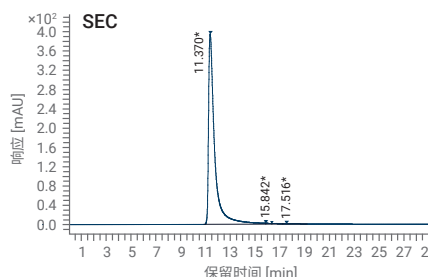
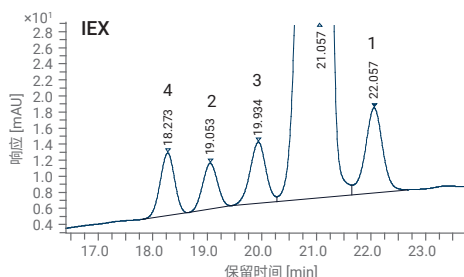
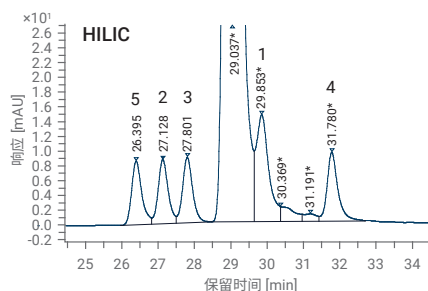
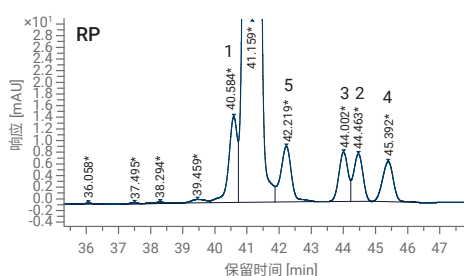


采用四种模式液相色谱方法分析 替尔泊肽有关物质

作者

马玲, 陈熙, 宋兰坤
安捷伦科技 (中国) 有限公司



摘要

随着人们对健康管理的日益重视和糖尿病、肥胖等慢性疾病的发病率不断上升, 替尔泊肽作为一种创新的 GIP/GLP-1 双靶点降糖药物, 日益成为多肽药物领域的明星产品, 亟需建立可靠的杂质分析方法来确保这类药物的安全性和有效性。参考国家药品监督管理局药品审评中心发布的《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则 (试行)》中“推荐采用不同原理的分析方法进行多肽有关物质检查”的要求, 本研究分别采用反相 (RP)、体积排阻 (SEC)、离子交换 (IEX) 和亲水相互作用色谱 (HILIC) 四种色谱分离模式建立替尔泊肽有关物质的液相色谱分析方法。四种方法均提供了良好的峰形和杂质分离效果。对比 RP、IEX 和 HILIC 三种分离方法的实验结果可以看出, 替尔泊肽和五种有关物质的出峰顺序及相对保留时间存在显著差异, 表明三种方法具有不同的分离选择性, 可以互为正交分析方法协同表征替尔泊肽的纯度。本研究将为替尔泊肽质量研究和有关物质控制方法开发与优化提供参考。

前言

多肽药物可视为介于有机小分子与蛋白质大分子之间的一类特殊药物^[1]。多肽药物因其广泛的生物活性、高特异性和良好的安全性等特点而日益受到关注^[2]。多肽药物在治疗肿瘤、糖尿病、心血管疾病、抗病毒和抗菌等多个方面具有显著疗效^[3]。糖尿病作为一种全球性的慢性疾病，不仅影响着患者的生活质量，还给社会带来了沉重的经济负担。而肥胖，作为糖尿病的重要风险因素之一，更是日益成为公共卫生关注的焦点。替尔泊肽的问世，无疑为这一领域的治疗提供了新的思路和解决方案。作为首个且目前唯一的葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP)/胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 双受体激动剂，替尔泊肽以其独特的双重作用机制和显著的降糖、减重效果，为 2 型糖尿病患者和超重/肥胖人群带来了新的希望。

随着多肽合成技术的不断进步，现代多肽药物的研发主要依赖于化学合成。多肽药物由几十个氨基酸按照一定的顺序组合而成，需要较多的合成步骤，由此产生复杂的杂质。多肽相关杂质（或称有关物质）是指与目标分子结构有关的杂质，是反映多肽化学纯度的重要指标之一。多肽相关杂质可能由起始物料引入，也可能来自生产工艺副反应，或者在长期放置过程中由降解产生（包括缺失肽、断裂肽、氧化肽等在合成过程中产生的工艺杂质，以及由于多肽脱酰胺、氧化、水解、二硫键错配、消旋等不稳定因素而产生的降解产物和聚合物）。多肽有关物质的存在不仅影响药物的有效性，而且与药物的安全性息息相关。因此，建立合适的方法对这些多肽相关杂质进行研究，是多肽药物质量控制的关键。2023 年 2 月，国家药品监督管理局药品审评中心发布了《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则（试行）》^[4]，对合成多肽药物的药学研究提出了技术指导和要求。该技术指导原则中指出，由于多肽相关杂质的结构、性质与主成分较为相似，采用单一原理的分析方法可能无法完全分离多肽相关杂质，推荐采用多种不同原理的检测方法进行有关物质评估，例如反相 HPLC 法、离子交换 HPLC 法、分子排阻 HPLC 法等^[5]。

本文采用反相 (RP)、体积排阻 (SEC)、离子交换 (IEX)、亲水相互作用色谱 (HILIC) 四种分离模式对 替尔泊肽及其有关物质进行分析，待分离的有关物质种类包括 1 种插入肽、3 种脱酰胺杂质和 1 种差向肽杂质。方法建立过程中对色谱柱进行了筛选，并对多种分离参数进行了优化。四种分析方法均获得了满意的峰形和杂质分离效果，为全面分析替尔泊肽有关物质提供了多种有效的正交分离手段。

实验部分

试剂和样品

甲醇、乙腈和三氟乙酸为色谱纯级，购于上海安谱实验科技有限公司；磷酸二氢钠和磷酸氢二钠为分析纯级，购于默克；氯化钠为优级纯级，购于国药集团化学试剂有限公司；实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水。替尔泊肽为市售商品，从国外获得；五种替尔泊肽相关杂质由国内客户提供。

仪器和设备

采用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统，配备如下安捷伦模块：四元泵（部件号 G5654A）、自动进样器（部件号 G5668A）、柱温箱（部件号 G7116A）和 VWD 检测器（部件号 G7114A）。

实验中使用的色谱柱见表 1。将 Agilent Buffer Advisor 软件用于 SEC、IEX 和 HILIC 分析方法的开发和优化。

表 1. 实验中使用的色谱柱列表

反相色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (2.1 × 150 mm, 2.7 μm; 部件号 653750-902) Agilent AdvanceBio Peptide Plus (2.1 × 150 mm, 2.7 μm; 部件号 695775-949) Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱 (2.1 × 150 mm, 2.7 μm; 部件号 653750-702) Agilent Poroshell 120 Aq-C18 (2.1 × 150 mm, 2.7 μm; 部件号 693775-742) Agilent Poroshell 120 Bonus-RP (4.6 × 150 mm, 2.7 μm; 部件号 693968-901)
体积排阻色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å (7.8 × 300 mm, 2.7 μm; 部件号 PL 1180-5350)
离子交换色谱柱	Agilent Bio SCX, NP5, Peek (4.6 × 250 mm, 5 μm; 部件号 5190-2427) Agilent Bio SAX, NP5, Peek (4.6 × 250 mm, 5 μm; 部件号 5190-2467) Agilent Zorbax 300 Å SCX (4.6 × 250 mm, 5 μm; 部件号 880952-704)
亲水相互作用色谱柱	Agilent AdvanceBio 酰胺 HILIC 色谱柱 (2.1 × 150 mm, 1.8 μm; 部件号 859750-913)

标准品制备

替尔泊肽及 5 种肽相关杂质均易溶于水。取适量替尔泊肽和杂质单标，分别用去离子水溶解，得到 1 mg/mL 溶液。向 1 mL 的 1 mg/mL 替尔泊肽溶液中依次加入 1 mg/mL 杂质单标溶液 10 µL，配制得到混合杂质加标溶液（各杂质含量约为 1%）。该杂质加标溶液用于反相分析方法开发。

取适量替尔泊肽及杂质单标，分别用水和乙腈 1:1 (v/v) 混合溶液溶解，得到 1 mg/mL 溶液。向 1 mL 的 1 mg/mL 的替尔泊肽溶液中依次加入 1 mg/mL 杂质单标溶液 25 µL，配制得到混合杂质加标溶液（各杂质含量约为 2.5%）。该杂质加标溶液用于 IEX 及 HILIC 分析方法开发。

在液相色谱分析过程中，将样品室温度控制在 8 °C。溶解后的样品溶液于 4 °C 冷藏备用。

反相色谱分析条件

色谱柱：	Poroshell 120 Bonus-RP (4.6 × 150 mm, 2.7 µm)			
流速：	0.4 mL/min			
柱温：	60 °C			
流动相：	A) 水（含 0.1% TFA） C) 50 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液，pH 3.5 D) 乙腈			
梯度程序：	时间(min)	A(%)	C(%)	D(%)
	0.00	2.50	72.50	25.00
	1.00	2.50	72.50	25.00
	11.00	2.50	55.00	42.50
	51.00	2.50	45.00	52.50
	52.00	2.50	7.50	90.00
	54.00	2.50	7.50	90.00
	54.10	2.50	72.50	25.00
	60.00	2.50	72.50	25.00
进样体积：	10 µL			
检测器：	214 nm			

体积排阻色谱分析条件

色谱柱：	AdvanceBio SEC 130 Å (7.8 × 300 mm, 2.7 µm)			
流速：	0.6 mL/min			
柱温：	25 °C			
流动相：	20 mmol/L 磷酸盐，250 mmol/L 氯化钠，pH 7.5			
等度洗脱时间：	30 min			
进样体积：	20 µL			
检测器：	220 nm			

离子交换色谱分析条件

色谱柱：	Zorbax 300 Å SCX (4.6 × 250 mm, 5 µm)			
流速：	0.6 mL/min			
柱温：	60 °C			
流动相：	A) 乙腈 C) 40 mmol/L 磷酸水溶液 D) 40 mmol/L 磷酸氢二钠水溶液			
梯度程序：	时间(min)	A(%)	C(%)	D(%)
	0.00	70.00	17.00	13.00
	15.00	70.00	16.00	14.00
	37.00	70.00	16.00	14.00
后运行时间：	15 min			
进样体积：	10 µL			
检测器：	214 nm			

亲水相互作用色谱分析条件

色谱柱：	AdvanceBio 酰胺 HILIC (2.1 × 150 mm, 1.8 µm)			
流速：	0.3 mL/min			
柱温：	60 °C			
流动相：	A) 乙腈 C) 40 mmol/L 磷酸水溶液 D) 40 mmol/L 磷酸氢二钠水溶液			
梯度程序：	时间(min)	A(%)	C(%)	D(%)
	0.00	85.00	8.20	6.80
	2.00	85.00	8.20	6.80
	32.00	80.00	10.80	9.20
	37.00	80.00	10.80	9.20
	38.00	60.00	21.20	18.80
	43.00	60.00	21.80	18.80
	44.00	85.00	8.20	6.80
	55.00	85.00	8.20	6.80
进样体积：	5 µL			
检测器：	214 nm			

结果与讨论

方法一：反相色谱分析方法的建立与优化

目前，多肽药物有关物质分析大多采用反相液相色谱法，固定相以 C18 键合相为主。色谱柱的选择是方法开发过程中的关键步骤。本实验基于 Agilent Poroshell 120 系列反相色谱柱进行方法开发。该系列色谱柱采用表面多孔核-壳填料颗粒，相对于全多孔颗粒具有更高的柱效和分离度，同时该系列色谱柱具有十几种不同的反相键合相，可以为多肽有关物质分析方法开发提供不同的色谱柱选择。在实验过程中，首先基于含 0.1% TFA 的水-乙腈体系筛选 5 种反相键合相，结果如图 1 所示。通过比较替尔泊肽峰形、分离出的杂质峰数量、替尔泊肽和前后杂质的分离度及杂质间的分离度，发现 Poroshell 120 Bonus-RP 提供了最佳分离效果。

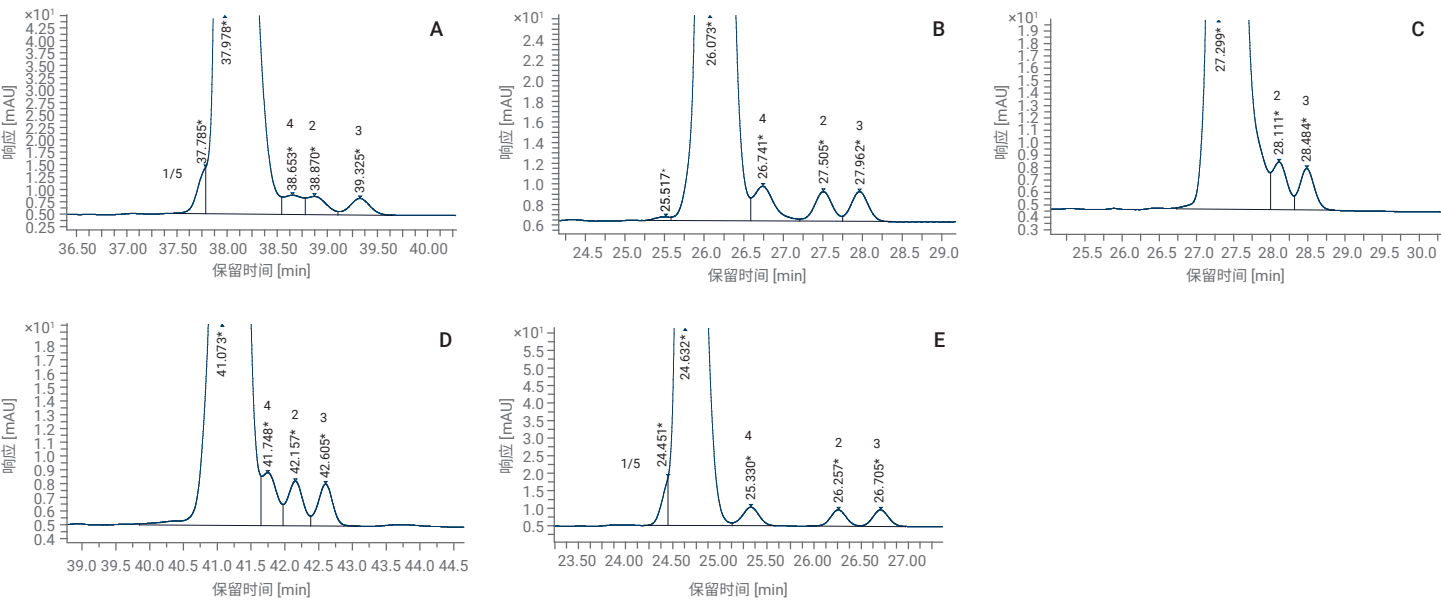


图 1. 五种反相键合相的筛选结果：(A) AdvanceBio 肽谱分析色谱柱；(B) AdvanceBio Peptide Plus；(C) AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱；(D) Poroshell 120 Aq-C18；(E) Poroshell 120 Bonus-RP

Poroshell 120 Bonus-RP 的键合相在烷基链中嵌入极性酰胺基团, 相较于 C18 键合相具有特殊的分离选择性。后续基于该色谱柱进行了一系列分离条件的优化, 包括流动相组成、流速、柱温等。对于流动相组成的考察, 首先比较了 50 mmol/L 磷酸盐体系和 0.1% (v/v) TFA 体系对分离的影响。结果发现, 在 50 mmol/L 的磷酸盐体系中替尔泊肽主峰后分离出四种杂质, 相较于 0.1% TFA 体系能够多分离出一种杂质。接着优化了磷酸盐的 pH 值, 对比了 pH 2.5、pH 3.5 及 pH 4.5 三种条件, 结果如图 2 所示。从图中可以看出, 在 pH 3.5 下, 替尔泊肽与 1 号杂质的分离效果最出色, 后杂分离出的数量最多且后杂之间的分离度也最出色。实验还发现, 向流动相中加入少量 0.1% TFA, 可以改善替尔泊肽与 1 号杂质的分离度。对添加的 0.1% TFA 的比例进行了优化, 发现其加入比例为 2.5% 时, 既能提高替尔泊肽与 1 号杂质的分离度, 又能兼顾 4 个后杂之间的分离度。完成对流动相组成的优化后, 考察了流速对分离的影响。实验过程中洗脱梯度保持不变, 将流速分别设定为 1.6 mL/min、1.2 mL/min、0.8 mL/min 和 0.4 mL/min。结果发现, 降低流速可以明显改善替尔泊肽和 1 号杂质的分离, 优化得到的最佳流速为 0.4 mL/min。最后对柱温进行了考察。结果表明, 柱温从 60 °C 降低至 50 °C 会导致分离的后杂数量减少, 且 1 号杂质与替尔泊肽的分离度变差, 说明高柱温条件更有利于替尔泊肽与有关物质的分离。因此, 最终方法柱温设定为 60 °C。通过以上色谱分离条件的优化, 得到反相模式下替尔泊肽混合杂质加标样品的谱图, 如图 3 所示。从图中可以看出, 替尔泊肽与 5 种有关物质均实现了良好的分离。

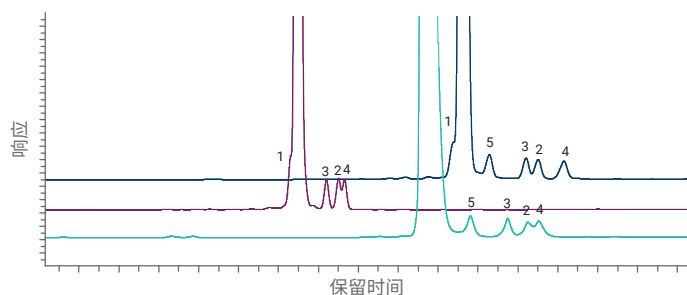


图 2. 磷酸盐的 pH 值对替尔泊肽和杂质分离的影响: 从上到下谱图对应的 pH 值分别为 3.5、2.5 和 4.5

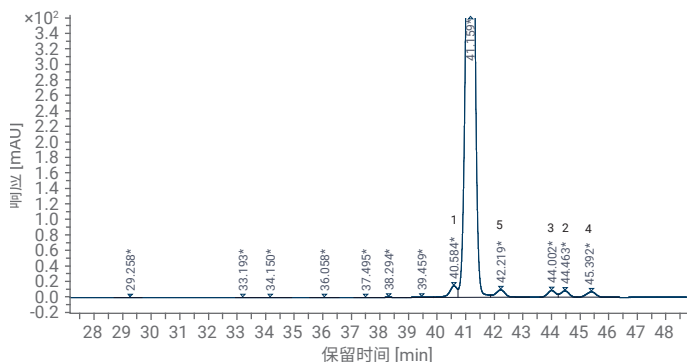


图 3. 反相模式下替尔泊肽混合杂质加标样品的分离谱图

方法二：体积排阻色谱分析方法建立与优化

在《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则》中, 针对多肽聚合物的分析推荐采用体积排阻色谱 (SEC) 或聚丙烯酰胺凝胶电泳法。替尔泊肽分子量在 5 KD 左右, 因此孔径在 100–150 Å 的色谱柱适用于该多肽的 SEC 分析。本实验选用 AdvanceBio SEC 130 Å (7.8 × 300 mm, 2.7 μm) 进行替尔泊肽 SEC 方法开发。大多数多肽比蛋白质的疏水性强, 因此在 SEC 分析时为了获得较好的峰形, 通常需要在流动相中加入较大比例的有机溶剂来减少多肽样品与色谱柱之间的次级相互作用。先前实验发现, 使用含 0.1% TFA 的水/乙腈 1:1 (v/v) 混合溶液作为流动相能够满足大多数多肽样品 SEC 分析的需求。本实验首先尝试上述流动相体系, 得到的谱图如图 4 所示。从图中可以看出, 主峰拖尾严重, 表明该流动相体系不适合该样品的 SEC 分析。中性磷酸盐-氯化钠水溶液是蛋白质 SEC 分析中常用的流动相。实验用到的替尔泊肽样品水溶性良好, 因此尝试用中性磷酸盐-氯化钠水溶液对样品进行 SEC 分析。实验结果表明, 主峰拖尾问题得到有效改善。后续进一步优化了流动相 pH 值、氯化钠浓度及有机改性剂的加入比例等条件。最终采用的流动相体系为 20 mmol/L 磷酸盐和 250 mmol/L 氯化钠水溶液 (pH 7.5), 在该条件下得到的替尔泊肽 SEC 分离谱图如图 5 所示。

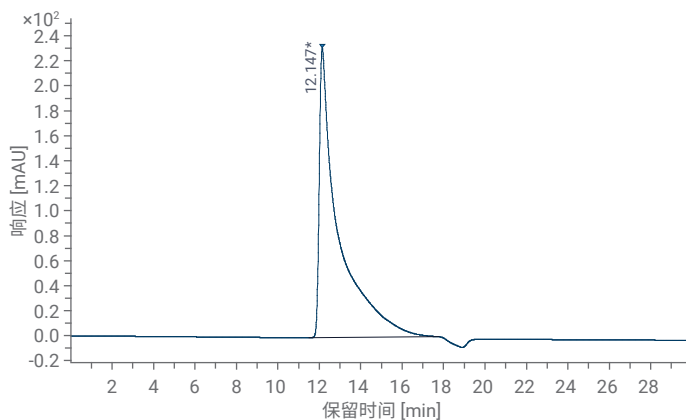


图 4. 采用 0.1% TFA 的水/乙腈 1:1 (v/v) 混合溶液作为流动相得到的替尔泊肽 SEC 分离谱图

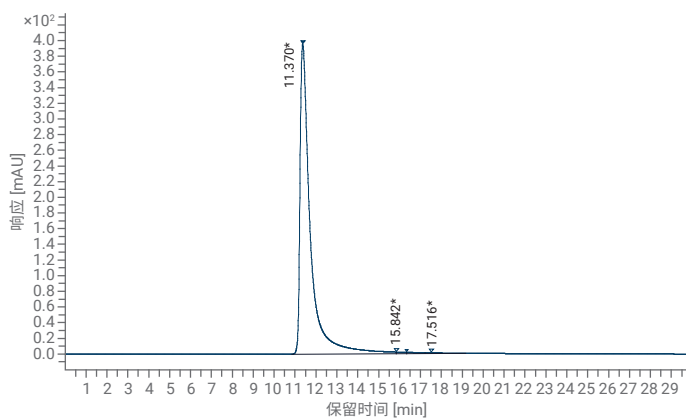


图 5. 在优化条件下得到的替尔泊肽 SEC 分离谱图

方法三：离子交换色谱分析方法建立与优化

离子交换色谱是根据物质的带电性质及带电数量的不同进行分离的一种色谱分析技术。多肽为两性分子，有其特定的等电点，因此在不同 pH 缓冲液中带有不同的电荷。根据多肽的带电性特点，可考虑使用离子交换色谱对多肽有关物质进行分析。

磷酸盐具有背景吸收低、缓冲范围宽等特点，是离子交换方法中常用的缓冲盐，因此本研究选用磷酸盐水溶液作为方法开发的缓冲溶液。替尔泊肽结构中含有 C20 脂肪二酸侧链，因此具有一定的疏水性，分析过程中需要在流动相中加入一定比例的乙腈作为有机改性剂，以减少离子交换填料与替尔泊肽之间的疏水相互作用，最终离子交换分析方法基于磷酸盐-乙腈体系进行开发。实验筛选了 Bio SAX、Bio SCX 和 Zorbax 300 Å SCX 三根离子交换色谱柱，结果表明聚合物基质的 Bio SAX 和 Bio SCX 对于待分析替尔泊肽的保留较弱；而硅胶基质的 Zorbax 300 Å SCX 对该样品具有出色的保留，因此最终选择 Zorbax 300 Å SCX 作为后续方法优化的色谱柱。

对于离子交换分析来说，流动相 pH 值对样品的保留和分离选择性有较大的影响。在阳离子交换模式下，要使目标多肽得到保留，建议流动相 pH 值低于目标多肽等电点 0.5–2 个数值。替尔泊肽的等电点在 4.6 左右，因此方法优化过程中考察了 3.0、3.5、4.0 三种 pH 值条件。结果如图 6 所示。从图中可以看出，pH 越低，替尔泊肽携带的正电荷越多，在强阳离子交换柱上的保留越强，出峰时间越晚。pH 4.0 条件下替尔泊肽的峰形更对称，但其保留相对较弱，方法优化的空间较小；因此最终选定流动相的 pH 值为 3.5。接着优化了流动相中乙腈的添加比例。图 7 显示了流动相中乙腈比例对替尔泊肽峰形和保留的影响。从图中可以看出，当流动相中乙腈比例从 50% 增加到 70% 时，替尔泊肽和杂质的峰形变得更加对称，且替尔泊肽与杂质之间的分离度增加，分离出的杂质数量也增加至 4 种。但是当乙腈比例增加至 75% 时，替尔泊肽和杂质的出峰时间大幅度延后，峰形展宽严重，峰响应显著降低。因此，最终确定流动相中乙腈的最佳添加比例为 70%。之后又对柱温进行了优化（谱图未展示），实验结果显示，柱温 60 °C 时得到的替尔泊肽的峰形最佳且与前后杂质的分离度更出色。最后考察了不同的梯度洗脱方法对分离的影响，最终梯度洗脱方法采用缓慢的 pH 梯度洗脱（pH 值在 0–15 min 内从 3.2 增加至 3.5），能够进一步提高替尔泊肽与紧邻前后杂质（3 号和 1 号杂质）的分离度。在优化的离子交换分析条件下得到的替尔泊肽混合杂质加标样品的分离谱图如图 8 所示。图中替尔泊肽与 4 种有关物质均实现了基线分离。

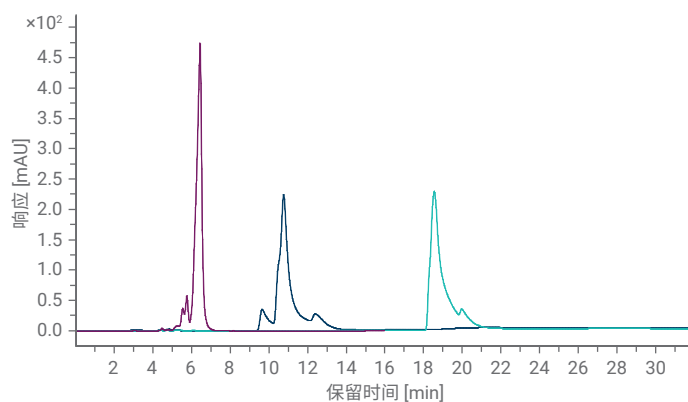


图 6. 流动相 pH 对替尔泊肽离子交换分离的影响：从左到右谱图对应的 pH 值分别为 4.0、3.5 和 3.0

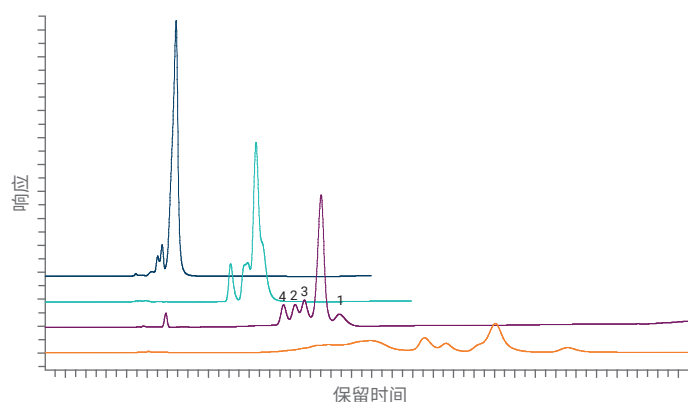


图 7. 流动相中乙腈比例对替尔泊肽峰形和保留的影响：从上到下，流动相中乙腈的加入比例依次为 50%、60%、70% 和 75%

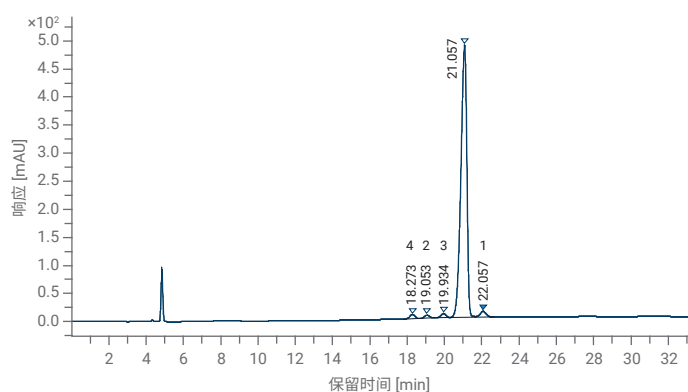


图 8. 替尔泊肽混合杂质加标样品离子交换分离谱图

方法四：亲水相互作用色谱分析方法建立与优化

多肽是两性化合物，具有一定的极性，且在一定 pH 条件下带有电荷，因此会在 HILIC 固定相表面得到保留。从分离机理上看，HILIC 与反相色谱完全正交，两者在分离选择性上存在巨大差异。因此，对于采用反相色谱难以分离的某些多肽有关物质，可以考虑用 HILIC 模式进行分离。

HILIC 色谱的固定相种类很多，包括纯硅胶柱、氨基柱、二醇基柱、酰胺基柱等。本实验中采用的酰胺 HILIC 色谱柱是酰胺键合相的 HILIC 柱。该色谱柱采用全多孔 1.8 μm 硅胶颗粒填料，具有很高的柱效；且独特的酰胺键合技术使色谱柱具有优异的长期稳定性和重现性，易于建立稳健和高分离度的 HILIC 分析方法。

本研究中，HILIC 方法开发同样基于磷酸盐-乙腈混合体系。实验过程中优化了流动相 pH 值、洗脱梯度、柱温等因素。首先考察了流动相 pH 值对分离的影响。由于酸性磷酸盐溶液的最佳缓冲范围为 pH 2.5-3.5，因而对 pH 2.5、3.0 和 3.5 进行了比较。如图 9 所示，在 pH 3.5 下，分离出的杂质数量最多且杂质之间的分离度最出色。当流动相 pH 值降低至 3.0 和 2.5 后，部分杂质和替尔泊肽共流出，且分离出的杂质数量明显减少，因而最终确定流动相的 pH 值为 3.5。接着考察了柱温对分离的影响，结果如图 10 所示。从图中可以看出，柱温从 60 °C 降低至 30 °C 会导致分离出的杂质数量减少，因此最终选择柱温 60 °C 进行分离。最后优化了洗脱梯度，结果如图 11 所示。从图中可以看出，随着洗脱梯度的延缓，替尔泊肽与杂质间的分离得到改善，因此最终确定洗脱梯度为 30 分钟内从 85% 乙腈洗脱到 80% 乙腈。基于以上优化的色谱条件对替尔泊肽混合杂质加标样品进行分离，得到图 12 所示的色谱图。图中替尔泊肽与 5 种有关物质均实现了良好的分离。

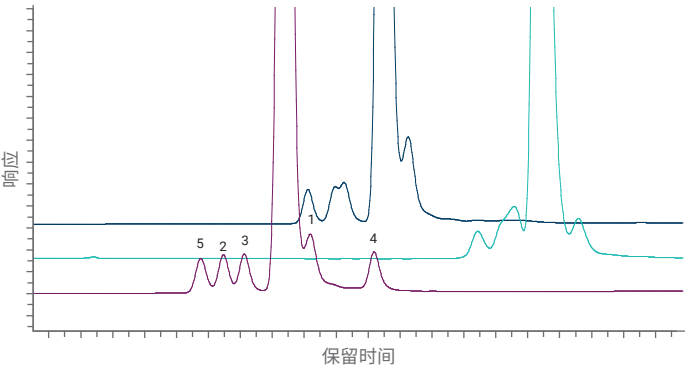


图 9. 不同流动相 pH 对分离的影响：从上到下，pH 依次为 3.0、2.5 和 3.5

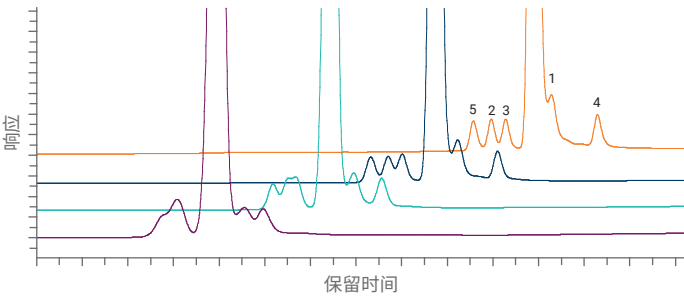


图 10. 柱温对分离的影响：从上到下，柱温依次为 60 °C、50 °C、40 °C 和 30 °C

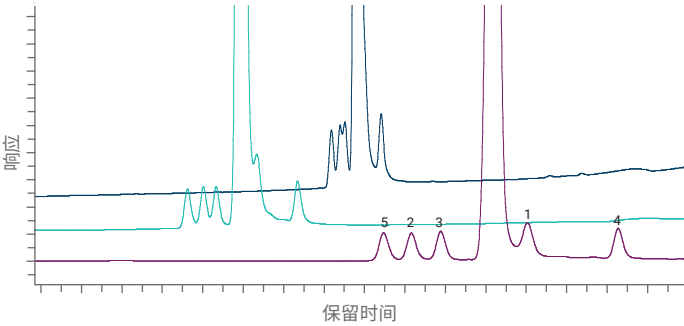


图 11. 洗脱梯度对分离的影响：从上到下，洗脱梯度依次为 30 min 内 90% 乙腈洗脱到 70% 乙腈；85% 乙腈洗脱到 75% 乙腈；85% 乙腈洗脱到 80% 乙腈

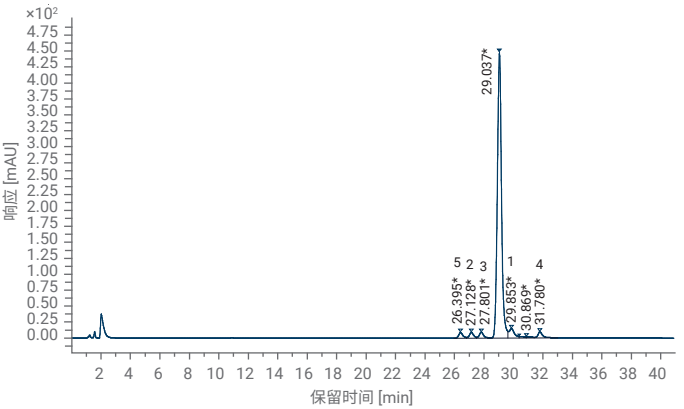


图 12. HILIC 模式下替尔泊肽混合杂质加标样品的分离谱图

反相色谱、离子交换色谱、亲水相互作用色谱分离选择性对比

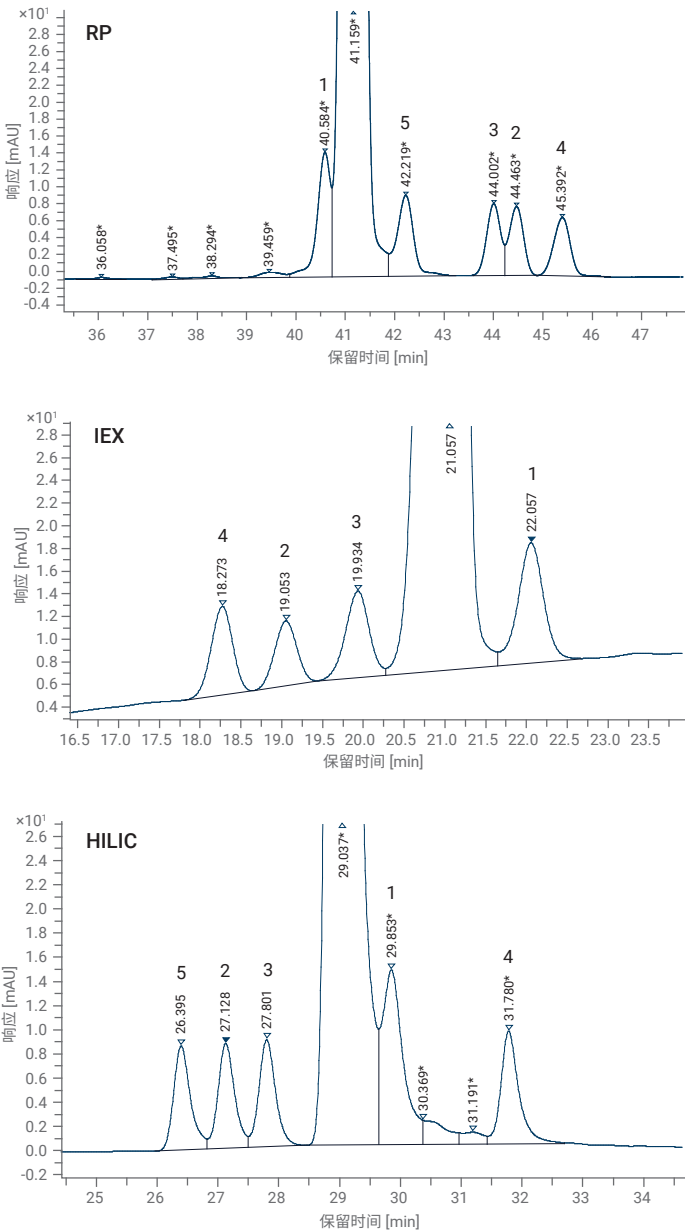


图 13. RP、IEX、HILIC 三种分离模式的对比谱图

图 13 为 RP、IEX、HILIC 三种分离模式的对比谱图。从图中可以看出，不同分离模式下 5 种杂质相对替尔泊肽的出峰先后顺序存在显著差异。在反相色谱分离模式下，1 号杂质在替尔泊肽前出峰，2-5 号杂质在替尔泊肽后出峰。在离子交换分离模式下，1 号杂质在替尔泊肽后出峰，其他杂质在替尔泊肽前出峰。在反相模式下分离较困难的 1 号杂质，在离子交换模式下与替尔泊肽实现了基线分离，同时 2 号和 3 号杂质之间的分离度也得到提高。在 HILIC 分离模式下，1 号杂质同样在替尔泊肽后出峰，3 号、2 号和 5 号杂质依次在替尔泊肽前出峰，且 5 号杂质峰在谱图上离替尔泊肽峰最远。因此对于 5 号杂质的分离，HILIC 模式明显优于反相模式。综合来看，在反相分离模式下，替尔泊肽前后紧邻的两个杂质（1 号和 5 号杂质）分别在离子交换模式和 HILIC 模式下取得了更好的分离效果。表 2 列出了 5 种杂质与替尔泊肽的相对保留时间，可基于各杂质的相对保留时间进一步比较三种分离模式的选择性差异。总之，杂质出峰顺序及相对保留时间的差异都表明，三种方法具有明显的分离选择性差异，可以互为正交分离手段。

表 2. 杂质与替尔泊肽的相对保留时间

名称	RP		IEX		HILIC	
	保留时间 (min)	相对保留时间 (RRT)	保留时间 (min)	相对保留时间 (RRT)	保留时间 (min)	相对保留时间 (RRT)
替尔泊肽	41.159	1.00	21.057	1.00	29.037	1.00
杂质 1	40.584	0.99	22.057	1.05	29.853	1.03
杂质 2	44.463	1.08	19.053	0.90	27.128	0.93
杂质 3	44.002	1.07	19.934	0.95	27.801	0.96
杂质 4	45.392	1.10	18.273	0.87	31.780	1.09
杂质 5	42.219	1.03	21.057	1.00	26.395	0.91

结论

多肽有关物质的结构、性质与主成分非常相似，采用单一原理的分析方法可能无法完全将其分离，因此《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则》中推荐采用不同原理的检测方法进行多肽有关物质检测。本文针对热点多肽药物——替尔泊肽及其有关物质建立了反相、体积排阻、离子交换、亲水相互作用色谱四种不同机理的液相色谱分析方法。反相色谱分析选择极性酰胺基团嵌入的 Poroshell Bonus-RP 色谱柱作为反相分析柱，进而通过优化流动相组成、柱温、流速等一系列参数，成功将替尔泊肽与 5 种有关物质分离。离子交换分析选用硅胶基质的强阳离子交换柱 Zorbax 300 Å SCX 作为分析柱，通过优化有机添加剂的比例、流动相 pH 值、柱温等参数，也成功分离出 4 种替尔泊肽有关物质。HILIC 分析采用具有独特键合技术的新型酰胺 HILIC 色谱柱进行方法开发，通过优化流动相 pH 值、洗脱梯度、柱温等参数，最终使替尔泊肽与 5 种有关物质实现分离。通过谱图和杂质相对保留时间的对比，进一步验证了这三种不同原理的分析方法对替尔泊肽有关物质的分离存在明显的选择性差异，可以互为正交分离手段。对于替尔泊肽聚合物杂质的分析，本文采用 130 Å 孔径，具有独特化学惰性处理技术的 AdvanceBio SEC 色谱柱进行方法开发，通过筛选流动相体系，优化了多项色谱分离参数，取得了比较理想的主峰峰形和杂质分离效果。

综上所述，本研究从替尔泊肽和 5 种有关物质分离的实际案例出发，系统介绍了四种不同原理的液相色谱分析方法的开发思路，为全面分析和表征替尔泊肽有关物质提供了多种方法学参考。

参考文献

1. 胡玉玺, 蒋煜, 韩天娇等. 合成多肽药物物质控及杂质谱研究. 中国新药杂志, 2018, 27 (5): 502-508
2. 吴一凡, 刘福利. 多肽固相合成中起始物料的控制策略. 中国新药杂志, 2022, 31 (10): 937-941
3. 胡玉玺, 蒋煜, 韩天娇. 制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响. 中国新药杂志, 2017, 26 (18): 2143-2148
4. 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学合成多肽药物药学研究技术指导原则 (试行), 2023 年 2 月
5. 尹菁, 王婉婷, 陆益红等. 基于 3 种原理分离技术的多肽类药物比伐芦定杂质分析. 中国现代应用药学, 2024, 41 (5): 626-635

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

www.agilent.com

DE-010526

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2025

2025 年 10 月 22 日，中国出版

5994-8572ZHCN