

多种 GLP-1 类似物的全面表征

使用配备电子捕获解离技术的 Agilent 6545XT
AdvanceBio LC/Q-TOF 和 ExDViewer 软件

作者

Rachel Franklin, Mike Hare,
Thomas Walker,
Joseph Meeuwsen
安捷伦科技有限公司

摘要

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物是一类模拟天然 GLP-1 激素的合成多肽。GLP-1 类似物的研发非常重要，因为它们对糖尿病和肥胖症的治疗具有重要意义。使用安捷伦高分辨 LC/Q-TOF 对合成多肽进行表征，可提供有关 GLP-1 类似物的关键质量信息。在 LC/MS 工作流程中应用基于电子的碎裂技术，是实现蛋白质和多肽的序列及修饰分析的有效方法。本应用简报介绍了使用配备 Agilent ExD Cell（用于电子捕获解离）的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统对利拉鲁肽、司美格鲁肽和替尔泊肽三种 GLP-1 类似物进行表征。Agilent ExDViewer 是一种高效易用的软件工具，可用于分析蛋白质和多肽产生的各种类型的碎裂数据。本应用简报使用 ExDViewer 的目标物解卷积工作流程进行了深入的序列分析，表征人工设计修饰，并重点展示了该软件在碎片化趋势可视化和数据质量评估方面的强大分析能力。

前言

GLP-1 是一种可与 GLP-1 受体结合的胰岛素刺激激素^[1,2]。2019 年, 首个 GLP-1 类似物获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准, 用于治疗 2 型糖尿病; 2020 年, GLP-1 类似物又获准用于治疗肥胖症^[3,4]。随着 GLP-1 类似物的应用日益广泛, 建立准确的质谱 (MS) 方法进行结构表征、纯度检测和仿冒品分析非常重要。

使用电子捕获解离 (ECD) 对合成多肽进行 LC/MS/MS 分析可获得详细的序列、修饰和纯度信息。与碰撞诱导解离 (CID) 相比, ECD 被认为是一种“更温和”的碎裂方法, 能够有效保留各种修饰, 例如 GLP-1 类似物中的脂肪酸修饰。这样就可以在有效裂解多肽主链的同时, 实现修饰位点的定位与表征 (图 1)。此外, 通过 ECD 对氨基酸侧链进行次级碎裂可以为序列鉴定提供更多证据, 并能实现天冬氨酸和异天冬氨酸等氨基酸异构体的鉴别研究^[5,6]。Agilent ExD Cell 和 Agilent ExDViewer 软件为具有复杂结构的合成多肽的详细表征提供了强大的解决方案。

本应用简报介绍了三种 GLP-1 类似物的 LC/MS/MS 分析: 司美格鲁肽、利拉鲁肽和替尔泊肽。实验采用配备 ExD Cell (用于实现 ECD) 的 6545XT LC/Q-TOF 进行分析。使用 ExDViewer 通过目标物解卷积工作流程分析 MS/MS 碎片谱图, 该工作流程专门针对电子碎裂特有的氢转移和侧链碎裂等现象进行了优化^[7]。此外, ExDViewer 还提供了实用工具, 可用于可视化碎片化趋势并评估 ECD 和 CID 实验的数据质量。通过结合 ExD 硬件和软件, 这些方法能够快速深入地表征具有非标准残基的多肽序列以及人工设计的修饰。

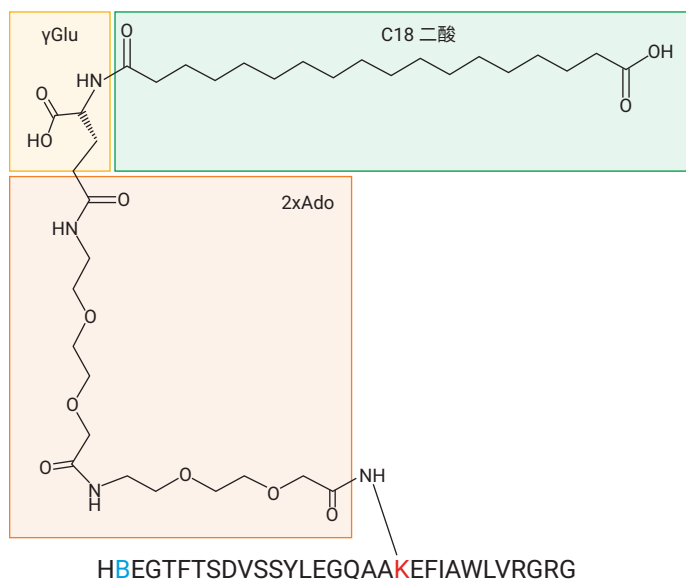


图 1. 司美格鲁肽的结构示意图, 第 2 位氨基酸为非典型氨基酸 2-氨基异丁酸, 以字母 B 表示。第 20 位的赖氨酸通过双氨基二乙氧基乙酰 (2xAdo) 和 γ -谷氨酸连接子修饰有 C18 脂肪酸。利拉鲁肽和替尔泊肽的赖氨酸修饰结构与之相似, 只是连接子和脂肪酸基团有所不同

实验部分

试剂与标准品

- 安捷伦 ESI-L 调谐混标 (部件号 G1969-85000), 含有 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蜂毒素 (部件号 G1997-85001)
- 甲酸, 99.0%+, Optima LC/MS 级, 货号 A-117-50, Fisher Chemical (货号 A-117-50)
- 乙腈, 99.9%+ LC/MS 级, Supelco OmniSolv (货号 AX0156-6)
- 利拉鲁肽, Sigma (货号 SML3925)
- 司美格鲁肽, AstaTech (货号 AT35750)
- 替尔泊肽, AstaTech (货号 AT40456)

样品前处理

将每种样品用含 0.1% 甲酸的 15% 乙腈溶液配制成 10 μM 浓度。对于液相色谱实验, 将三种样品等体积混匀后进行分析。

HPLC 色谱柱

- Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 120 \AA , 2.1 \times 150 mm, 2.7 μm (部件号 653750-902)

仪器

- Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统
 - Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
 - Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF MS, 配备 Agilent ExD Cell

软件

- 用于 LC/Q-TOF 的 Agilent MassHunter 采集软件, 11.0 版
- Agilent ExDControl 软件, 3.6 版
- Agilent ExDViewer 软件, 4.6.12 版

液相色谱方法

大多数 ECD 实验采用本应用简报中所述的 LC 方法。但 ExD Cell 调谐及电荷态依赖性碎裂研究采用了直接进样方式。使用 500 μL 进样针, 以 10–20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度直接进样。使用 PEEK 管将样品从进样针传输到安捷伦双 AJS 离子源的雾化器进样口。图 2 显示了三种 GLP-1 类似物混合物的色谱分离情况。

表 1. 用于 GLP-1 类似物分析的液相色谱方法

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统	
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 120 Å, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm
流动相 A	LC/MS 级水 + 0.1% 甲酸
流动相 B	乙腈 + 0.1% 甲酸
流速	0.400 mL/min
进样量	10 μL
柱温	60 °C
梯度程序	时间 (min) %B
	0 20
	20 60
	20.10 80
	21.90 80
22 20	

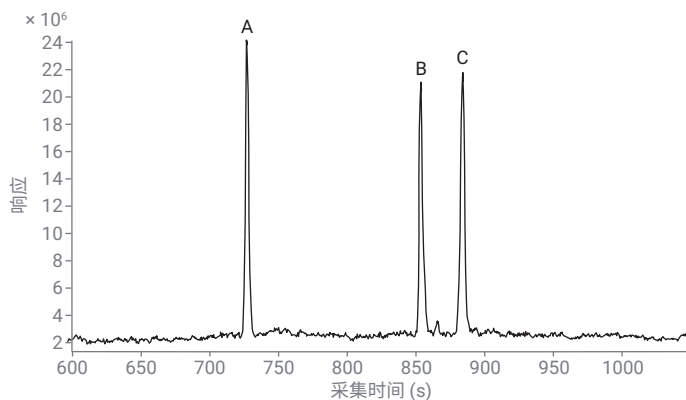


图 2. GLP-1 类似物混合物的色谱图。峰分别为: (A) 司美格鲁肽, (B) 利拉鲁肽, 以及 (C) 替尔泊肽

质谱方法

表 2. LC/Q-TOF 参数

Agilent 6545XT Q-TOF MS 系统	
离子源	安捷伦双喷射流 ESI 离子源
极性	正
气体温度	325 °C
干燥气流量	10 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流量	12 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	175 V
锥孔电压	75 V
采集速率	2 质谱图/秒
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz)
分离窗口	中等 (4 amu)
MS 谱图范围	m/z 120–3200
MS/MS 谱图范围	m/z 120–3200

表 3. 自动 MS/MS 数据采集参数

参数	设定值
前体离子选择	4+ 的首选前体离子列表: - m/z 938.2 (利拉鲁肽) - m/z 1028.7 (司美格鲁肽) - m/z 1203.6 (替尔泊肽)
强度阈值 (Abs)	2000
强度阈值 (Rel)	0.01%
质量数误差范围	20 ppm
静态排除	m/z 100–400
同位素模型	多肽
仅使用首选离子列表	False

靶向 ECD MS 工作流程

ExD Cell 透镜和内部灯丝由 ExDControl 软件（3.6 版）控制，该软件与 MassHunter 采集软件一起作为单独的应用程序运行。通过自动灯丝调谐确定最佳灯丝电流为 2.55 A，然后进行手动调节以优化蜂毒素 ECD 碎片信号。完整离子 MS1 传输的透镜参数是通过调谐混标离子进行自动调谐来确定的。使用蜂毒素 ECD 碎片离子峰来自动调谐 MS2 中用于 ECD 的透镜参数。对于液相色谱实验，在 MassHunter 采集软件中设置了自动 MS/MS 采集方法，具体参数如表 2 和表 3 所示。对于直接进样实验，采用靶向 MS/MS 采集来研究各电荷态。

数据分析

使用 ExDViewer 的 MS1 解卷积工作流程确定 GLP-1 类似物的分子量。将原始.d 文件直接加载到 ExDViewer 中，并使用默认参数进行解卷积。对每个色谱峰的 MS1 谱图进行平均化处理。通过在谱图窗口中切换谱图视图来生成去电荷谱图。将文件保存为.svg 文件并导入到 Microsoft PowerPoint 中以自定义图表元素。

使用 ExDViewer 的目标物解卷积进行序列和修饰分析。首先，在目标物编辑器中定义 GLP-1 类似物序列，并在 MS/MS 结果中进行搜索。除赖氨酸修饰表征外，其余的碎片匹配均使用默认参数。在修饰分析中，将离子评分阈值提高到 10，仅筛选包含修饰的高质量碎片匹配结果。



图 3. GLP-1 类似物合成多肽的 LC/MS/MS 分析工作流程

结果与讨论

使用 ExDViewer 进行同位素分辨谱图解卷积

使用安捷伦 LC/MS/MS 工作流程分析 GLP-1 类似物，可以在单次实验中实现分子量测定、信号异质性分析和序列测定。ExDViewer 的非目标物解卷积算法可以有效地处理同位素分辨谱图的信号，这类信号常见于多肽分析。MS1 解卷积可以测定合成多肽的分子量。

图 4 显示了图 2 所示混合物中各 GLP-1 类似物的 MS1 和解卷积谱图。解卷积谱图显示，每个色谱峰的主信号均对应于 GLP-1 类似物，同时伴有少量丰度较低的盐加合物峰 (Na^+/K^+)。对于大分子蛋白质离子，ExDViewer 的同位素分辨信号解卷积与 [Agilent MassHunter BioConfirm](#) 的最大熵解卷积形成了互补方法。

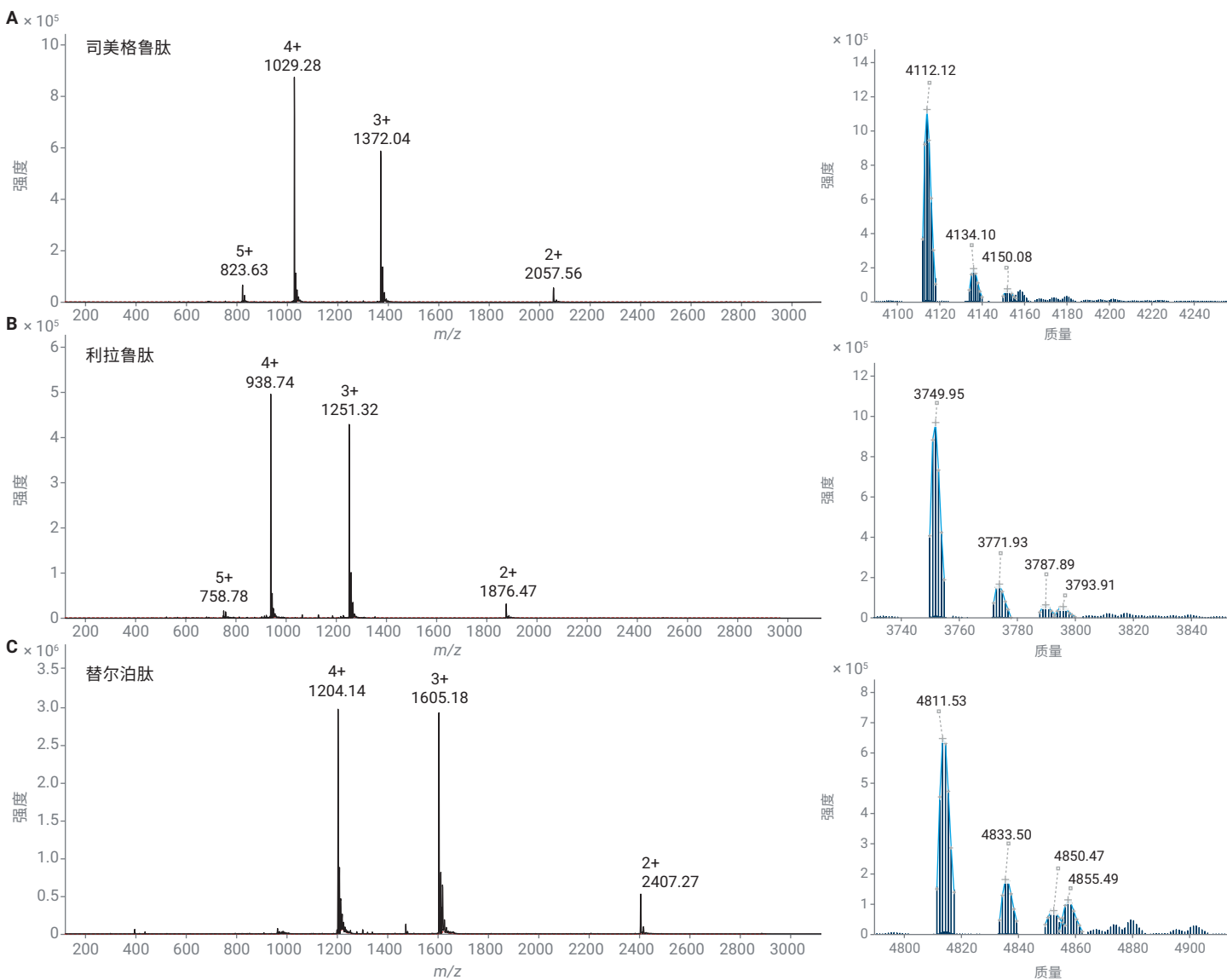


图 4. LC 分离的 GLP-1 类似物 (A) 司美格鲁肽, (B) 利拉鲁肽和 (C) 替尔泊肽的 MS1 谱图 (左) 和相应的解卷积谱图 (右)。解卷积谱图中已标注单一同位素质量

非经典氨基酸序列分析

ECD 气相碎裂技术可实现多肽主链的精确断裂，从而产生干净且可重复的碎裂谱图，这些谱图可通过 ExDViewer 轻松解析。司美格鲁肽和替尔泊肽含有非经典氨基酸，可以在 ExDViewer 的 Building Block (结构单元) 编辑器中将它们定义为自定义氨基酸。在本分析中，非经典氨基酸定义为 2-氨基

基异丁酸，缩写为单字母代码 B。使用在 2 Hz 下采集的单次靶向 MS/MS 谱图，对利拉鲁肽、司美格鲁肽和替尔泊肽的 4+ 前体离子实现了 100% 序列覆盖度。检测到多种 CID 和 ECD 碎片离子类型 (a、b、c、d 和 w、y、z)，为序列确认提供了补充证据 (图 5)。

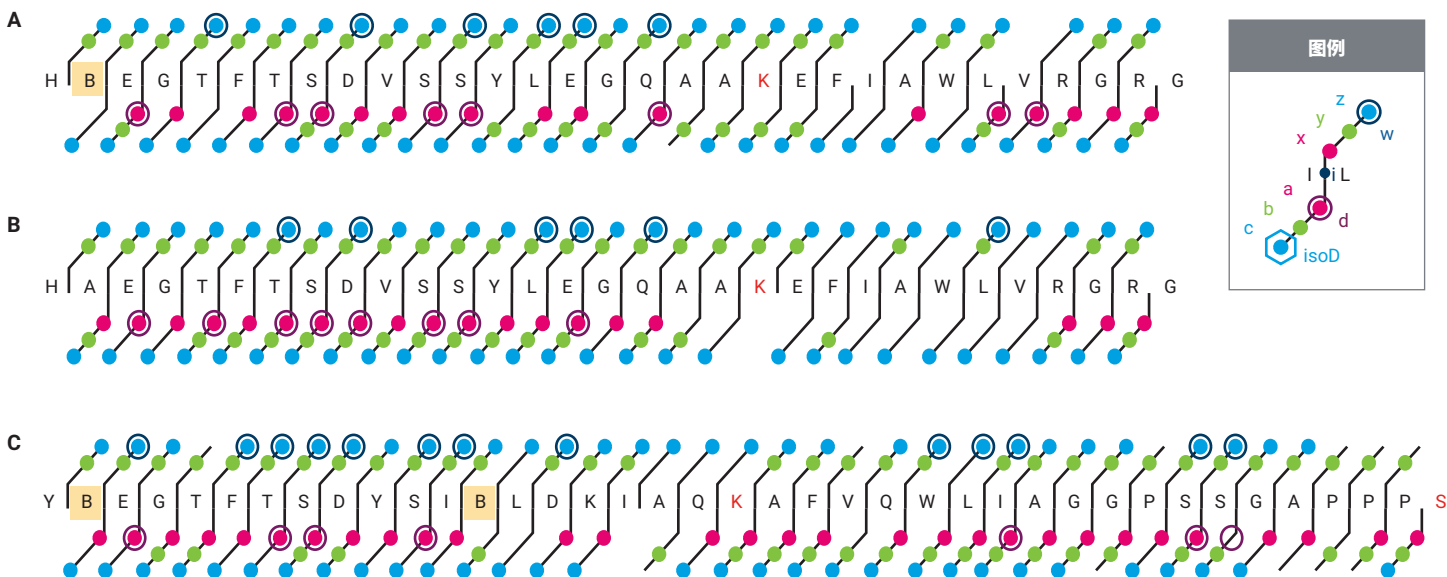


图 5. (A) 司美格鲁肽、(B) 利拉鲁肽和 (C) 替尔泊肽的序列覆盖图。非标准 B 氨基酸以黄色突出显示，而修饰的赖氨酸以红色文字表示。已鉴定出几种互补的 c/z 和 b/y 型离子。Agilent ExDViewer 碎片匹配使用默认参数

使用 ExD Cell 通常会生成丰富的氨基酸侧链片段，这为亮氨酸与异亮氨酸等同分异构氨基酸的鉴别提供了额外信息。ECD 自由基离子引发的氨基酸侧链的次级碎裂产物被称为 w 离子^[4]。ExDViewer 将自动标注侧链证据，从而简化氨基酸异构体的分析^[7]。该软件还能标注与异天冬氨酸形成（该修饰对于评估蛋

白质量至关重要）相关的离子^[6,7]。图 6 中标注的 w_{23}^{2+} 离子为证明该位置存在天冬氨酸提供了额外的证据。将鼠标悬停在 w_{23}^{2+} 离子上时，将显示一个信息提示框，其中给出了氢转移百分比、质量、侧链丢失基团分子式、评分和匹配的同位素数量。

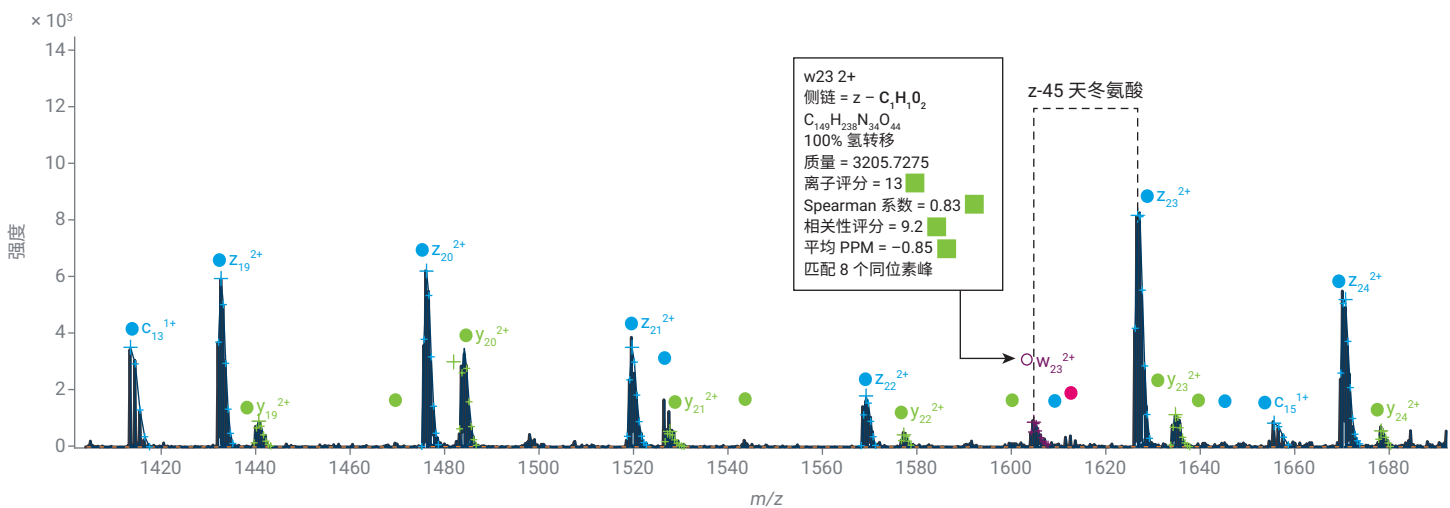


图 6. 利拉鲁肽的代表性碎裂谱图，软件自动标注碎片为区分天冬氨酸和异天冬氨酸等同分异构氨基酸提供了证据。通过 z_{23}^{2+} 离子丢失了一个 CHO₂ 基团可鉴定天冬氨酸

ECD 和 CID 碎片化趋势可视化

ExDViewer 中自动生成的图表可清晰呈现不同实验条件下的碎片化趋势。这种可视化对于评估数据质量非常有用。例如，离子强度图显示了检测到的每种离子类型的信号，包括内部离子和未鉴定离子。这些图表对于评估碰撞能量等方法参数的设置是否合理也很有用。图 7 中的离子强度图展示了司美格鲁肽在 ECD 或 CID 和 ECD 联用的情况下的电荷态依赖性碎裂模式。

在碰撞能量为零时，ECD 对 5+ 和 4+ 司美格鲁肽前体离子实现了 100% 序列确认，但单独使用 ECD 难以有效裂解 3+ 前体离子。施加 35 V 的碰撞能量后，3+ 前体离子的序列覆盖度从 57% 提高到了 93% (图 7C 和 7F)。值得注意的是，3+ 司美格鲁肽的碎片离子总丰度在有无 CID 时非常相近，这表明增加 CID 后序列覆盖度的增加源于新增了不同的碎裂途径，而非碎片离子丰度的普遍性增加。因此，ECD 配合低强度碰撞能量

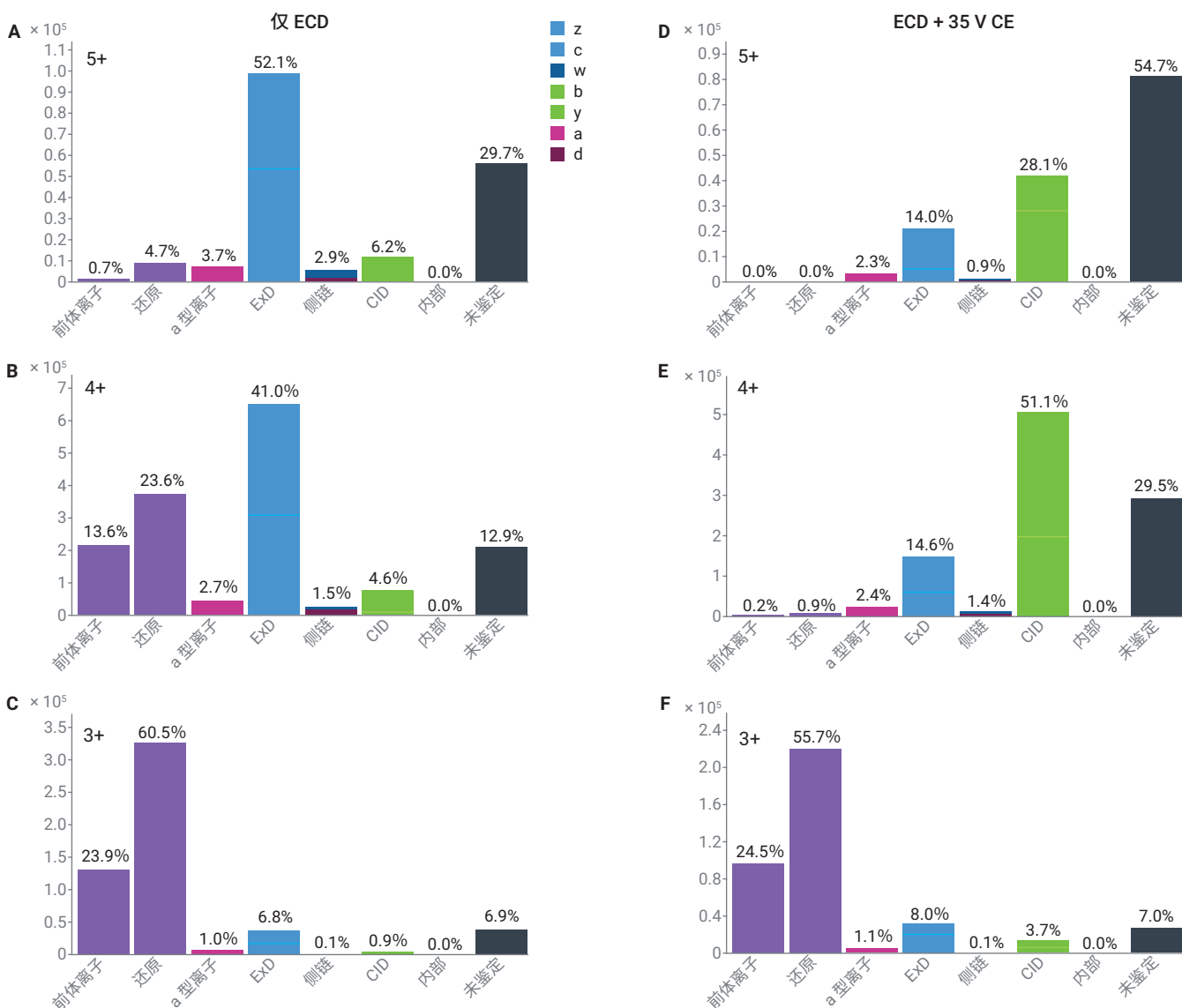


图 7. 司美格鲁肽 3、4 和 5+ 前体离子的碎裂途径。图 A、B 和 C 显示了仅 ECD 条件下的离子强度。图 D、E 和 F 显示了 ECD 结合 35 V 碰撞激活 (ECD+CID) 获得的离子强度。在分析这些数据集时没有考虑内部碎片离子

可作为提升低电荷肽段序列覆盖度的有效策略。但需注意，过高的碰撞能量可能会导致未鉴定离子信号的百分比激增，这可能是过度碎裂所致（图 7D）。

GLP-1 类似物修饰的表征

随着新型 GLP-1 类似物衍生物的不断研发，建立有效的方法来表征它们的修饰情况非常重要。本研究采用 ExDViewer 进行碎片分析，以鉴定三种 GLP-1 类似物中合成修饰的位点和结构。GLP-1 类似物修饰的自定义化学参数在 ExDViewer 的 Modifications Editor（修饰编辑器）中设置。

ExDViewer 的碎片匹配算法根据 m/z 和强度匹配以及周围的噪音水平为每个同位素簇分配一个离子评分。默认的离子评分设置适用于大多数序列分析应用。但在修饰表征中，必须采用严格的谱图质量标准以实现修饰的准确定位。图 8 显示了在替尔泊肽中检测到的含有修饰的 ECD 离子示例，展示了可以在碎裂谱图中观察到的离子匹配质量差异范围。

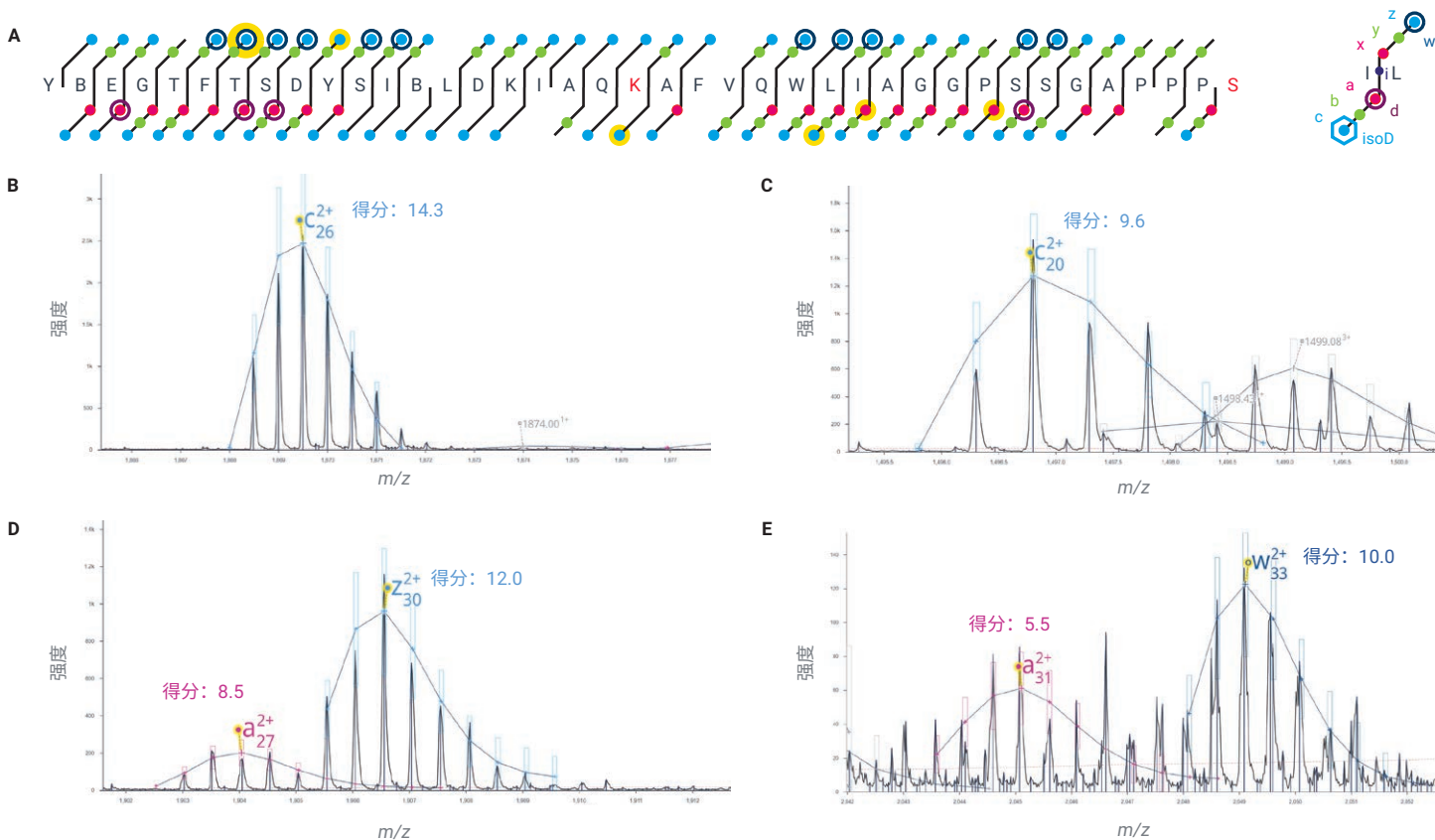


图 8. 离子评分各不相同的代表性替尔泊肽碎片。根据 m/z 和预测强度匹配以及周围的噪音水平为每个离子分配一个分数。(A) 替尔泊肽序列覆盖图，仅考虑得分为 5 或更高的离子。(B-E) 包含修饰的碎片示例及其相应的离子评分。经修饰的赖氨酸以红色文字表示。C₂₀²⁺ 离子是位点特异性定位碎片，而其他突出显示的离子是在多肽骨架的不同位置处碎裂的含有修饰的肽段

与碰撞解离不同，ECD 是一种温和的技术，它可以裂解多肽骨架，同时保留重要但不稳定的化学修饰。通过比较采用 ECD 或 CID 分析 GLP-1 类似物获得的离子评分，发现 ECD 碎裂相比 CID 能产生更多含有修饰的高质量碎片（图 9）。当修

饰位点两侧均获得高质量匹配时，可显著提升定位可置信度。在许多情况下，单独使用 ECD 碎裂就足以提供详细的结构信息，无需再进行碰撞能量优化，从而节省了序列分析的时间。

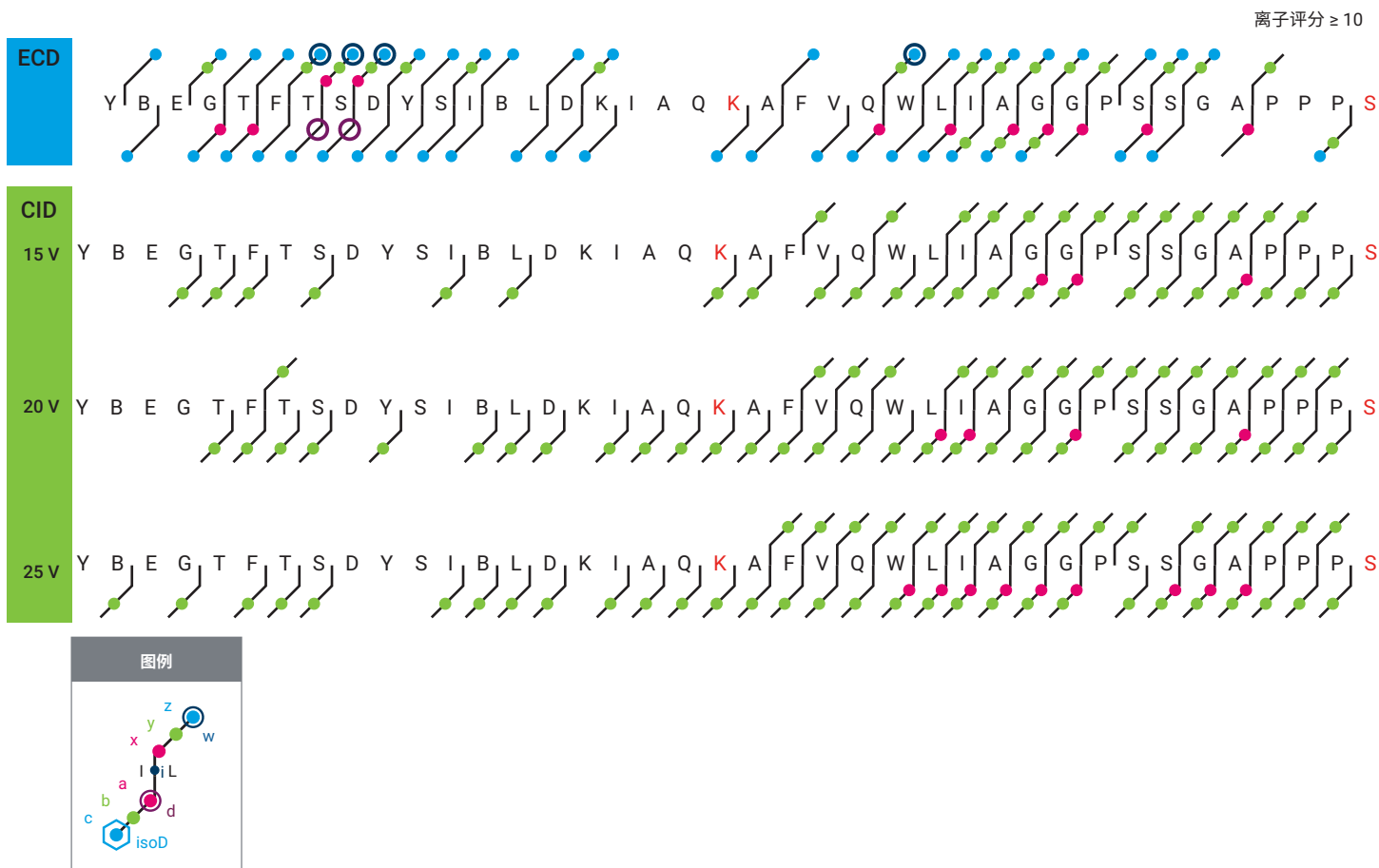


图 9. 在 ECD 或 CID 实验中鉴定的替尔泊肽碎片，离子评分为 10 或更高。ECD 提供了更多含有修饰的高质量碎片，特别是在修饰位点的 N 端侧。ECD 产生了更完整的离子系列，其中包含多种互补离子类型。但富含脯氨酸的区域是个例外，因为 ECD 无法在脯氨酸的 N 端侧进行裂解

结论

本研究使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 与用于碎片分析的 Agilent ExDViewer, 通过电子解离技术对三种合成 GLP-1 类似物进行了全面的序列分析和修饰位点定位。氨基酸侧链的碎裂为鉴别天冬氨酸和异天冬氨酸等氨基酸异构体提供了额外的证据。基于 ECD 数据的高质量碎片匹配能够实现有效的修饰表征和定位, 并且由于整个过程不需要优化碰撞能量, 节省了分析时间。ExDViewer 为 ECD 和 CID 实验提供了强大的碎裂途径可视化工具和数据质量评估工具。本应用简报中介绍的方法为 GLP-1 类似物的分析提供了一个框架, 同时也可作为使用 ECD 研究新型 GLP-1 类似物衍生物和杂质的基础框架。

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

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA250218.98

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4月14日, 中国出版
5994-7994ZHCN

参考文献

1. Andersen, A.; Lund, A.; Knop, F. K.; Vilsbøll, T. Glucagon-Like Peptide 1 in Health and Disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *14*(7), 390–403
2. Holst, J. J. The Physiology of Glucagon-Like Peptide 1. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*(4), 1409–1439
3. U.S. Food and Drug Administration FDA News Release. FDA Approves First Oral GLP-1 Treatment for Type 2 Diabetes. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-oral-glp-1-treatment-type-2-diabetes> (2019 年访问)
4. U.S. Food and Drug Administration FDA News Release. FDA Approves Weight Management Drug for Patients Aged 12 and Older. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-adults-alzheimers-disease> (2020 年访问)
5. Beckman, J. S.; Voinov, V. G.; Hare, M.; Sturgeon, D.; Vasil'ev, Y.; Oppenheimer, D.; Shaw, J. B.; Wu, S.; Glaskin, R.; Klein, C.; et al. Improved Protein and PTM Characterization with a Practical Electron-Based Fragmentation on Q-TOF Instruments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2021**, *32*(8), 2081–2091
6. Wang, J.; Mukherjee, S.; Zubarev, R. A. Isoaspartate and Neurodegeneration. *Aging (Albany NY)*, **2022**, *14*(22), 8882
7. 使用配备电子捕获解离的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统鉴定氨基酸异构体, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-7506ZHCN, **2024**