

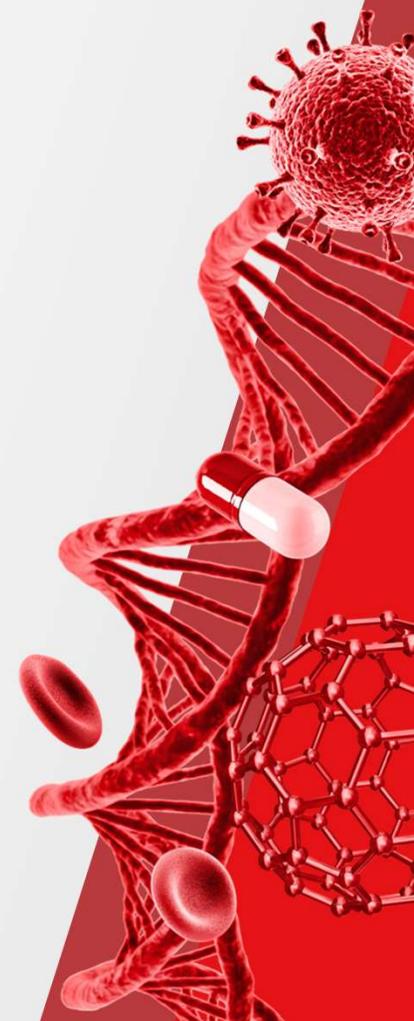
多肽类药物分析色谱质谱耗材解决方案

Junxia.Shi

CCS

202402

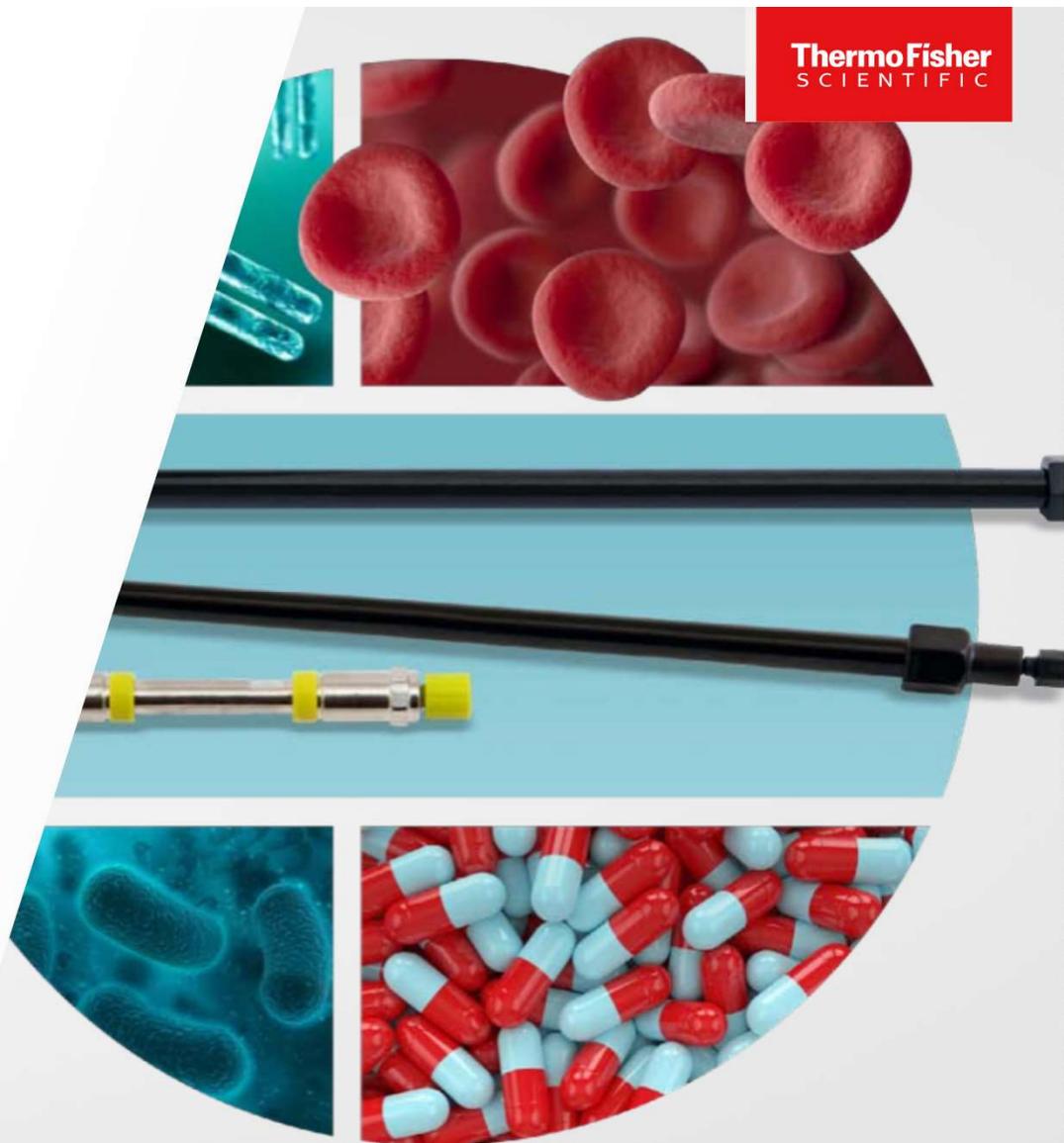
 The world leader in serving science



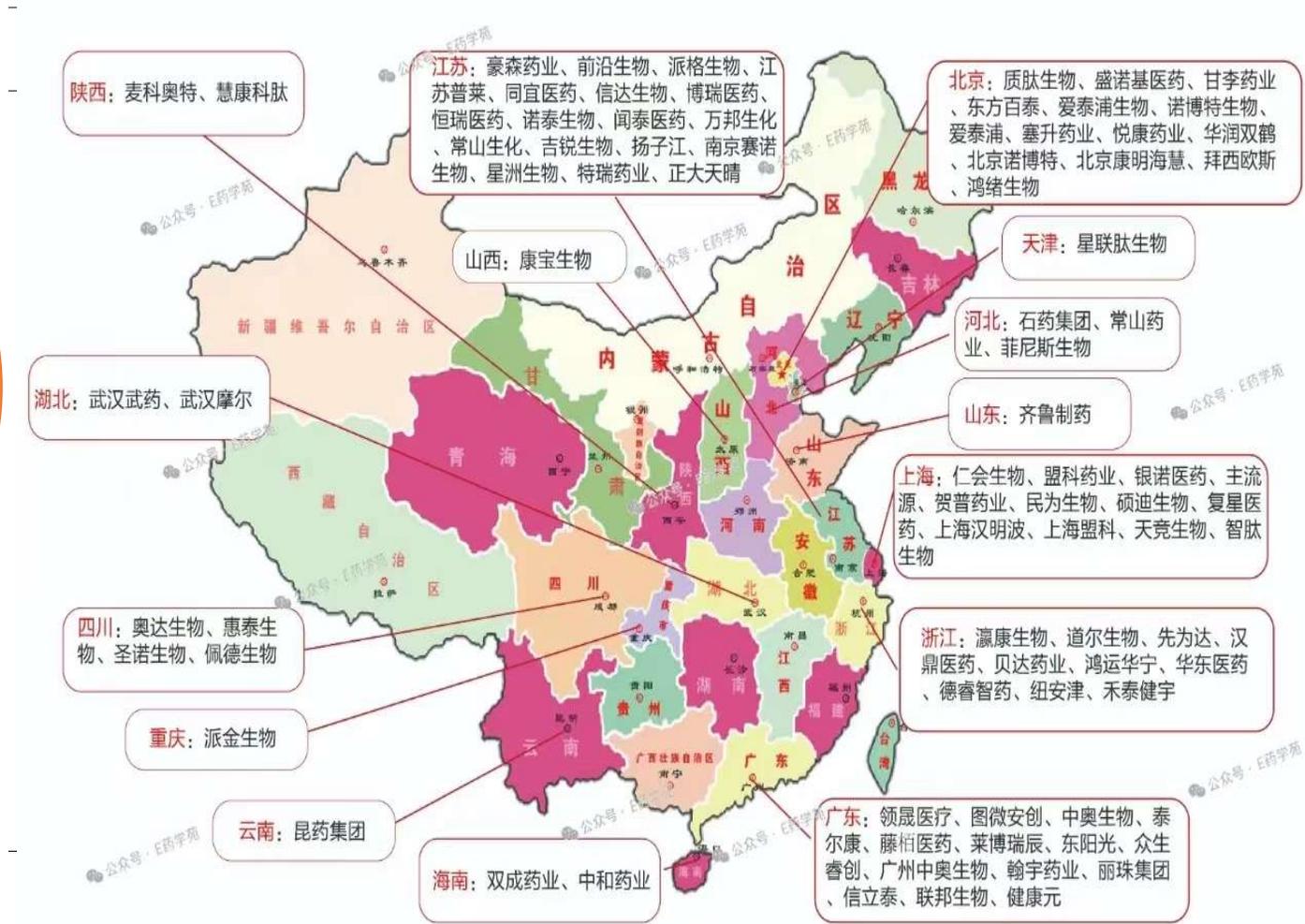
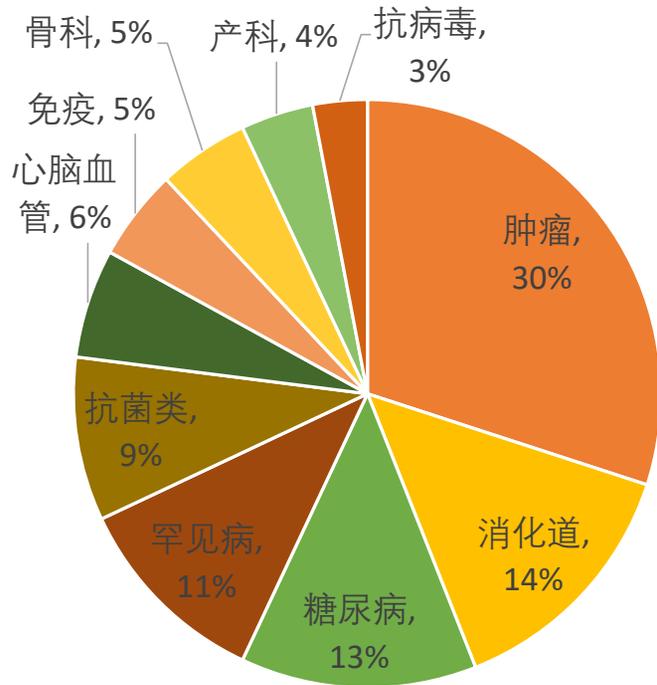
主要内容

- 多肽药物领域以及分布状况
- 多肽的生产方法以及以及质控关注点
 - 化学合成
 - 生物发酵
- 多肽的质量控制
 - 中间体控制
 - 原料药分析
 - 杂质研究
 - 工艺相关杂质
- 多肽的体内代谢分析

ThermoFisher
SCIENTIFIC



多肽的应用领域与中国药物研究进展



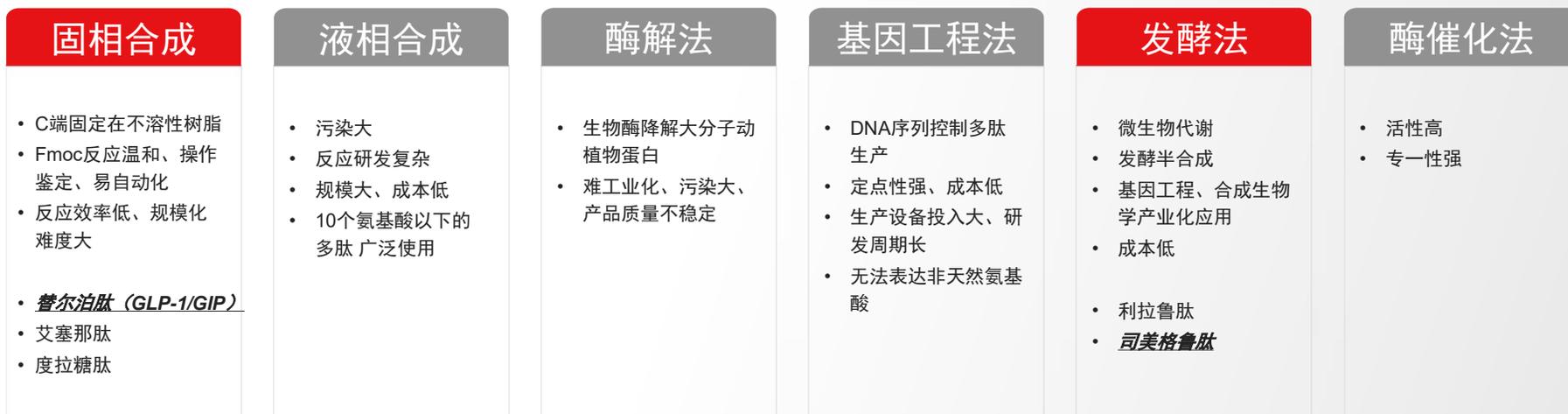
GLP-1国内研究现状

候选药物	公司	靶点	在研适应症	临床前	IND	I期	II期	III期	NDA/BLA	
利拉鲁肽注射液	华东医药 (中美华东)	GLP-1R	超重/肥胖	→ 已上市						
DR10624	华东医药 (道尔生物)	GGLP-1R+GCGR+FGF21R	超重/肥胖	→						
HDM1002	华东医药	GLP-1R	超重/肥胖	→						
HDM1005	华东医药	GLP-1R + GIPR	超重/肥胖	→						
贝那鲁肽	仁会生物	GLP-1R	超重/肥胖	→ 已上市						
玛仕度肽 Mazdutide	信达生物/礼来	GLP-1R+GCGR	超重/肥胖	→						
诺利糖肽 Noiglutide	豪森药业; 恒瑞医药	GLP-1R	超重/肥胖	→						
TJ103	石药/天视珍生物	GLP-1R	超重/肥胖	→						
格鲁塔单抗 GMA105	鸿运华宁	GLP-1R	超重/肥胖	→						
GZR18	甘李药业	GLP-1R	超重/肥胖	→						
HEC88473	东阳光	GLP-1R/FGF21	超重/肥胖	→						
Ecnoglutide	先为达生物; 凯因科技	GLP-1; GLP-1R	超重/肥胖	→						
GX-G6	石药集团; 天境生物; 天士力; Genexine	GLP-1; GLP-1R	超重/肥胖	→						
HRS9531	恒瑞医药	GLP-1R + GIPR	超重/肥胖	→						
Survodutide	Boehringer Ingelheim; Zealand Pharma	GLP-1R/GCGR	超重/肥胖	→						
MDR-001	德睿智药	GLP-1R	超重/肥胖	→ 1/2期						

候选药物	公司	靶点	在研适应症	临床前	IND	I期	II期	III期	NDA/BLA	
BGM0504	博瑞医药	GLP-1R + GIPR	超重/肥胖	→						
MWN101	民为生物	GLP-1R; GIPR; glucagon	超重/肥胖	→						
RAY1225	众生睿创	未知	超重/肥胖	→						
VCT220	闻泰医药	GLP-1R	超重/肥胖	→						
ZT002	质肽生物	GLP-1R	超重/肥胖	→						
利拉鲁肽生物类似药	圣诺生物	GLP-1R	超重/肥胖	→						上市申请
利拉鲁肽生物类似药	万邦生化	GLP-1R	超重/肥胖	→						
利拉鲁肽生物类似药	先为达生物	GLP-1R	超重/肥胖	→ Be实验						
利拉鲁肽生物类似药	诺博特生物	GLP-1R	超重/肥胖	→ Be实验						
司美格鲁肽	诺和诺德	GLP-1R	超重/肥胖	→ 240106						
替尔泊肽	礼来	GLP-1R	超重/肥胖	→						上市申请
口服司美格鲁肽	诺和诺德	GLP-1R	超重/肥胖	→						
Orforglipron	礼来	GLP-1R	超重/肥胖	→						
Retatrutide	礼来	GLP-1R/GIPR/GCGR	超重/肥胖	→						
CagriSema	诺和诺德	GLP-1R/AMYP	超重/肥胖	→						
Supaglutide 苏帕鲁肽	银诺医药	GLP-1R	肥胖	→						
GGBR-1290	硕迪生物	GLP-1R	超重/肥胖	→						

多肽的生产工艺

主要分为化学合成法和生物法



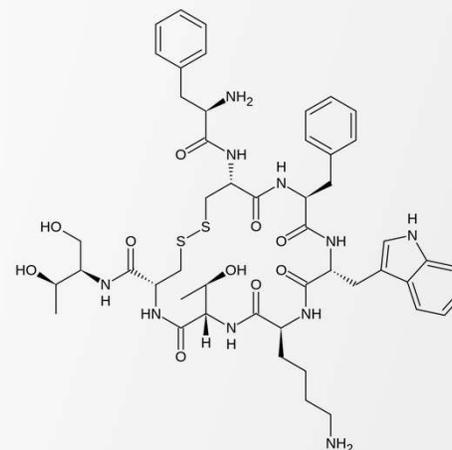
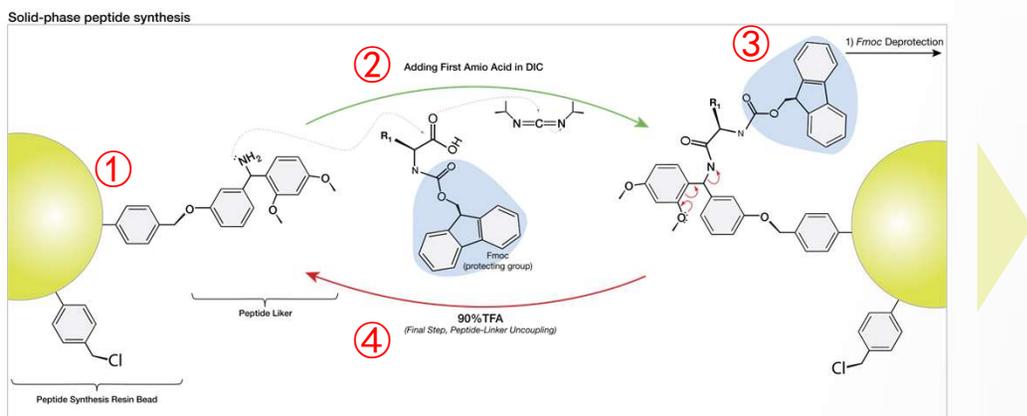
替尔泊肽

- 固相合成
- 侧链修饰（提高稳定性、延长半衰期）
- GLP-1类似物+linker+脂肪酸侧链

司美格鲁肽/利拉鲁肽

- 酿酒酵母发酵（重组DNA技术）获得前体
- 化学合成修饰添加侧链
- GLP-1类似物+linker+脂肪酸侧链

固相合成



奥曲肽

固相合成 Solid-phase peptide synthesis on a Rink amide resin using Fmoc- α -amine-protected amino acid
Robert Bruce Merrifield, 发明多肽固相合成法, 1984年诺贝尔化学奖



维基百科: <https://zh.wikipedia.org/zh-hans/%E5%A4%9A%E8%82%BD%E5%90%88%E6%88%90>

化学合成多肽药物药学研究技术指导原则

原料药制备工艺				结构确证		制剂处方工艺			质量研究与控制						
合成工艺	物料与控制	生产工艺		一级结构	高级结构	剂型选择	处方筛选及工艺开发	工艺描述及中间体控制	原料药质量研究				制剂质量研究		
合成方法	起始物料	工艺描述	反应终点控制	中间体控制	氨基酸组成 (氨基酸比值) 氨基酸序列	二级/三级结构	不同剂型	关注稳定性	关键步骤	鉴别	氨基酸比值	杂质	含量测定	质量研究	
固相合成 液相合成 线性合成 片段合成 杂质、纯化	保护氨基酸 性状、鉴别 有关物质 残留溶剂 (乙酸乙酯、 乙酸) 含量 保护不完全 氨基酸 手性异构体 二肽衍生物 β-丙氨酸杂质	反应试剂 投料量 反应条件 过程控制	液相合成 TLC、HPLC 固相合成 茚三酮法 三硝基苯磺 酸法 氯苯醌法 二硫键 Ellman实验、 HPLC	分子量 有关物质 含量	胸腺法新, 蛙降钙素界 别项目为色 谱鉴别或者 肽键的化学 鉴别,表征 结构信息少, 氨基酸比值 作为检查项 美国药典特 立帕肽使用 HPLC法和肽 图进行鉴别, 不需要药氨 基酸比值。 MS-MS Edman降解 氨基酸修饰 侧链/二硫键 /酰胺键 位点、结构	CD FTIR Raman NMR XRD AUC FFF 生物活性	注射剂 长效制剂 口服 吸入	影响因素: pH 离子强度 光 热 湿 氧化 水分 辅料选择	批内和批间 质量一致性	HPLC MS (±1.0 Da) 大于2kDa的 多肽建议使用 HRMS 氨基酸组成 NMR (少于 30个氨基酸 (胸腺五肽, 胸腺法新) 肽图 (>20氨 基酸) USP	HPLC	HPLC、LC- HRMS、 IEX、 CE、SEC、 CE-SDS 肽相关杂质 缺失肽 插入肽 替换肽 错结肽 差向肽 Asp/Asn 相关 杂质 焦谷氨酸 聚合物 含硫杂质 氨基官能团 乙酰化 含芳香族或 含硫侧链氧 化杂质 主峰纯度	HPLC、ICPMS GC 非肽杂质 试剂 溶剂 金属催化剂 缩合剂 元素杂质	HPLC 多肽 反离子	性状、鉴别 澄清度与颜色 pH值、有关物质 装量/装量差异 可见异物 渗透压摩尔浓度 不溶性微粒 细菌内毒素 无菌 含量测定 抑菌剂 抗氧化剂 降解杂质 制剂工艺杂质 (相容 性) 聚合物

化学合成多肽药物药学研究技术指导原则, CDE, 2023

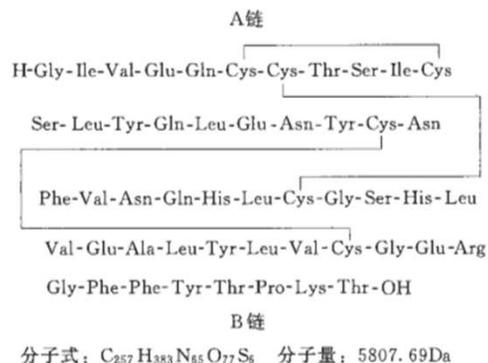
(1503) QUALITY ATTRIBUTES OF SYNTHETIC PEPTIDE DRUG SUBSTANCES, USP

在药用物质通则 (通则2034, Substances for Pharmaceutical Use) 中规定合成多肽中的有关物质报告限 0.1%, 鉴定限 0.5%, 质控限 1.0%

发酵多肽药物分析参考项目—2020版药典人胰岛素

人胰岛素

Ren Yidaosu

Human Insulin

3.3 检查

3.3.1 有关物质

取本品适量,用0.01mol/L盐酸溶液溶解并稀释制成每1ml中含3.5mg的溶液,作为供试品溶液。照含量测定项下的方法,以0.2mol/L硫酸盐缓冲液(pH 2.3)-乙腈(82:18)为流动相A、乙腈-水(50:50)为流动相B,按下表进行梯度洗脱。调节流动相比例使人胰岛素主峰的保留时间约为25分钟,系统适用性试验应符合含量测定项下的规定。取供试品溶液20 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,按峰面积归一化法计算, A₂₁脱氨人胰岛素不得过1.5%;其他杂质峰面积之和不得过2.0%。

时间(分)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	78	22
36	78	22
61	33	67
67	33	67

3.3.2 高分子蛋白质

取本品适量,用0.01mol/L盐酸溶液溶解并稀释制成每1ml中约含4mg的溶液,作为供试品溶液。照分子排阻色谱法(通则0514)试验。以亲水改性硅胶为填充剂(5~10 μ m);以冰醋酸-乙腈-0.1%精氨酸溶液(15:20:65)为流动相,流速为每分钟0.5ml,检测波长为276nm。取人胰岛素单体-二聚体对照品,用0.01mol/L盐酸溶液溶解并稀释制成每1ml中含4mg的溶液;取100 μ l注入液相色谱仪,人胰岛素单体峰与二聚体峰的分度应符合要求。取供试品溶液100 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,除去保留时间大于人胰岛素主峰的其他峰面积;按峰面积归一化法计算,保留时间小于人胰岛素主峰的所有峰面积之和不得大于1.0%。

3.1 性状

本品为白色或类白色粉末。

3.2 鉴别

3.2.1 在含量测定项下记录的色谱图中,供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

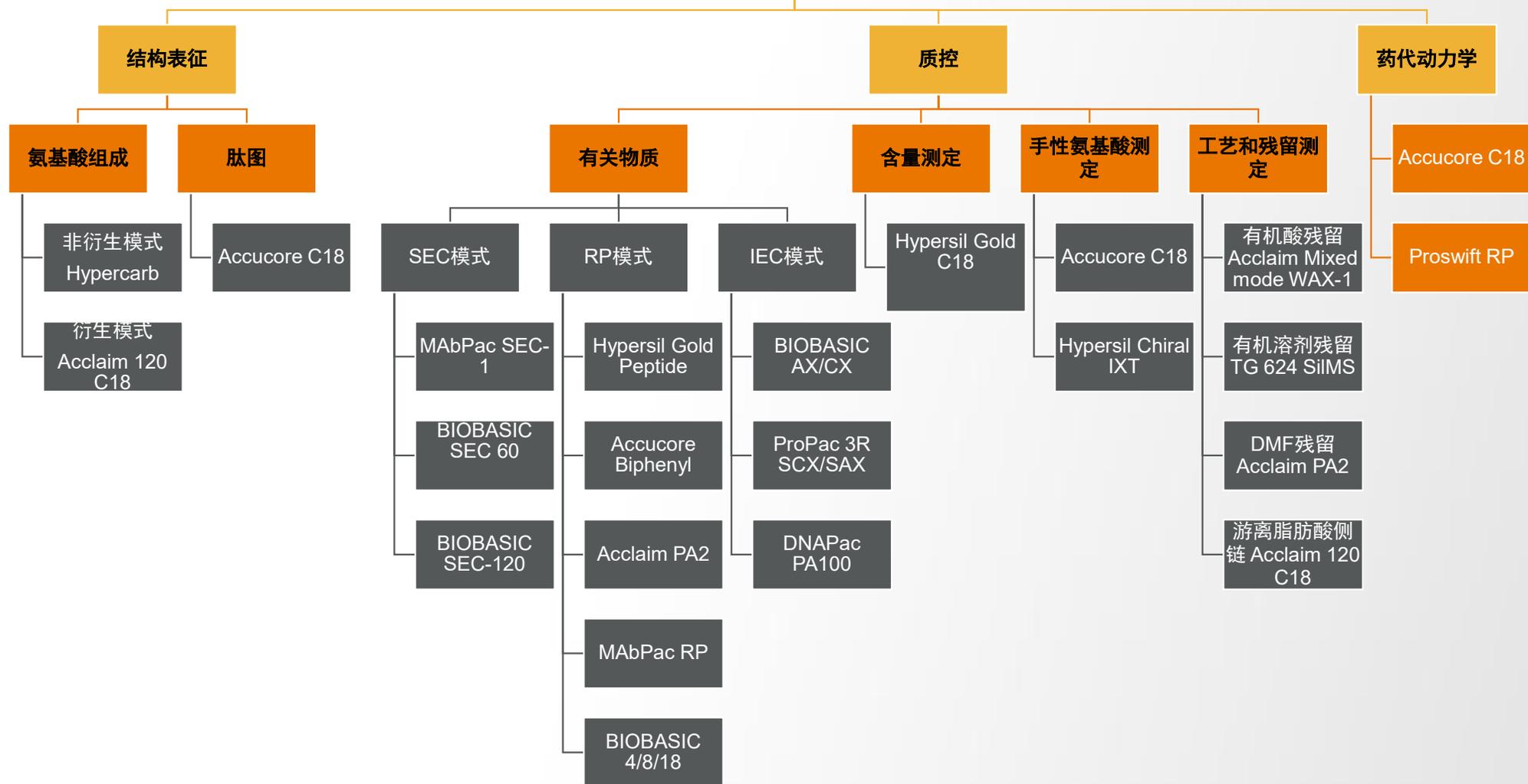
3.2.2 取本品适量,用0.1%三氟乙酸溶液制成每1ml中含10mg的溶液,取20 μ l,加0.2mol/L三羟甲基甲烷-盐酸缓冲液(pH 7.3)20 μ l、0.1%V₈酶溶液20 μ l与水140 μ l,混匀,置37℃水浴中2小时后,加磷酸3 μ l,作为供试品溶液;另取人胰岛素对照品适量,同法制备,作为对照品溶液。照含量测定项下的色谱条件,以0.2mol/L硫酸盐缓冲液(pH 2.3)-乙腈(90:10)为流动相A、乙腈-水(50:50)为流动相B,按下表进行梯度洗脱。取对照品溶液和供试品溶液各25 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,片段II与片段III之间的分离度应不小于3.4,片段II与片段III的拖尾因子应不大于1.5。供试品溶液的肽图谱应与对照品溶液的肽图谱一致。

时间(分)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	90	10
5	80	20
45	40	60
50	40	60

多肽生产和质控耗材筛选

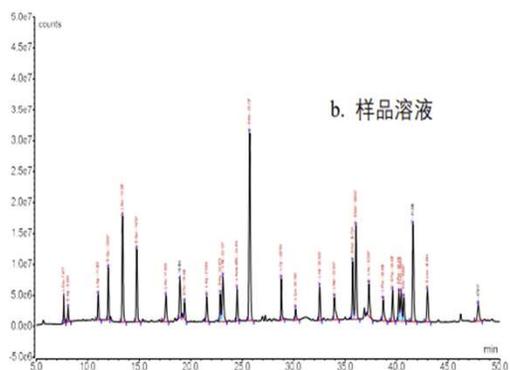
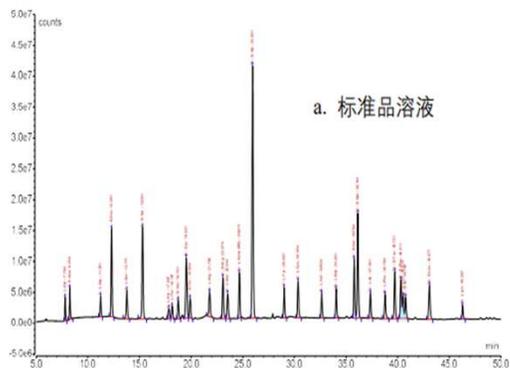
多肽分析耗材选择

ThermoFisher
SCIENTIFIC



起始物料 保护氨基酸—OPA在线衍生D/L氨基酸在AccucoreXL C18色谱柱分离

ThermoFisher
SCIENTIFIC



色谱柱:	Accucore XL C18, 4.0 μm , 4.6 \times 150 mm		
流动相:	A: 50 mM 乙酸钠水溶液, pH 7.0		
	B: 乙腈/甲醇/水=45:45:10		
洗脱程序:	Time (min)	A (%)	B (%)
	-5	96	4
	0	96	4
	2	96	4
	4	90	10
	20	80	20
	35	65	35
	43	60	40
	50	50	50
	55	0	100
	65	0	100
流速:	1.0 mL/min		
进样体积:	UDP 程序进样, 自动在线衍生		
柱温:	30 $^{\circ}\text{C}$		
检测器:	FLD, 激发波长 230 nm, 发射波长 450 nm, 灵敏度 5, 灯模式 标准		
谱图:	a. 标准品溶液谱图; b. 样品溶液谱图		
样品:	混合标准品溶液和样品提取溶液, 经柱前自动在线衍生后, 反相分离, 荧光检测器测定		
仪器:	Vanquish Core HPLC-FLD		

方法信息

衍生剂信息

硼酸缓冲液	0.1M 十水合四硼酸钠 (7.6g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ in 200mL H_2O), 用5M NaOH调pH至10.2
衍生试剂	硼酸缓冲液中含有260 mM-异丁酰基-L-半胱氨酸 (IBLC)/170 mM 邻苯二甲醛 (OPA)
稀释液	0.1%乙酸水溶液

进样量

混标: 混标0.5 μl , 衍生试剂0.25 μl

样品1、5: 样品2 μl , 衍生试剂2.2 μl

在线针内衍生程序

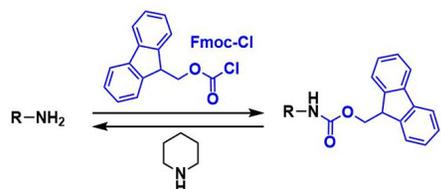
No	Command	Parameters
1	UDP_PrepareLiquidHa...	Volume=33.25 [μl]
2	UDP_Draw	Position=R:1, Volume=1 [μl], Speed=1 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
3	UDP_Draw	Position=R:A2, Volume=2.5 [μl], Speed=1 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
4	UDP_Draw	Volume=0.5 [μl], Speed=1 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
5	UDP_Draw	Position=Air, Volume=3 [μl], Speed=3 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
6	UDP_InNeedleMix	Volume=5.5 [μl], DrawSpeed=20 [$\mu\text{l}/\text{s}$], DispenseSpeed=20 [$\mu\text{l}/\text{s}$], Cycles=10
7	UDP_Wait	30 [s]
8	UDP_NeedleWash	Duration=10 [s]
9	UDP_Draw	Position=R:A3, Volume=0.25 [μl], Speed=1 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
10	UDP_Draw	Position=Air, Volume=1 [μl], Speed=1 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
11	UDP_InNeedleMix	Volume=7.5 [μl], DrawSpeed=20 [$\mu\text{l}/\text{s}$], DispenseSpeed=20 [$\mu\text{l}/\text{s}$], Cycles=20
12	UDP_Wait	30 [s]
13	UDP_NeedleWash	Duration=10 [s]
14	UDP_Draw	Position=R:A4, Volume=15 [μl], Speed=10 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
15	UDP_Draw	Position=Air, Volume=10 [μl], Speed=10 [$\mu\text{l}/\text{s}$]
16	UDP_InNeedleMix	Volume=20 [μl], DrawSpeed=20 [$\mu\text{l}/\text{s}$], DispenseSpeed=20 [$\mu\text{l}/\text{s}$], Cycles=10
17	UDP_Wait	10 [s]
18	UDP_NeedleWash	Duration=10 [s]
19	UDP_PrepareInject	

Position R:A2, 硼酸缓冲液; Position R:A3, 衍生试剂; Position R:A4, 稀释液

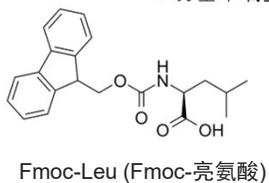
起始物料

保护氨基酸—Fmoc衍生氨基酸在Acclaim Chiral IXT 色谱柱分离

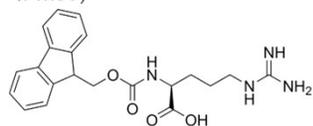
17种Fmoc衍生保护氨基酸的分离



9-芴基甲氧基羰基保护基 (Fmoc)



Fmoc-Leu (Fmoc-亮氨酸)

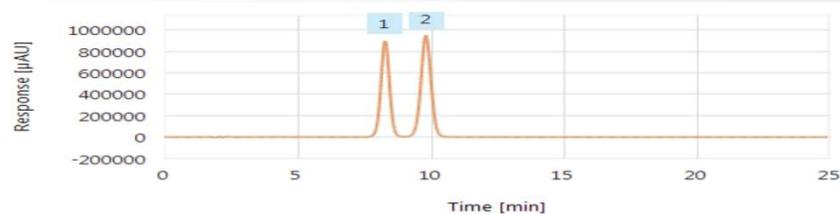


Fmoc-Arg (Fmoc-精氨酸)

[PDF CCS-SW-225 Chiral IXT色谱柱应用于FMOC-亮氨酸手性分析.pdf](#)

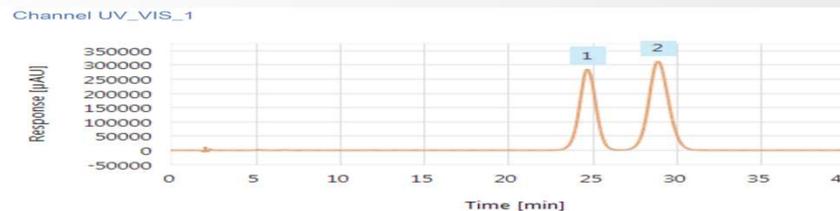
[PDF CCS-SW-226 Chiral IXT色谱柱应用于FMOC-脯氨酸手性分析.pdf](#)

[PDF CCS-SW-227 Chiral IXT色谱柱应用于FMOC-酪氨酸手性分析.pdf](#)



Channel UV_VIS_1

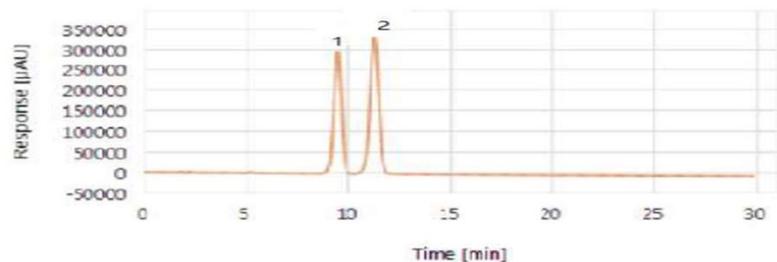
#	Compound Name	Compound Class	RT (min)
1	L-FMOC PRO-OH	STANDARD	8.31
2	D-FMOC PRO-OH	STANDARD	9.84



Channel UV_VIS_1

#	Compound Name	Compound Class	RT (min)
1	L-FMOC-TYR-IBU-OH	STANDARD	24.77
2	D-FMOC-TYR-IBU-OH	STANDARD	28.98

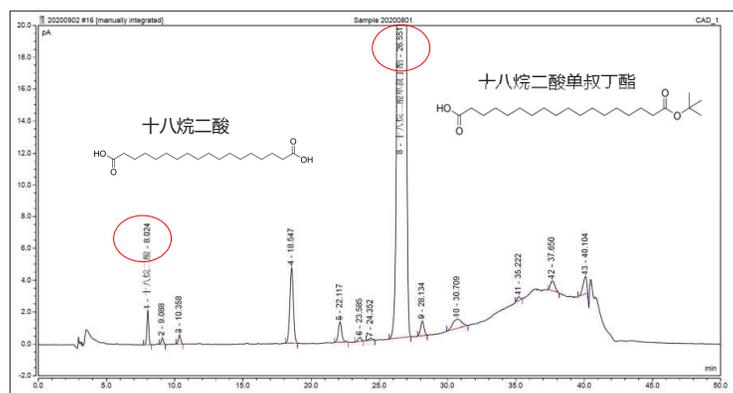
Hypersil Chiral IXT分析D/L- FMOC 亮氨酸



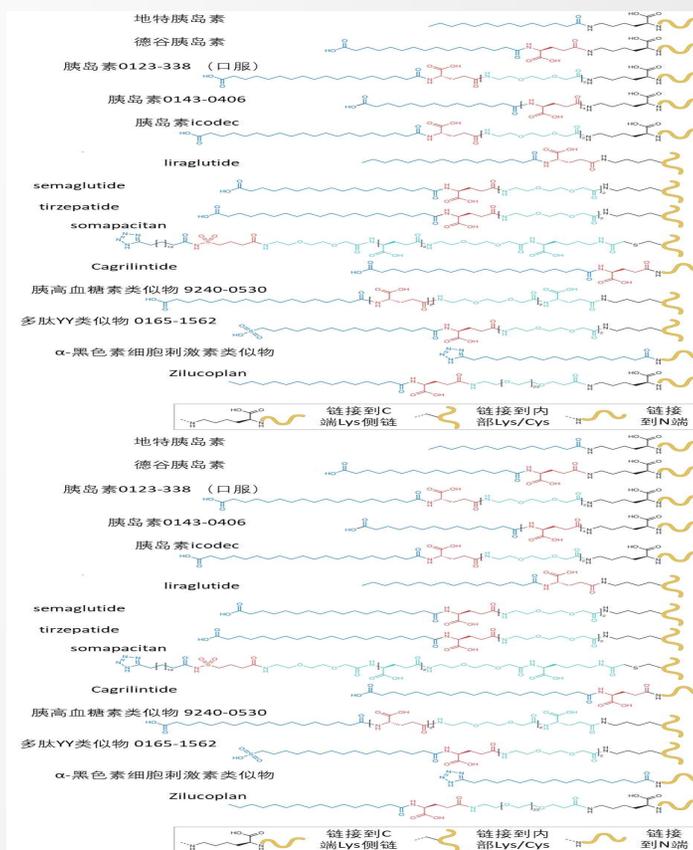
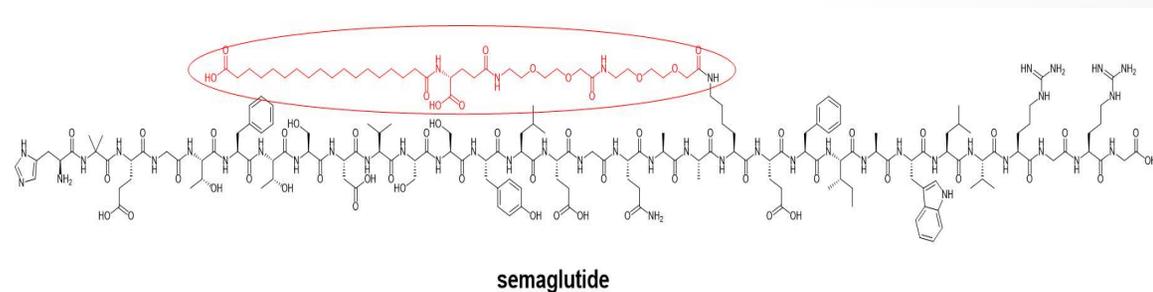
色谱柱:	Hypersil Chiral IXT, 5 μm
规格:	4.6×250 mm
流动相:	0.1%TFA 水溶液:乙腈:甲醇=45:25:30
流速:	1.5 mL/min
进样体积:	2 μL
柱温:	40 °C
检测器:	UV 220 nm
样品:	D/L-FMOC-LEU-OH (500 mg/L)
	峰1: L-FMOC-LEU-OH
	峰2: D-FMOC-LEU-OH
仪器:	Vanquish Flex 高压四元系统

起始物料

修饰脂肪酸侧链---Acclaim 120 C18分析十八烷二酸单叔丁酯



- Ultimate 3000
- Acclaim 120 C18 (5 μm 4.6×250 mm)
- A: 乙腈/四氢呋喃 95/5
- B: 50 mM乙酸水溶液
- Corona Veo SD
- Chromeleon 7.2

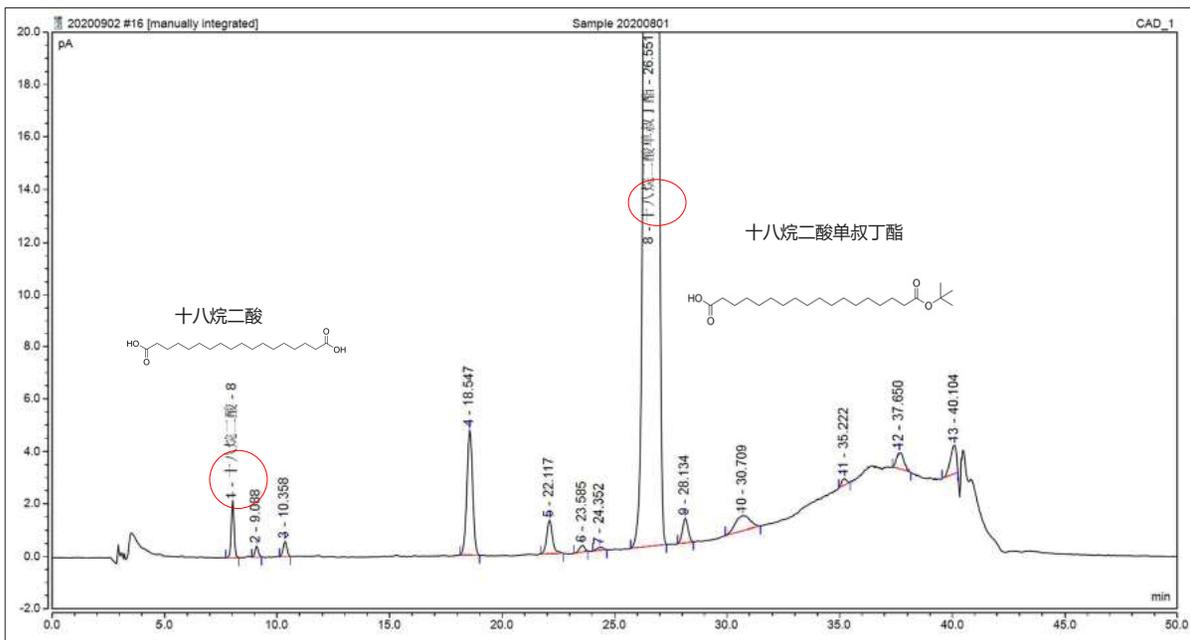


1-2020-APP-LC-005-十八烷二酸单叔丁酯中关键杂质十八烷二酸

Derivatization with fatty acids in peptide and protein drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery. 2023, 22, 59–80

常见多肽脂质化修饰

Acclaim 120 C18分析十八烷二酸单叔丁酯中的相关物质



色谱柱: Acclaim 120 C18 (5 μm 4.6×250 mm)

流动相: A:乙腈/四氢呋喃 95/5

B:50 mM乙酸水溶液

梯度:

Time, min	A%	B%
0	80	20
16	85	15
33	95	5
36	95	5
36.5	80	20
50	80	20

流速: 0.8 mL/min

进样体积: 25 μL

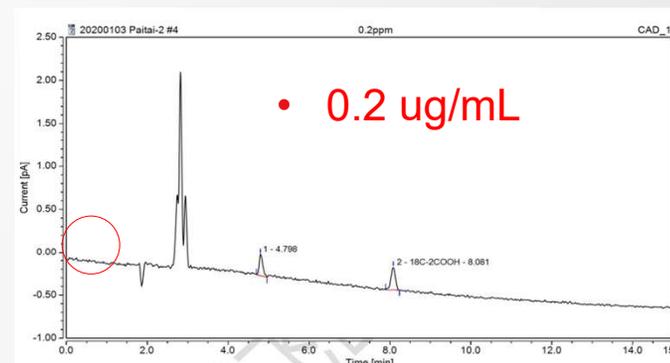
柱温35°C

样品配置: 十八烷二酸单叔丁酯: 分别称取一定量的客户提供的两个十八烷二酸单叔丁酯样品固体, 用 DMF:ACN=10:90 溶液溶解配制成 1 mg/mL 的样品溶液

仪器: U3000

检测器: CAD: Corona VEO, 蒸发温度: 50°C, 5 Hz, filter 3.6 s

Peak No.	Peak Name	Ret.Time min	Amount ug/mL	Rel.Area %	Area pA*min
1		4.764	n.a.	0.01	0.0131
2	18C-2COOH	8.034	0.5275	0.14	0.1721
3		8.421	n.a.	0.03	0.0342
4		15.344	n.a.	0.05	0.0580
5		18.623	n.a.	0.06	0.0799
6		20.522	n.a.	0.12	0.1459
7		22.222	n.a.	0.37	0.4661
8		22.640	n.a.	0.02	0.0278
9		24.448	n.a.	0.01	0.0179
10	18C-2COOH-Ester	26.684	n.a.	99.05	125.0854
11		30.243	n.a.	0.15	0.1892



原料药杂质测定

ThermoFisher
SCIENTIFIC

缺失肽

- 合成过程中缺失一个或多个所需氨基酸
- 质量差=缺失氨基酸-水

插入肽

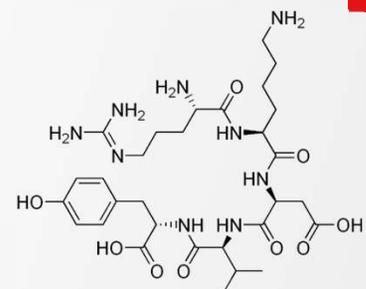
- 过量氨基酸再次交联
- 质量差=缺失氨基酸-水

错结肽

- 既发生缺失
- 又发生插入

共价附着

- 永久性保护基团不完全去除
- 质量差为保护基



胸腺五肽

单个杂质峰面积不得大于对照溶液的主峰面积（1.0%）

各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积的2倍（2.0%）

差向/消旋肽

- 1个或多个非预期手性构型的氨基酸
- 氘代试剂水解衍生化检测

断裂肽

- 高温或pH变化时可能发生肽键断裂

脱酰胺杂质

- 谷氨酰胺
- 天冬酰胺
- 通过直接水解/β转变

异构化杂质

- 天冬氨酸侧链失水或氨环化到主链
- 琥珀酰亚胺
- 水解开环形成异构体

二嗪啉酮/焦谷氨酸

- 氨基进攻β位主链酰胺键的羰基，形成二嗪啉酮
- 缺失两个氨基酸
- N-端谷氨酰胺环化成焦谷多肽类似物

聚合物

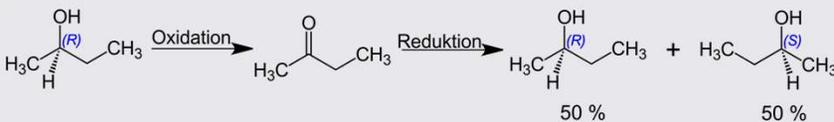
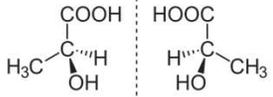
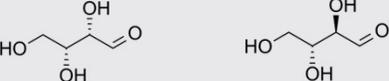
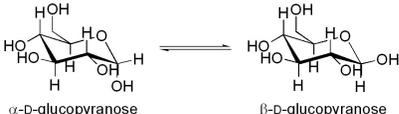
- 分子间聚集和自结合
- 二硫键
- 二酪氨酸
- 增加免疫原性

氧化杂质

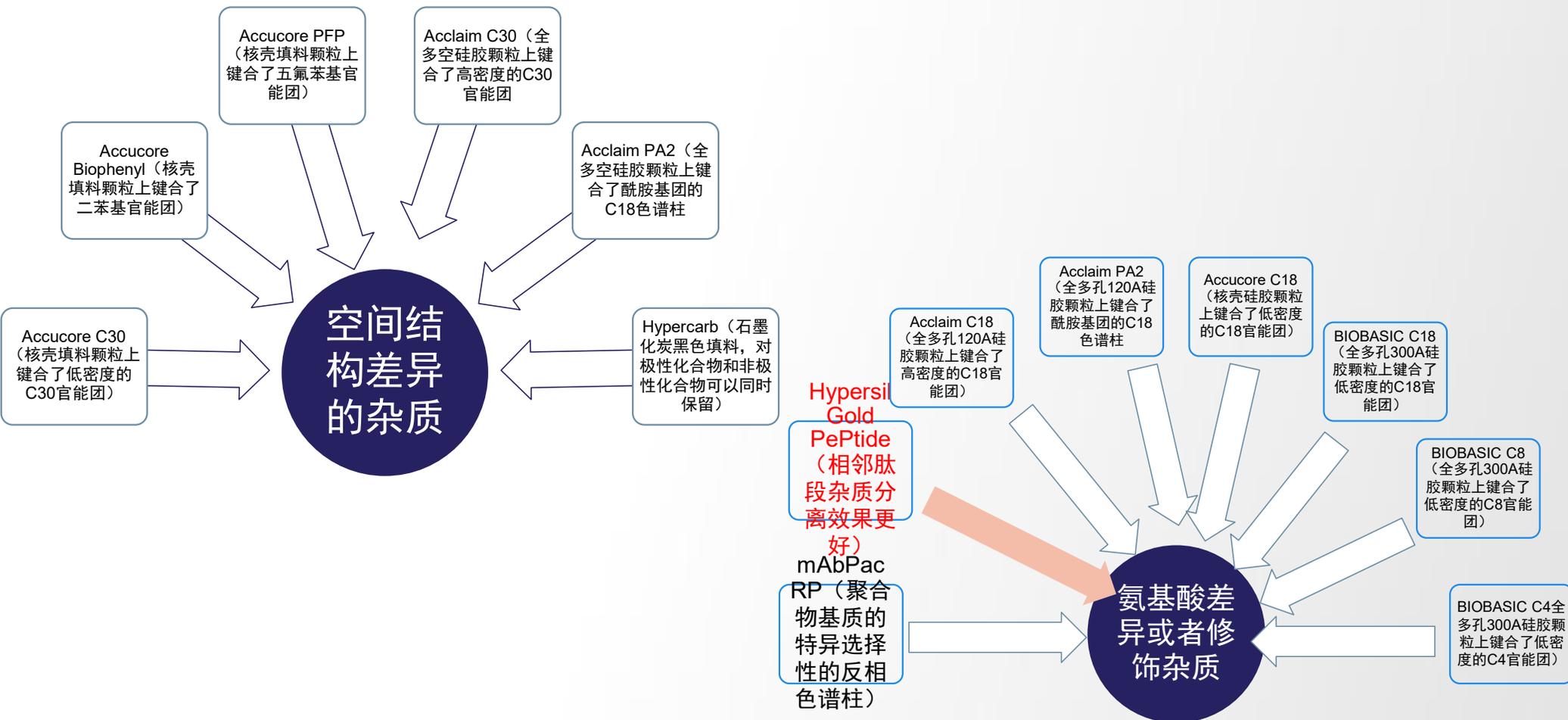
- 含硫氨基酸-二硫键、亚砷、砷和磺酸
- 组氨酸、酪氨酸、色氨酸

差向肽

非对映异构体杂质

分类	描述	结构举例
外消旋化	在完全外消旋化后形成外消旋混合物 两种对映体的1:1混合物	 <p>The diagram illustrates the racemization of a chiral alcohol. It starts with (R)-butan-2-ol, which is oxidized to butan-2-one. This ketone is then reduced back to butan-2-ol, resulting in a 50% yield of the original (R)-enantiomer and a 50% yield of the (S)-enantiomer.</p>
对应异构体	互为镜像 (mirror images) 的分子	 <p>Two enantiomers of 2-butanol are shown as mirror images across a vertical dashed line. The left structure has a methyl group on the left, a hydroxyl group on the right, and a hydrogen atom on a dashed bond. The right structure is its mirror image, with a methyl group on the right, a hydroxyl group on the left, and a hydrogen atom on a dashed bond.</p>
非对映异构	包含具有一个或多个手性中心但不互为镜像关系的化合物 顺反异构体、构象异构体、内消旋化合物和具有非对映关系的光学异构体	 <p>Two diastereomers of 2,3-butanediol are shown. The left structure is the meso form, with both hydroxyl groups on the same side of the carbon-carbon bond. The right structure is the (2R,3R) form, with hydroxyl groups on opposite sides.</p>
差向异构体	含有两个或多个四面体型手性中心的分子中 只有一个不对称原子构型不同的一对非对映异构体	 <p>Two anomers of D-glucose are shown in equilibrium. The left structure is alpha-D-glucopyranose, and the right structure is beta-D-glucopyranose. They differ only in the orientation of the hydroxyl group on the anomeric carbon (C1).</p>

多肽有关物质测定RP柱的选择



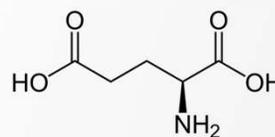
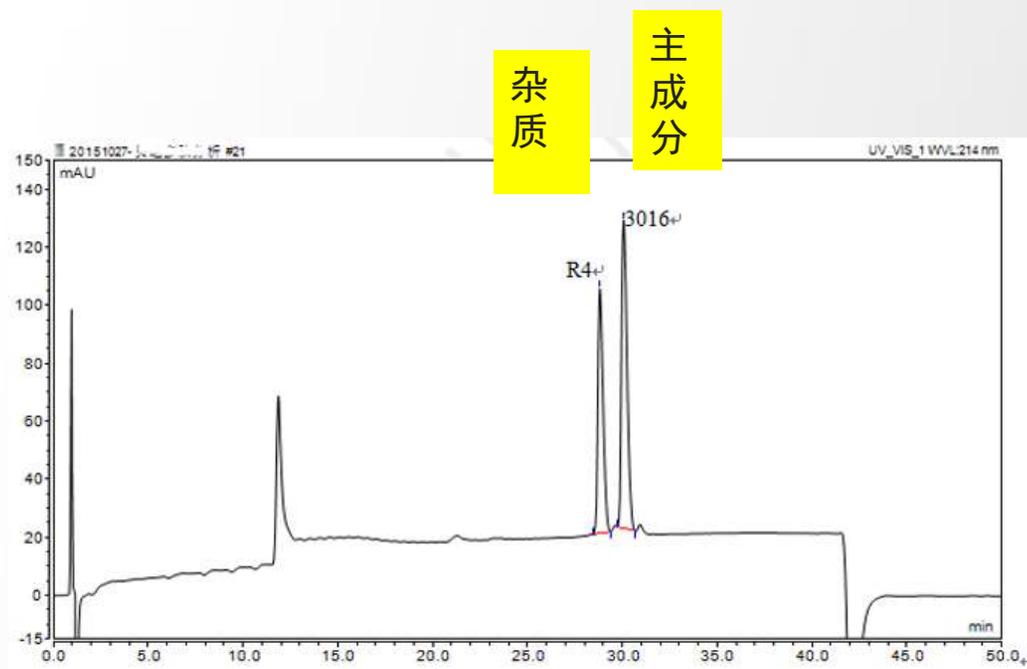
差向肽分析案例——Acclaim PA2分析L/D-Glu 差异的多肽杂质分析

- 色谱柱: Acclaim RSLC PA2, 2.1×150mm, 2.2um
- 目标成分: 33个氨基酸的多肽;
- 杂质R4: 肽链中L-Glu(OtBu)-OH换成D-Glu(OtBu)-OH, 其他结构同3016;
- 分子量: 均为4153。

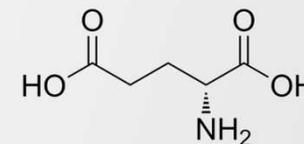
A: 5%乙腈+95%水+0.1%TFA, B: 95%乙腈+5%水+0.1%TFA;

流速: 0.4ml/min; 梯度分离;

时间/min	A/%	B/%
0	99	1
10	82	18
10.1	65	35
35	50	50
40	50	50
40.1	99	1
50	99	1



• L-谷氨酸

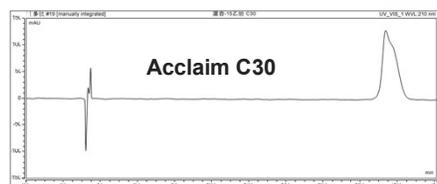
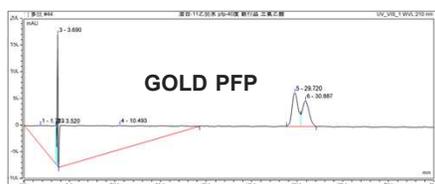
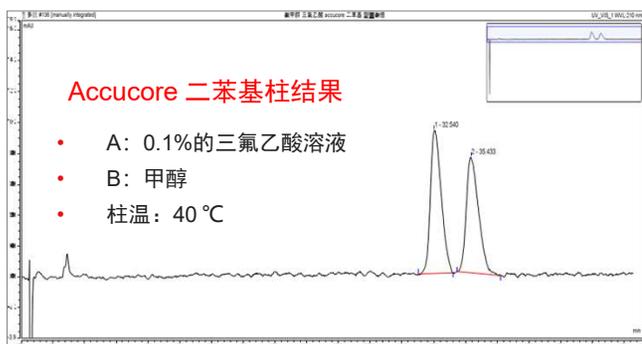


• D-谷氨酸

插入肽分析案例-MAbPac RP分析一个丙氨酸插入的18个氨基酸的杂质

相差一个丙氨酸的杂质分析

- 主成分: H-Gly-Gly-■■■■■-Pro-Lys-Gly-NH₂
- 杂质: H-β-Ala-Gly-■■■■■-Pro-Lys-Gly-NH₂



客户测试:

- Techmate C18-ST
- Waters Acquity BEH C18
- Welch ultimate XB-C8
- Waters symmetry C18
- 均无法分离

实验室筛查:

- Acclaim C30
- Acclaim PA2
- Synchroni AQ
- GOLD Phenyl
- GOLD PFP
- Synchronis C18
- Mabpac RP
- 无法有效分离

18个氨基酸与19个氨基酸的多肽的分离

流动相:

A: 95%乙腈+5%超纯水+0.08%三氟乙酸

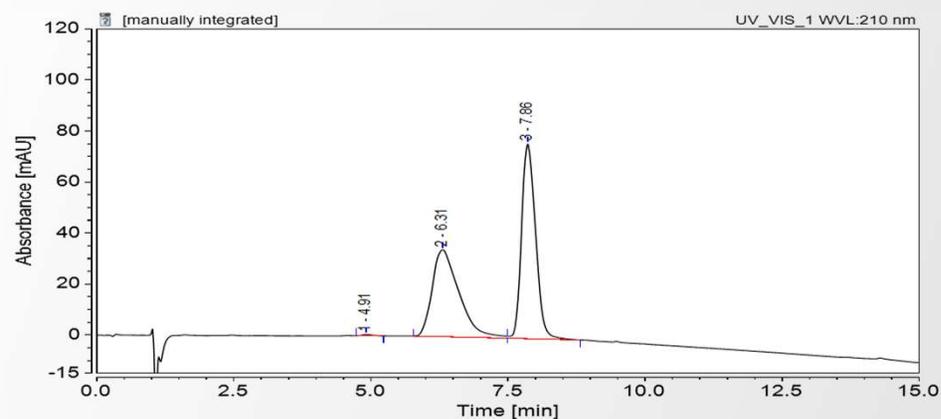
B: 5%乙腈+95%超纯水+0.1%三氟乙酸

流速: 0.25 mL/min

进样体积: 1 uL

柱温: 60 °C

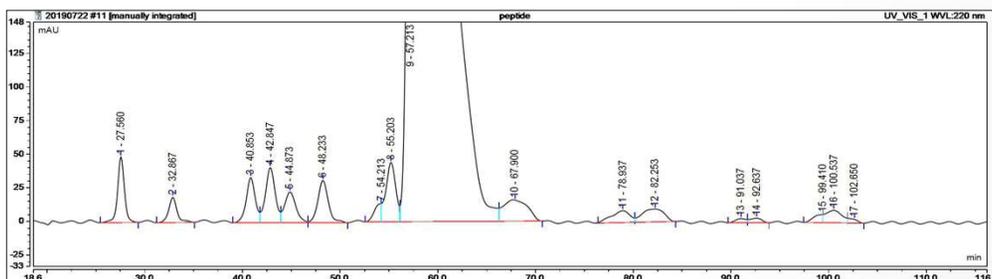
色谱柱: mAbPac RP 2.1 × 50 mm, 4μm(P/N088648)



4-CCS-SW-125 Accucore Biphenyl 2.6um 2.1mmX100mm(PN 17826-102130)分析一个丙氨酸差异的多肽

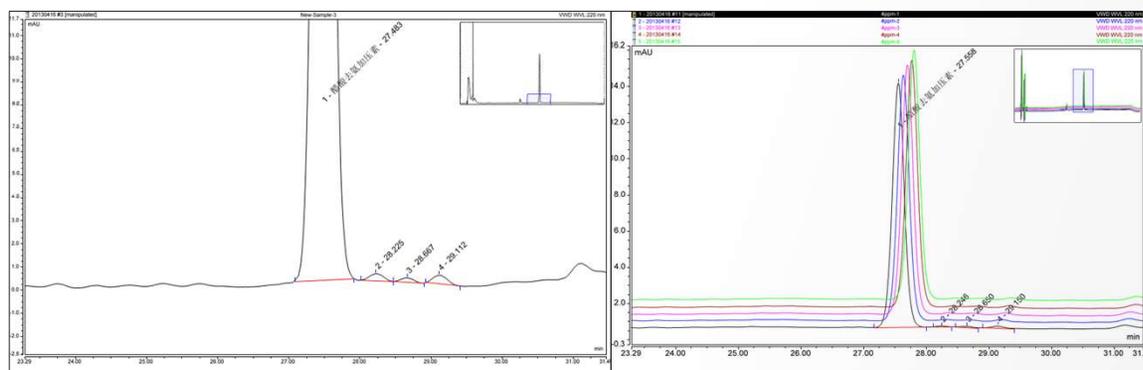
有关物质分析-RP模式

Acclaim 120C18分析醋酸去氨加压素



多肽中16个杂质分离

- Acclaim120 C18 (2.1 x 100 mm, 2.2 μm)
- A: 三乙胺/水, 磷酸调pH至3.0
- B: 异丙醇: 乙腈 (2:3)
- 柱温: 40° C
- VWD
- Chromeleon 7.2



醋酸去氨加压素

- Acclaim C18 (4.6*250 mm, 5.0 μm)
- A: 磷酸盐溶液 pH =7
- B: ACN
- VWD
- Chromeleon 7.2

有关物质分析-RP模式

Acclaim 120 PA2按照2020版中国药典方法分析胸腺法新有关物质

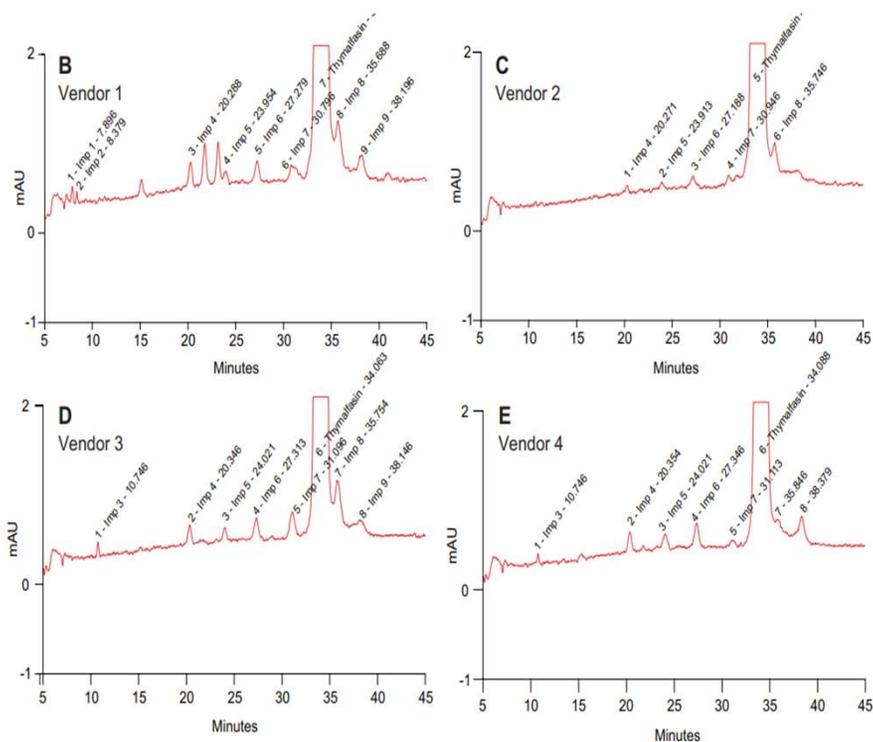


Figure 5. Comparison of thymalfasin injections from different vendors at 0.8 mL/min. (A) Overlay of all four chromatograms; (B-E) individual chromatograms.

Experimental conditions

Column: Acclaim PolarAdvantage II C18, 3 μ m, 4.6 \times 150 mm

Mobile phase:
 A: 100 mM ammonium sulfate + 1.25% phosphoric acid in water:acetonitrile (v/v: 90:10) (pH 1.5)
 B: 100 mM ammonium sulfate + 1.25% phosphoric acid in water:acetonitrile (v/v: 50:50) (pH 1.5)

	Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
Gradient:	0	88	12
	45	82	18
	50	50	50
	51	88	12
	60	88	12

Flow rate: 0.8 mL/min

Column temperature: 50 $^{\circ}$ C

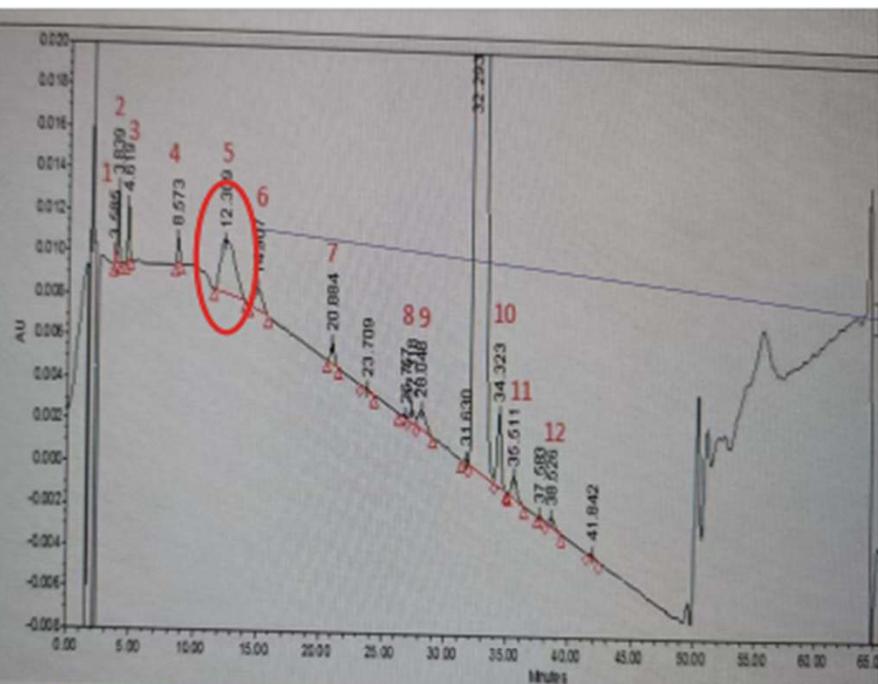
Sample compartment
temperature: 4 $^{\circ}$ C

Injection volume: 20 μ L

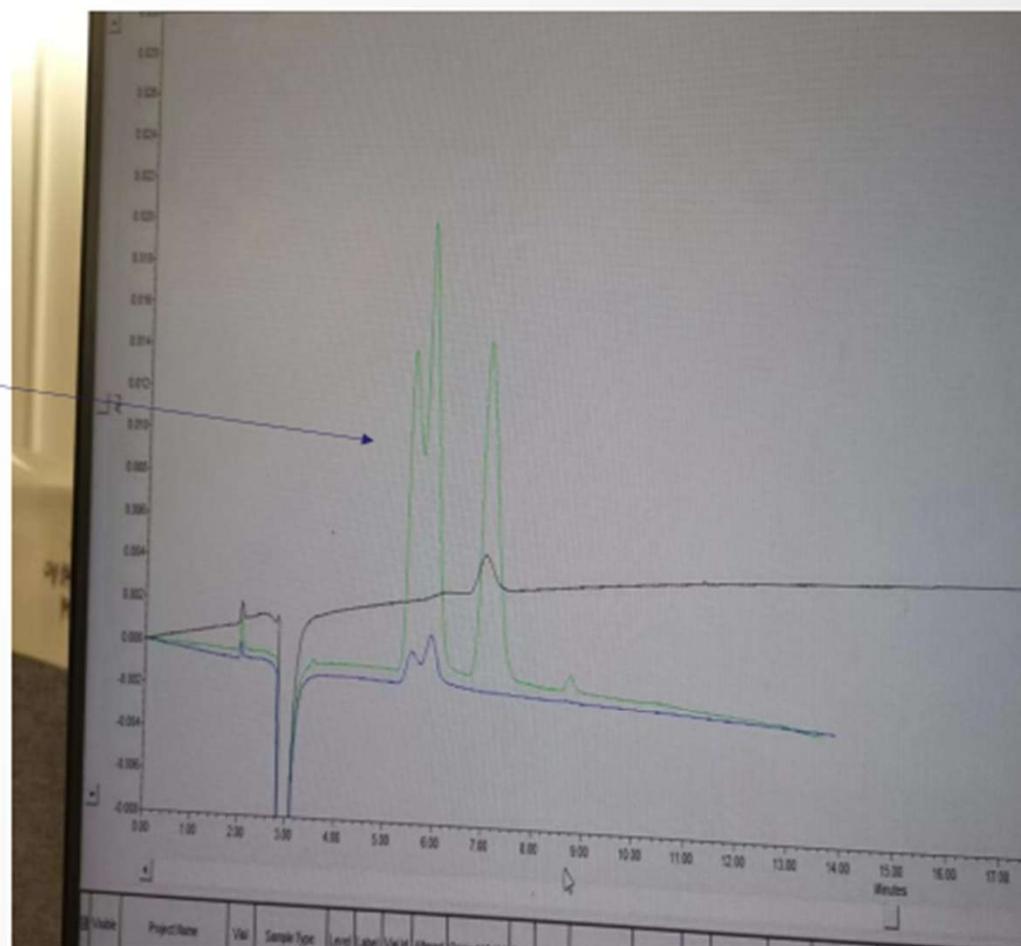
Needle wash solvent: 50% methanol

Detection: 210 nm, 2 Hz, response time 2.0 s

Acclaim PA2分析杂质，跟C18互补的选择性

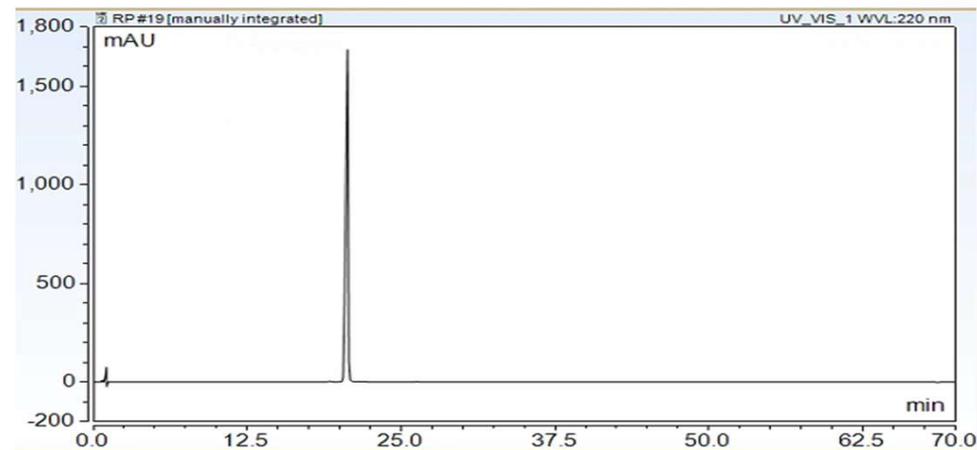
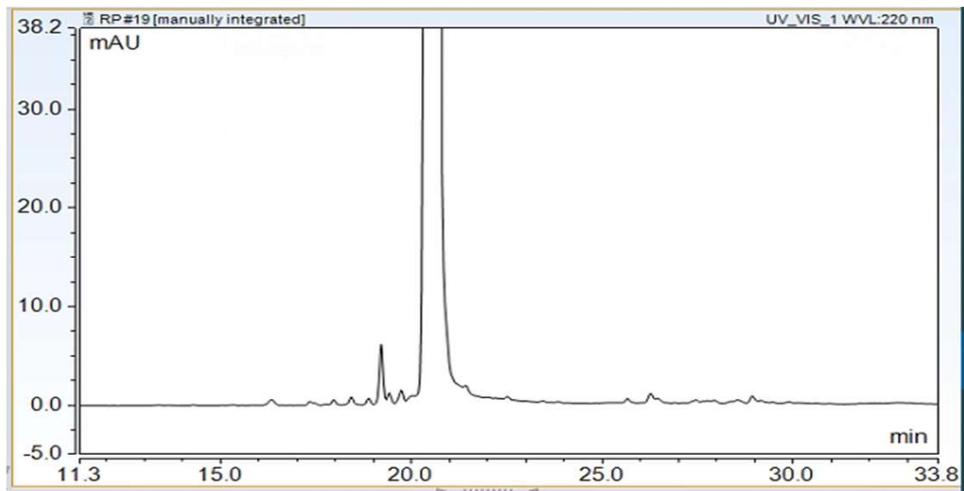


问题：原方法稳定性样品 5 号峰处实际是两个包裹的杂质峰未分开。



有关物质分析-RP模式

Hypersil Gold Peptide 在Vanquish Flex 四元高效液相系统分析司美格鲁肽原料有关物质

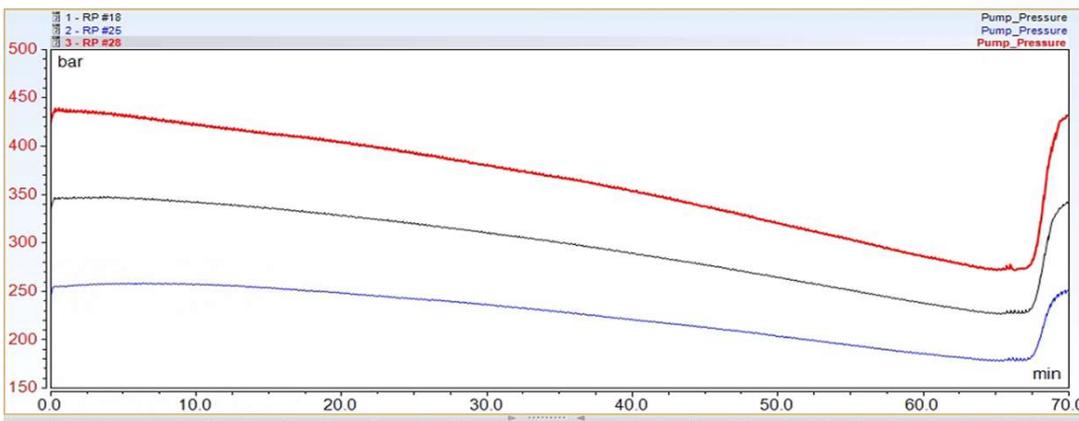
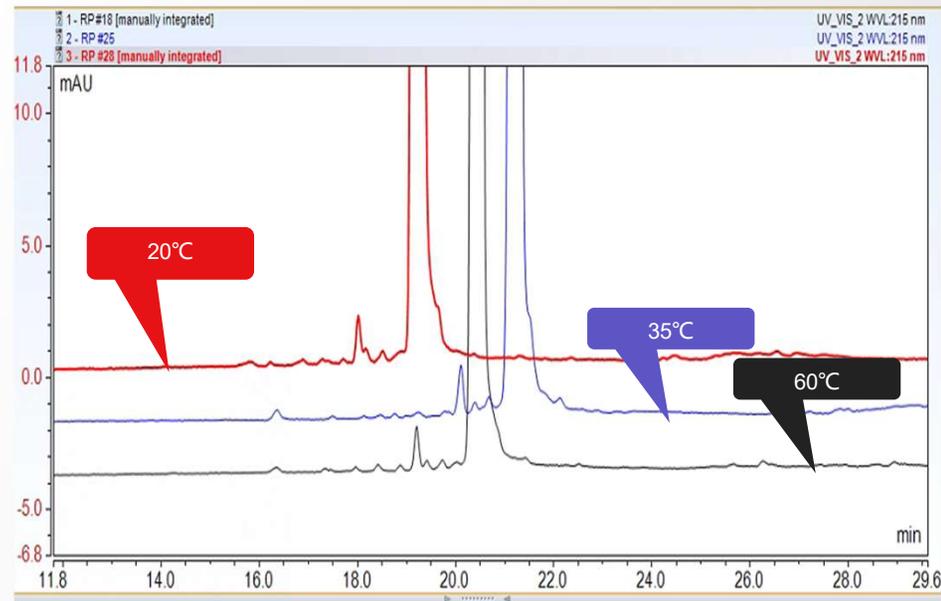
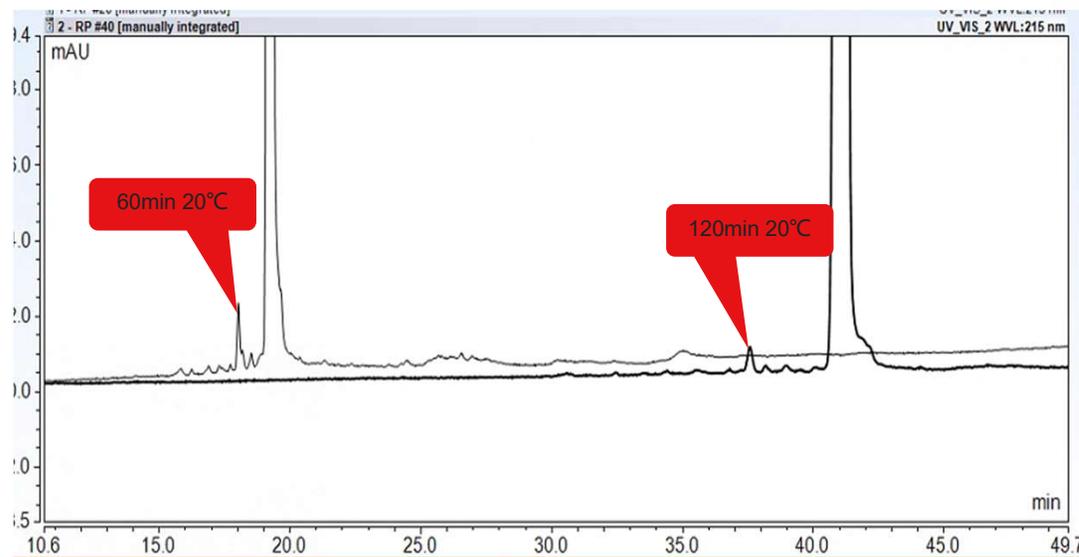


- Column size: 2.1X150 1.9um
- 磷酸二氢铵乙腈体系

No	Time	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0.000					Equilibration
2	0.000	0.300	60.0	0.0	40.0	5
3	New Row					
4	0.000					Run
5	0.000	0.300	60.0	0.0	40.0	5
6	60.000	0.300	0.0	0.0	100.0	5
7	60.010	0.300	0.0	0.0	100.0	5
8	65.000	0.300	0.0	0.0	100.0	5
9	65.010	0.300	60.0	0.0	40.0	5
10	70.000	0.300	60.0	0.0	40.0	5
11	New Row					
12	70.000					Stop Run

Peak No.	Ret.Time min	Rel.Area %	Area mAU*min	Height mAU	Asym. EP	Resol. EP	Plates EP
1	16.340	0.03	0.1161	0.61	0.92	4.04	47935
2	17.328	0.01	0.0606	0.40	1.96	3.51	130065
3	17.958	0.02	0.0658	0.56	n.a.	2.68	184648
4	18.423	0.03	0.1131	0.83	0.99	2.54	163924
5	18.872	0.02	0.0829	0.70	1.06	1.94	191319
6	19.208	0.17	0.7083	6.15	n.a.	1.11	194976
7	19.412	0.03	0.1377	1.23	n.a.	1.55	156837
8	19.733	0.05	0.2055	1.53	n.a.	2.86	128769
9	20.650	98.90	418.7368	1686.25	0.67	n.a.	38268
10	21.423	0.26	1.0962	1.99	n.a.	n.a.	n.a.
11	22.510	0.05	0.1988	0.84	n.a.	n.a.	n.a.
12	22.818	0.13	0.5527	0.40	n.a.	n.a.	n.a.
13	25.664	0.04	0.1559	0.62	n.a.	2.33	193139
14	26.260	0.08	0.3288	1.12	n.a.	n.a.	140568
15	27.458	0.03	0.1394	0.48	n.a.	n.a.	n.a.
16	27.928	0.04	0.1697	0.42	n.a.	n.a.	n.a.
17	28.549	0.04	0.1642	0.43	n.a.	0.85	30881
18	28.931	0.03	0.1339	0.85	n.a.	n.a.	213076
19	29.153	0.02	0.0737	0.39	n.a.	n.a.	n.a.
20	29.449	0.01	0.0409	0.21	n.a.	n.a.	n.a.
21	29.885	0.02	0.1055	0.23	n.a.	n.a.	124828
Maximum		98.90	418.7368	1686.25	1.96	4.04	213076
Minimum		0.01	0.0409	0.21	0.67	0.85	30881
Sum		100.00	423.3866	1706.23			

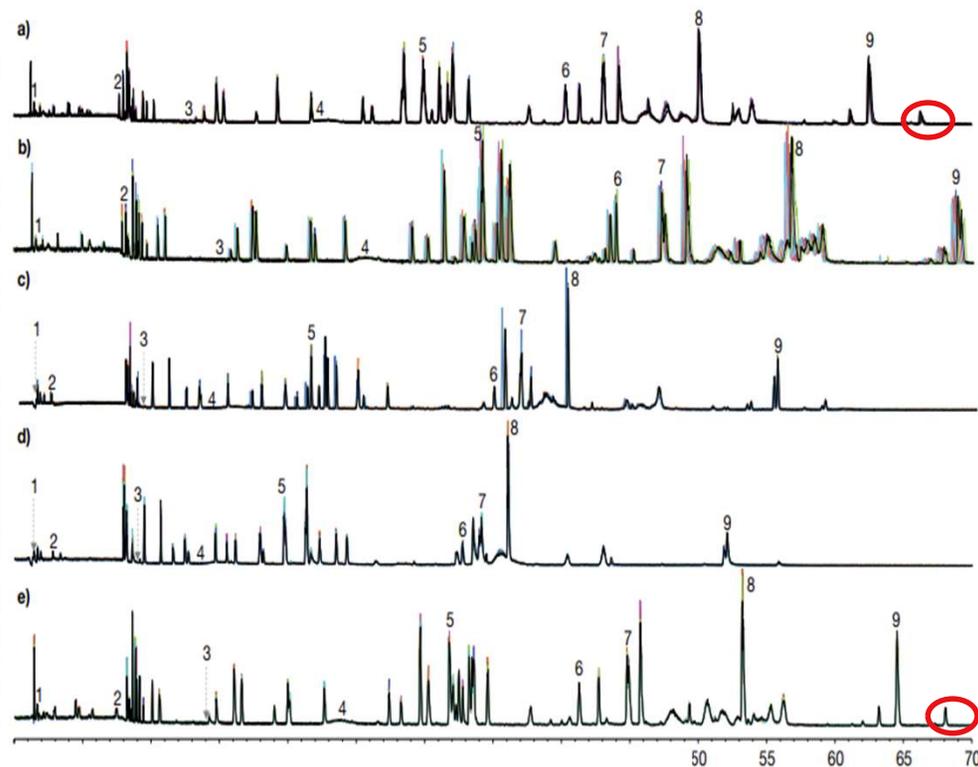
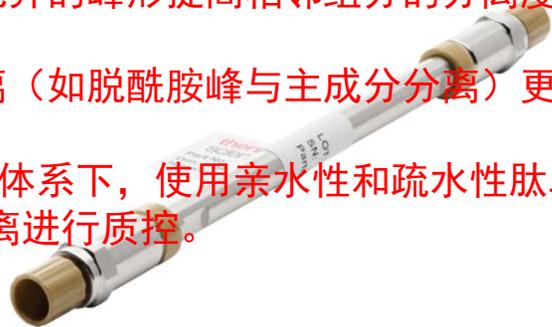
Hypersil Gold Peptide 不同梯度时间和温度对分离结果对比



- 低扩散效应，延长梯度时间优于调整温度带来的分离结果的改善
- 0.3mL/min,ACN,磷酸二氢铵水体系下，20°C的压力在500bar以内

Hypersil Gold Peptide 色谱柱新产品特色

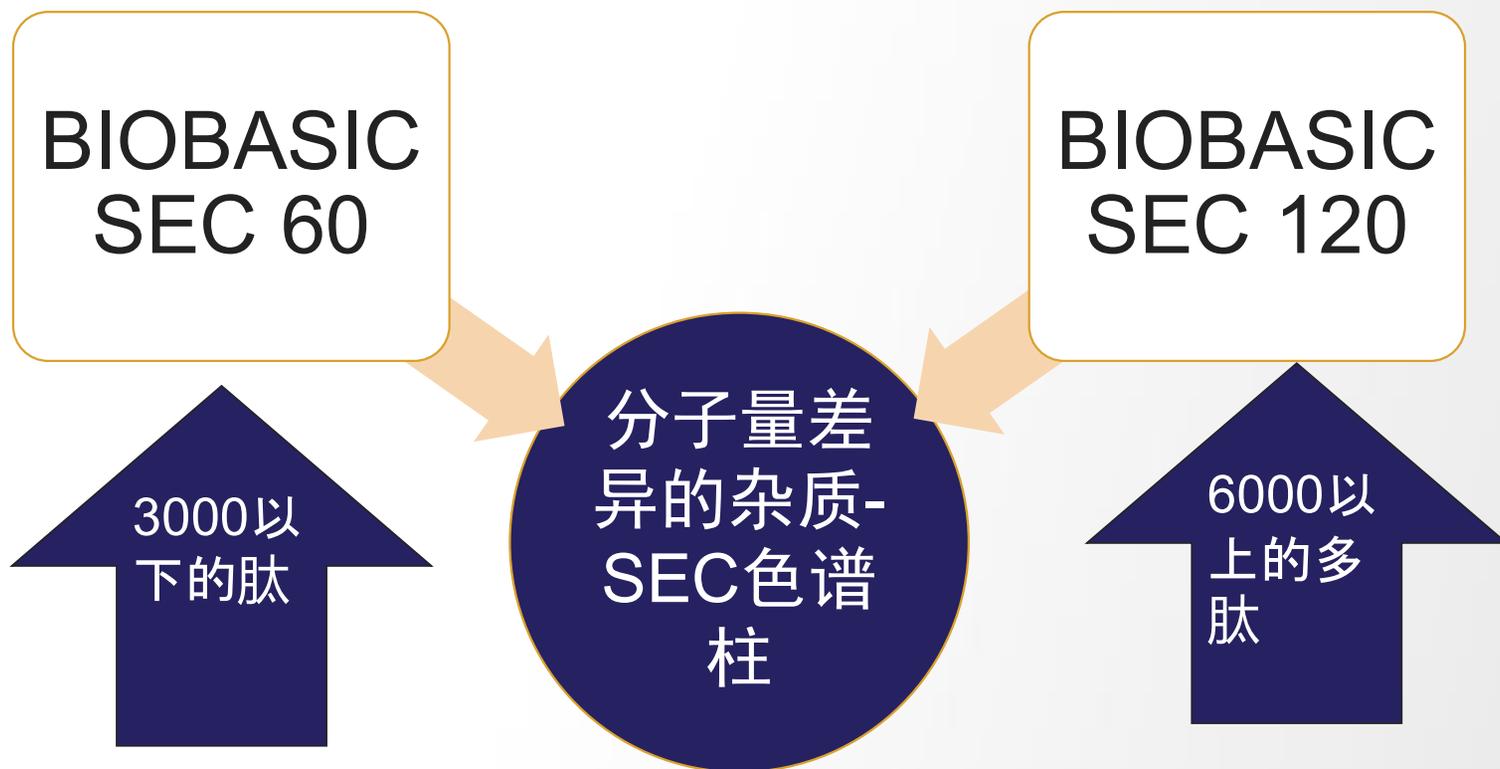
- 柱子与柱子之间，批次间非常小的标准偏差
- 同时优化了亲水性肽段的保留和疏水性肽段的洗脱
- 出色的峰容量，优异的峰形提高相邻组分的分离度
- 翻译后修饰的分离（如脱酰胺峰与主成分分离）更好
- 严格质控，在甲酸体系下，使用亲水性和疏水性肽段的保留和相邻峰的分离进行质控。
- Rituximab和NIST肽图应用开发中，保留时间和峰面积的稳定性优于市场上的同类产品。



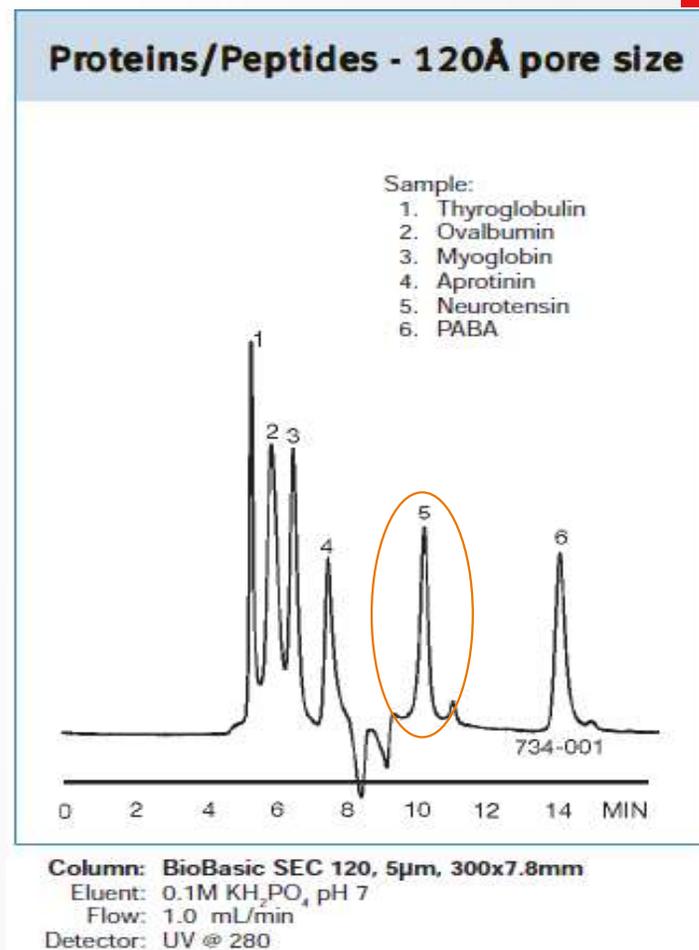
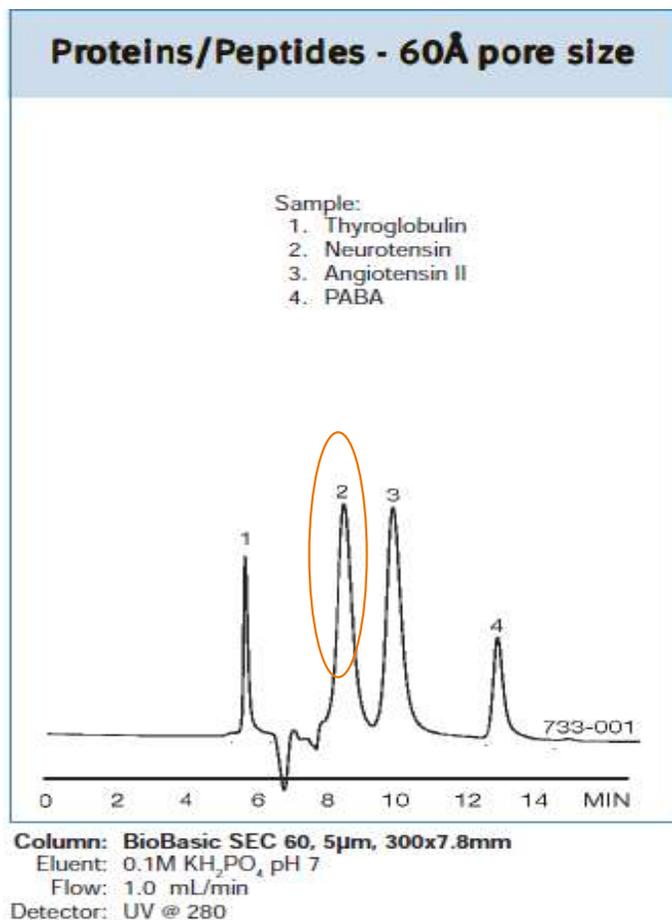
Ordering information

Description	Length (mm) I.D.	Cat. no
Hypersil GOLD Peptide column, 1.9 μ m, peptide separation	50 \times 2.1 mm	26002-052130
Hypersil GOLD Peptide column, 1.9 μ m, peptide separation	100 \times 2.1 mm	26002-102130
Hypersil GOLD Peptide column, 1.9 μ m, peptide separation	150 \times 2.1 mm	26002-152130

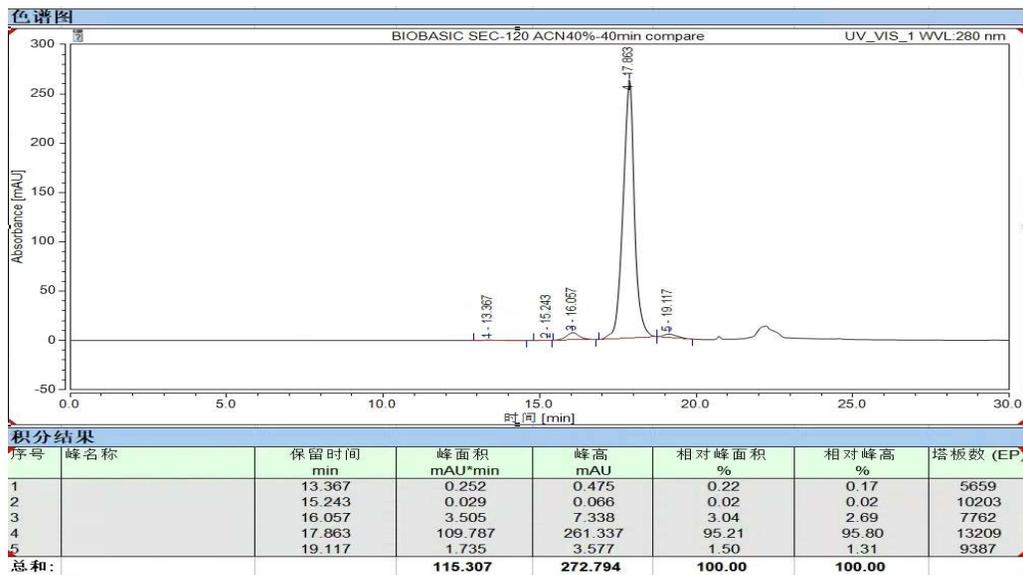
多肽聚合体的测定-SEC模式



不同孔径柱子分离多肽比较图



聚合物分析--重组替度鲁肽的SEC 分析



色谱柱及货号: Biobasic SEC-120 5 μ m 300*7.8mm (PN: 73405-307846)
 保护柱及货号: BioBasic SEC-120-保护柱 5 μ m 30mm*7.8mm (PN: 73405-037821A)

流速: 0.5 mL/min

最大柱压: 727 psi

流动相: 冰醋酸-乙腈-0.1%精氨酸 (11.25:40:48.75)

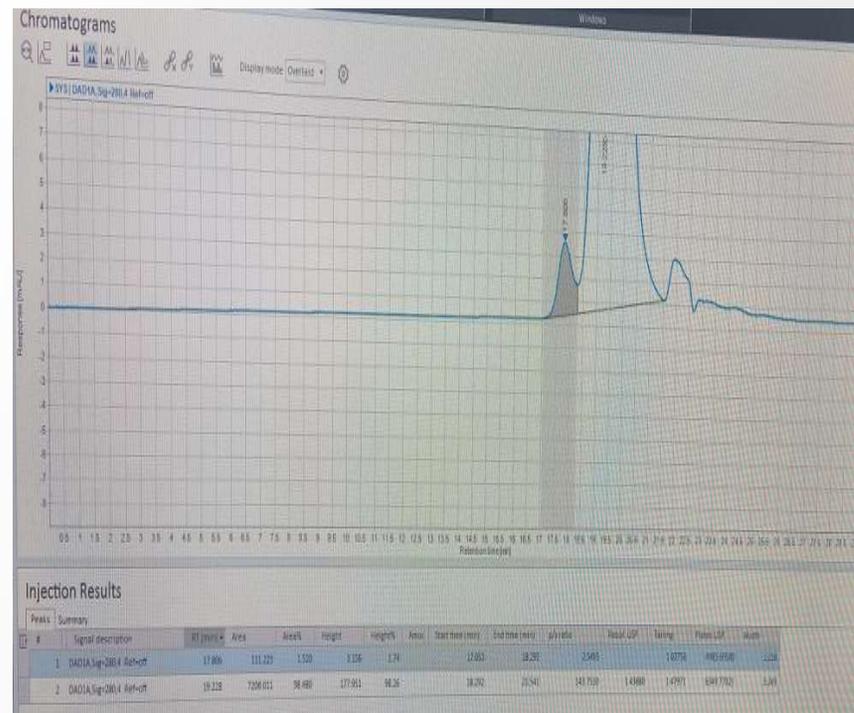
梯度条件: 等度

进样体积: 50 μ L

柱温: 30 $^{\circ}$ C

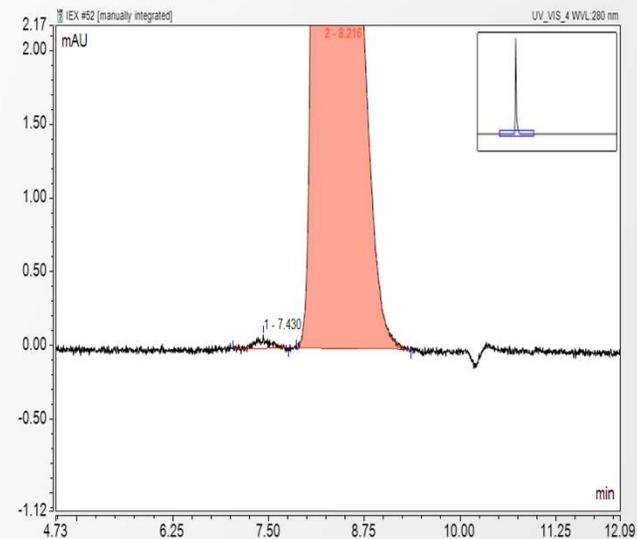
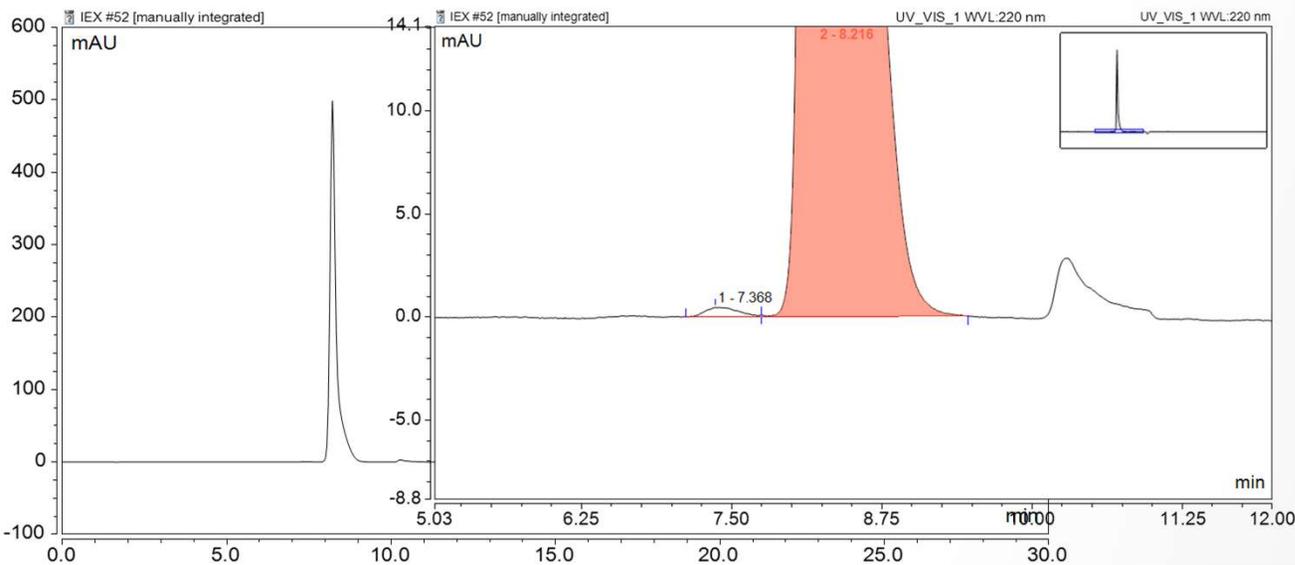
检测器: UV 280 nm

采集时间: 30 min



Insulin HMWP (7.8 \times 300mm,10 μ m)

有关物质--司美格鲁肽的SEC 分析



色谱柱及货号: Biobasic SEC-120 5 μ m 300*7.8mm (PN: 73405-307846)

流速: 0.8 mL/min

最大柱压: 727 psi

流动相: 0.1% TFA-乙腈=40: 60

梯度条件: 等度

进样体积: 10 μ L

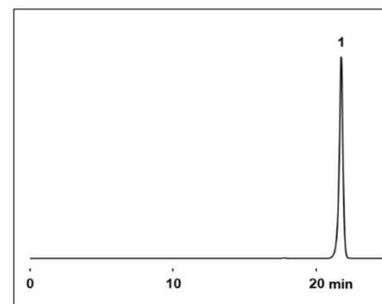
样品: 司美格鲁肽原料 (1mg/mL) 99.87%

柱温: 30 $^{\circ}$ C

检测器: UV 220 nm

采集时间: 30 min

司美格鲁肽制剂是一种糖尿病治疗药物。以下是使用硅胶基质水溶性SEC (GFC) 色谱柱 PROTEIN KW-802.5分析司美格鲁肽制剂的应用实例。

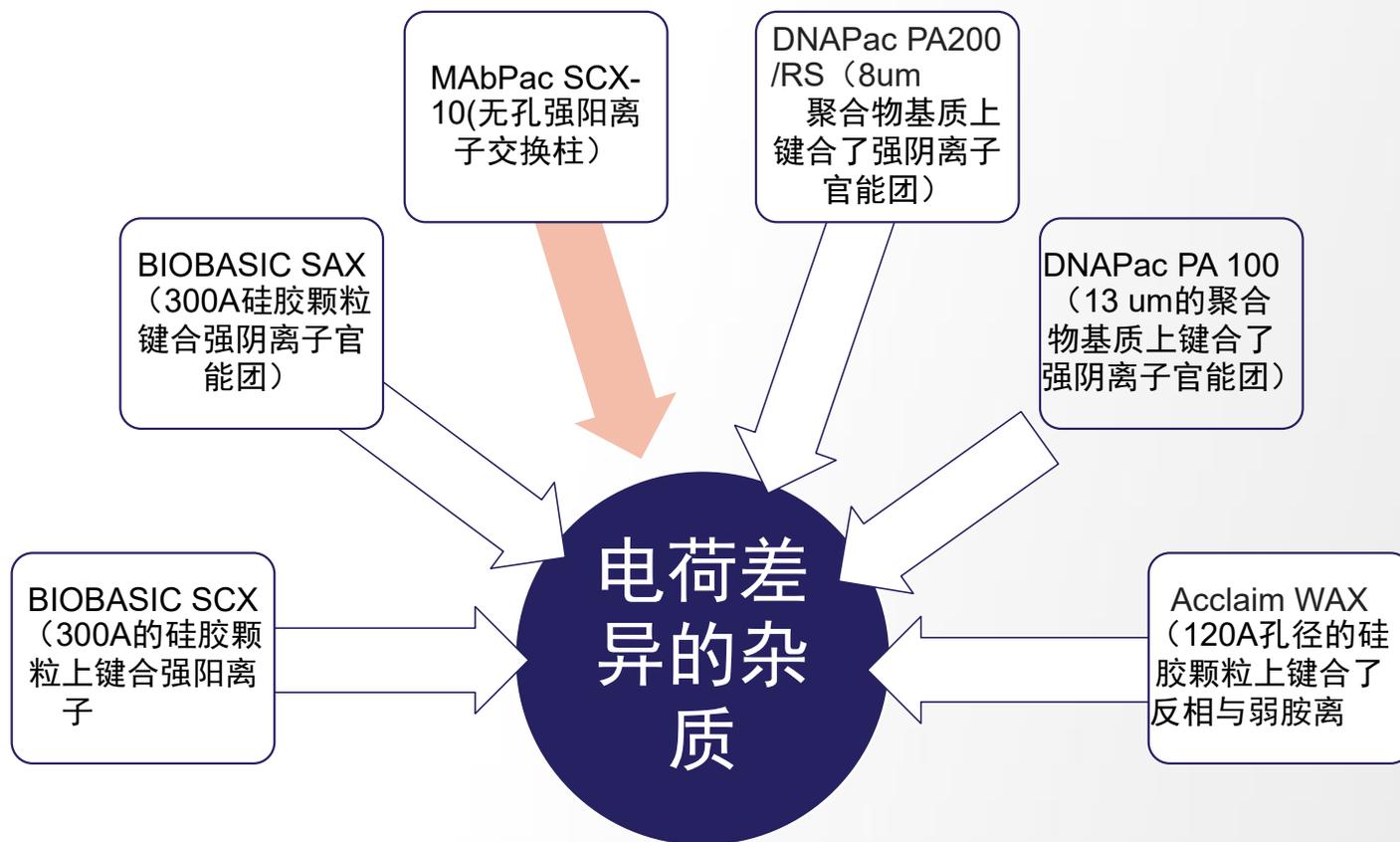


Sample: 5 μ L

1. Semaglutide formulation 1.5 mg/mL

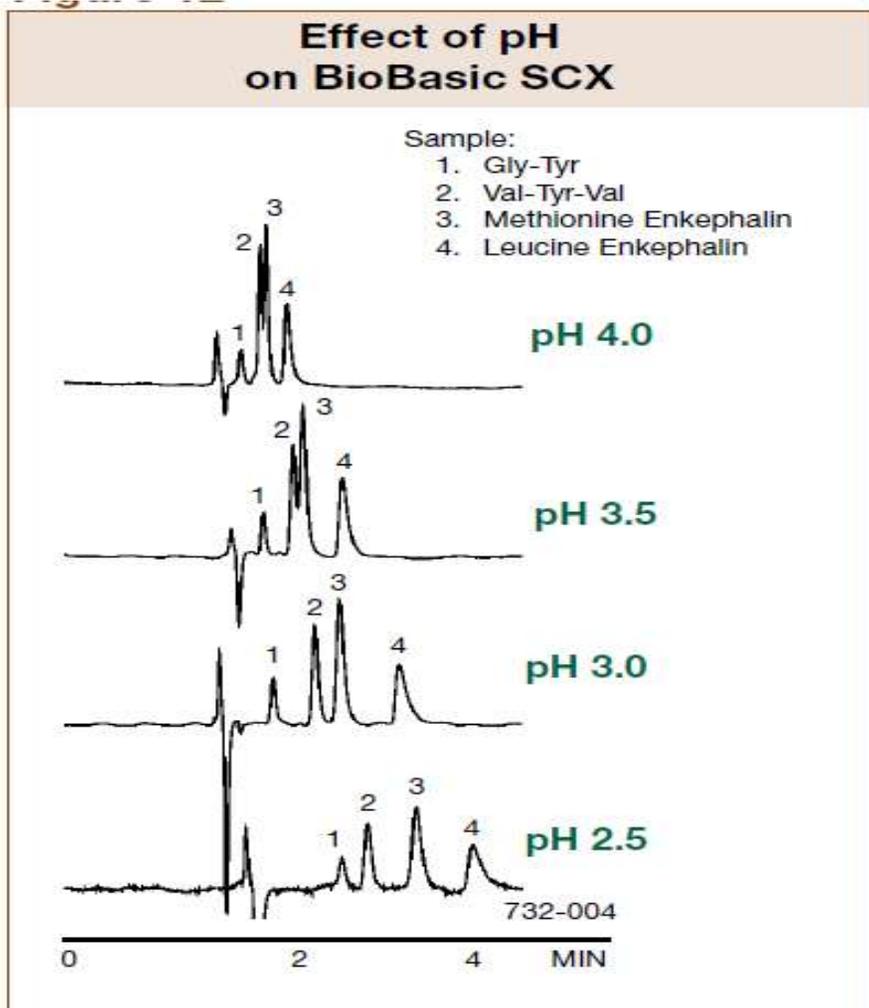
Column : Shodex PROTEIN KW-802.5 (8.0 mm I.D. x 300 mm)
Eluent : H₂O/CH₃CN/TFA=500/500/1
Flow rate : 0.5 mL/min
Detector : UV (280 nm)
Column temp. : 30 $^{\circ}$ C

根据多肽杂质组成不同选择不同官能团离子交换柱



肽在阳离子交换柱上的分离

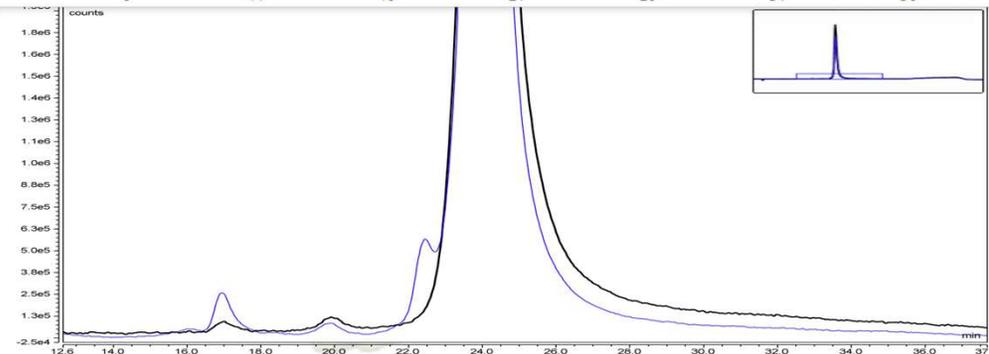
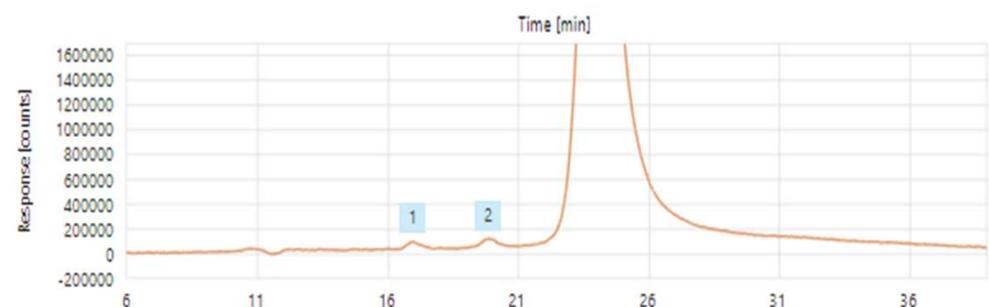
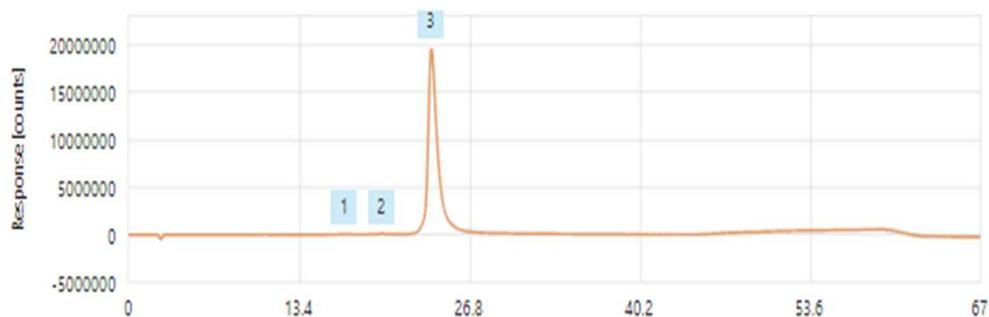
ThermoFisher
SCIENTIFIC



BioBasic SCX, 5 μ m, 150x4.6mm
Eluent: A: 5mM NH₄ Formate
B: A + 1M NaCl
95% A / 5% B
Flow: 1.0 mL/min
Detector: UV @ 210

调整流动相pH值可以
很大程度改变多肽样
品的保留和多肽样品
之间的分离度

利拉鲁肽的IEX分析



Method Parameters

Run Time Length	67 min
Injection Volume	5.0 μ L
Pump Eluent A	10 mM Sodium Acetate pH 4.0: ACN (45:55 V/V)
Pump Eluent B	350 mM Sodium Acetate pH 5.5 : ACN (45:55 V/V)
Sampler Tray Temp	8.0 $^{\circ}$ C
Column Oven Temp	25.0 $^{\circ}$ C
FLD Emission Wavelength 1	360.0 nm
FLD Excitation Wavelength 1	280 nm

Gradient DGP-3600 / Pump Left

Ret Time (min)	Flow (mL/min)	%B	%C
0.000	0.400	0.0	0.0
2.000	0.400	0.0	0.0
40.000	0.400	10.0	0.0
44.000	0.400	40.0	0.0
55.000	0.400	55.0	0.0
57.000	0.400	0.0	0.0
67.000	0.400	0.0	0.0

Description

The Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Bio-LC system is applied for the Ion Exchange analysis of liraglutide. The separation was performed on a Thermo Scientific MAbPac SCX-10.

Market: Pharma
Keywords: HPLC, synthetic peptide, MAbPac SCX 10, Liraglutide, ion exchange analysis
Matrix: N/A
Author: Ankitkumar Patel
Affiliation: thermo Fisher Scientific, CoE Lab, Ahmedabad, India

Uploaded on 5/5/2020.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

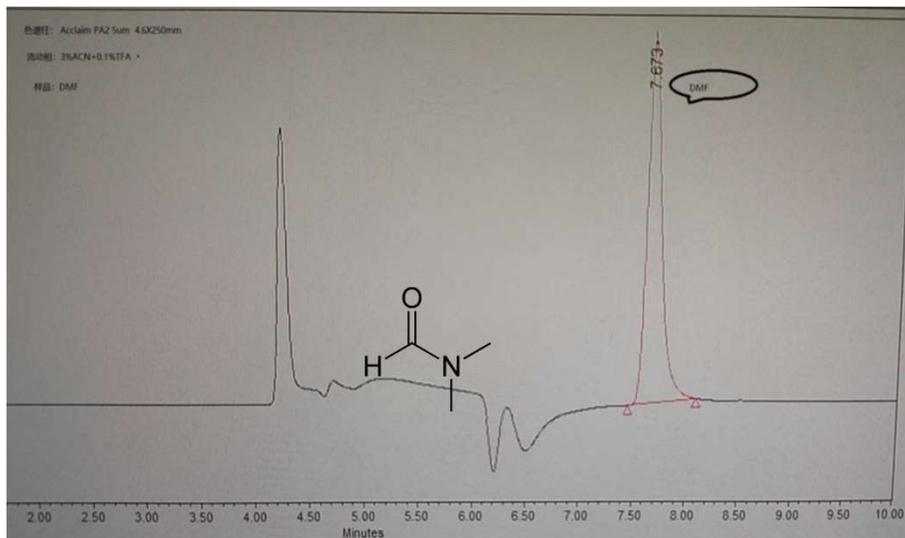
残留溶剂

工艺过程中不同残留溶剂

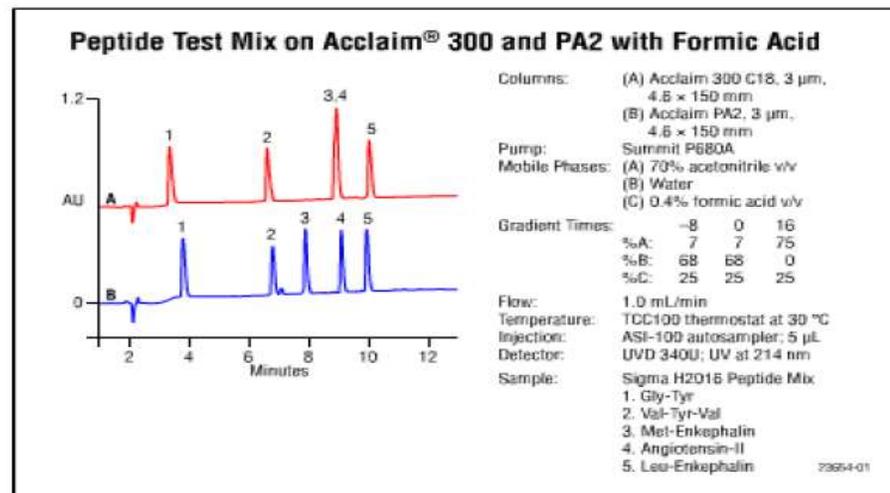
	缩合/清洗	脱保护	切割	纯化	LC	IC	GC
氢氟酸		√	√ (Boc)			√	
三氟乙酸		√	√ (Fmoc)	√	√	√	
乙腈				√			√
DMF	√	√			√		√
哌啶	√	√				√	√
哌嗪	√	√				√	√
二乙胺	√	√				√	√
三乙胺	√	√				√	√
三异丙基硅烷			√				√
缩合试剂	√				√	√	

缩合和清洗工艺中残留检测

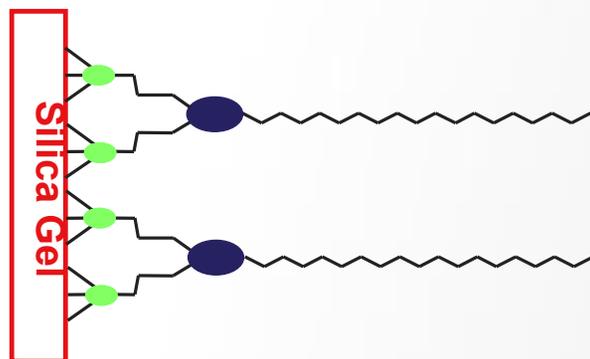
DMF-Acclaim PA2



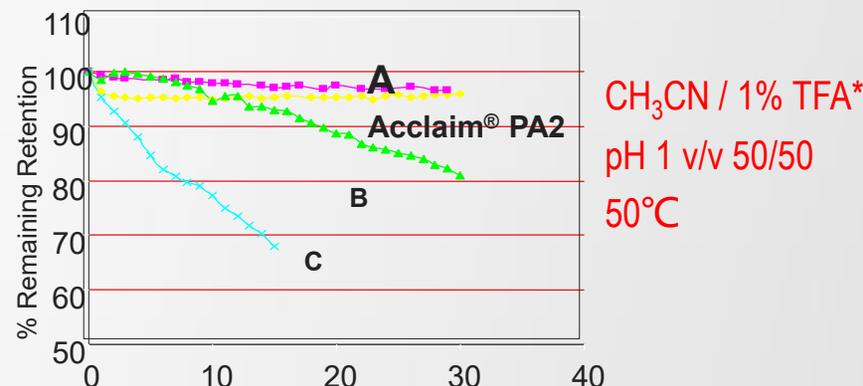
Acclaim PA2 优异的选择性



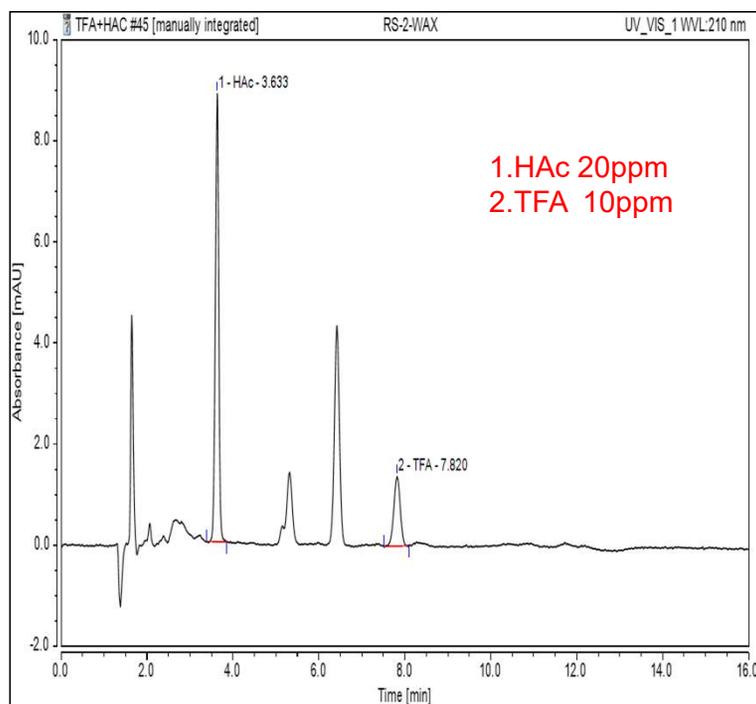
- Acclaim PA2 (5 μm 4.6 × 250 mm)
- 3% ACN + 0.1% TFA
- DMF (二甲基甲酰胺) 残留检测
- DMF刺激性、急性毒性、肝肾损伤



AQ系列耐水相柱子保留弱，不稳定

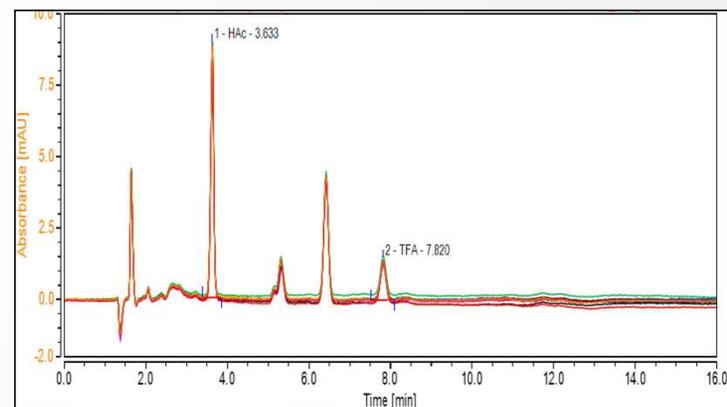


脱保护和切割工艺中的三氟乙酸残留检测-Acclaim Mixed Mode WAX-1



多肽中杂质控制--有机酸含量测试

色谱柱:Acclaim Mixed-Mode WAX-1, 5 μ m,4.6x150 mm(PN:064984)
 流动相:25mM磷酸二氢钠溶液 (pH6.0) -乙腈=60-40
 流速: 1mL/min
 柱温: 30°C
 检测波长: 210 nm
 进样量: 50uL

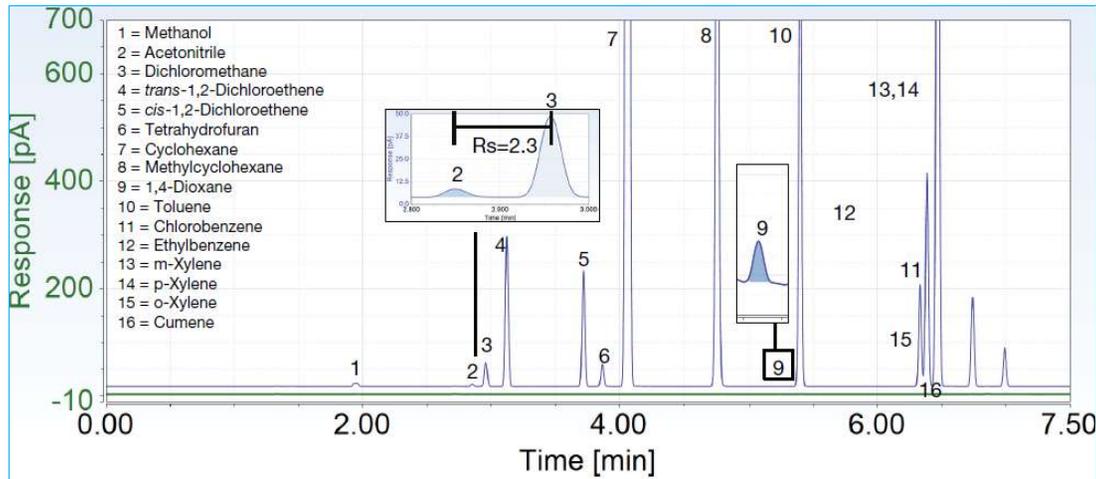


连续10针, 重复性好

有机溶剂残留溶剂检测-TG624 SiIMS (30mX0.32mmX 1.8um)

ThermoFisher
SCIENTIFIC

其他工艺溶剂残留



胸腺五肽：甲醇、乙醇、乙醚、乙腈、二氯甲烷、四氢呋喃、吡啶、N,N-二甲基甲酰胺按气相顶空法检测

AN_19004_GCMS_药物_顶空气相色谱法分析药品中的溶剂残留

AN_10676_Routine-grade performance of a new static headspace autosampler for the analysis of residual solvents (USP 467)

TN_10681_Simplified, cost-effective headspace GC Simplified, cost-effective headspace GC pharmaceutical products

thermoscientific

赛默飞新一代顶空TriPlus 500分析药品中的溶剂残留

赵紫娟 车金水 王申 赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

关键词:

TRACE1310 GC; TriPlus 500; 中国药典(2015版); 溶剂残留

目标

药品中的残留溶剂是指在原料药或辅料的生产中,以及在制剂制备过程中使用的,但在工艺过程中未能完全去除的有机溶剂。残留溶剂不仅没有疗效,其毒性和致敏作用还会对患者产生一定的伤害。

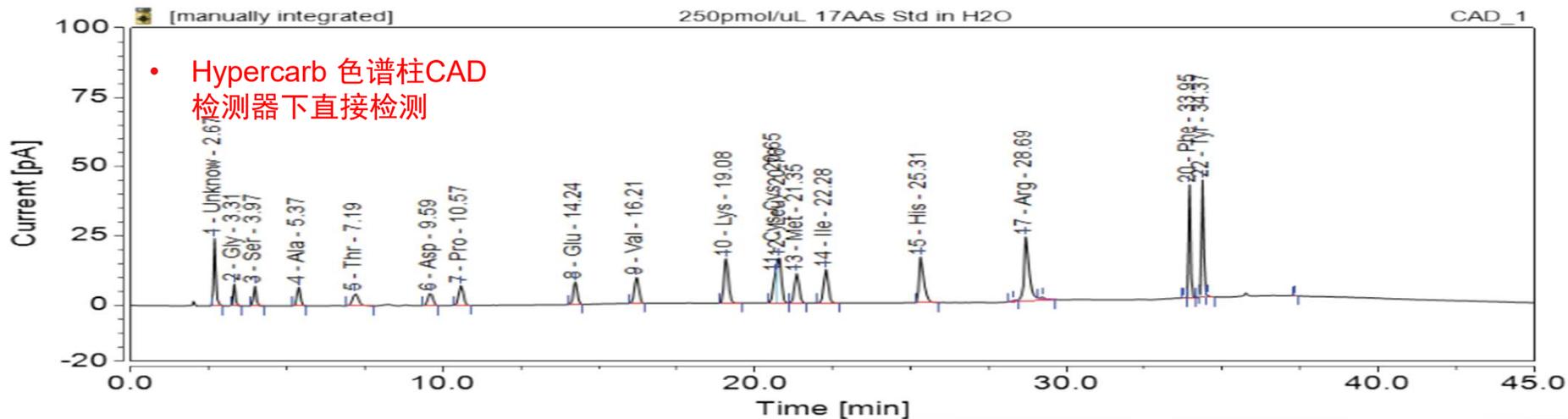
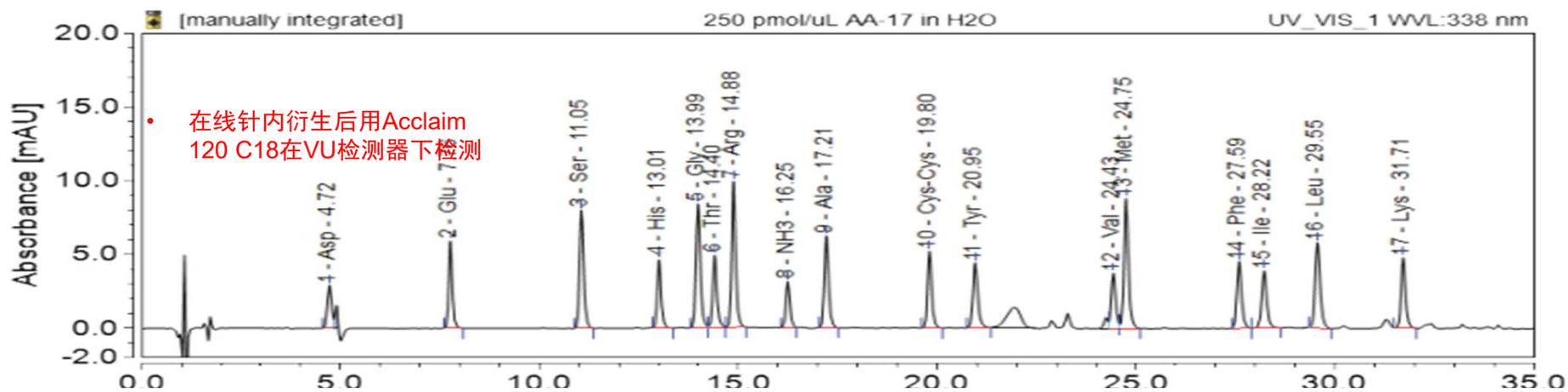
药品中常见的残留溶剂及限度见下表1,除另有规定外,第一、第二、第三类溶剂的残留限度应符合表1中的规定;对于其他溶剂,应根据生产工艺的特点,制定相应的限度,使其符合产品规范、药品生产质量管理规范(GMP)或其他基本的技术要求。

表1. 常见溶剂的分类及其限量

溶剂名称	限度/%	溶剂名称	限度/%	溶剂名称	限度/%	溶剂名称	限度/%
第一类溶剂 (应该避免使用)		第二类溶剂 (应该限制使用)		第三类溶剂 (药品GMP或其他质量要求限制使用)		第三类溶剂 (药品GMP或其他质量要求限制使用)	
苯	0.0002	二氯六环	0.038	醇酸	0.5	丁酮	0.5
四氯化碳	0.0004	2-乙氧基乙醇	0.016	丙酮	0.5	甲基异丁基酮	0.5
1,2-二氯乙烷	0.0005	乙二胺	0.062	甲氧基苯	0.5	异丁醇	0.5
1,1-二氯乙烷	0.0008	甲酰胺	0.022	正丁醇	0.5	正戊醇	0.5
1,1,1-三氯乙烷	0.15	正己烷	0.029	仲丁醇	0.5	正己醇	0.5
第二类溶剂 (应该限制使用)		甲醇	0.3	乙酸丁酯	0.5	正丙醇	0.5
乙醇	0.041	2-甲氧基乙醇	0.005	叔丁基甲基醚	0.5	异丙醇	0.5
氯苯	0.036	甲基环己烷	0.118	异丙基苯	0.5	乙酸丙酯	0.5
三氯甲烷	0.006	N-甲基吡咯烷酮	0.063	乙醚	0.5	(尚无足够毒理学资料)	
环己烷	0.388	硝基甲烷	0.005	乙酸乙酯	0.5	1,1-二乙基丙烷	
1,2-二氯乙烷	0.187	吡啶	0.02	乙醚	0.5	1,1-二甲氧基甲烷	
二氯甲烷	0.06	四氯化碳	0.016	甲胺乙酯	0.5	2,2-二甲氧基丙烷	
1,2-二甲氧基乙烷	0.01	四氯化碳	0.01	甲酸	0.5	异辛烷	
N,N-二甲基乙酰胺	0.109	四氢呋喃	0.072	正庚烷	0.5	异丙醚	
N,N-二甲基甲酰胺	0.088	甲苯	0.069	乙酸异丙酯	0.5	甲基异丙基酮	
1,1,2-三氯乙烷	0.008	二甲苯	0.217	乙酸异丙酯	0.5	甲基四氢呋喃	
				乙醚	0.5	石油醚	
				3-甲氧基-1-丁醇	0.5	三氯乙酸	
						三氯乙酸	

AN_19004_GCMS

结构表征—氨基酸的检测



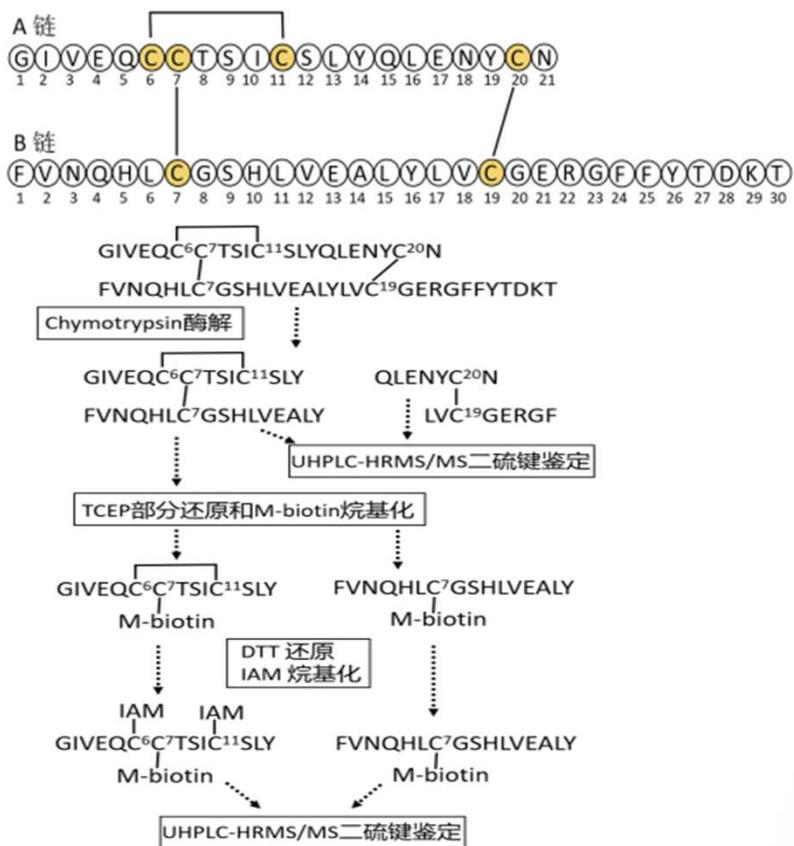
CCS-239 Acclaim C18 衍生VS Hypercarb 直接进样在Vanquish Core高效液相色谱系统用于氨基酸分析

• 结构表征

氨基酸的测定衍生方法VS直接检测方法

方法	在线针内衍生-紫外检测法	非衍生-电雾式检测法																																																						
分析柱	Acclaim 120 C18 (5µm, 4.6 x 150mm,PN: 059148)	Hypercarb (5µm, 4.6 x150mm, PN:35005-154630, Lot 5-848)																																																						
柱温	35 °C	30 °C																																																						
流动相	A: 50mM 磷酸氢二钾溶液 (磷酸调pH=6.5) ; B: 甲醇: 乙腈=1:1	A: 0.3%九氟戊酸水溶液; B: 乙腈																																																						
流速	1.5 mL/min;	1.0 mL/min																																																						
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time, min</th> <th>A%</th> <th>B%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>97</td><td>3</td></tr> <tr><td>2.2</td><td>97</td><td>3</td></tr> <tr><td>30</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>35</td><td>30</td><td>70</td></tr> <tr><td>38</td><td>30</td><td>70</td></tr> <tr><td>38.5</td><td>97</td><td>3</td></tr> <tr><td>45</td><td>97</td><td>3</td></tr> </tbody> </table>	Time, min	A%	B%	0	97	3	2.2	97	3	30	60	40	35	30	70	38	30	70	38.5	97	3	45	97	3	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time, min</th> <th>A%</th> <th>B%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>5</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>25</td><td>85</td><td>15</td></tr> <tr><td>30</td><td>74</td><td>26</td></tr> <tr><td>35</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>45</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>50</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>51</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>60</td><td>100</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Time, min	A%	B%	0	100	0	5	100	0	25	85	15	30	74	26	35	50	50	45	5	95	50	5	95	51	100	0	60	100	0
	Time, min	A%	B%																																																					
0	97	3																																																						
2.2	97	3																																																						
30	60	40																																																						
35	30	70																																																						
38	30	70																																																						
38.5	97	3																																																						
45	97	3																																																						
Time, min	A%	B%																																																						
0	100	0																																																						
5	100	0																																																						
25	85	15																																																						
30	74	26																																																						
35	50	50																																																						
45	5	95																																																						
50	5	95																																																						
51	100	0																																																						
60	100	0																																																						
检测器	WWD: 338nm, 263 nm (脯氨酸)	CAD, 蒸发温度: 50°C; 采集频率: 5Hz; 过滤常数: 3.6 s																																																						
进样模式	Custom: UDP	Normal																																																						
进样量	2 µL	10 µL																																																						

• 结构表征-肽图分析



部分还原和分步烷基化对胰岛素二硫键鉴定实验流程图

色谱柱	Accucore™ C18, 2.6 μm, 150 X 2.1 mm	
流速	0.2 mL/min	
柱温	50°C	
流动相	A: 0.1% 甲酸-水 B: 0.1% 甲酸-乙腈	
色谱梯度	时间/min	B相浓度/%
	0.0	3
	3.0	3
	5.0	10
	16.0	30
	21.5	90
24.5	90	
25.0	3	
30.0	3	

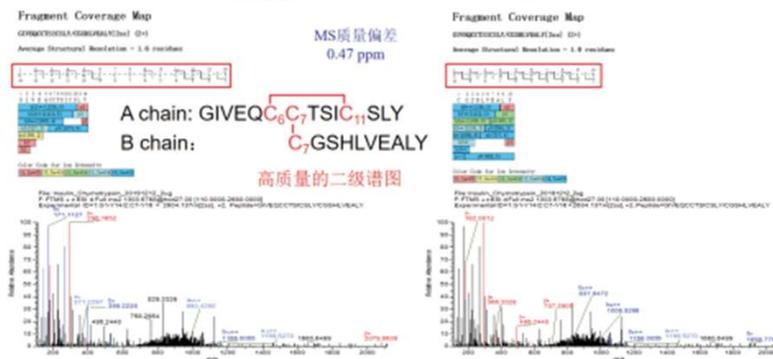
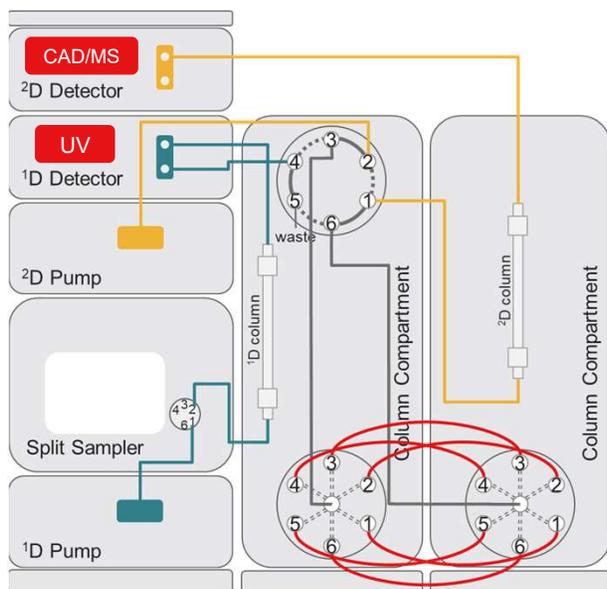


图6. 双二硫键 A chain:C6-C11和A chain:C7-B chain:C7二级谱图

杂质鉴定

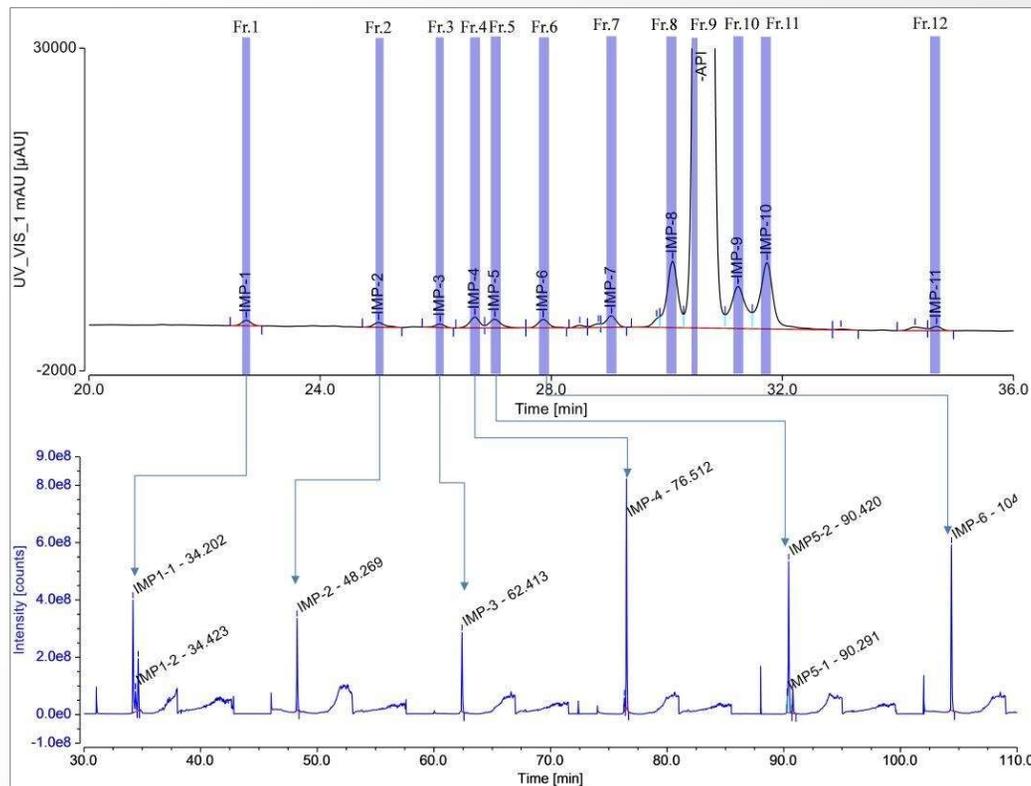
2D-LC在线除盐技术与HRMS联用



全自动在线多中心切割2D LC在线除盐系统

常规多肽LC分析用到非挥发性缓冲液（磷酸盐系统），非质谱兼容

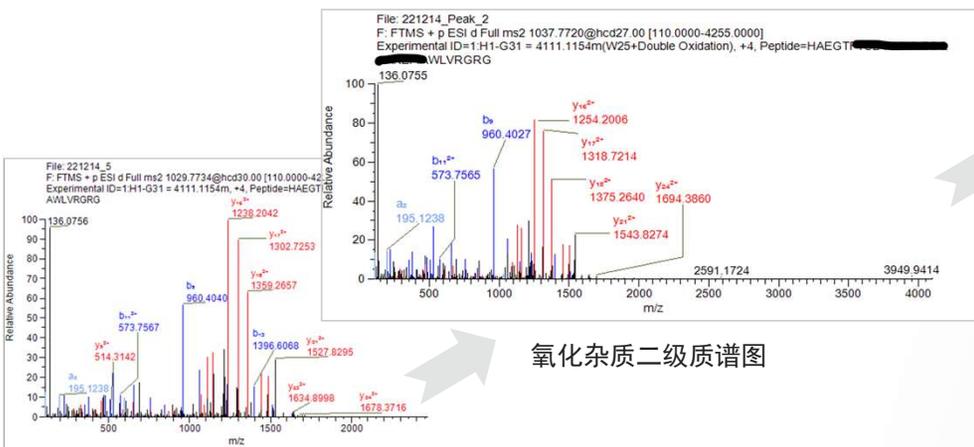
4-AN_18038_基于双三元液相高通量在线除盐技术与Orbitrap高分辨质谱联用在合成类多肽药物杂质鉴定中的应用



- U3000 DGP-3600RS
- DAD-3000RS
- Q Exactive Focus
- Chromeloeon 7.2
- Acclaim 120C18 (4.6X50mm, 3.0µm)
- A: H₂O + 0.1%FA
- B: ACN + 0.1%FA

氧化杂质鉴定

通过丰富可靠的二级碎片进行氧化杂质判别



氧化杂质二级质谱图

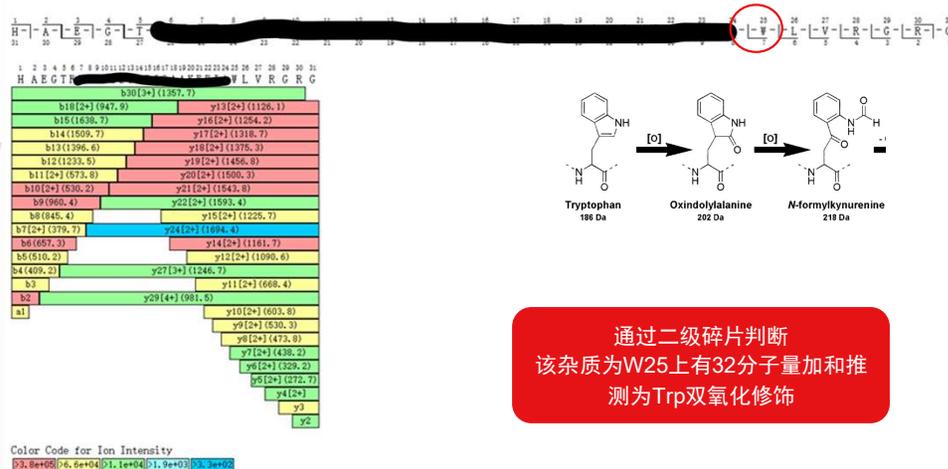
API二级质谱图

HAEGTF■■■■■■■■■■AWLVRGRG
HAEGTF■■■■■■■■■■AWLVRGRG

Fragment Coverage Map

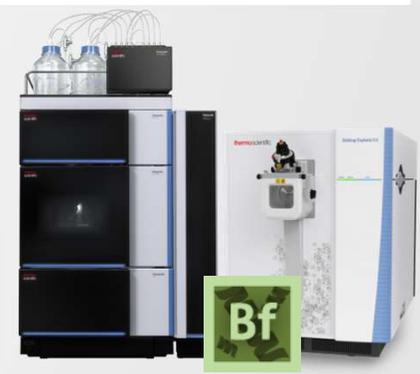
HAEGTF■■■■■■■■■■AWLVRGRG (A2+Aib) (K20+AEEA) (W25+Double Oxidation) (4+)

Average Structural Resolution = 1.0 residues



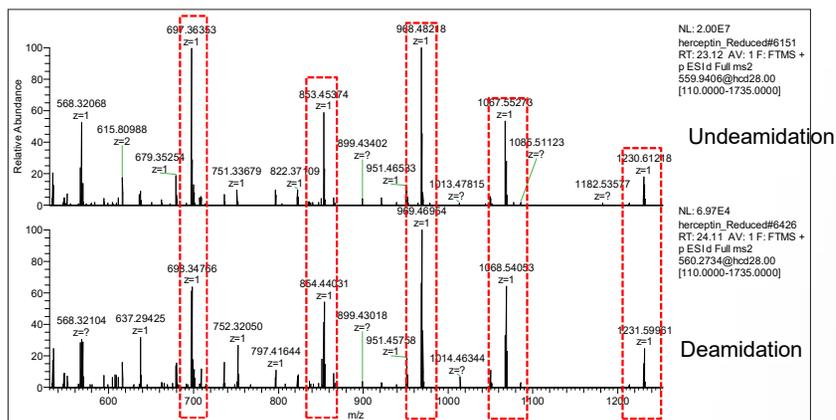
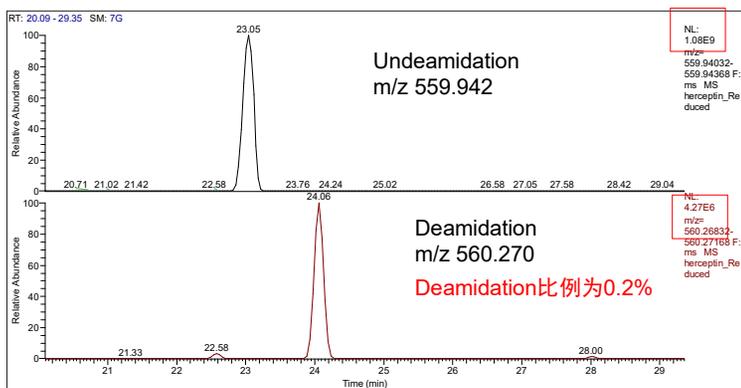
通过二级碎片判断
该杂质为W25上有32分子量加和推
测为Trp双氧化修饰

使用BioPharma Finder软件，根据目标多肽的氨基酸序列可对氨基酸缺失、多肽降解、氧化/还原、脱酰胺等不同修饰类相关杂质进行鉴定



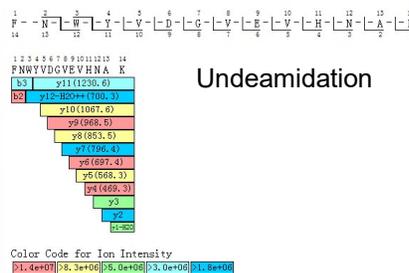
脱酰胺杂质鉴定

通过丰富可靠的二级碎片进行脱酰胺杂质判别



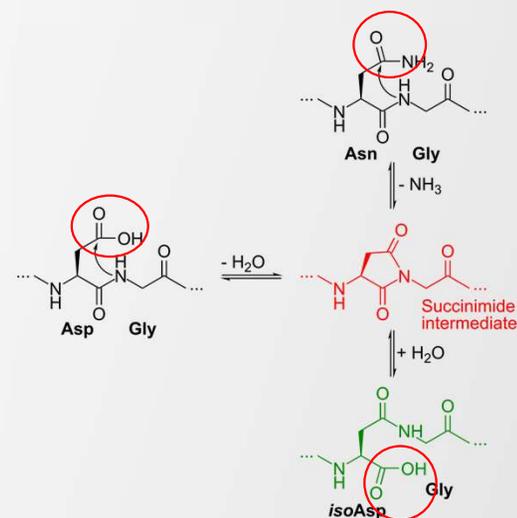
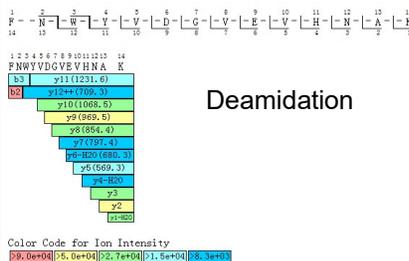
Fragment Coverage Map

FNWYVDGVEVHNAK (3+)
Average Structural Resolution = 1.1 residues



Fragment Coverage Map

FNWYVDGVEVHDAK (3+)
Average Structural Resolution = 1.1 residues

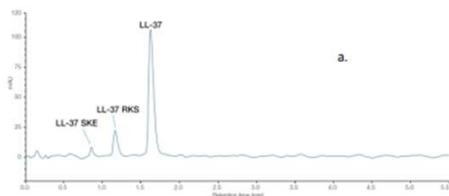


天冬酰胺 → 天冬氨酸

Orbitrap可以同时保证高灵敏和高分辨率
低丰度成分同样具有丰富的二级碎片离子

合成抗菌肽LL-37(37个氨基酸) 及其片段的鉴定---Acclaim120 C18

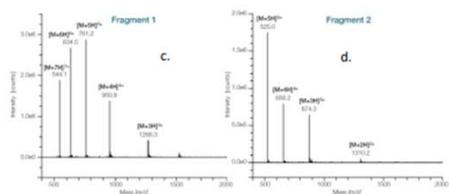
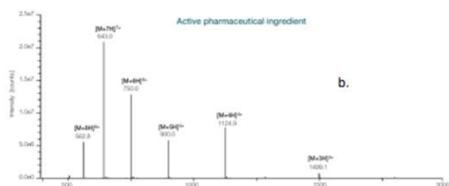
Acclaim RSLC 120 C18 应用于合成抗菌肽 LL-37 及其片段的测定



色谱条件			
色谱柱:	Acclaim RSLC 120 C18, 2.2 μm, 2.1×50 mm		
流动相:	A: 0.1% 甲酸水 B: 0.1% 甲酸乙腈		
洗脱程序:	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	80	20
	2	50	50
	2.1	80	20
	5.5	80	20

流速:	0.5 mL/min
进样体积:	1 μL
样品盘温度:	4 °C
柱温:	50 °C
检测器:	UV, 214 nm, 10 Hz

质谱条件	
扫描模式:	Full Scan, 正模式
鞘气压力:	49.9 psig
辅助气压力:	5.7 psig
吹扫气压力:	0.5 psig
蒸发温度:	282 °C
离子传输管温度:	300 °C
离子源电压:	3000 V
质量范围:	m/z 500–2000
驻留时间:	0.2 s



比较 UV, TIC 及 XIC 下测定模拟肽杂质相对峰面积

Compound	RT [min]	Resolution	UV trace Rel. Area [%]	TIC trace Rel. Area [%]	XIC trace Rel. Area [%]
LL-37 SKE (Fragment 2)	0.9	3.54	4.4	4.3	5.9
LL-37 RKS (Fragment 1)	1.2	4.38	18.5	21.9	25.1
LL-37 (API)	1.7	—	100	100	100

谱图: a. 214 nm 下模拟合成抗菌肽 LL-37 杂质分析谱图; b. API 质谱图; c. 片段 1 质谱图; d. 片段 2 质谱图

样品: 修饰的 Guide RNA (0.2 mg/mL)
仪器: Vanquish Flex UHPLC-ISQ EM

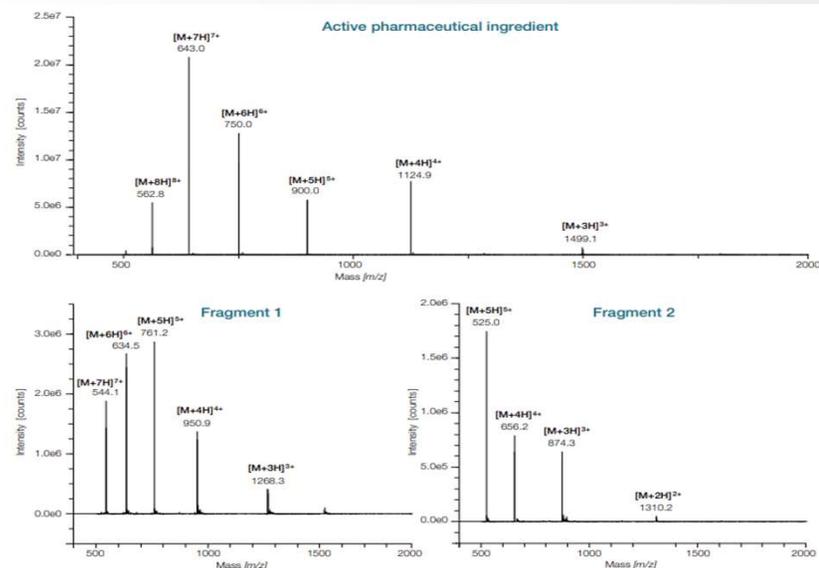


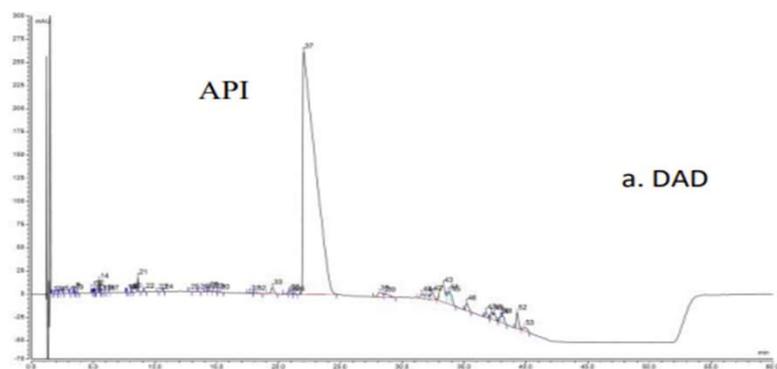
Figure 4. Obtained mass spectra for the API and the two fragments

Compound	Amino acid sequence	Theoretical average mass [Da]	Theoretical monoisotopic mass [Da]	Theoretical most abundant isotope mass [Da]
LL-37 (API)	LLGDFFRKSKKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	4493.299	4490.565	4492.582
LL-37 RKS (fragment 1)	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	3800.488	3798.211	3799.225
LL-37 SKE (fragment 2)	SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR	2619.130	2617.544	2618.558

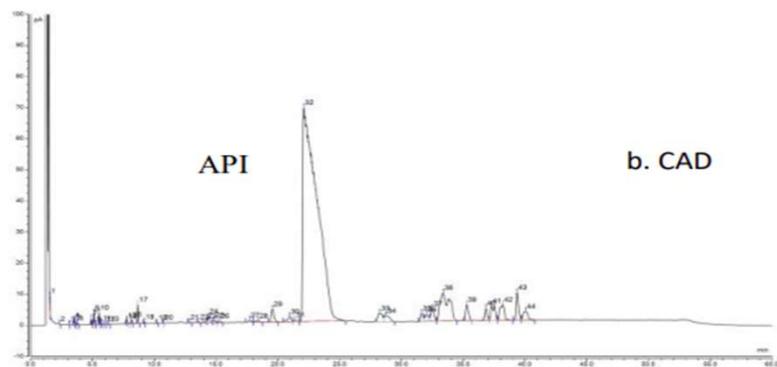
- AN 72818 Impurity profiling of the synthetic peptide LL-37 using high-performance liquid chromatography with combined UV and single quadrupole mass spectrometric detection

制剂强制降解研究---Accucore C18

Accucore C18 配合 DAD 串联 CAD 应用于多肽制剂杂质分析



a. DAD



b. CAD

色谱柱:	Accucore C18, 2.6 μ m, 4.6 \times 150 mm			
流动相:	A: 0.1% 三氟乙酸水			
	B: 超纯水			
	C: 乙腈-水=60:40			
洗脱程序:	Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
	0	35	30	35
	10	35	10	55
	30	33	2	65
	40	20	5	75
	50	20	5	75
	51	35	30	35
	60	35	30	35
流速:	1.0 mL/min			
进样体积:	20 μ L			
柱温:	25 $^{\circ}$ C			
检测器:	UV, 210 nm			
	CAD, 蒸发温度 50 $^{\circ}$ C, 采集频率 5 Hz, 过滤常数 3.6 s			
谱图:	a. 多肽制剂样品溶液 DAD 谱图;			
	b. 多肽制剂样品溶液 CAD 谱图			
样品:	多肽制剂热破坏样品溶液			
仪器:	Vanquish Flex UHPLC-DAD-CAD			

BIOBASIC SEC-120 5 μ m 7.8 mm X 300 mm 73405-307846

色谱柱检测多肽制剂中的聚乙烯醇残留

ThermoFisher
SCIENTIFIC

色谱柱: BIOBASIC SEC-120

色谱柱规格: 7.8mmX300 mm

色谱柱粒径: 5 μ m

色谱柱孔径: 120A

色谱柱P/N: 73405-307846

流动相组成:

(0.1%TFA)ACN : (0.1%TFA)H₂O=3:7

流速: 0.5 mL/ min

进样体积: 10 μ L/50 μ L

样品信息: 多肽制剂 (绿色)

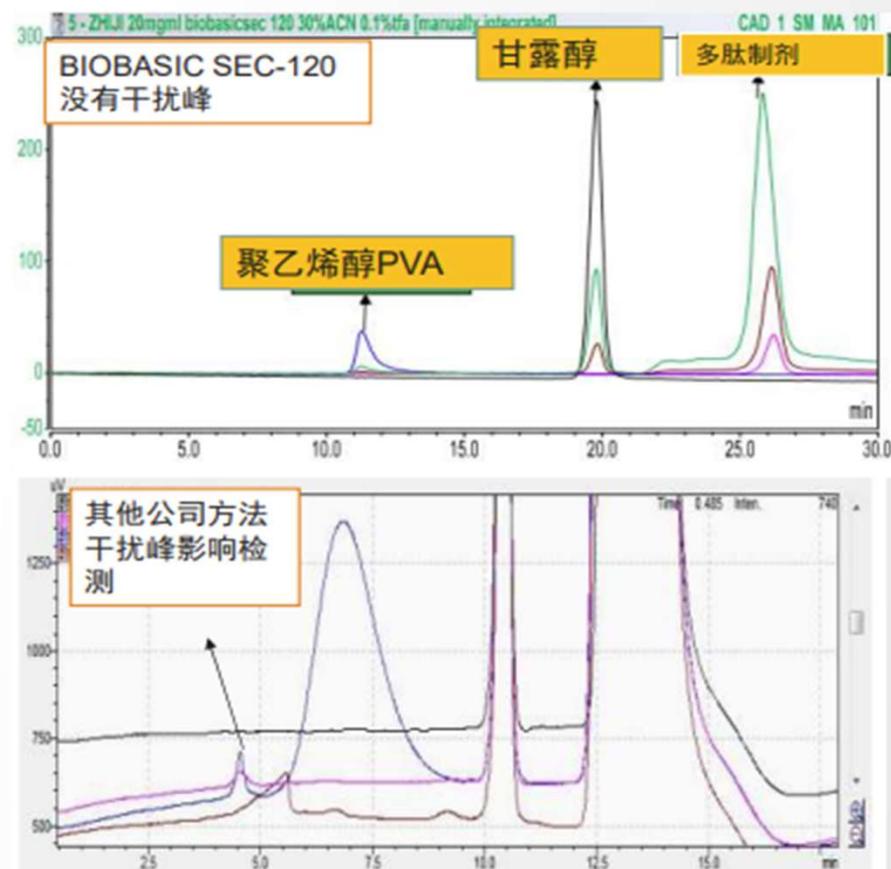
甘露醇 (黑色)

聚乙烯醇 (蓝色)

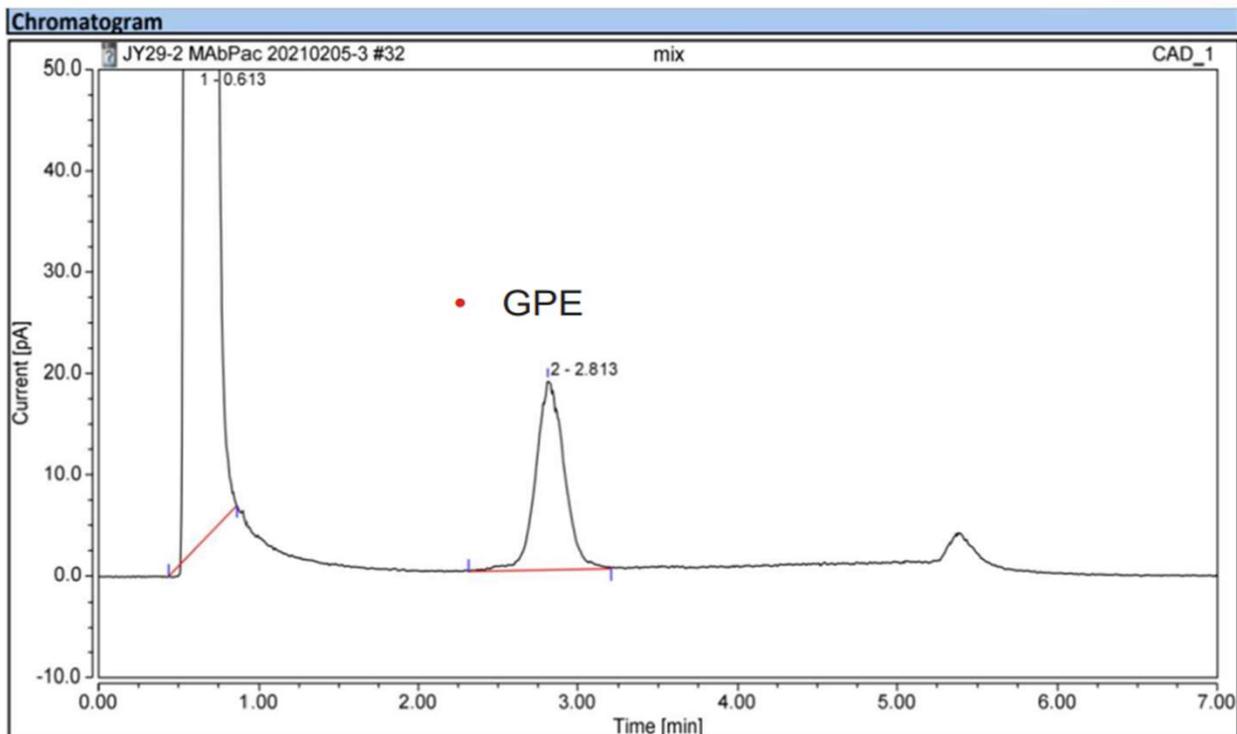
柱温: 不控温

检测器: Charged Aerosol Detector

仪器: Ultimate 3000 UHPLC系统



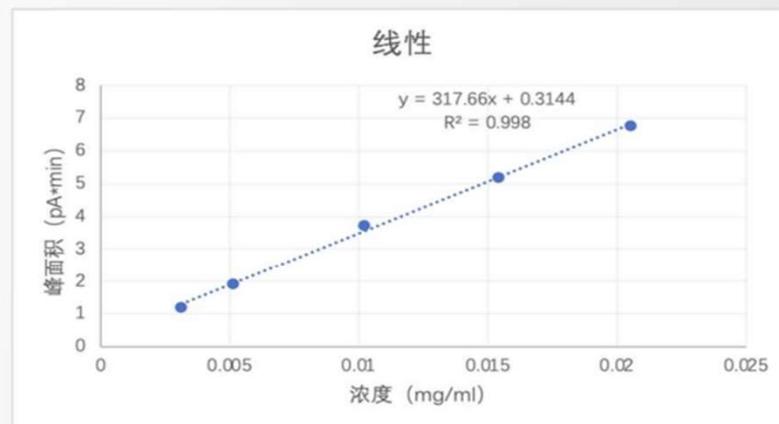
MABPac RP检测多肽制剂中的消泡剂-聚氧乙烯醚



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area pA*min	Height pA	Relative Area %	S/N	Amount n.a.
1		0.613	82.108	488.301	95.47	226.4	n.a.
2		2.813	3.898	18.723	4.53	8.7	n.a.
Total:			86.006	507.024	100.00	235.12	

色谱柱: Thermo MabPac RP 3.0*50mm, 4um,
 流动相A: 0.1%TFA水溶液
 流动相B: 0.1%TFA乙腈溶液
 流速: 0.5ml/min, 柱温: 50°C, CAD温度: 50°C, 进样量: 20μl
 洗脱梯度:

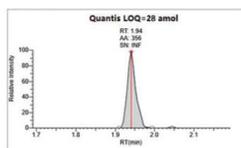
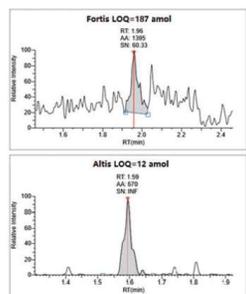
时间 (min)	0	1	1.5	4.0	4.1	7
B (%)	50	50	95	95	50	50



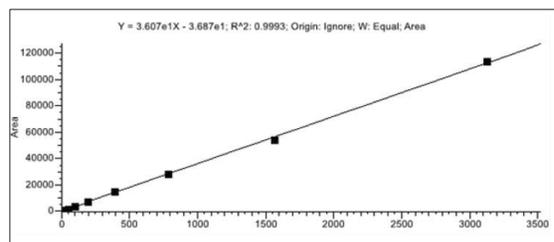
在0.03%~0.2% (即0.003~0.02mg/ml) 范围内, 线性良好

多肽药代动力学研究-Accucore C18

分子量高，体内稳定性差，血浆浓度低



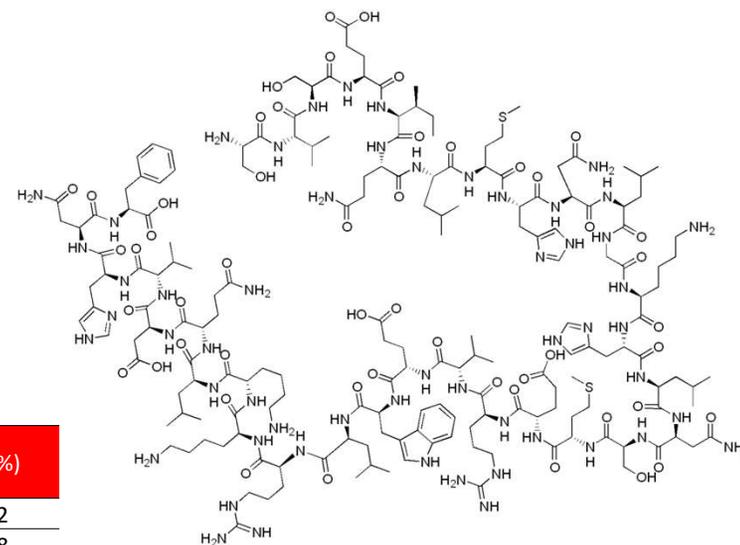
	LOD Average Area	RSD %
Fortis	1525.3	14.4
Quantis	227.6	18.1
Altis	777.3	12.3



特立帕肽在Altis的血浆标曲

Standard	Theoretical Amt (pg/mL)	Calculated Amt (pg/mL)	Diff(%)
1	24.414	25.689	5.22
2	48.828	51.209	4.88
3	97.656	104.478	6.99
4	195.313	195.85	0.27
5	390.625	413.669	5.9
6	781.25	783.248	0.26
7	1562.5	1497.734	-4.15
8	3125	3153.709	0.92

特立帕肽在Altis的血浆标曲回算精密度



特立帕肽

化学式	C ₁₈₁ H ₂₉₁ N ₅₅ O ₅₁ S ₂
摩尔质量	4117.72 g/mol

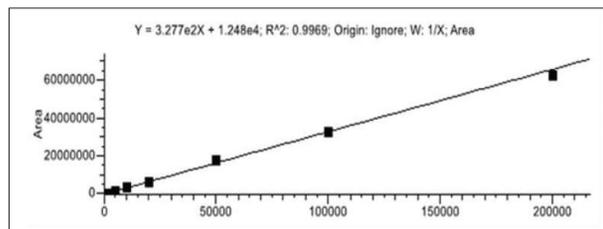
人类甲状旁腺激素（PTH）的一部分
氨基酸序列的1到34多肽
适用于患严重骨质疏松的患者

- Vanquish Flex
- TSQ Altis, Quantis, Fortis
- Accucore 150 C18 (50×2.1mm, 2.6um)
- TraceFinder

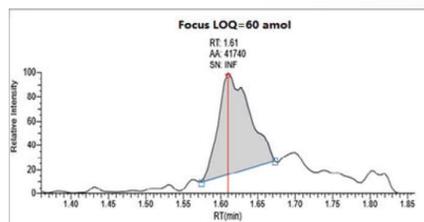
5-AN_20010_LSMSLM_药物_基于Obitrap超高分辨质谱平台的多肽药物特立帕肽的定量分析

多肽药代动力学研究-Accucore C18

Orbitrap优越定量能力



特立帕肽在Focus上的线性



Focus上LOQ的峰图

- QE Focus对特立帕肽的定量下限为50 pg/mL
- 上样5 μ L, 上柱约60 amol, 标准曲线线性良好, R2=0.997
- 标准曲线各点回算的浓度在理论值的15%以内
- 重复5针的RSD<10%

Standard	Theoretical Amt (pg/mL)	Calculated Amt (pg/mL)	Diff(%)
1	50	47.737	-4.53
2	100	87.251	-12.75
3	200	200.467	0.23
4	500	457.877	-8.42
5	1000	1051.464	5.15
6	2000	1981.783	-0.91
7	5000	5037.399	0.75
8	10000	11118.54	11.19
9	20000	20089.28	0.45
10	50000	55847.795	11.7
11	100000	101378.995	1.38
12	200000	191551.413	-4.22

Focus标曲回算精密度

血清中的胰岛素定量-ProSWIFT RP

质谱仪器: Q-Exactive高分辨质谱仪

液相色谱: Vanquish Flex 超高压二元液相色谱仪

色谱柱: ProSwift RP-4H整体柱, 0.5um * 10cm

2. 仪器和分析方法

色谱方法: 见表1.

质谱方法: 见表2

流动相	A 0.2%FA 水溶液	
色谱梯度	B 0.2%FA 乙腈溶液	
Time (min)	Flow (mL/min)	%B
0.0	0.2	10
0.7	0.2	10
1.0	0.2	20
1.5	0.2	25
3.5	0.2	36
3.6	0.2	36
3.8	0.2	90
4.8	0.2	90
5.0	0.2	10
8.0	0.2	10

表1. ProSwift整体柱分析胰岛素色谱条件

源参数		质谱参数	
Sheath gas	30	SIM scan	
Aux gas	10	Resolution	70K
Sweep gas	0	Isolation window	20Th
Spray voltage	3.8Kv	Central Mass	1160
Capillary temp	280	AGC target	1e5
Probe heater temp	400	MaxIT	200ms
S-lens RF	70	MicroScan	1
Probe height	B	Data type	Profile
离子通道		使用软件	
人胰岛素定量离子	1162.332	数据采集	Xcalibur
人胰岛素定性离子1	1162.139	定量分析	TraceFinder 4.1
人胰岛素定性离子2	1162.534	离子抽提窗口	15ppm
猪胰岛素定量离子	1156.336		

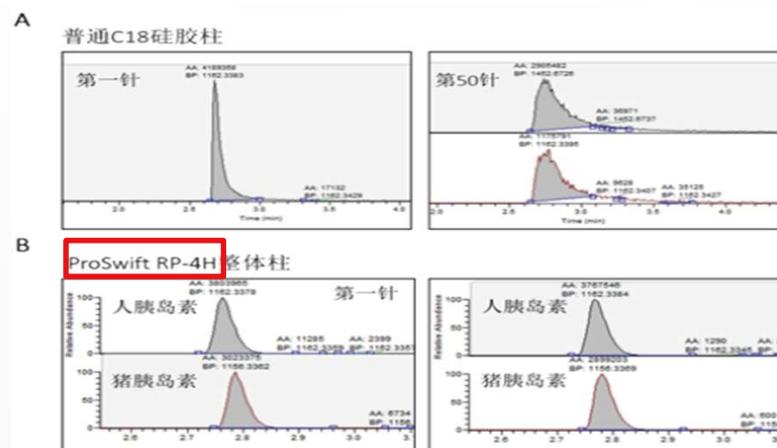


图2. 用ProSwift RP-4H色谱柱检测胰岛素的色谱表现

AN18040 Q Exactive高分辨质谱定量血清中 胰岛素

多肽药物分析表征耗材选择卡

分析项目	推荐色谱柱	应用	
结构表征	氨基酸组成	非衍生模式: Hypercarb 衍生模式: Acclaim C18	CCS-239 Acclaim C18 衍生VS Hypercarb 直接进样在Vanquish Core高效液相色谱系统用于氨基酸分析 (1)
	肽图 (HPLC)	Accucore C18	CCS-SW-237 Accucore C18 在_UHPLC-Q Exactive高分辨质谱对胰岛素含邻近半胱氨酸复杂二硫键的表征
质量控制	有关物质	Hypersil Gold Peptide Accucore Biphenyl Acclaim PA2 MAbPac RP BIOBASIC 4/8/18 MAbPac SEC-1 BIOBASIC SEC-120 BIOBASIC SCX BIOBASIC SAX MAbPac SCX	生物药应用文集
	含量测定	Hypersil Gold/BIOBASIC 4/818	
	手性氨基酸	AccucoreXL C18/Acclaim C18 Hypersil Chiral IXT	CCS-SW-238 Accucore C18 应用于氨基酸对映异构体的分析 CCS-SW-225/226/227Chiral IXT色谱柱用于FOMOC 手性氨基酸分析
	残留溶剂 (TFA,醋酸)	Acclaim Mixed mode WAX-1	CCS-XY-341新型复合模式色谱柱检测极性有机酸应用
	有机溶剂残留	TG 624 SiIMS	AN19004-GCMS赛默飞新一代顶空TriPLUS 500分析药品中的溶剂残留
	DMF残留	Acclaim PA2	
	游离脂肪酸侧链含量	Acclaim 120 C18	
	药代动力学	药代动力学分析	Accucore C18 PROSWIFT RP

谢谢大家

