

利用SmartMS赋能的BioAccord LC-MS系统进行肽类生物治疗药物的质量数确认和杂质分析

Kiran Krishnan, Sumit Bobhate, Raghu Tadala, Padmakar Wagh博士

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍BioAccord LC-MS系统在研究、开发以及生产和质控领域（实验室受到更严格法规约束）如何用于肽的质量数确认和杂质分析。UNIFI中的一体化工作流程使分析人员能够在同一平台上对肽类生物治疗药物及其杂质进行基于精确质量数的鉴定、序列构象分析和相对定量，借助SmartMS技术，组织内的广大科学家和技术人员都可以使用这些功能。

优势

- 符合法规要求的定性和定量工作流程，可通过光学分析和质谱分析实现肽的质量数确认和杂质分析
- 以SmartMS技术赋能系统，即使是之前不具备相关LC-MS经验的分析人员也可以快速部署、培训并进行常规操作

简介

如今，业界正在开发各种肽类生物治疗药物，这类药物具有诸多治疗益处，其合成和重组生产、下游加工以及生物输送技术也有明显进步。虽然这些分子的物理性质各不相同，但其中大多数的分子量都低于5000 Da。肽的纯度最终取决于生产和加工步骤中各种参数的优化，此过程需要采用能够快速、可靠地评估这些分子的分析工具，以确认主要产物、任何特征性杂质并检测任何意外的产物修饰。业界通常利用具有光学检测功能的常规液相色谱分析方法来解决杂质分析问题，但这些分析方法对于未分离的杂质存在一定的局限性，并且无法解释新发现峰的原因，因此需要利用更先进的分析仪器，以提供有关这些分子的更多结构信息，从而快速解决上述挑战。

质谱非常适合用于确定肽类生物治疗药物的特性和纯度¹。将高分辨率质谱分析纳入分析工作流程中，可基于精确质量数确认肽类API、已知杂质，并通过肽序列的碎片离子对其进行验证²。BioAccord LC-MS系统是一款高性能分析平台，专为高效、轻松地部署和操作而设计和开发，适用于先前缺乏LC-MS技术经验的实验室。BioAccord的SmartMS功能体现为简化的用户界面、自动启动和先进的自检能力。本应用纪要介绍BioAccord系统如何支持肽类生物治疗药物分析和杂质分析的一体化工作流程。

利拉鲁肽属于胰高血糖素样肽-1受体激动剂，是一种包含31个氨基酸(HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFWLVRGR G)的肽类治疗药物，其结构中的棕榈酸链通过谷氨酸连接基团连接至赖氨酸侧链，单同位素质量数为3748.9465 Da。rDNA技术与化学合成方法均可生产该药物。本研究使用rDNA来源的利拉鲁肽来展示BioAccord系统上的一体化工作流程。waters_connect信息学平台上符合法规要求的UNIFI应用程序可提供精简的工作流程，结合了自动化数据采集、处理和结果报告功能。



图1. Waters BioAccord LC-MS系统和
waters_connect信息学平台。该系统由ACQUITY
UPLC I-Class PLUS结合光学检测器(TUV/FLR)和
ACQUITY RDa质谱检测器组成，并由
waters_connect信息学平台上的UNIFI应用程序进
行控制。该平台上集成了符合法规要求的自动化
数据采集、数据处理、结果审查与报告功能。

实验

样品前处理

本研究使用浓度为6 mg/mL的利拉鲁肽溶液（rDNA来源）。

LC-MS条件

LC-MS系统：

BioAccord结合ACQUITY RDa质谱检测器

ACQUITY UPLC I-Class PLUS和ACQUITY UPLC
TUV检测器

色谱柱：

ACQUITY UPLC CSH C₁₈肽分析专用柱, 130 Å, 1.7

	μm, 2.1 × 150 (部件号: 186006938)
柱温:	45 °C
TUV波长:	215 nm
流速:	0.12 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
进样体积:	1 μL

梯度

步骤	时间(min)	溶剂A含 量(%)	溶剂B含 量(%)	曲线图
1	0.00	95	5	初始
2	2.00	70	30	6
3	80.00	45	55	6
4	100.00	5	95	6
5	101.00	95	5	6
6	105.00	95	5	6

质谱条件

模式：	碎裂模式下的全扫描
质量范围：	50~2000 <i>m/z</i>
极性：	正
毛细管电压：	1.50 kV
脱溶剂气温度：	550 °C
锥孔电压：	50 V
碎裂锥孔电压：	95-100 V
校正标样：	Waters_connect实时校正标准液（部件号：186009298）

数据管理

信息学软件：	包含UNIFI应用程序的waters_connect平台
--------	------------------------------

结果与讨论

肽类生物治疗药物质量数确认和杂质分析所用的LC-HRMS策略利用UNIFI信息学肽图分析工作流程表征肽和杂质峰，并利用精确质量数筛查工作流程进行目标杂质分析和自动化相对百分比测量。利用表征阶段得到的数据生成肽类物质的目标列表，以实现精确质量数监测和定量。

使用肽图分析工作流程进行肽表征

首先，使用ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 130 Å肽分析专用柱，以0.1%甲酸的乙腈溶液作为流动相，通过缓梯度对利拉鲁肽中的杂质进行色谱分离。然后利用肽图分析工作流程方法对采集的LC-MS数据进行处理，以鉴定杂质并确

认杂质和利拉鲁肽的肽序列。图2所示为利拉鲁肽样品的放大版总离子流色谱图，其中的色谱峰上已标记出相应的鉴定结果；图3所示为组分汇总，提供了这些鉴定结果的详细信息。观察到的杂质为利拉鲁肽的异构体、N端截断、加成和氧化形式。

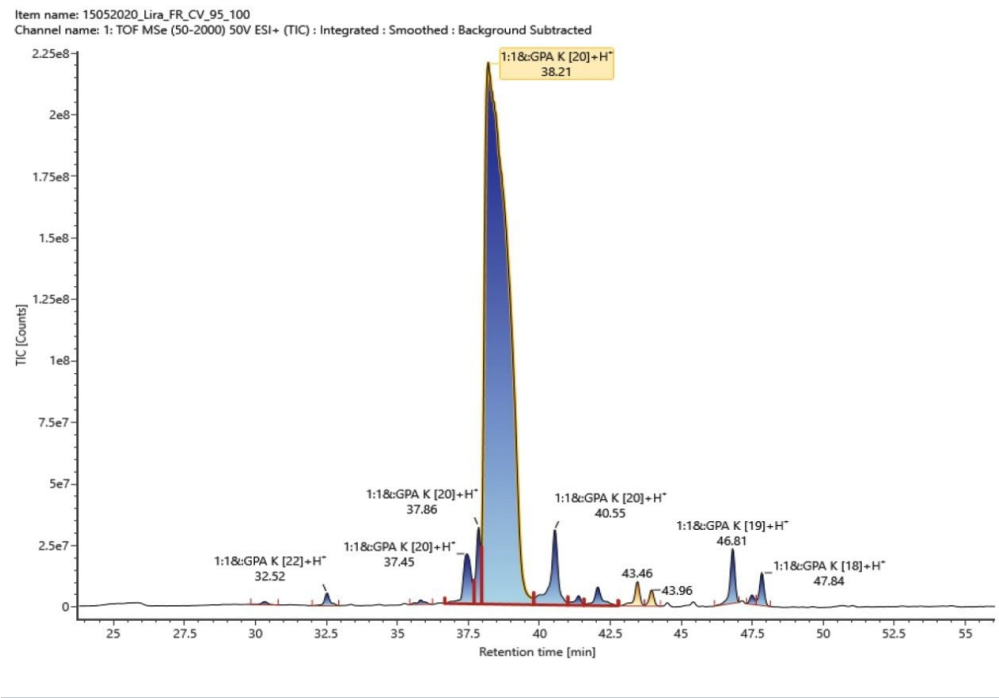


图2.使用肽图分析工作流程进行利拉鲁肽LC-MS分析得到的总离子流色谱图

Component Summary											
Component name	Protein name	Peptide	Modifiers	Observed mass...	Mass error (ppm)	Observed RT... ¹	Response	Observed m/z	Charge	Matched 1st Gen Primary Ions	
1:1&c:GPA K [20], Oxidation...	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20], Oxidation W [25]	3765.9338	-3.9	30.33	4676922	942.2389	4		25
1:1&c:GPA K [22]+H ⁺	LGT_HA	HAHAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [22]	3958.0335	-4.1	32.53	16464621	792.4125	5		36
1:1&c:GPA K [20], Oxidation...	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20], Oxidation x2 W [25]	3781.9204	-6.1	35.83	6477567	946.2355	4		32
1:1&c:GPA K [20]+H ⁺	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20]	3749.9370	-4.5	37.51	92106280	938.2397	4		18
1:1&c:GPA K [20]+H ⁺	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20]	3749.9342	-5.2	37.86	119050784	938.2390	4		42
1:1&c:GPA K [20]+H ⁺	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20]	3749.9422	-3.1	38.19	3339716608	1250.6523	3		42
1:1&c:GPA K [20]+H ⁺	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20]	3749.9332	-5.5	40.56	143428640	938.2388	4		42
1:1&c:GPA K [20]+H ⁺	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20]	3749.9360	-4.7	41.40	17017996	938.2394	4		37
1:1&c:GPA K [20]+H ⁺	LGT	HAEGFTSDVSSYLEGQAAKE...	GPA K [20]	3749.9335	-5.4	42.07	26564040	938.2388	4		36
1:1&c:GPA K [19]+H ⁺	LGT_H	AEGFTSDVSSYLEGQAAKEFI...	GPA K [19]	3612.8759	-5.2	46.82	79922800	1204.9635	3		42
1:1&c:GPA K [16]+H ⁺	LGT_HAEG	TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWL...	GPA K [16]	3355.7830	-3.2	47.49	13810025	839.7012	4		34
1:1&c:GPA K [18]+H ⁺	LGT_HA	EGFTSDVSSYLEGQAAKEFIA...	GPA K [18]	3541.8453	-3.5	47.85	49845260	1181.2866	3		40

图3.使用肽图分析工作流程进行利拉鲁肽LC-MS分析得到的组分汇总

ACQUITY RDa能够在其中一种操作模式下生成结构信息丰富的碎片离子，从而增加基于精确质量数进行肽分配的可信度。此独特功能可以通过在数据采集过程中交替进行MS扫描（一次采用低碰撞能量，一次采用高碰撞能量梯度）实现。因此，仪器可以只采集MS得到母离子信息(MS 1)，也可以进行MS全扫描(MS 2)，在CID模式下得到碎片离子信息（数据非依赖型采集）。图4和图5所示的碎片离子谱图分别为：棕榈酸链通过谷氨酸连接基团连接至Lys²⁰侧链的利拉鲁肽；以及利拉鲁肽截断杂质（在UV检测中以0.45%的相对浓度观察到，经证实为N端丢失两个氨基酸‘HA’）。软件的自动化数据处理功能可为所有检测到的组分生成带标注的碎片离子谱图。

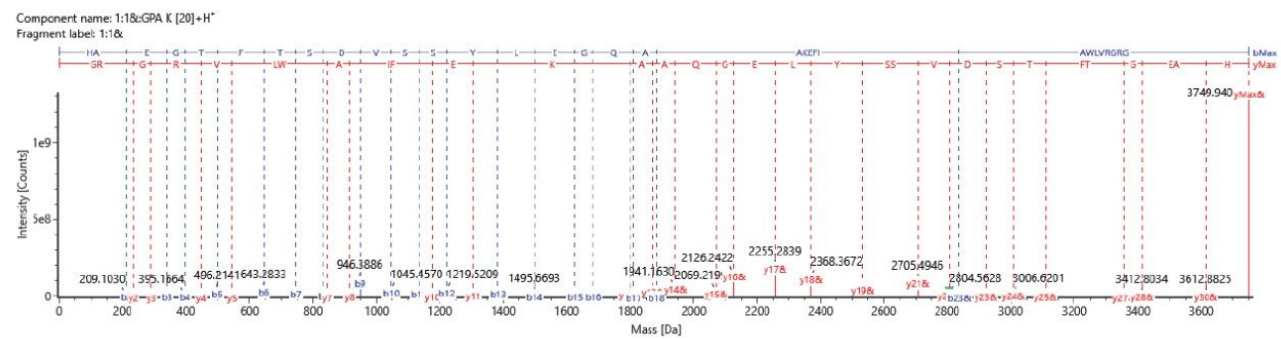


图4.棕榈酸链通过谷氨酸连接基团连接至Lys²⁰的利拉鲁肽的碎片离子谱图

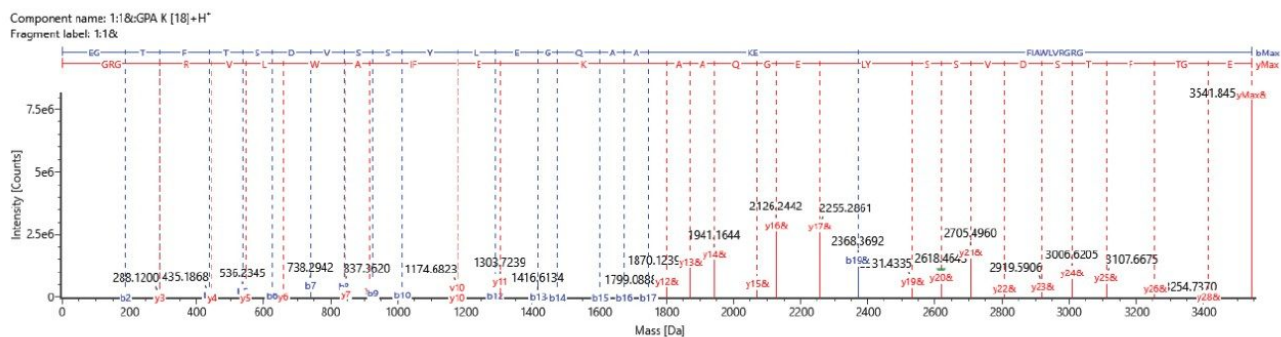


图5.利拉鲁肽截断杂质（经证实为N端丢失两个氨基酸‘HA’）的碎片离子谱图

在UNIFI科学数据库中创建新型氨基酸修饰和非天然氨基酸

用户可以在UNIFI处理过程中选择现有的氨基酸修饰来分配肽杂质，也可以创建新型氨基酸修饰，以补充软件中的默认修饰集。另外，可以在UNIFI科学数据库中创建并保存非天然氨基酸。科学数据库应用程序的界面非常简单，方便用户生成新修饰（图6）。

Edit amino acid modifier

Name: GPA K

☐ All Amino Acids

☐ A Alanine
☐ R Arginine
☐ N Asparagine
☐ D Aspartic acid
☐ C Cysteine
☐ E Glutamic acid
☐ Q Glutamine
☐ G Glycine
☐ H Histidine
☐ I Isoleucine
☐ L Leucine
☒ K Lysine
☐ M Methionine
☐ F Phenylalanine
☐ P Proline
☐ S Serine
☐ T Threonine
☐ W Tryptophan
☐ Y Tyrosine
☐ V Valine

Modified location
Site type: SideChain
Look ahead:
Look behind:

Delta Mass
Elemental composition: C21H37NO4
Monoisotopic mass: 367.272586769
Average mass: 367.52278

Test modifier definition using an example amino acid sequence

1: 1 to 31 HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVRGR G

Find Find next Find previous Ch: 1 AA: H No: 1 Abs. No.: 1 Sel: 0

图6.在科学数据库应用程序中创建针对赖氨酸的新型氨基酸修饰GPA K（带有棕榈酸链的谷氨酸连接基团）

使用UNIFI精确质量数筛查工作流程进行杂质分析

表征阶段通过肽图分析工作流程鉴定出的杂质可以添加至科学数据库文件中，然后导入精确质量数筛查工作流程以实施目标杂质分析。也可以基于已有知识创建额外的数据库条目。精确质量数筛查工作流程基于目标组分列表中的质量数和保留时间信息使用各种目标化合物的XIC，旨在根据UV和MS响应以及相对于主峰MS响应的相对丰度%自动测定肽的纯度%。图7所示为精确质量数筛查工作流程的组分汇总，其中显示了同时使用MS和UV检测所监测的利拉鲁肽和杂质组分的纯度。图8所示为利拉鲁肽(A)以及利拉鲁肽截断杂质‘LGT-HA’ (B)的提取离子流图(XIC)。

Component Summary											
Component name	Identification status	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (ppm)	Observed RT (min)	Response	Adducts	% UV-Purity	% MS-Purity	% (Impurity/API)
1 LGT_Oxidation W	Identified	3764.94138	3764.9206	942.2394	-3.4	30.33	18843	4x(+H)	0.06	0.09	0.11
2 Lira_+HA	Identified	3957.04249	3957.0222	990.2628	-5.1	32.53	21726	4x(+H)	0.11	0.11	0.12
3 LGT_Oxidation x2 W	Identified	3780.93629	3780.9133	946.2356	-6.1	35.83	32050	4x(+H)	0.10	0.16	0.18
4 LGT_Isomer_1	Identified	3748.94646	3748.9313	938.2401	-4.0	37.51	421622	4x(+H)	1.11	2.08	2.40
5 LGT_Isomer_2	Identified	3748.94646	3748.9296	938.2397	-4.5	37.83	478011	4x(+H)	1.01	2.36	2.72
6 LGT	Identified	3748.94646	3748.9332	938.2406	-3.5	38.18	17571568	4x(+H)	92.27	86.73	100.00
7 LGT_Isomer_3	Identified	3748.94646	3748.9260	938.2388	-5.5	40.56	678636	4x(+H)	1.70	3.35	3.86
8 LGT_Isomer_4	Identified	3748.94646	3748.9297	938.2397	-4.5	41.40	86217	4x(+H)	0.23	0.43	0.49
9 LGT_Isomer_5	Identified	3748.94646	3748.9269	938.2390	-5.2	42.07	129858	4x(+H)	1.35	0.64	0.74
10 LGT_Unk_1	Identified	3760.94646	3760.9308	941.2400	-4.2	43.46	187940	4x(+H)	0.38	0.93	1.07
11 LGT_Unk_2	Identified	3774.94954	3774.9542	944.7458	1.2	43.96	129037	4x(+H)	0.21	0.64	0.73
12 LGT_-H	Identified	3611.88755	3611.8695	903.9746	-5.0	46.82	271098	4x(+H)	0.90	1.34	1.54
13 LGT_-HAEg	Identified	3354.78638	3354.7762	839.7013	-3.0	47.49	52306	4x(+H)	0.12	0.26	0.30
14 LGT_+HA	Identified	3540.85044	3540.8389	886.2170	-3.2	47.84	180909	4x(+H)	0.45	0.89	1.03

图7.精确质量数筛查工作流程的组分汇总，显示了同时使用MS和UV检测所得到的利拉鲁肽以及各种目标杂质的纯度。

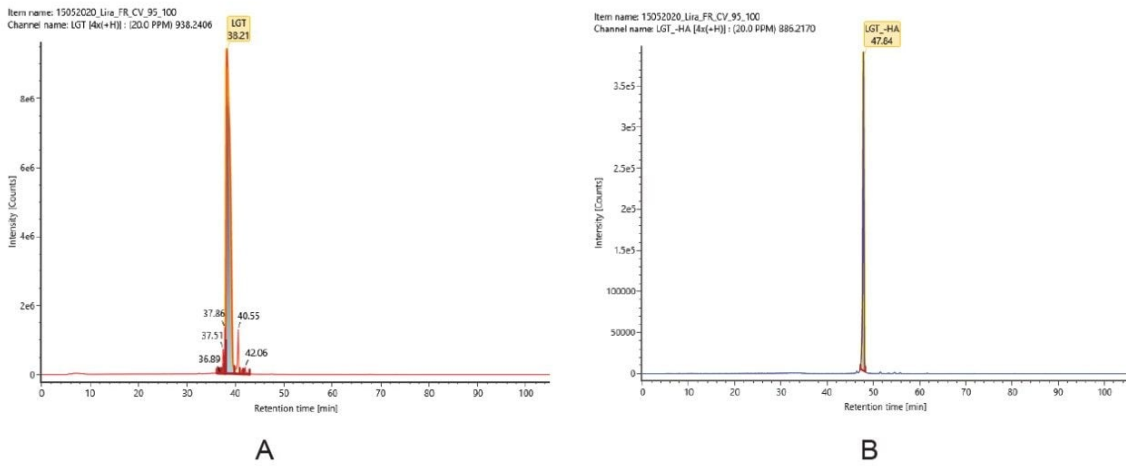
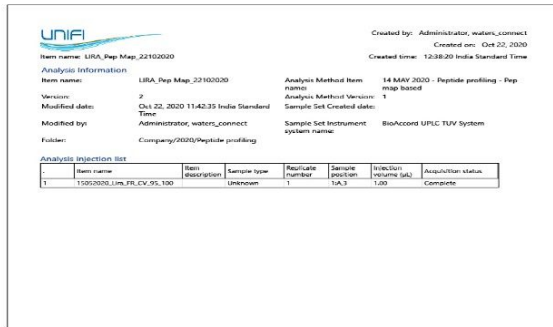


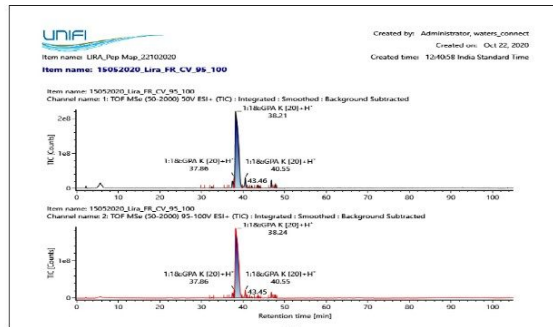
图8.利拉鲁肽(A)以及利拉鲁肽截断杂质(B)的XIC

用户可以使用预定义（默认或用户自定义）模板在采集后自动生成一份或多份报告，以汇总该杂质监测研究的最终结果（图9）。软件可以根据法规或组织要求在这些报告上提供电子签名。

分析信息



色谱图



组分汇总

Component name	Protein name	Peptide	Modifications	Observed mass (Da)	Mass error (ppm)	Charge	Observed m/z	Matched 1st Ion primary
1	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation W	5195.9558	-5.9	5155	46788	947.236 4
2	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3588.0835	-4.1	3283	14644	700.412 5
3	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3781.8354	-6.1	3583	46779	946.535 4
4	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9370	-4.5	3731	32106	936.239 4
5	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9342	-5.2	3746	11505	936.239 4
6	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9422	-3.1	3619	23397	1250.45 3
7	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9332	-5.5	4056	14342	936.238 4
8	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9360	-2.7	4140	10017	936.238 4
9	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9359	-4.4	4207	2698	936.238 4
10	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9359	-4.3	4622	79623	1250.46 3
11	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9359	-4.3	4140	10017	936.238 4
12	1:18uGPK K [20]+H+ Oxidation K2 W [20]+H+	HAAGTTTSDVSYLQ QAAKEFANLVVGRG	GNK K [20] Oxidation K2 W	3749.9359	-4.3	4140	10017	936.238 4

质谱图

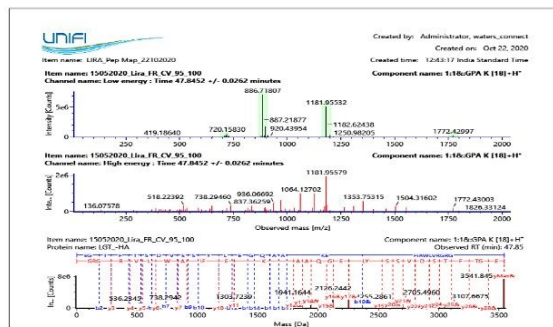


图9.采用肽图分析工作流程进行利拉鲁肽分析所得到的代表性UNIFI报告

使用本文所述的肽图分析和精确质量数筛查/监测工作流程分析利拉鲁肽，科学家可以利用BioAccord LC-MS系统，通过高效的一体化方法对肽类生物治疗药物进行质量数确认和杂质分析。通过添加精确质量数数据而产生的重要结构信息，将有助于实现更快速的方法开发、方法转移以及产物偏差调查，使肽类生物治疗药物企业能够更好地、更快地制定决策。

结论

本应用纪要介绍BioAccord LC-MS系统在研究、开发以及生产和质控领域（实验室受到更严格法规约束）如何用于肽的质量数确认和杂质分析。UNIFI中的一体化工作流程使分析人员能够在同一平台上对肽类生物治疗药物及其杂质进行基于精确质量数的鉴定、序列构象分析和相对定量，借助SmartMS技术，组织内的广大科学家和技术人员都可以使用这些功能。

参考资料

1. Prabhala BK, Mirza O, Hojrup P, Hansen PR.Characterization of Synthetic Peptides by Mass Spectrometry.*Methods Mol Biol.*2015; 348:77–82.doi:10.1007/978-1-4939-2999-3_9.
2. Zeng K, Geerlof-Vidavisky I, Gucinski A, Jiang X, Boyne MT 2nd.Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry for Peptide Drug Quality Control.*AAPS J.*2015; 17(3):643–651.doi:10.1208/s12248-015-9730-z.

特色产品

生物制药专用BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

720007093ZH, 2020年12月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私声明](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号