应用简报

生物制药

使用 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 快速确认 GLP-1 类似物（利拉鲁肽）

作者

Chae-Young Ryu
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了采用 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 对利拉鲁肽进行分析。在对 GLP-1 类似物进行快速分子量确认时，InfinityLab LC/MSD iQ 可在高达 1450 *m/z* 的宽质量数范围内实现高灵敏度扫描。为确认利拉鲁肽等生物制药产品的完整分子量，本研究采用了 Agilent OpenLab CDS 2.8 中的解卷积功能。在快速方法开发过程中，Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换阀为多种色谱柱筛选提供了灵活的测试环境。

前言

市场对 GLP-1 类多肽药物的广泛关注，促使众多制药企业投身于 GLP-1 类似物的开发。GLP-1 类似物最初作为 II 型糖尿病的治疗药物问世，但随着多种新作用机制的发现，其应用场景已拓展至多个领域。然而，天然 GLP-1 在血浆中的半衰期极短，因此研究人员尝试了各种方法来延长其半衰期。利拉鲁肽通过引入棕榈酰谷氨酸作为侧链，相较天然 GLP-1，半衰期得到大幅延长。

肽类药物（包括 GLP-1 类似物）通常指由少于约 40 个氨基酸组成的药物。这类合成肽类治疗药物，必须满足药品审批的相关法规要求。因此，确认生产工艺、全面表征药物降解产生的杂质，是药品获批的基本前提。

带有修饰侧链的合成肽可能伴随多种与目标分子理化性质相近的杂质。因而，在研发早期建立准确的 HPLC 评估方法，对于确保高度精密可控的工艺至关重要。灵活的 Agilent Infinity II 全能泵有助于对多种添加剂进行筛选，配合 InfinityLab Quick Change 快速更换阀轻松在线切换不同的色谱柱，从而高效测试各种肽分析方法。

InfinityLab LC/MSD iQ 的扫描范围可达 1450 *m/z*，适用于分析具有多种电荷态的肽段。此外，OpenLab CDS 2.8 的解卷积功能可将质谱图中的多电荷峰转化为单一中性分子量。OpenLab CDS 的解卷积功能不仅可用于生物制药开发后期阶段的确认分析，还可以用于质量控制，因为它满足数据完整性和合规性要求。

本应用简报采用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统搭配 InfinityLab Quick Change 快速更换阀，对比了不同酸性改性剂与色谱柱条件下的检测结果。借助 InfinityLab LC/MSD iQ 与 OpenLab CDS 2.8 的解卷积功能，对利拉鲁肽的完整分子量进行了评估。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温器
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，配备生物兼容性标准流速热交换器及生物兼容性 6 色谱柱选择阀（1300 bar，部件号 5320-0025）
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)，配备生物惰性最大光强卡套式流通池 60 mm（部件号 G5615-60017）
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (G6160A)

试剂

甲酸 (FA) 与二氟乙酸 (DFA) 购自 Sigma-Aldrich；三氟乙酸 (TFA) 购自 Merck；乙腈购自 B&J。

样品

利拉鲁肽购自韩国 Kairos Tech 公司。将利拉鲁肽用水溶解，配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液，然后进一步用水稀释至浓度为 100 µg/mL 和 10 µg/mL，用于实验分析。

流动相

- 流动相 A
  - 0.1% 甲酸水溶液
  - 0.1% 三氟乙酸水溶液
  - 0.1% 二氟乙酸水溶液
- 流动相 B
  - 0.1% 甲酸乙腈溶液
  - 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液
  - 0.1% 二氟乙酸乙腈溶液

色谱柱

- Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱，120 Å, 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 InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm（部件号 693775-742）

软件

Agilent OpenLab CDS 2.8

方法

表 1. Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱方法参数

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱，120 Å, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm
流速	0.4 mL/min
柱温	40 °C
进样量	5 µL
流动相	A) 0.1% 酸性改性剂 B) 0.1% 酸性改性剂的乙腈溶液
梯度 – 色谱柱筛选	时间 (min) %A %B 0 70 30 1 70 30 15 10 90 15.1 70 30 20 70 30
梯度 – 优化	时间 (min) %A %B 0 80 20 1 80 20 20 40 60 25 10 90 25.1 80 20 30 80 20
检测器	UV 280 nm（DAD HS，带生物惰性最大光强卡套式流通池，60 mm）

表 2. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 数据采集参数

参数	值
离子源	ESI (+)
离子源参数	
气体温度	325 °C
气体流量	11 L/min
雾化器	45 psi
毛细管电压	4500 V
采集	
扫描范围	300 至约 1450 *m/z*
碎裂电压	150 V
扫描时间	997 ms (1 Hz)
储存	– 方法优化：棒状图 – 解卷积：轮廓图

结果与讨论

以 TFA 作为酸性改性剂对利拉鲁肽进行基础分析

在采用 HPLC 进行多肽分析时，TFA 是常用的添加剂。将利拉鲁肽溶于水，配制成浓度为 100 µg/mL 的溶液，并在 0.1% TFA 水溶液和 0.1% TFA 乙腈溶液条件下进行分析，采集利拉鲁肽的色谱峰及 UV 谱图。上述分析条件作为基础方法，用于筛选适用于 API 及杂质检测的色谱柱与酸性改性剂条件。

色谱柱与酸性改性剂的筛选

安捷伦色谱柱产品组合提供了多种适用于多肽分析的色谱柱化学键合相。本文所提供的结果基于 AdvanceBio 肽谱分析柱、Peptide Plus 和 Poroshell 120 Aq-C18 色谱柱，这三款色谱柱都具有独特的特性，针对不同的分析物可提供不同的选择性。

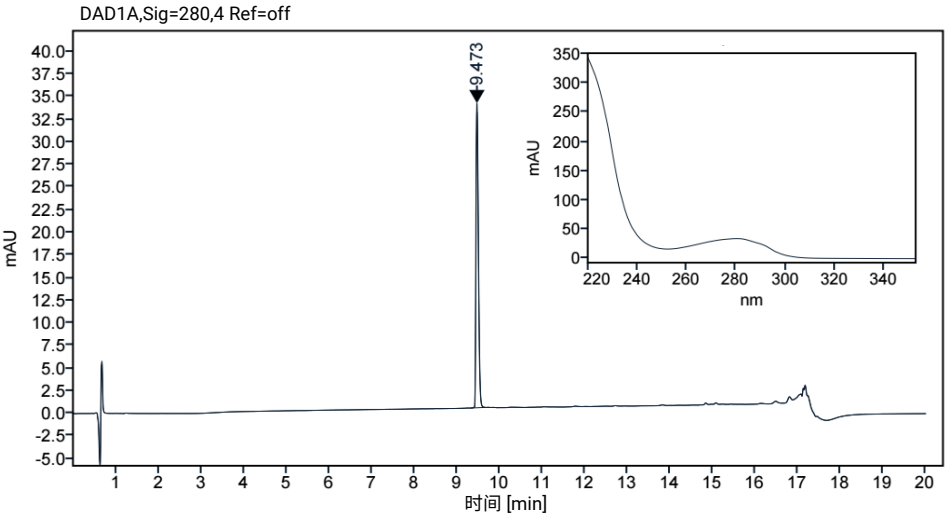


图 1. 在 TFA 条件下，100 µg/mL 利拉鲁肽的色谱图和 UV 谱图

因此，应根据目标化合物的分析需求选择合适的色谱柱。

在 HPLC 及 LC/MS 应用中，常用的酸性改性剂为 FA 和 TFA。低 pH 流动相不仅能降低色谱柱封端带来的影响，还有助于维持流动相的 pH 值，从而有助于待测物形成稳定的形态。因此，酸性改性剂的种类与浓度会直接影响峰形。具体而言，TFA 的 pKa 值低于 FA，可通过形成离子对减少待测物与色谱柱的次级相互作用，从而大幅降低峰拖尾现象，获得高分离度。然而，TFA 会抑制质谱中的离子化效

率，且在分析过程中难以去除。DFA 的离子对形成能力弱于 TFA，可用于多肽质谱分析，在规避 TFA 相关问题的同时，实现高灵敏度与高分辨率的质谱检测。

结果表明，三种色谱柱搭配三种酸性改性剂时，峰容量与对称因子存在差异（图 2）。其中，采用 AdvanceBio 肽谱分析柱配合 TFA 条件时，分析结果最佳。当以 FA 作为流动相添加剂时，对称因子显著降低，难以达到高分离度，且因峰宽过大导致峰高降低。

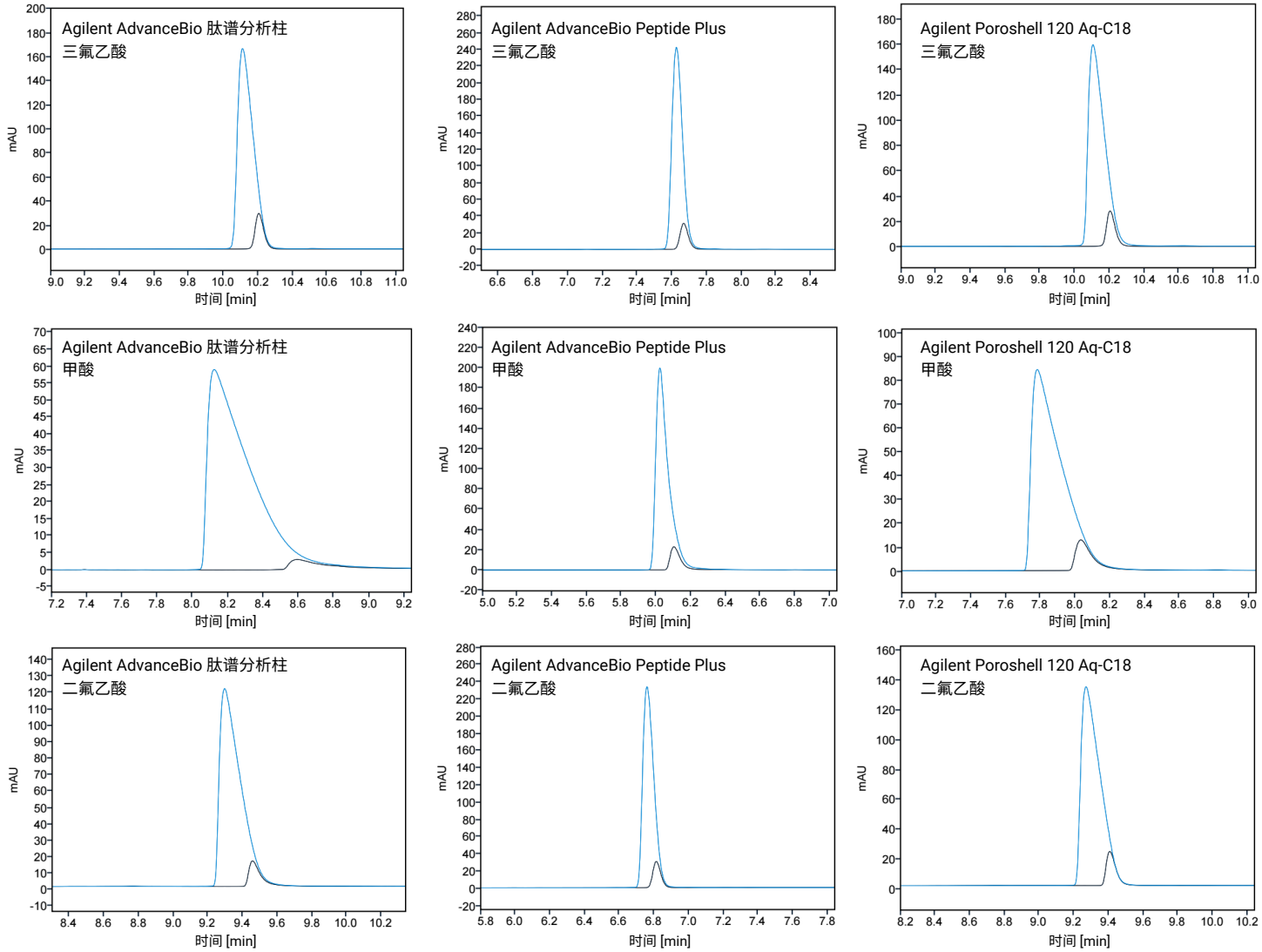


图 2. 利拉鲁肽（1 mg/mL 与 100 µg/mL）在甲酸、三氟乙酸及二氟乙酸体系下的色谱图，分别采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱、Peptide Plus 柱及 Poroshell 120 Aq-C18 柱（蓝色：1 mg/mL；黑色：100 µg/mL）

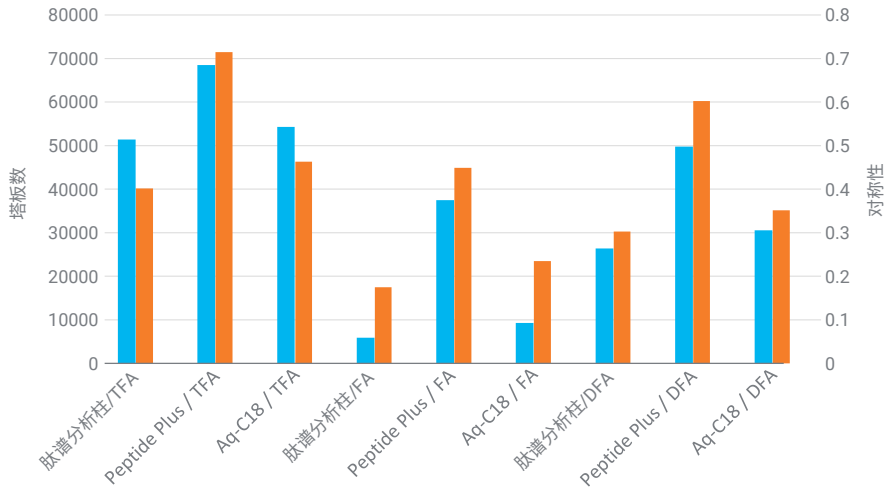


图 3. 各条件下色谱柱的塔板数及峰对称性结果（左轴，蓝色：塔板数；右轴，橙色：对称因子）

优化峰分离度的条件筛选

AdvanceBio Peptide Plus 搭配 TFA 的组合表现最佳，但其在质谱兼容性及杂质特异性方面可能存在顾虑。除峰分离度表现最差的 FA 条件外，对其余条件进行了梯度优化以提升峰分离度。AdvanceBio 肽谱分析柱与 TFA 的组合检测到的杂质最多。然而，考虑到质谱分析需求，AdvanceBio 肽谱分析柱与 DFA 的组合同样是提升峰分离度的优选方案（图 4）。

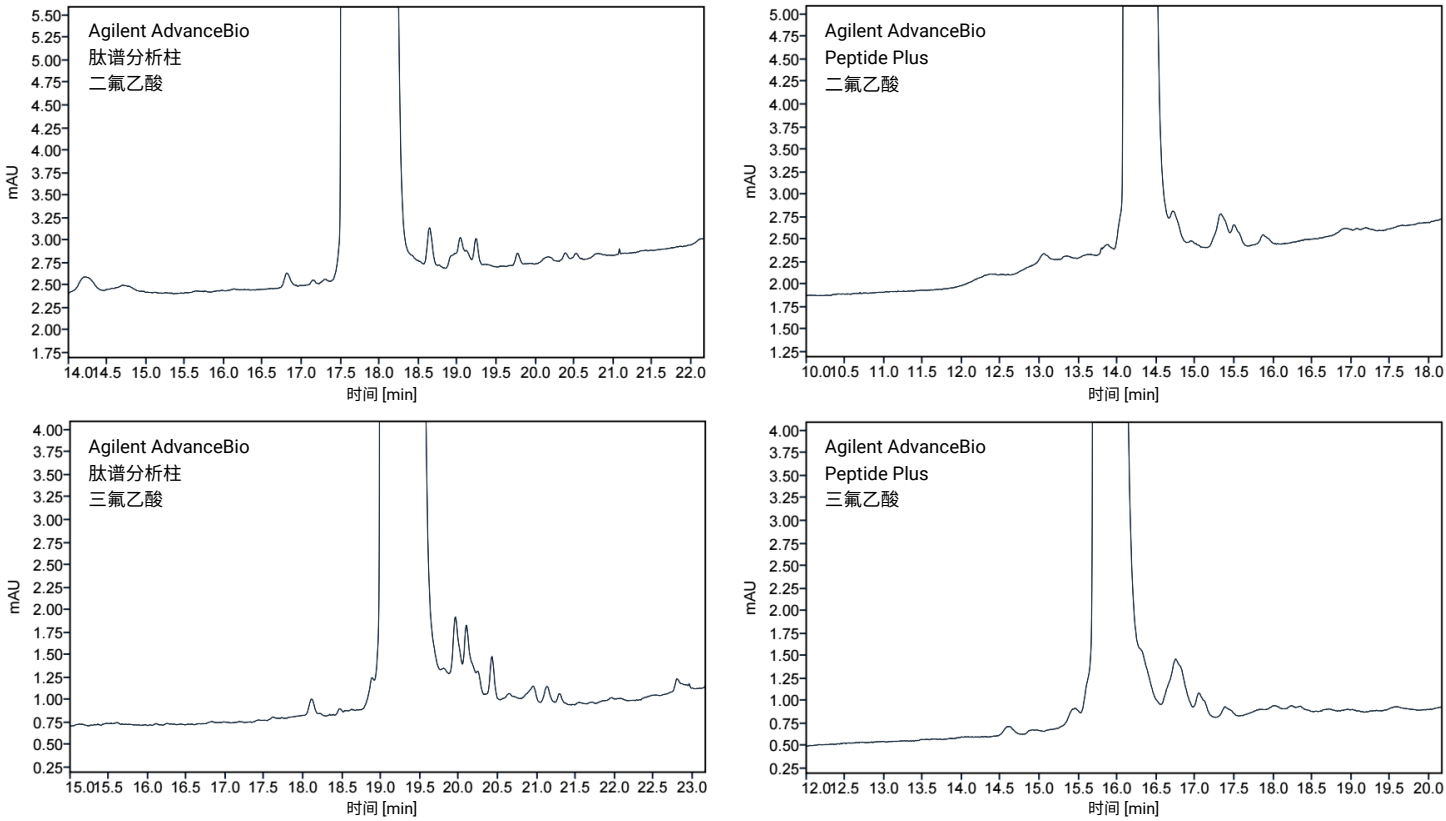


图 4. 采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱及 Peptide Plus 柱，在 DFA 与 TFA 体系下分析利拉鲁肽 (1 mg/mL) 所得色谱图

不同酸性改性剂条件下的 MS 结果

使用 AdvanceBio 肽谱分析柱比较了不同酸性改性剂的 MS 结果（图 5）。虽然 FA 的灵敏度最高，但使用 DFA 不仅具有足够的灵敏度，还能获得清晰的质谱图并实现良好的杂质分离。相比之下，TFA 条件下的 MS 灵敏度最低。上述结果证实，不同酸性改性剂不仅影响色谱峰的保留时间与特异性，还会影响质谱灵敏度。

在 10 µg/mL 浓度下进行质谱分析时，TIC 表现出显著差异（图 6）。在 DFA 条件下，观察到峰高响应为 1×10^6 的峰，而 TFA 条件下未检测到质谱峰。这表明，DFA 在维持色谱峰分离度的同时，更适用于低浓度杂质的质谱图确认。

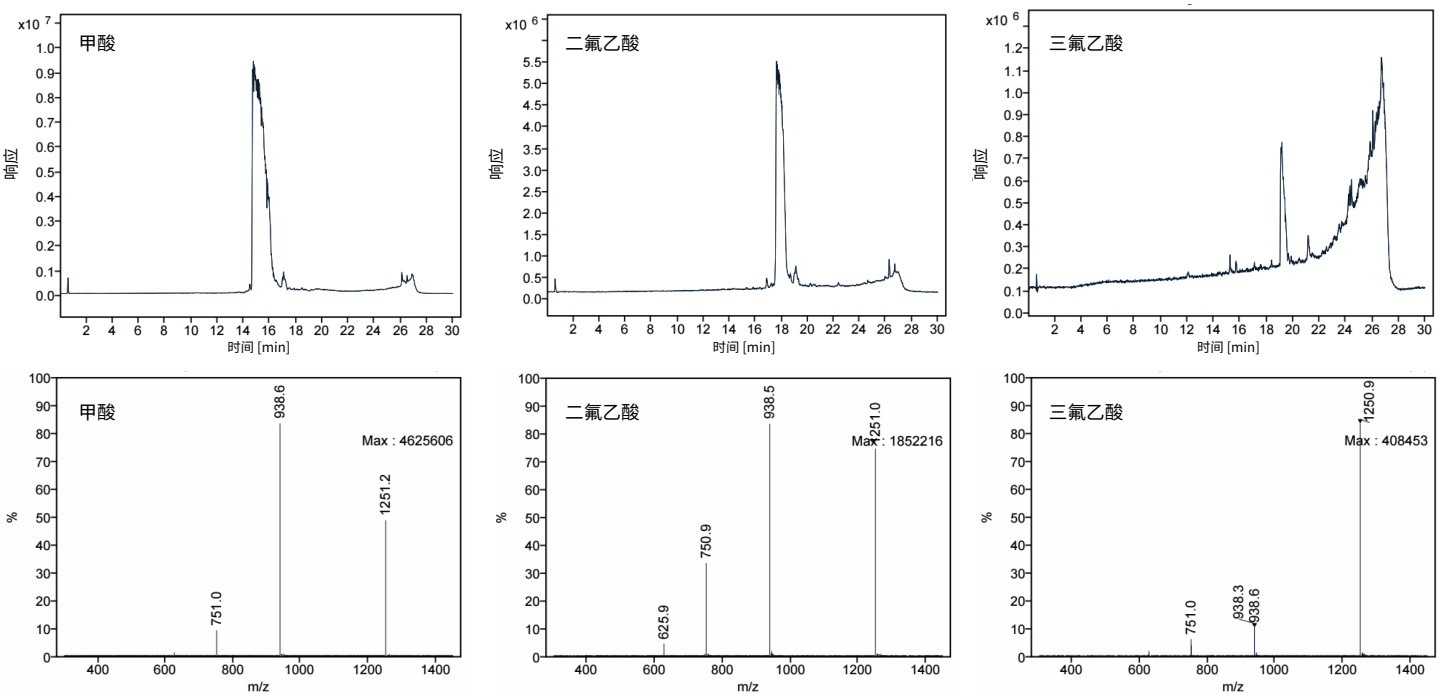


图 5. 采用 Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱及 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ，在不同酸性改性剂条件下利拉鲁肽 (1 mg/mL) 的总离子流色谱图 (TIC) 及质谱图

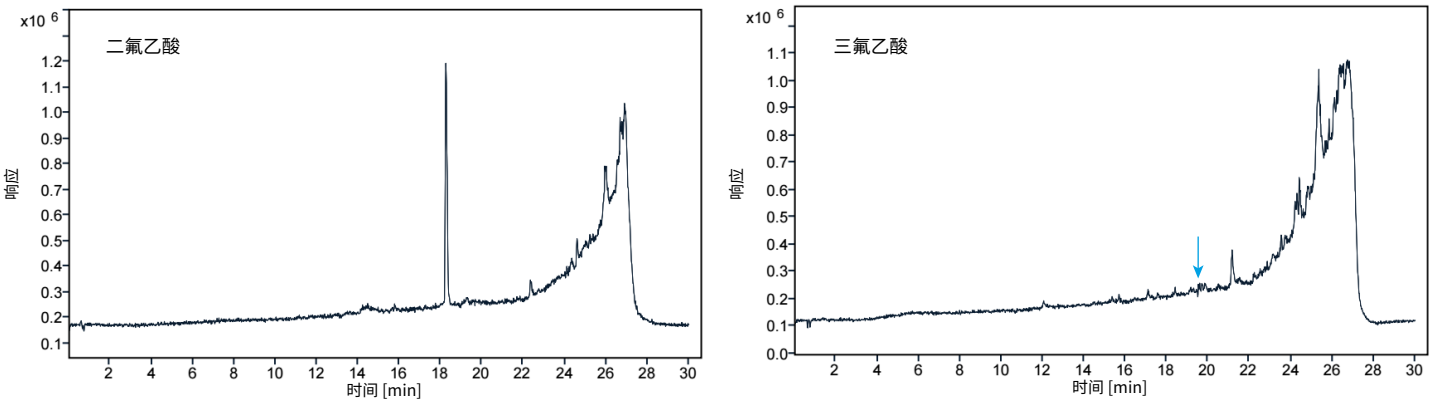


图 6. 10 µg/mL 利拉鲁肽在 DFA 与 TFA 条件下的 TICs 对比

利拉鲁肽质谱图的解卷积与确认

最终，采用 0.1% DFA 与 AdvanceBio 肽谱分析柱，在 InfinityLab LC/MSD iQ 系统上完成了利拉鲁肽的质谱图确认（图 7）。观察到 +3 至 +6 的多种电荷态，结果与利拉鲁肽理论电荷态高度吻合（表 3）。

表 3. 利拉鲁肽多电荷离子的理论值与实测值

	理论值	实测值
$[M+3H]^{3+}$	1251.3	1251.0
$[M+4H]^{4+}$	938.7	938.5
$[M+5H]^{5+}$	751.1	750.9
$[M+6H]^{6+}$	626.1	625.9

利用 OpenLab CDS 2.8 的解卷积功能对 InfinityLab LC/MSD iQ 采集的质谱图进行处理，得到分子量为 3750.23，与理论计算值 3749.95 的偏差在可接受误差范围内。

结论

采用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱与 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ，不仅简化了合成肽（如利拉鲁肽）的分析方法开发流程，还可实现无缝的确认分析。借助安捷伦全能泵与 InfinityLab Quick Change 快速更换阀，可高效筛选最佳酸性改性剂及反相色谱柱。结果表明，Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱搭配三氟乙酸在紫外检测中表现出优异性能；Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱搭配二氟乙酸则在质谱检测中展现出高特异性与高灵敏度。Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 与 OpenLab CDS 2.8 软件的解卷积功能相结合，能够准确确认利拉鲁肽的中性分子量。

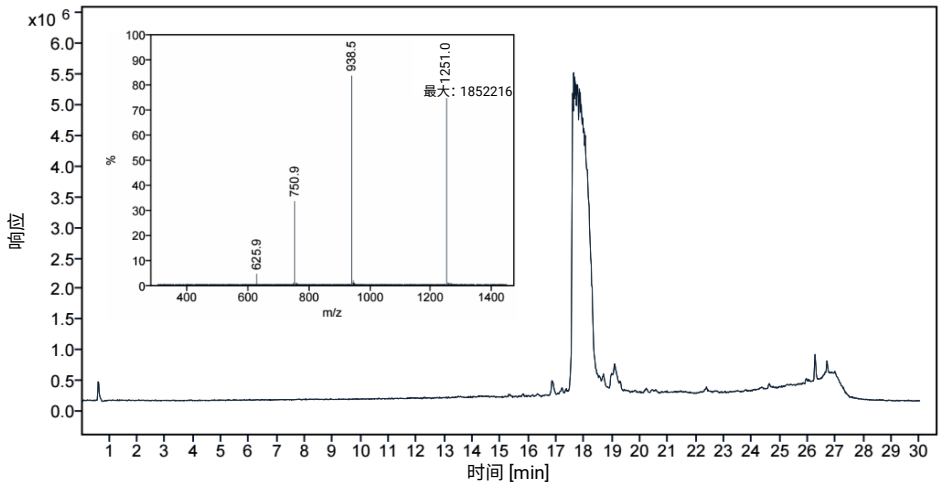


图 7. 1 mg/mL 利拉鲁肽的 TIC 及质谱图

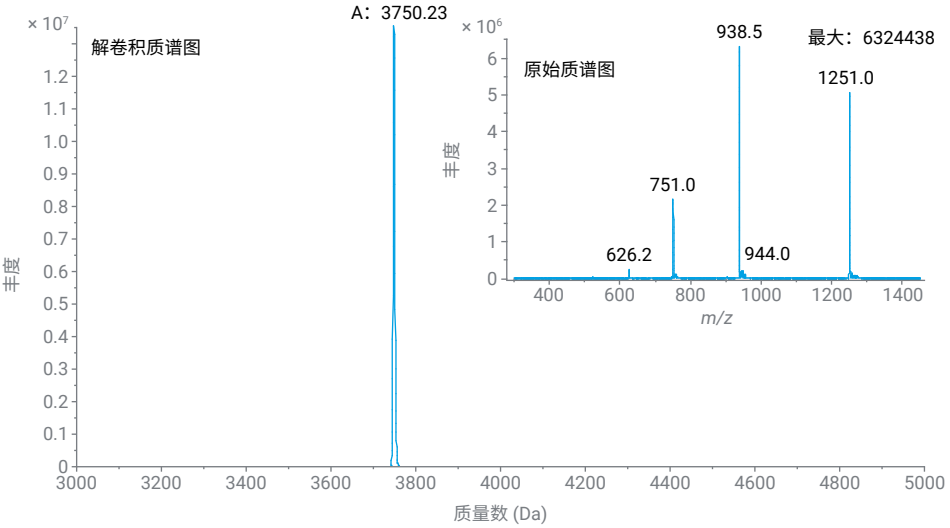


图 8. 利拉鲁肽的解卷积分析结果

参考文献

1. ANDAs for Certain Highly Purified Synthetic Peptide Drug Products That Refer to Listed Drugs for rDNA Origin, Guidance for Industry. *U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER*, **2021**
2. Guideline on the Development and Manufacture of Synthetic Peptides. *European Medicines Agency*, **2023**
3. Brian, R.; Jarod, G. Unit Mass Spectral Deconvolution for Molecular Weight Confirmation of Large Molecules（用于大分子分子量确认的单位质量谱图解卷积），*安捷伦科技公司技术概述*，出版号 5994-6928EN，**2024**
4. Benedikt, M.; Lucas, W. Simplify Your Method Development Using the Agilent 1260 Infinity II Prime LC System and InfinityLab LC/MSD iQ（使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和 InfinityLab LC/MSD iQ 简化方法开发），*安捷伦科技公司技术概述*，出版号 5994-2124EN，**2020**

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

DE51523916

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，2024

2024 年 5 月 1 日，中国出版
5994-7415ZHCN

Agilent
Trusted Answers