 AXIMA 系列仪器分析软件 Launchpad 配置了聚合物分析软件 Polymer Analysis, 同时可以和第三方聚合物分析软件 Polymerix 联用, 均能快速分析获取聚合物相关信息。

“聚合物”一词来自希腊语“很多部分”, 用来表示由重复的亚基 (单体) 组成的材料。聚合物的常见的分析方法有 SEC/GPC 分析、NMR/FT-IR 分光法等。与传统方法相比, MALDI-TOF MS 更加简便快捷, 能在短时间内得到聚合物的分子量分布、多分散性以及端基结构信息。因此, MALDI-TOF MS 进行聚合物分析的应用越来越普遍。

吐温 80, 又称聚山梨酯-80, 是一种药用辅料, 经常用作注射液及口服液的增溶剂或乳化剂; 胶囊剂用分散剂; 软膏剂用乳化剂和基质; 栓剂用基质等。在食品工业中用作乳化剂, 还广泛用于高级化妆品、轻纺、医药工业作增溶剂, 也可以广泛用于纺织、油漆、农药、印刷、石油等行业作乳化剂、稳定剂、润滑剂、柔软剂、抗静电剂。本文以葱三酚 (Dithranol) 为基质, 应用 AXIMA-Performance 分析了药用辅料吐温 80 的分子量分布及单体信息, 可作为聚合物样品分析时的参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 AXIMA-Performance

1.2 分析条件

调谐模式: 反射正离子模式

扫描范围: m/z 10-20000

激光器: 337 nm 氮气激光器

激光能量: 75-90

脉冲引出质量: 2000 Da

2. 样品前处理

取 10 μL 的多西他赛注射液样品溶液、10 μL 的葱三酚基质溶液 (30 mg/mL)、5 μL 辅助盐溶液 NaTFA (5 mg/mL) 预混合, 再取 1 μL 混合液点靶, 自然干燥后将靶板送入质谱分析。

3. 结果与讨论

合适基质的选择等前处理过程是影响 MALDI-TOF MS 信号表现的主要方面。本实验过程中使用聚合物分析常用基质 CHCA、DCTB、THAP 等进行测试，结果表现为样品离子化效果较差而致无明显目标信号。经过多次筛选，最后选定葱三酚基质，质谱图信号良好。

样品的质谱检测结果如图 1 所示。在 m/z 500-2800 Da 检测到三个不同的聚合物正态分布的离子峰系列。分别与吐温 80 的理论分子式 $C_{24}H_{44}O_6(C_2H_4O)_n$ 、吐温 80 失去一分子 H_2O 的理论分子式 $C_{24}H_{42}O_5(C_2H_4O)_n$ 、吐温 80 得到一分子 H_2O 的理论分子式 $C_{24}H_{46}O_7(C_2H_4O)_n$ 相符合。

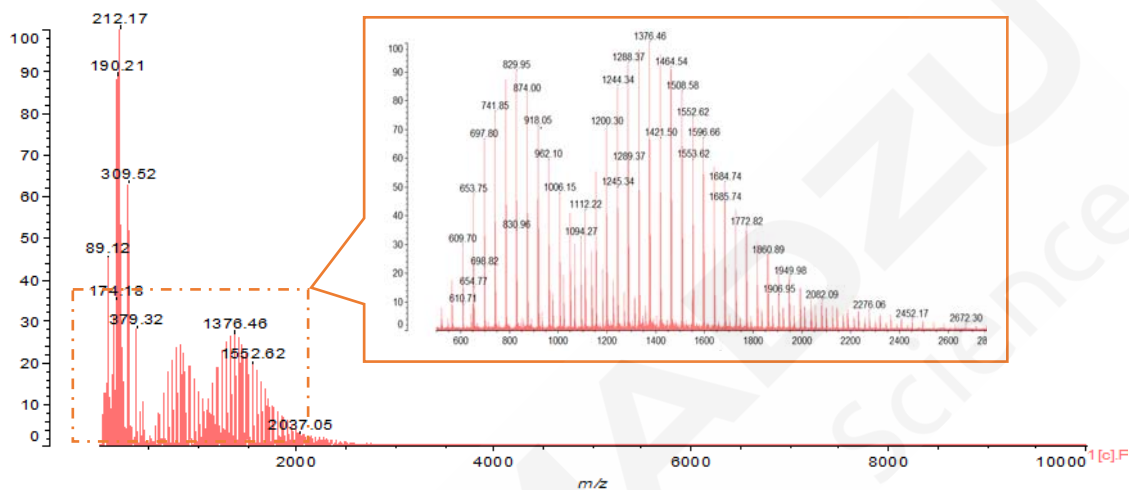


图 1 样品一级质谱图 (m/z 10-10000); 插图: 局部放大图 (m/z 500-2800)

将数据用聚合物分析软件 Polymerix 进行分析。首先，如图 2 所示，在 m/z 800-2400 Da 检测到相邻聚合单元分子量相差 44 Da 的聚合物离子峰系列（红色标识峰），分子量分布与吐温 80 的理论分子式 $C_{24}H_{44}O_6(C_2H_4O)_n$ 相符，重均分子量 1586.475 Da，单体分子量 44 Da。

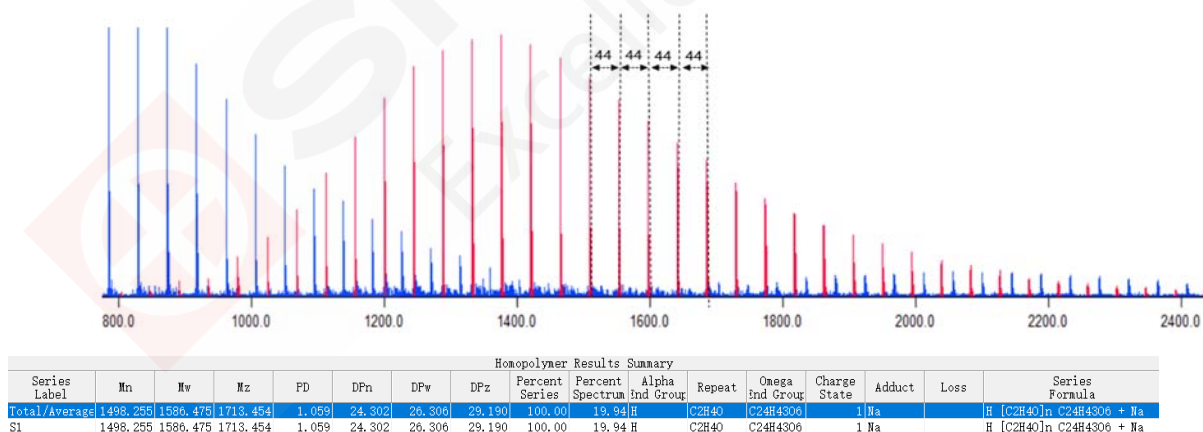


图 2 样品 Polymerix 分析结果 (m/z 800-2400 Da)

其次，如图 3 所示，在 m/z 500-1500 Da 检测到相邻聚合单元分子量相差 44 Da 的聚合物离子峰系列（红色标识峰），分子量分布与在吐温 80 基础上失去一分子 H_2O 的理论分子式 $C_{24}H_{42}O_5(C_2H_4O)_n$ 相符，重均分子量 1188.254 Da，单体分子量 44 Da。

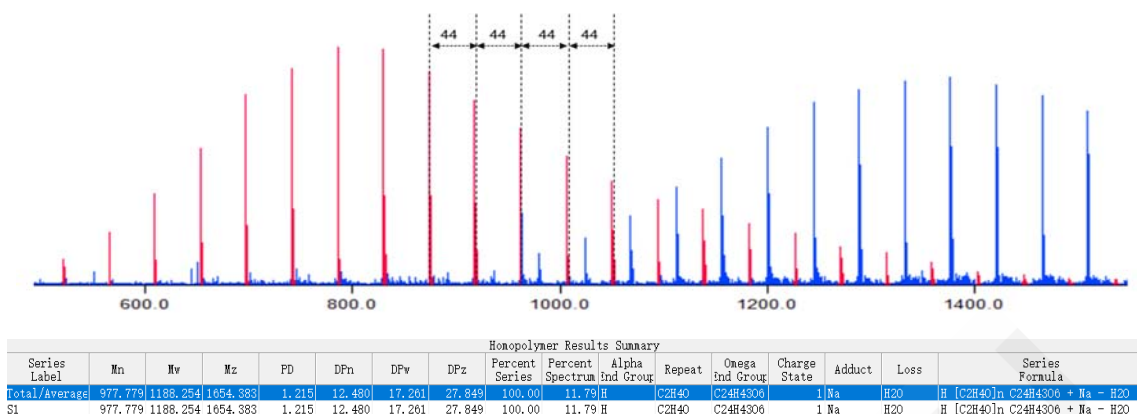


图3 样品 Polymerix 分析结果 (m/z 500-1500 Da)

最后,如图4所示,在 m/z 1200-2800 Da 检测到相邻聚合单元分子量相差 44 Da 的聚合物离子峰系列(红色标识峰),分子量分布与吐温 80 得到一分子 H₂O 的理论分子式 C₂₄H₄₆O₇(C₂H₄O)_n 相符,重均分子量 2190.857 Da,单体分子量 44 Da。

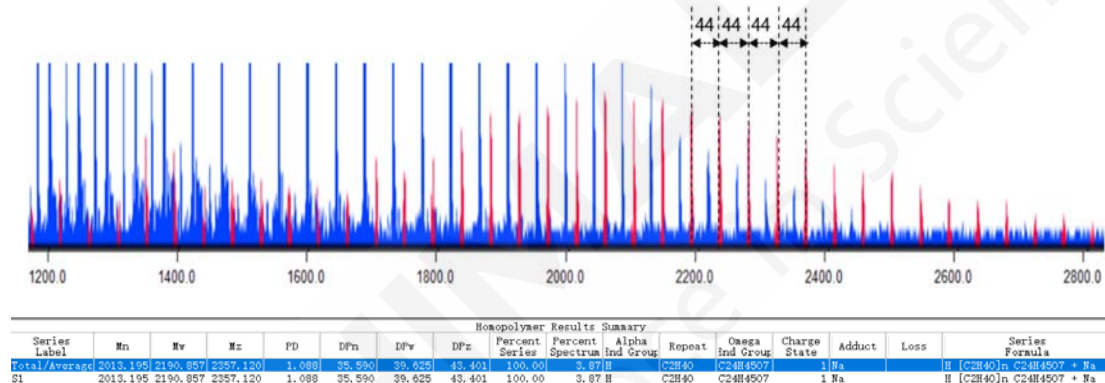


图4 样品 Polymerix 分析结果 (m/z 1200-2800 Da)

4. 结论

本文应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AXIMA-Performance 分析吐温 80,直接得到了样品的平均分子量、多分散度、聚合度、单体质量的信息,有助于研究吐温 80 的分子量分布情况和结构解析,为医药、食品、轻纺等领域中吐温的分析提供新的思路。AXIMA-Performance 作为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱,具有飞行距离长、分析速度快、仪器维护方便的特点,是聚合物分析的有力工具。

注射剂中辅料吐温 80 的降解评价

摘要：本文建立了应用台式 MALDI-TOF 对注射剂中辅料吐温 80 进行降解评价的方法。结果表明，注射剂中吐温 80 在特定环境下容易发生降解，通过比较标品及注射剂中吐温 80 的分子量分布，可以对注射剂中吐温 80 的降解程度进行评价。该方法简单易行，数据精确、分析速度快、通量高，为医药行业注射剂中辅料吐温 80 的质量控制提供了参考。

关键词：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020 吐温80 降解

吐温80，又名聚山梨酯80，化学名称为聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯，是一种亲水型非离子表面活性剂，在注射剂中广泛地用作药物的增溶剂，可以增加药物的溶解性。注射剂在临床应用时，由于避过了肝肠循环直接进入人体，吸收快、作用迅速，一旦辅料出现质量问题，就会迅速对机体产生不可逆的损伤，危害程度很大。吐温80具有很强的破裂细胞膜的作用而引起刺激性，溶血性和组胺释放（致敏性），近年来国内外出现多起因吐温80质量问题或使用不当导致注射剂不良反应（过敏、溶血等）的报道。吐温80中亲脂成份包括不饱和脂肪酸，这些不饱和脂肪酸十分容易氧化降解而产生更多的有毒成份，由此而产生的毒副反应将会超过产品本身带来的益处。吐温80来源复杂，对吐温80原料的质量以及注射剂中吐温80的降解程度进行监测对保证临床用药安全至关重要。

本文应用台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-8020，通过比较标品及注射剂中吐温 80 的分子量分布，可以快速对注射剂中吐温 80 的降解程度进行评价。该方法简单易行，数据精确、分析速度快、通量高，为医药行业注射剂中辅料吐温 80 的质量控制提供了参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

MALDI-8020 台式基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪

1.2 分析条件

调谐模式：线性正离子模式

扫描范围：m/z 500-5000

激光器：355 nm 固态激光器

激光能量：65

1.3 样品前处理

取吐温80标品按注射剂中吐温80的浓度比例加入用于配制注射剂的缓冲液中，作为吐温80对照样品。取样品加水稀释10倍作为样品工作液。取1 μ L NaTFA（三氟乙酸钠，1 mg/mL）点靶，自然干燥。取1 μ L 样品工作液和1 μ L 葱三酚基质溶液（20 mg/mL）依次点在靶点的盐结晶层上，自然干燥后将靶板送入质谱分析。

2. 结果与讨论

2.1 吐温 80 标品分析

使用岛津 MALDI-8020 分析吐温 80 标品的一级质谱图见图 1。质谱图中可见三个明显的“钟形”离子峰簇，分别为 m/z 500-1600、m/z 1100- 2700、m/z 2500-4000，其中 m/z 1100- 2700 之间的离子峰簇信号

强度最高。以该离子峰簇为例，使用 Polymerix 软件进行分子量统计分析，结果见表 1，相邻不同质谱峰相差 44 Da，与吐温 80 的单体 C_2H_4O 分子量相符。

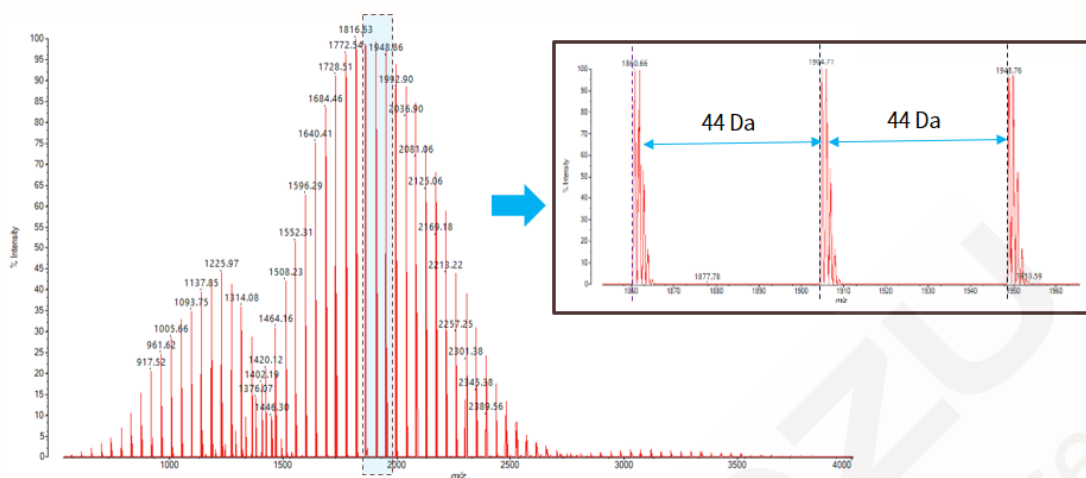


图 1 吐温 80 标品的一级质谱图

2.2 不同处理的注射液制剂缓冲液吐温 80 降解分析

取某医药企业提供的两份注射液制剂缓冲液样品，保存条件分别为 $4^{\circ}C$ 20 天及 $40^{\circ}C$ 28 天，应用 MALDI-8020 进行分子量检测，质谱图见图 2，分子量统计信息见表 1。由图可见， $4^{\circ}C$ 保存 20 天时，注射液中吐温 80 的分子量分布与标品相比无显著变化，但 $40^{\circ}C$ 保存 28 天时吐温 80 重均分子量明显变小，检测到 m/z 500-1100、 m/z 1000-1800、 m/z 1200-2000 三个离子峰簇，其中 m/z 1200-2000 离子峰簇中包含的质谱峰的数量较多，可能为吐温 80 降解后产生的碎片。该结果表明吐温 80 不太稳定，受特定环境影响容易发生降解，应用 MALDI-8020 通过分子量检测可以对是否发生降解进行监测。

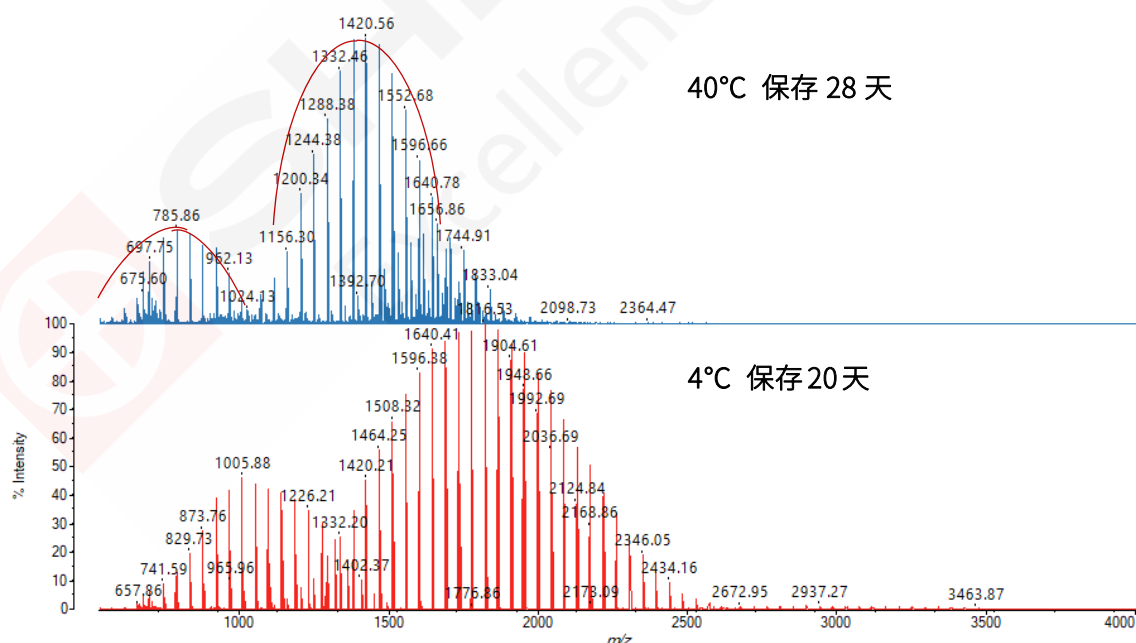


图 2 不同保存条件下的注射液制剂缓冲液中吐温 80 的一级质谱图

2.3 不同品牌多西他赛注射液中吐温 80 分子量分析

从市场上购买三种不同品牌的多西他赛注射液，应用 MALDI-8020 进行分子量分析，检测结果见图 3。从结果来看，品牌 1 与品牌 3 吐温 80 的分子量分布相比标品无明显变化，但品牌 2 中的吐温 80 的重均分子量明显减小，检测到 m/z 500-1100、 m/z 1000-1800、 m/z 1400-1900 三个离子峰簇，可能是吐温 80 在原料来源、药物生产或成品保存过程中发生了降解所致。应用 MALDI-8020 对注射剂中吐温 80 进行分子量检测，简单易行，检测结果可为吐温 80 的质控提供参考，有助于保障临床用药安全。

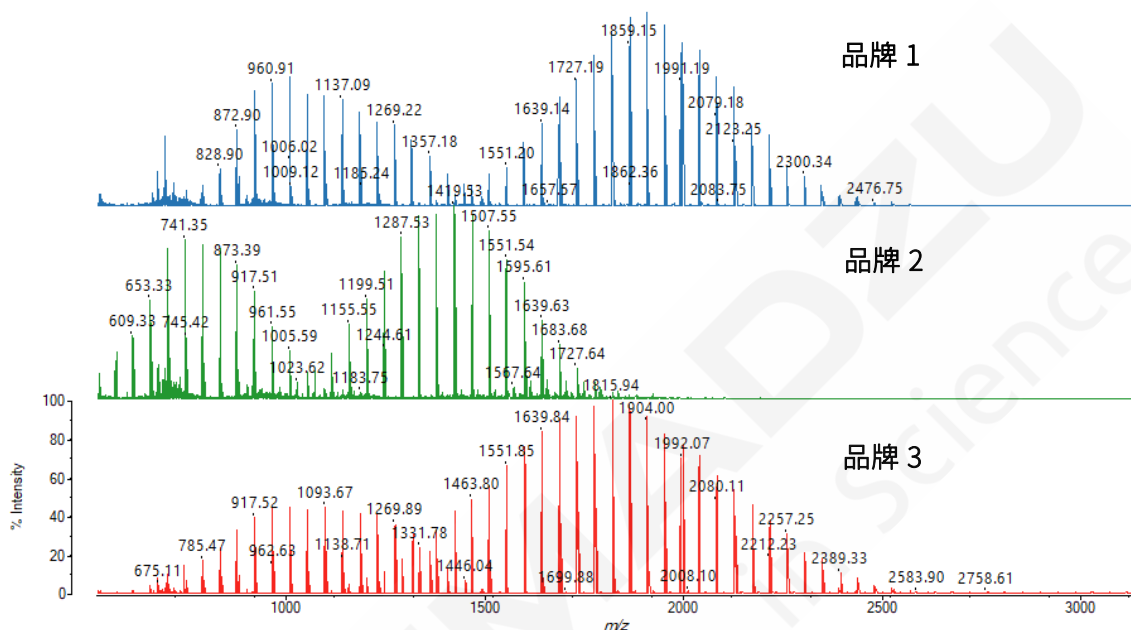


图 3 市售不同品牌注射剂中吐温 80 的一级质谱图

表 1 样品分子量统计信息（分析软件：Polymerix）

样品	DPn	DPw	DPz	Mn	Mw	Mz
吐温 80 标品	41.42	42.10	42.76	1855.75	1885.90	1914.92
缓冲液 1	39.22	40.02	40.80	1758.95	1794.12	1828.41
缓冲液 2	31.31	31.77	32.26	1410.42	1431.01	1452.39
市售 1	41.29	41.77	42.24	1850.22	1871.19	1892.00
市售 2	30.98	31.34	31.69	1395.96	1411.91	1427.58
市售 3	39.66	40.49	41.30	1778.37	1814.84	1850.30

备注：缓冲液 1-某注射液制剂缓冲液 4℃保存 20 天；缓冲液 2-某注射液制剂缓冲液 40℃保存 28 天；市售 1-市售多西他赛注射液品牌 1；市售 2-市售多西他赛注射液品牌 2；市售 3-市售多西他赛注射液品牌 3。

3. 结论

本文应用台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 MALDI-8020 检测注射液中吐温 80 的分子量分布信息，通过样品与标品的分子量变化对比，可以判断吐温 80 是否发生明显降解，为吐温 80 的质控评价提供参考。MALDI-8020 作为台式基质辅助激光解析电离飞行时间质谱，操作简便、体积紧凑、分析速度快、仪器维护方便，性能卓越，是医药行业中聚合物类辅料分子量分析的有力工具。

附录 分析应用案例快速索引

序号	样品名称	检测项目	基质	辅助盐	分析模式	页码
1	牛血清白蛋白 (BSA) 和免疫球蛋白 A (IgA)	分子量	SA	-	正离子	8
2	核糖核酸酶 B	分子量	SA	-	正离子	10
3	病毒蛋白类疫苗亚基	分子量	SA	-	正离子	12
4	重组人粒细胞刺激因子	分子量	SA	-	正离子	15
5	牛血清白蛋白 (BSA)	蛋白质序列	1,5-DAN/CHCA	-	正离子	17、19
6	磷酸化蛋白 (牛 α -酪蛋白)	蛋白质序列/ 修饰位点	CHCA	-	正离子	22
7	司美格鲁肽	分子量及杂质	CHCA	-	正离子	25
8	合成多肽 Exendin-4	分子量及杂质	CHCA	-	正离子	29
9	Fmoc 保护氨基酸	分子量及杂质	葱三酚	NaTFA	正离子	35
10	聚乙二醇化多肽药物 /多肽/聚乙二醇	分子量	SA/CHCA/DCTB	-/- /NaTFA	正离子	37
11	胸腺法新	聚集体	CHCA	-	正离子	40
12	合成肽 Exendin-4	修饰	CHCA	-	正离子	43
13	合成寡核苷酸药物	分子量及杂质	3-HPA	-	正离子	48
14	亚磷酰胺单体	分子量及杂质	葱三酚	NaTFA	正离子	51
15	mRNA	加帽反应后的 帽子端定性	3-HPA	-	正离子/负 离子	55、57
16	mRNA 合成核苷酸原料	分子量	DHB	NaTFA	正离子	60
17	福米韦生	核苷酸序列	3-HPA	-	负离子	63
18	肽核酸 (PNA)	分子量	CHCA、SA	-	正离子	65

19	DMG-PEG2000	分子量及组成	蒽三酚	NaTFA	正离子	68
20	脂质纳米粒原料（阳离子脂质、中性脂质、胆固醇、DMG-PEG2000）	分子量及组成	DHB/9-AA	NaTFA/-	正离子	71
21	PEG6000	分子量及分布	蒽三酚	-	正离子	74
22	乙交酯丙交酯共聚物	分子量及组成	蒽三酚	NaTFA	正离子	76
23	吐温 80	分子量及分布	蒽三酚	NaTFA	正离子	79、82

注： - 未使用或未提及辅助盐溶液。

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的区域分布状况, 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

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
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。