应用简报

生物制药

使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统和 Blend Assist 高效优化司美格鲁肽分析方法

作者

Chae-Young Ryu
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了用于司美格鲁肽纯度检测的 HPLC 方法开发，司美格鲁肽是一种用于治疗 II 型糖尿病及肥胖症的药物。本文重点探讨了作为酸性改性剂的三氟乙酸 (TFA) 的浓度对杂质峰分离效果的影响，并展示了如何利用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统的 Blend Assist 功能轻松实现方法优化。

高纯度合成肽的杂质谱较为简单，为确保等效性，对峰-峰分离度提出了较高要求。此外，一套对酸性改性剂具有高度耐受性且相互作用极小的系统，对肽段检测尤为关键。实践证明，Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱搭配 Infinity II 生物液相色谱系统，是修饰多肽分析的理想方案。

前言

随着多肽合成方法近年取得重大突破，如今氨基酸数量少于 40 个的肽链，不仅可以通过 rDNA 技术的生物来源获取，也可经由化学合成制得。相较于小分子药物，合成肽在安全性、有效性和特异性方面表现更优；而与生物制剂相比，其生产成本更低，免疫原性也更弱[1]。FDA 相关指导原则中放宽了审批标准，促使众多制药企业积极投身于合成肽的研发。

但 FDA 指南同时规定，合成肽原料药的杂质水平须不高于杂质谱已明确确认的原研药 (RLD) 的杂质水平。杂质谱的确证要求对含量超过原料药 0.5% 的杂质进行安全性论证[2]。因此，原料药纯度测试成为了保障质量的关键质量属性 (CQA)，也是优化纯化或合成工艺时的重要判定依据[3]。

为防止 DPP-4 降解司美格鲁肽，研究人员引入了修饰氨基酸（例如将第 8 位的丙氨酸替换为 α-氨基丁酸，第 28 位的赖氨酸替换为精氨酸）。此外，还在第 20 位赖氨酸上连接脂肪酸长链，使其半衰期延长至 7 天[4]。但这些修饰增加了分子的疏水性，导致其在分析条件下与液相色谱系统发生相互作用，表现为峰拖尾或峰分裂。

酸性改性剂浓度的变化会改变分析物的疏水性和离子对作用特性，进而影响方法的特异性[5]。但若采用高浓度酸性改性剂，会给色谱柱与液相系统造成苛刻的工作环境，可能降低整套分析系统的耐用性。AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱在宽 pH 范围内表现出优异的稳定性，即便在高浓度三氟乙酸 (TFA) 条件下仍能维持稳定的分析结果。AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱采用表面带电荷的改性填料颗粒，为肽段分析提供了不同的选择性。本应用简报采用配备生物兼容性流路 (MP35N) 的 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱，显著降低了系统表面的相互作用。同时，AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱在司美格鲁肽相关杂质分析中获得了理想结果。

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 1290 生物标准流速 Quick-Connect 快速连接热交换器 (G7116-60071)
- 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 (G5615-60017)

试剂

TFA 购自 Merck；乙腈购自 B&J。

样品

司美格鲁肽及 Ozempic（司美格鲁肽制剂，1 mg）由本地客户惠赠。将司美格鲁肽溶于 30% 乙腈，配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液，于 80 °C 加热一天，冷却后待测。

色谱柱

- Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 150 mm, 2.7 µm（部件号 695775-949）
- Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 250 mm, 2.7 µm（部件号 693775-949）

软件

Agilent OpenLab CDS 2.7

方法

表 1. 方法参数

参数	值
色谱柱	TFA 浓度筛选： AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 150 mm, 2.7 µm 平缓梯度条件： AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 250 mm, 2.7 µm
流速	0.4 mL/min
柱温	40 °C
进样量	5 µL（TFA 筛选），10 µL（平缓梯度）
流动相	A) 水 B) 乙腈 C) 1% TFA 水溶液 D) 1% TFA 的乙腈溶液
梯度 – TFA 浓度筛选	时间 (min) %(A + C) %(B + D) 流速 (mL/min) 0 80 20 0.6 0.5 80 20 – 15 40 60 – 20 10 90 – 22 10 90 – 22.1 80 20 – 27 80 20 0.6
梯度 – 平缓	时间 (min) %(A + C) %(B + D) 流速 (mL/min) 0 65 35 0.4 0.5 65 35 – 60 55 45 – 65 40 60 – 70 10 90 – 75 10 90 – 75.1 65 35 – 80 65 35 0.4
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）

结果与讨论

TFA 浓度筛选的 Blend Assist 方法设置

为利用 Blend Assist 筛选最佳 TFA 浓度，对流动相进行了配置，并应用了梯度时间表（图 1）。随后，对最终浓度进行调整并保存，浓度区间为 0.05% 至 0.5%。

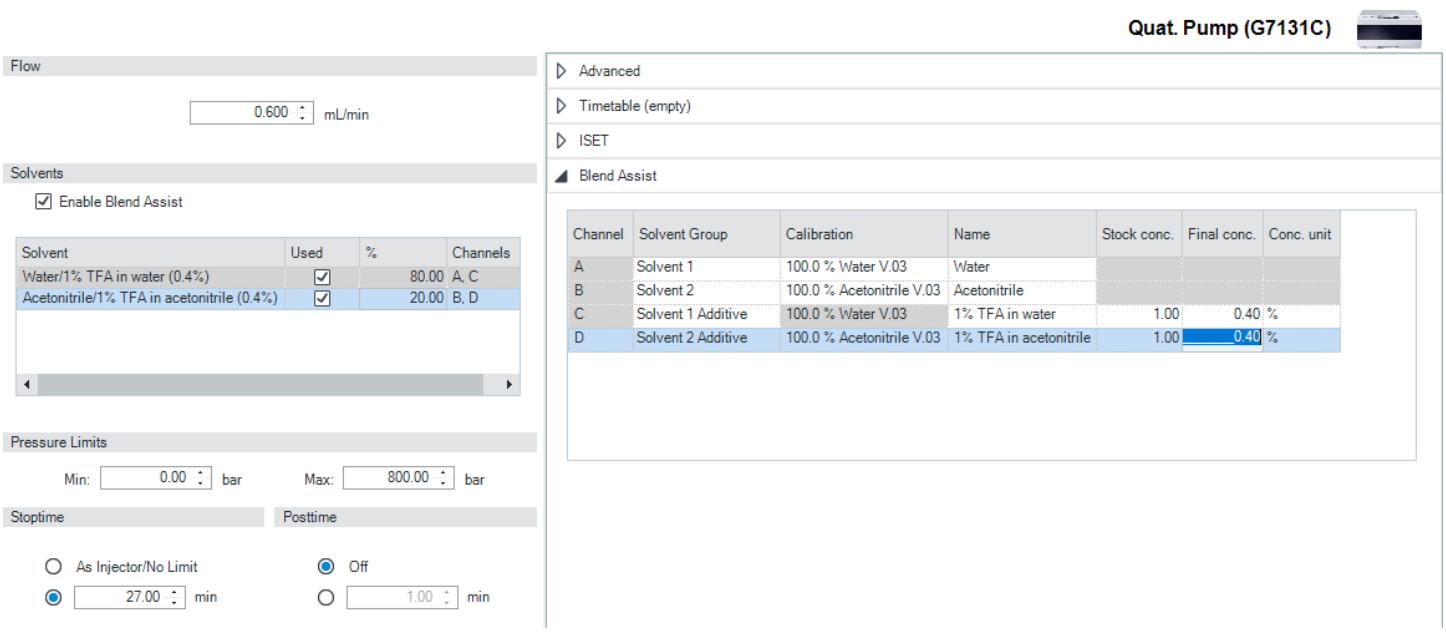


图 1. 使用 1% TFA 配制 0.4% TFA 的 Blend Assist 设置示例

不同 TFA 浓度下司美格鲁肽的杂质谱验证

借助全能泵的 Blend Assist 功能，手动调节 TFA 浓度，采集多组实验数据。多数色谱柱在高浓度 TFA 条件下出现柱效下降。然而，AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱即使在 0.5% TFA 浓度下仍表现出稳定的性能。为评估杂质分离过程中的分离度，实验采用经 80 °C 加热一天的司美格鲁肽溶液进行分析。随着 TFA 浓度从 0.05% 升高至 0.50%，可以观察到杂质峰的分离度明显提高。如图 2 所示，在 0.40% 和 0.50% TFA 条件下获得了最高分离度。基于上述两种浓度，进一步开展测试以继续提升分离度。

实现最高峰分离度

将杂质谱与 RLD 杂质谱进行对比是一项重要的 CQA。将司美格鲁肽用 30% 乙腈稀释至 1 mg/mL，并于 80 °C 加热一天，将所得样品溶液与获批上市原研药 Ozempic 进行对比分析。为确保最大分离度，将流速设置为 0.4 mL/min，并采用 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱 (2.1 × 250 mm, 2.7 µm)。1260 Infinity II 生物全能泵即使在约 0.17%/min 的平缓梯度条件下，仍表现出稳定的保留时间。尽管处于 0.4% TFA 的强酸性条件下，色谱峰形始终保持稳定。如图 3 所示，此前通过简单的 TFA 浓度筛选观察到的杂质谱，在此条件下实现了更高分离度的检测。

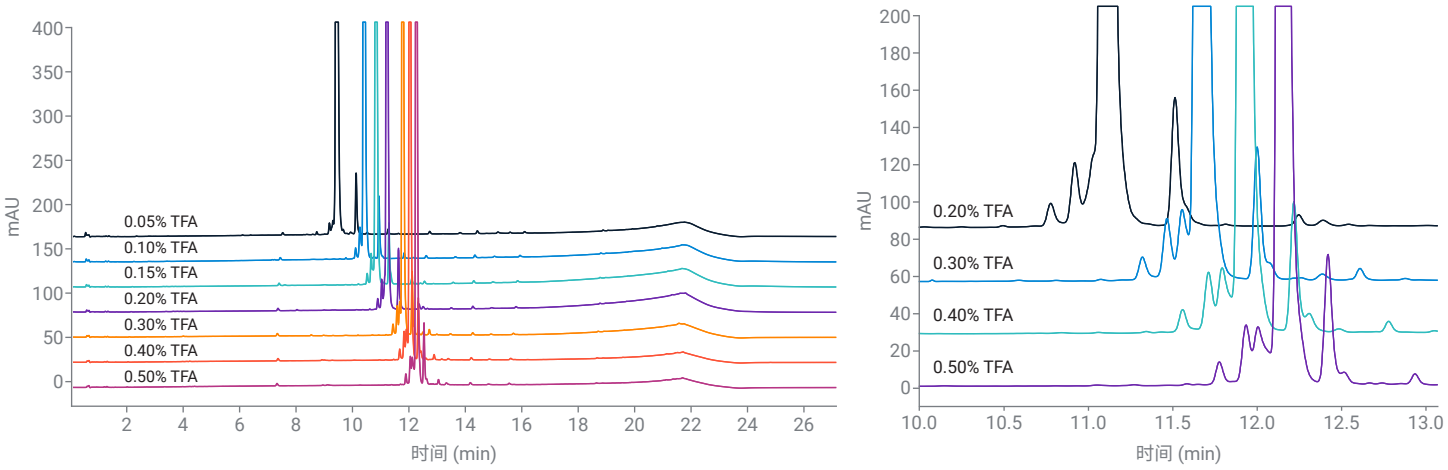


图 2. 利用 Blend Assist 将 TFA 浓度设定在 0.05%–0.50% 范围内所获得的色谱图

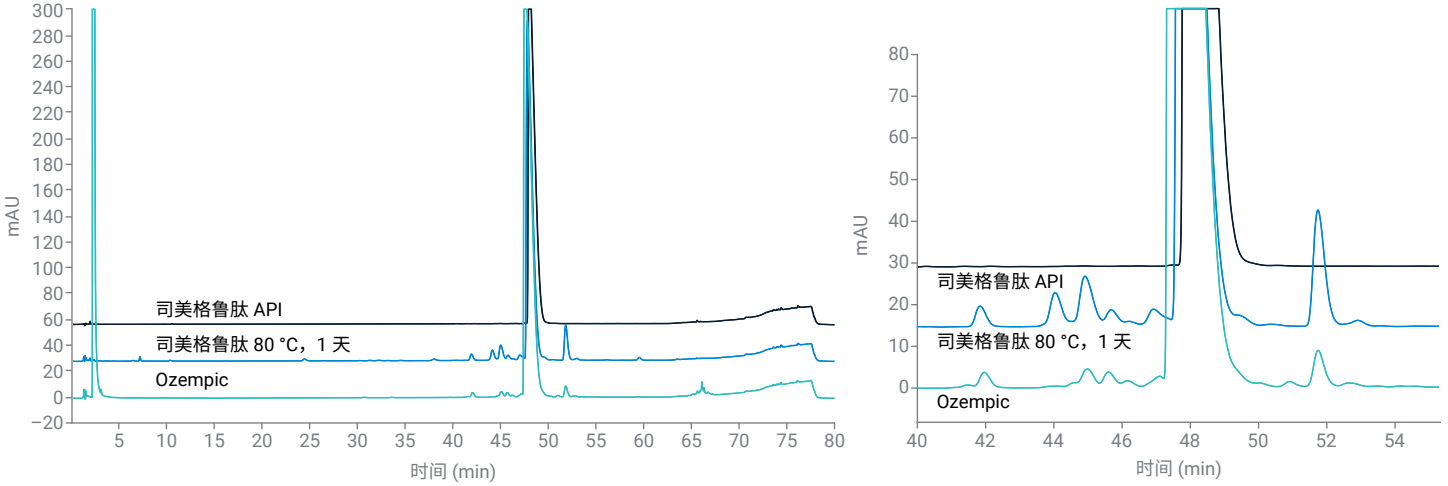


图 3. 在 0.4% TFA 条件下，使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 250 mm, 2.7 µm 色谱柱分析司美格鲁肽 API、80 °C 加热样品及 Ozempic（终浓度均为 1 mg/mL）得到的色谱图

如图 4 所示，使用 60 mm 最大光强卡套式流通池，成功检出极低浓度的杂质（低于 0.01%）。通过方法筛选，峰分离度显著提升，有助于实现更为科学的杂质谱监测和控制。

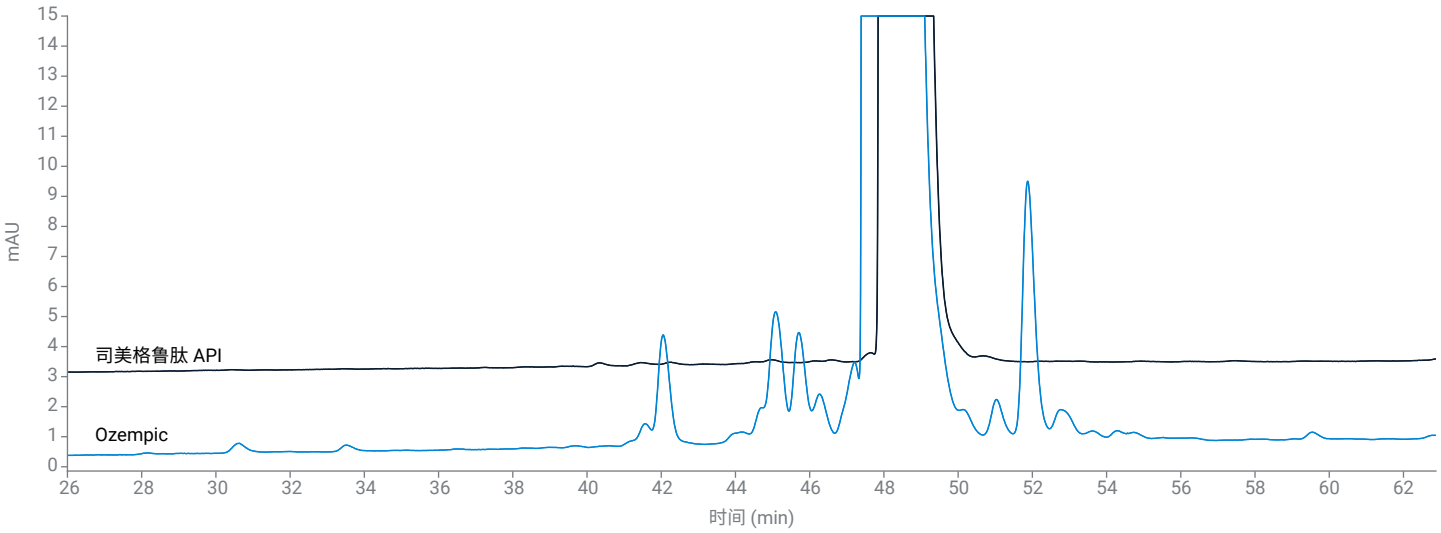


图 4. 司美格鲁肽 API 和 Ozempic 的色谱图局部放大视图

结论

由于司美格鲁肽自身化学特性，其色谱分离效果会受 LC 系统与色谱柱填料的共同影响。若需实现高分离度，需使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱，搭配稳健的 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱，同时要求系统具备稳定平缓的梯度洗脱能力。此外，经化学合成得到的治疗性多肽，其杂质种类及含量均显著低于生物法制备的多肽。然而，与小分子合成药物不同，多肽药物的杂质在理化性质上与原料药极为相似。这为在色谱分析中实现原料药与杂质之间的足够分离度提出了巨大挑战。

本应用简报介绍了利用 Blend Assist 功能自动调节酸性改性剂浓度，从而简化方法开发流程并显著提升杂质与主峰之间的分离度。文中重点展示了 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统的卓越性能，在苛刻条件下依然保持优异的稳健性与高分离度。此外，AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱即便在高浓度 TFA 条件下，仍能实现高分离度分离并保持出色的耐用性。

参考文献

1. Stefan, M. Regulatory Challenges of Nanomedicines and Their Follow-on Versions: A Generic or Similar Approach? *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, *131*, 122–131
2. 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**
3. Guideline on the Development and Manufacture of Synthetic Peptides. *European Medicines Agency* **2023**
4. Minzhi, Y.; *et al.* Battle of GLP-1 Delivery Technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, *130*, 113–130.
5. Melanie, M.; Clarissa, D. 配备 Blend Assist 的 Agilent 1260 Infinity II 全能泵，*安捷伦科技公司技术概述*，出版号 5991-9088ZHCN，**2018**

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

DE27116299

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 6 日，中国出版
5994-7414ZHCN

Agilent
Trusted Answers