应用简报

生物制药/制药

小分子 GLP-1 药物强制降解分析的色谱柱化学键合相筛选

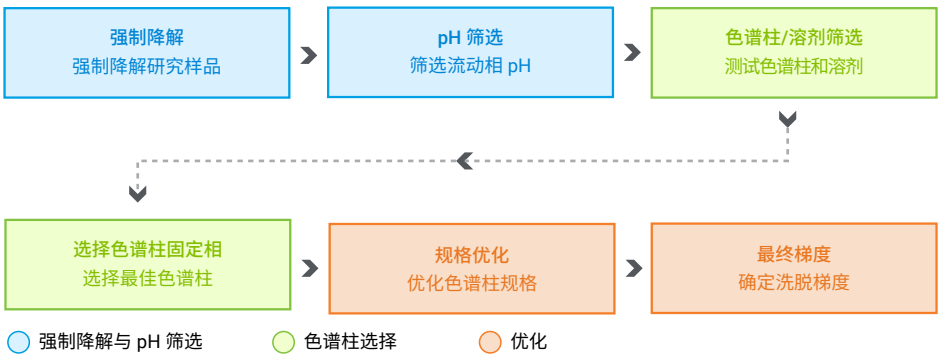
作者

Emily Parry
安捷伦科技有限公司

摘要

奥氟格列隆 (Orforglipron) 是最近获批的一款口服、非肽类胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂，相较于传统注射型肽类 GLP-1 治疗药物，这是一项重大进展。为支持杂质分析和方法开发，本研究开展强制降解试验，生成具有代表性的降解产物，用于考察色谱分离条件。采用液相色谱/质谱 (LC/MS) 开展系统性方法筛选，评估了 C18、苯基类、五氟苯基 (PFP) 和混合模式等 6 种固定相，并分别采用乙腈和甲醇作为有机流动相进行比较。根据活性药物成分 (API) 的保留、杂质分离以及检测到的杂质峰总数来评估色谱柱性能。Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱在整体选择性和杂质分离度方面表现最优。进一步采用柱长 100 mm、粒径 1.9 µm 的色谱柱，并将梯度延长至 26 分钟，显著提高了降解产物和相关杂质的分离度。最终建立的分析方法能够对奥氟格列隆及其杂质进行有效的紫外和质谱表征。

用于分离奥氟格列隆强制降解产物的系统性 LC 方法筛选



前言

GLP-1 受体激动剂是一类重要的治疗药物，主要用于治疗 2 型糖尿病和肥胖症。传统绝大多数 GLP-1 药物属于肽类药物，易被酶降解、胃肠道吸收差，口服生物利用度低，因此需要通过皮下注射给药。虽然口服司美格鲁肽证明肽类 GLP-1 药物可以实现口服给药，但需要特殊制剂工艺来克服上述给药难题。奥氟格列隆（图 1）的获批代表了该领域的重大进步，它是一种非肽类小分子 GLP-1 受体激动剂，可以口服给药，相比注射制剂，有望提升用药便捷性，改善患者用药可及性。

随着这款新型治疗药物问世，对潜在杂质进行表征和监测对于确保产品质量和安全至关重要。强制降解试验通过生成药物在生产、储存、使用过程中可能形成的降解产物，有助于深入了解活性药物成分 (API) 的稳定性特征。得到的降解混合物可用于考察色谱方法，确保 API 与相关杂质和降解产物充分分离。本研究采用系统性 LC/MS 方法筛选策略，开发奥氟格列隆杂质分析方法。评估了六种具有不同选择性机制的固定相，包括反相、芳香选择性和混合模式固定相，并在此基础上筛选和优化最终色谱方法。

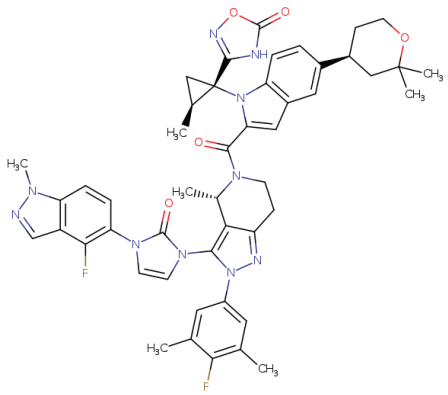


图 1. 奥氟格列隆结构

实验部分

化学品

奥氟格列隆购自 Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan)。LC/MS 级氢氧化铵和甲酸购自 Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri)。InfinityLab LC/MS 级水、乙腈和甲醇用作样品溶剂和流动相组分。

仪器

将 Agilent 1290 Infinity II 二元泵 (G7120B) 搭配外部阀驱动和 13 通溶剂切换阀 (G4235A)，以便于流动相筛选。使用 Agilent Multisampler (G7167B) 将样品引入配备 8 色谱柱切换阀 (G4239C) 的高容量柱温箱 (G7116B) 中。采用二极管阵列检测器进行杂质检测，配置参见表 1。随后将洗脱液导向 Agilent InfinityLab LC/MSD Pro iQ 进行质谱检测。MS 运行参数见表 2。使用 Agilent OpenLab CDS 2.8 版进行采集和数据分析。

表 1. DAD 设置

DAD	
参数	**设置**
信号	254 nm
带宽	4
数据采集速率	40 Hz
光谱	190–400 nm
步长	2 nm

表 2. MS 设置

IQ Pro	
参数	**设置**
气体温度	325 °C
气体流量	11 L/min
雾化器	30 psi
毛细管电压	3500 V
采集模式	
扫描 (+)	70–1000 *m/z*
SIM (+)	883.4 *m/z*

样品前处理和强制降解

将 10 mg 奥氟格列隆溶于 4 mL 乙腈:水 (60:40, v/v) 中，超声处理直至完全溶解。取 900 µL 该溶液分装至三个独立样品瓶中，开展强制降解研究。分别加入 100 µL 1 M 盐酸（酸降解）、100 µL 1 M 氢氧化钠（碱降解）、100 µL 30% 过氧化氢（氧化降解）来诱导降解。

酸降解和碱降解样品在 70 °C 下加热 2 小时，氧化降解样品在 70 °C 下加热 1 小时。温育结束后，将三份降解样品混合，终止进一步降解反应。将所得混合物转移至 HPLC 样品瓶中进行分析。

同时制备并分析了溶剂空白和未降解的奥氟格列隆参考样品，以用于比较。

方法筛选

在 OpenLab 中，可以通过修改序列面板来实现方法参数的自动更改。可以向序列添加一系列方法覆盖列，从而覆盖特定的方法设置（图 2）。例如，安装 8 柱选择阀时，通过在工作列表中切换阀位，并在样品分析前运行简短的平衡方法，即可使用同一方法评估不同的色谱柱固定相。其他可用于方法覆盖的参数包括柱温、初始梯度组成和流速。

选择六根色谱柱进行测试，均为 2.1 × 50 mm, 2.7 µm 粒径，详见表 3。

表 3. 参与评估的安捷伦 HPLC 色谱柱

化学键合相 (2.1 × 50 mm, 2.7 µm)	部件号
InfinityLab Poroshell HPH-C18	699775-702
InfinityLab Poroshell 120 CS-C18	699775-942
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18	699775-902
InfinityLab Poroshell 120 PFP	699775-408
InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl	699775-912
Altura Poroshell 120 PFAS	227205-007
其他规格	
InfinityLab Poroshell EC-C18, 2.1 × 100, 2.7 µm	695775-902
InfinityLab Poroshell EC-C18, 2.1 × 100, 1.9 µm	695675-902

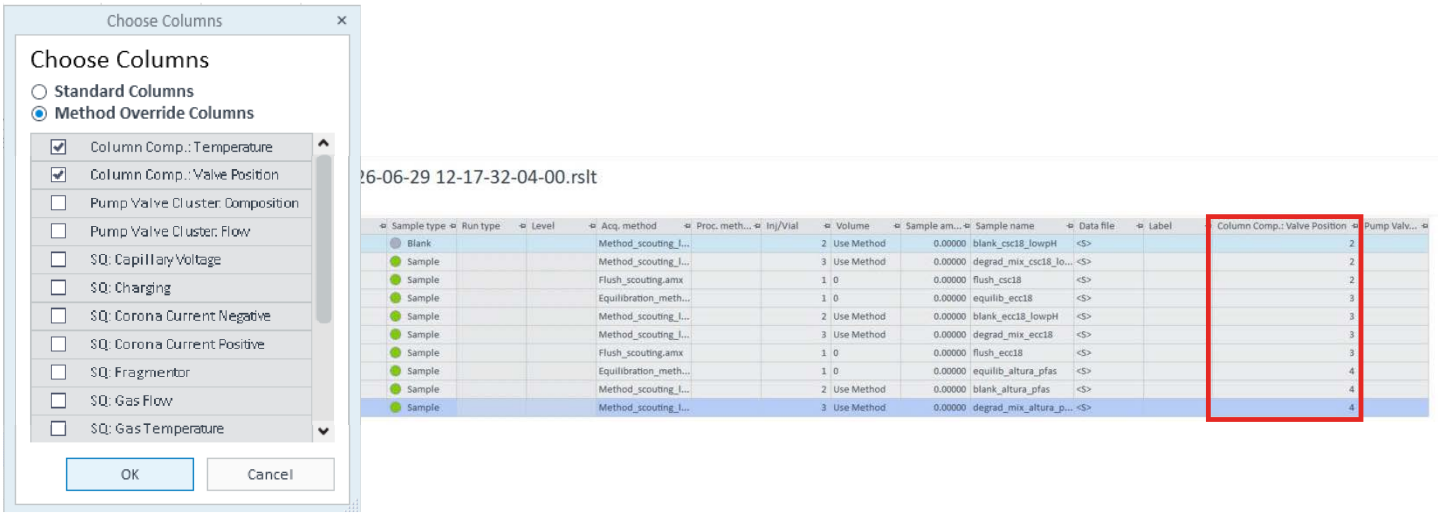


图 2. 序列面板中提供的 OpenLab 方法覆盖列

结果与讨论

方法筛选结果

初始 pH 筛选使用 Poroshell HPH-C18 色谱柱，因为该色谱柱适用于较宽的 pH 范围。水相流动相为 0.1% 甲酸水溶液或 10 mM 氢氧化铵水溶液，有机相为含相应改性剂的乙腈。结果显示低 pH 条件下保留效果更好（见图 3），后续配制含 0.1% 甲酸、以甲醇为有机相的流动相，并通过切换 12 通溶剂选择阀将其纳入自动化测试流程。

初始筛选梯度中，API 和所有杂质在高有机溶剂比例下在 1 分钟窗口内洗脱。色谱峰下方基线抬升，表明存在明显的共洗脱现象。为了更有效地评估不同的色谱柱化学键合相，开发了一种从高比例有机溶剂开始的平缓梯度（图 4），并用于测试其他色谱柱。

之所以选择 Poroshell EC-C18，是因为其表面和键合相特性与 Poroshell HPH-C18 不同，因此可为奥氟格列隆及其降解产物提供互补的保留性和选择性。之所以选择 Poroshell CS-C18 色谱柱，是因为其不同的 C18 选择性有望改善杂质分离；而选择 Poroshell PFP 固定相，是因为它对芳香族化合物（如奥氟格列隆）具有独特的选择性。Poroshell Altura PFAS 色谱柱的混合模式保留机制提供了不同于传统反相相互作用的选择性，因此可能更有利于分离传统 C18 固定相无法充分分离的杂质。

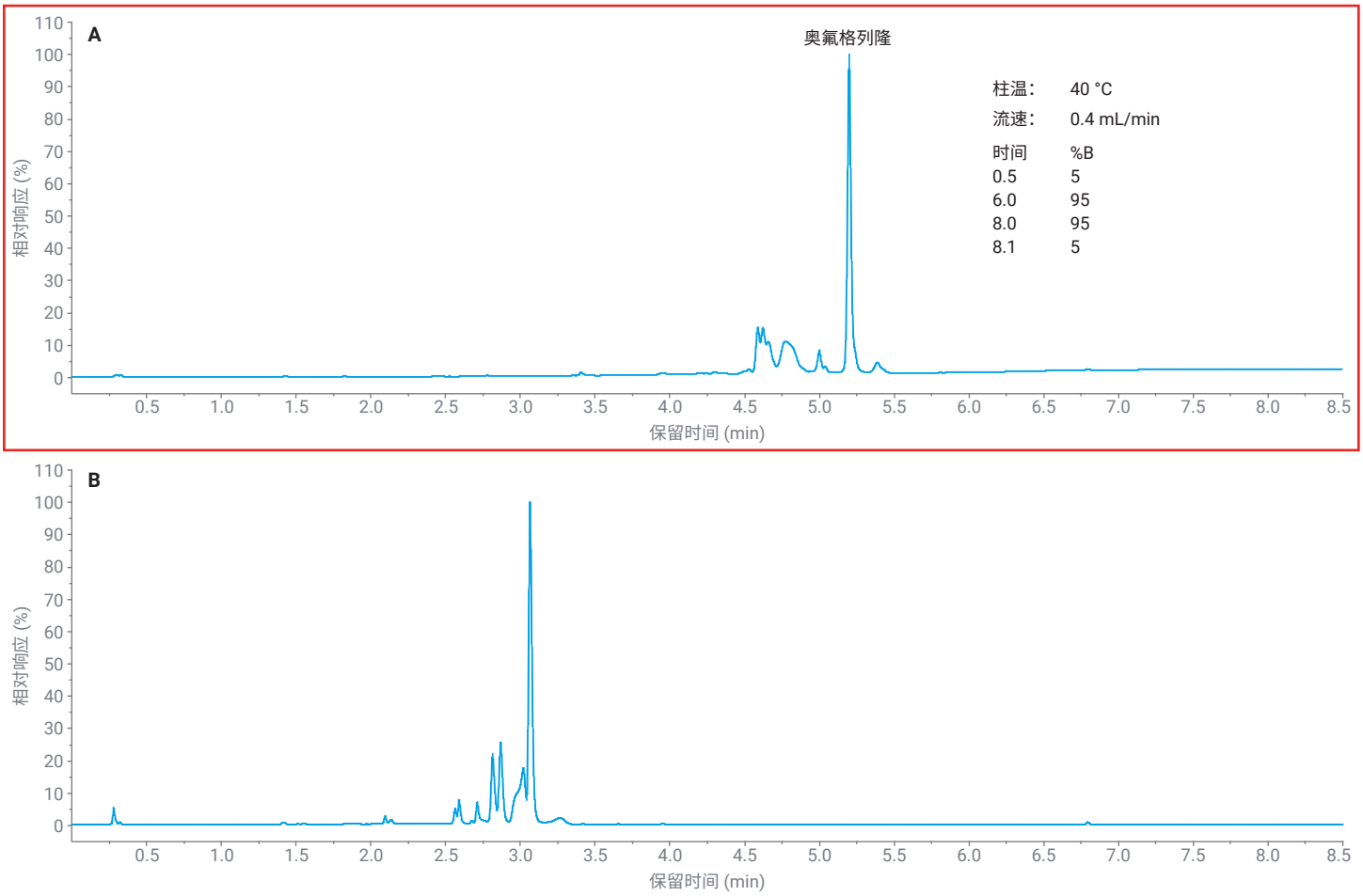


图 3. 使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱获得的降解混合物色谱图：(A) 甲酸梯度 (B) 氢氧化铵梯度

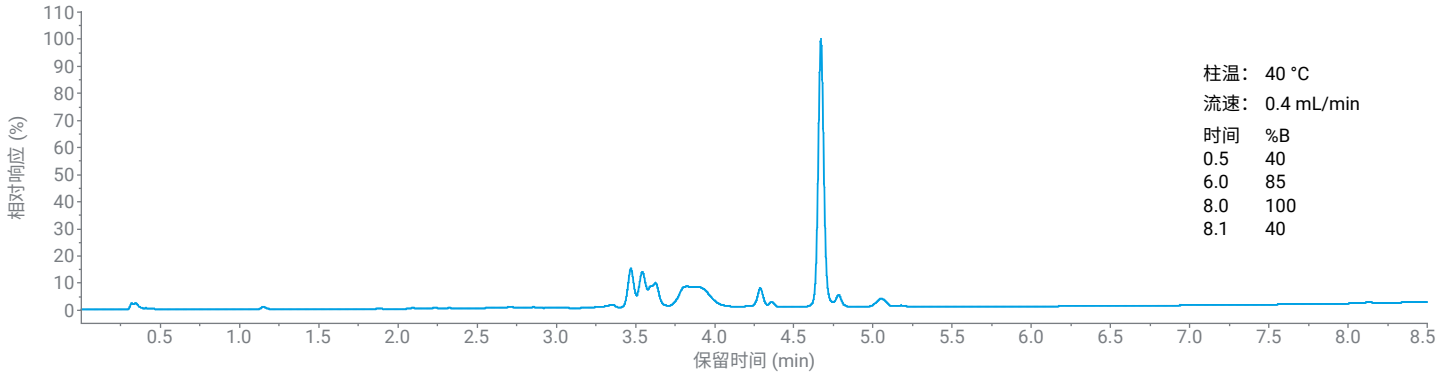


图 4. 使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱和低 pH 聚焦筛选梯度获得的降解混合物色谱图

图 5 展示了选定固定相的色谱图。使用三个主要指标评估色谱柱性能：API 与杂质的分离度、API 保留以及检测到的杂质峰总数。根据这些标准，Poroshell EC-C18 色谱柱综合性能最优。

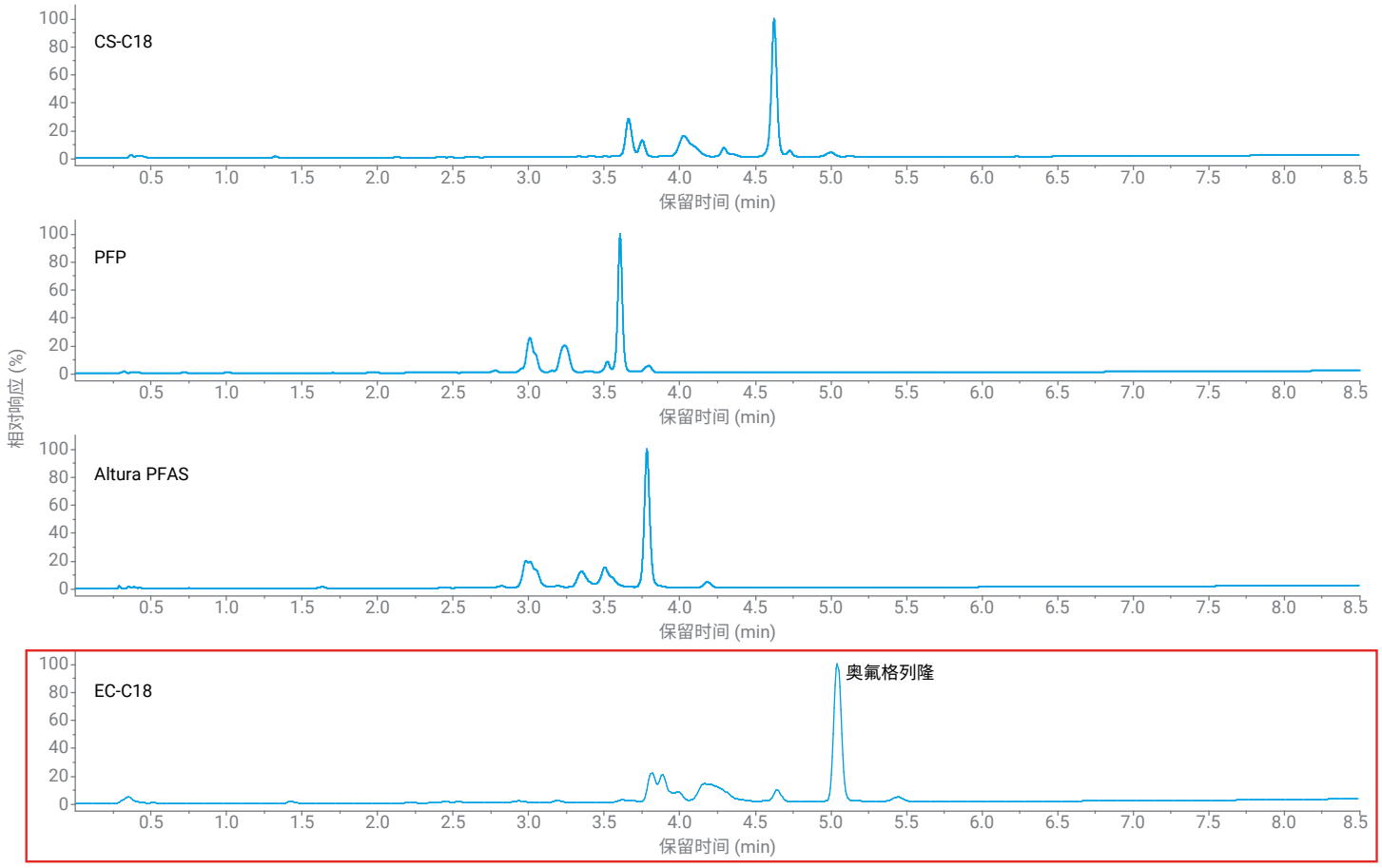


图 5. 降解混合物色谱图

所有色谱柱均分别使用乙腈和甲醇作为有机改性剂进行评估。在大多数情况下，乙腈表现出更优异的性能，API 和杂质峰之间分离度更高。唯一的例外是 PhenylHexyl 柱。图 6 比较了使用 (A) 乙腈和 (B) 甲醇在 PhenylHexyl 柱上的分离效果。之所以纳入这种固定相，是因为它可以通过与奥氟格列隆等芳香性较强的化合物发生 π-π 相互作用提供独特的选择性。已知甲醇相比乙腈会改变 PhenylHexyl 固定相的选择性，在本研究中，使用甲醇获得了更好的杂质分离效果。但无论是乙腈还是甲醇条件，PhenylHexyl 色谱柱在杂质与 API 的分离效果及检出杂质峰总数方面，均不及 Poroshell EC-C18 色谱柱。

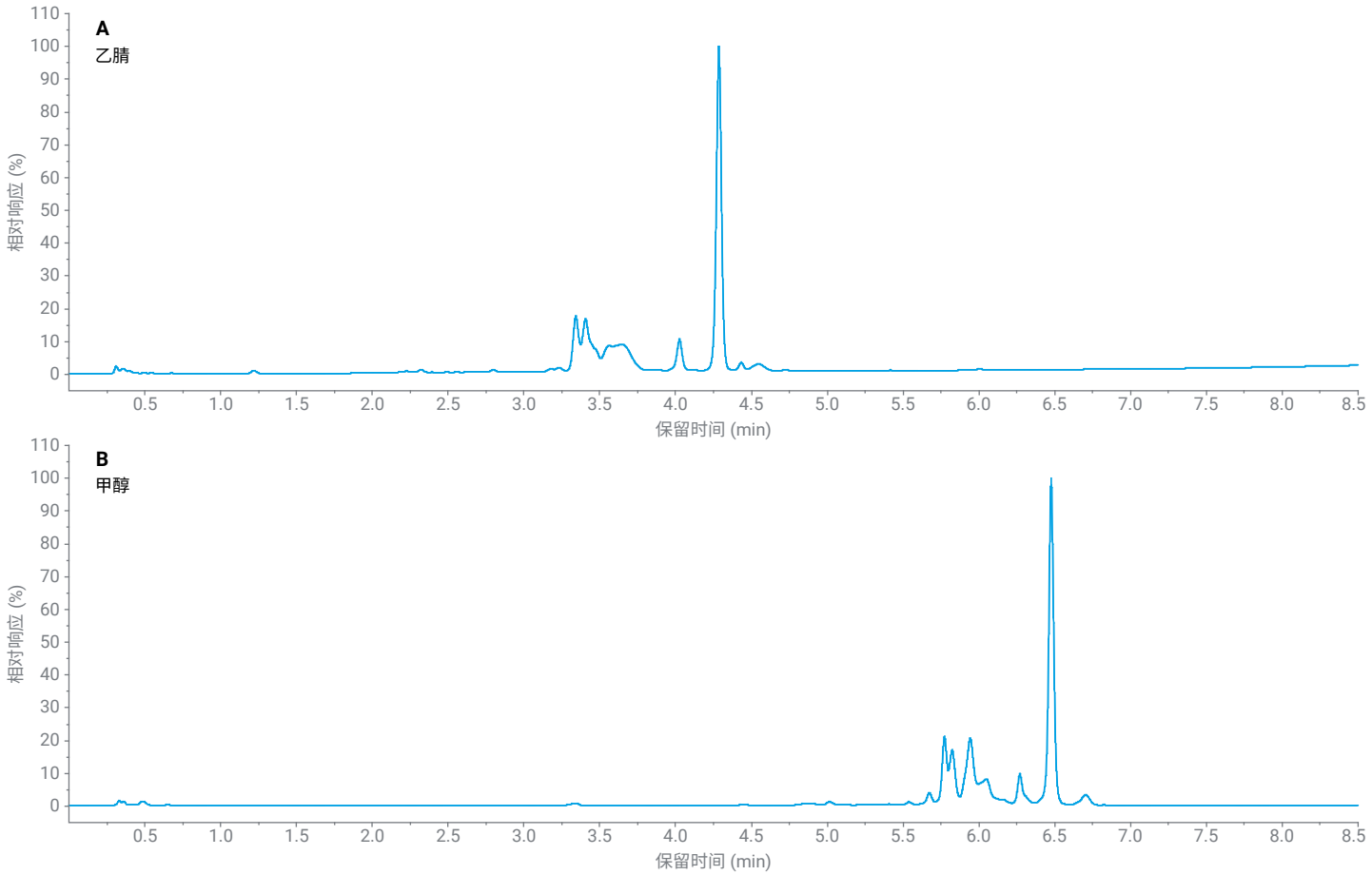


图 6. 使用 Agilent Poroshell PhenylHexyl 色谱柱获得的降解混合物色谱图，有机流动相为 (A) 乙腈和 (B) 甲醇

Poroshell EC-C18 分离优化

提高杂质分离度的另一种方法是增加柱长。因此，进一步评估了初步筛选确定的 Poroshell EC-C18 固定相，采用柱长 100 mm、粒径分别为 2.7 和 1.9 µm 的色谱柱，并使用 8.5 分钟梯度。100 mm × 1.9 µm 色谱柱整体分离效果最好，因此选择该柱进一步开发方法。此外，API 质谱图可在 *m/z* 883.4 处观察到清晰的质子化分子离子峰，在 *m/z* 797.3 处观察到由中性丢失产生的源内碎片离子峰（图 7）。

尽管 8.5 分钟的梯度实现了主要杂质与 API 的基线分离，但仍有多个杂质峰仅部分分离。为了进一步提高分离度，开发了一种更长且充分优化的梯度。

最终方法采用 26 分钟梯度，显著改善了杂质分离，并实现了对杂质谱的更完整表征（表 4）。要实现杂质的完全分离，需要采用平缓的初始梯度。使用优化方法获得的代表性 UV 和 MS 色谱图如图 8 所示。更长的梯度提高了分离度，从而能够更好地检测和表征各个杂质峰，同时保持可接受的 API 峰形和保留行为。

表 4. 用于奥氟格列隆杂质分析的最终优化液相色谱方法

参数	最终条件
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18
规格	2.1 × 100 mm, 1.9 µm
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈
流速	0.5 mL/min
柱温	40 °C
进样量	1 µL
梯度程序	时间 (min) %B 0.5 40 16 52 18.4 70 24 100

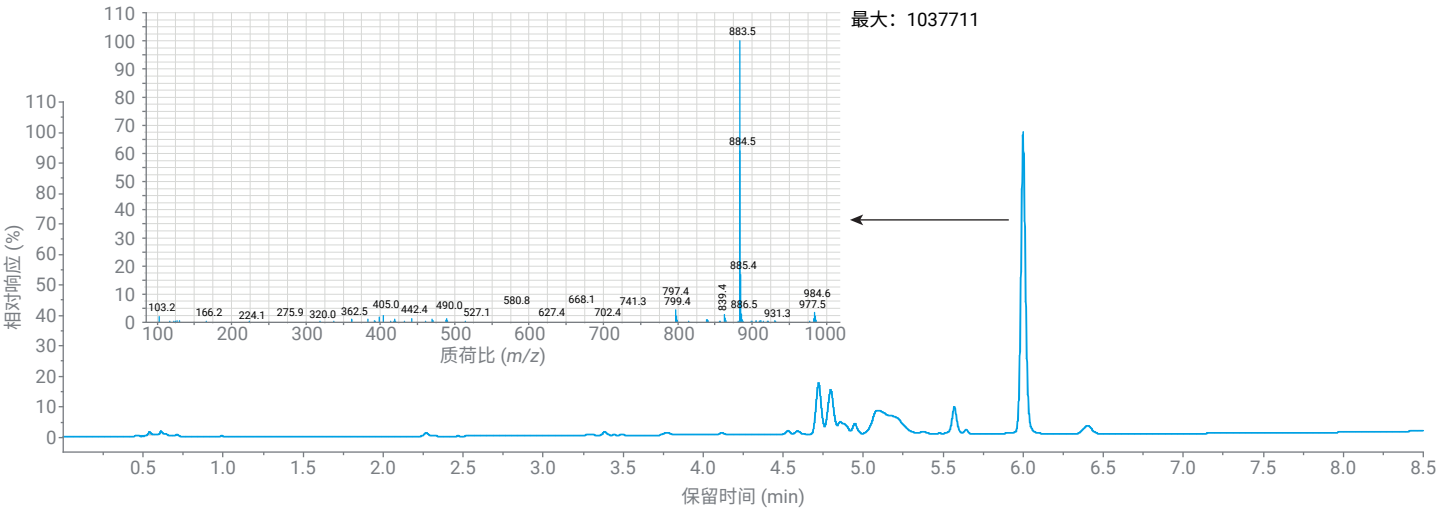
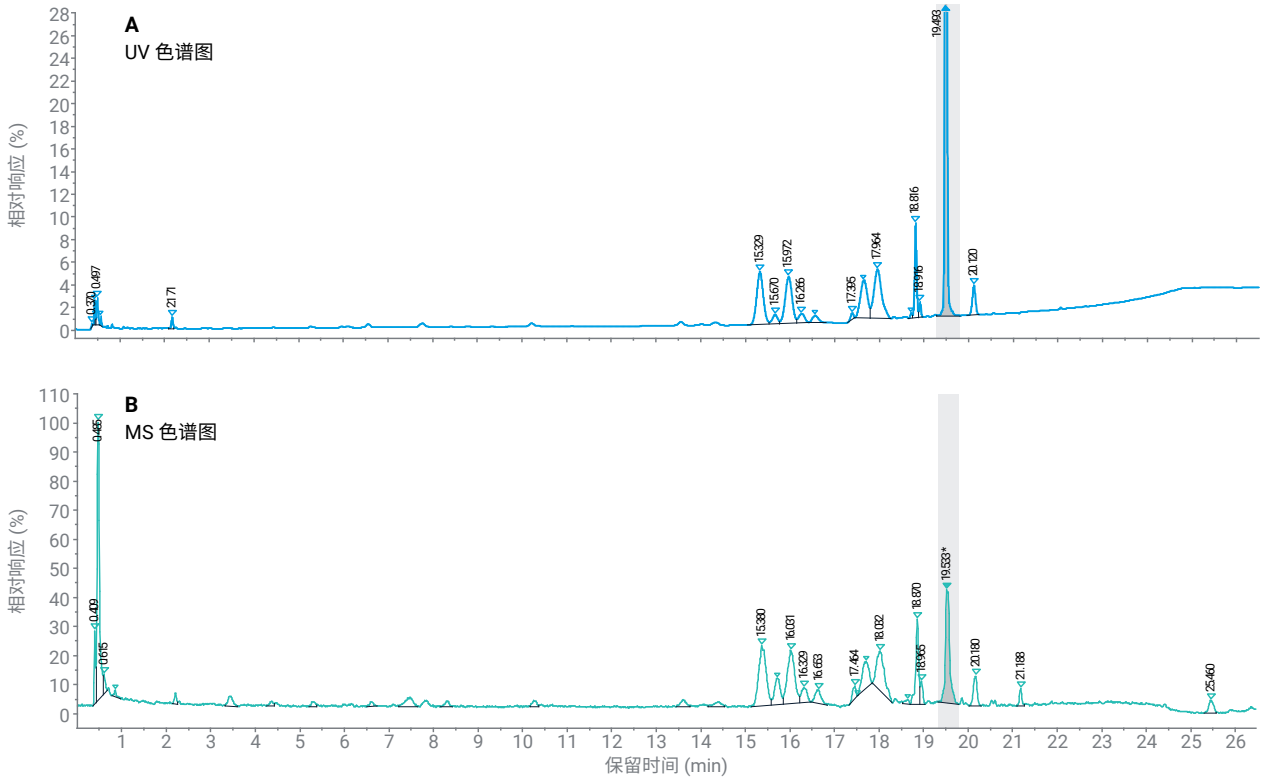


图 7. 使用 Agilent EC-C18 2.1 × 100 mm, 1.9 µm 色谱柱和 8.5 分钟梯度获得的降解混合物 UV 色谱图，以及 API 峰的 MS 谱图



RT	*m/z*
0.496	130.1
15.329	917.4
15.670	696.3
15.972	917.4
16.266	917.4
16.568	917.4
17.395	859.5
17.657	951.4
17.964	951.4
18.816	887.4
18.916	887.4
19.493	883.4
20.120	917.5

图 8. 使用 Agilent Poroshell EC-C18 色谱柱的最终梯度得到的降解混合物的 (A) UV 色谱图和 (B) MS 色谱图，以及所有峰 *m/z* 的 MS 数据表

结论

色谱柱筛选结果表明，在评估的所有固定相中，Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 最适合奥氟格列隆杂质谱分析，具备优异的 API 保留、杂质分离以及杂质峰检出能力。绝大多数条件下乙腈的分离效果优于甲醇，但对于 Agilent InfinityLab Poroshell 120 PhenylHexyl 色谱柱，甲醇可以改善选择性。

进一步优化表明，增加柱长和减小粒径可以提高分离度，其中填装 1.9 µm 填料的 100 mm Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱综合性能最优。8.5 分钟的梯度能够将主要杂质与 API 分离，将梯度延长至 26 分钟进一步提高了各杂质的分离度。最终的方法能够对奥氟格列隆及其杂质实现有效的 UV 和 MS 分析，并可检测 *m/z* 883.4 处的质子化分子离子，因此被选为杂质分析的首选方法。

www.agilent.com

DE-017712

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，2026

2026 年 10 月 8 日，中国出版
5994-9501ZHCN

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

Agilent
Trusted Answers