

提升多肽表征和稳定性评估能力

利用 Agilent Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计
进行紫外-可见二阶导数光谱分析

作者

Suresh Babu C. V.
安捷伦科技有限公司

摘要

监测多肽治疗药物的稳定性对于生物药物研发至关重要。但稳定性研究中常用的传统紫外-可见 (UV-Vis) 吸收光谱技术往往无法提供足够的波长分辨率，尤其对于蛋白质和 DNA 这类通常具有宽吸收峰的生物分子而言更是如此。这种局限性导致难以检测细微的结构变化，特别是在光谱特征发生重叠的情况下。本应用简报介绍了使用 Agilent Cary 3500 多池紫外-可见光分光光度计进行紫外-可见二阶导数光谱分析，在改进多肽表征和稳定性评估方面的优势。Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计具有多池同步测量和内置导数计算等先进功能，可简化数据采集和分析流程，使其成为生物制药应用中多肽稳定性研究的宝贵工具。

前言

合成多肽是一类日益增长的生物治疗药物。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 激动剂是一类模拟天然 GLP-1 激素的合成多肽，在代谢调节方面发挥着重要作用，既能促进胰岛素分泌，又有助于减重^[1]。由于 GLP-1 分子易受多种降解途径影响，因此评估 GLP-1 型治疗药物的质量和稳定性对于确保其有效性至关重要。

目前，多采用紫外光谱来检测多肽吸收光谱的变化，从而监测其稳定性^[2]。这种非破坏性检测技术为工作流程带来了显著优势：例如，珍贵样品在分析后仍保持完整，可继续用于液质联用等互补技术分析。此外，紫外-可见光谱检测速度快、操作简单，便于各种技能水平和专业背景的用户使用。

然而，在监测生物分子因氧化应激等环境因素引起的微小变化时（例如吸收峰位置轻微偏移或强度轻微变化），传统的紫外-可见吸收光谱数据往往难以解析。此外，当生物分子光谱包含多个重叠组分时，谱峰难以分辨也是分析的一大挑战。导数光谱技术通过增强细微光谱特征，能够有效分辨传统吸收光谱中难以区分的重叠峰，从而克服这些局限性。

Agilent 3500 多池紫外-可见分光光度计配备多池模块，结合二阶导数测量功能，为生物分子分析提供了强大工具。该仪器可在相同条件下同时测量多个样品，包括标准品、样品和对照。用于控制 Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计的 Agilent Cary UV Workstation 软件内置方程计算功能，在完成吸光度测量后可自动生成二阶导数光谱，以尽可能减少计算误差并实现高效数据处理。

本应用简报展示了如何使用 Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计的先进功能，结合紫外-可见二阶导数光谱技术，有效提升多肽和芳香族氨基酸重叠吸收峰的分辨率。

实验部分

材料

色氨酸 (W)、酪氨酸 (Y)、苯丙氨酸 (F)、α-促黑素细胞激素 (MSH)、蜂毒肽、利拉鲁肽、血管紧张素 II、30% (v/v) 过氧化氢 (H₂O₂) 和磷酸钠均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

样品前处理

所有多肽样品，包括色氨酸 (0.15 mM)、酪氨酸 (0.5 mM) 和苯丙氨酸 (4.0 mM) 均用磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 配制，浓度为 1 mg/mL。为模拟应激条件，将多肽样品与 0.07% H₂O₂ 在室温下孵育过夜。在紫外-可见分析之前无需再进行其他样品前处理。

仪器

使用配置 Cary Workstation 软件的 Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计，按表 1 所列参数采集数据。多池设计支持同时测量最多 7 个样品及 1 个参比样品。使用光程 10 mm 的超微量矩形比色皿（安捷伦部件号 5062-2496）进行测量。最终的光谱由多次测量 (n = 5) 进行平均处理得到，以确保重现性并降低噪声干扰。

表 1. Agilent Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计方法参数

参数	设定值
采集模式	Scan
扫描范围	200–500 nm
信号平均时间	0.02 s
数据间隔	1.00 nm
扫描速率	3000 nm/min
光谱带宽	2.00 nm
导数	二阶导数
平滑滤波器	9

结果与讨论

芳香族氨基酸的紫外-可见光谱

色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸是多肽和蛋白质中常见的芳香族氨基酸，具有特征性紫外-可见吸收图谱。图 1A 为色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸的零阶紫外-可见光谱。在零阶光谱中，吸收峰相互重叠，难以区分氨基酸中细微的光谱特征。

为提高吸收光谱的分辨率和准确性，我们采用 Savitzky-Golay 方法分析了二阶导数光谱。图 1B、1C 和 1D 分别为酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的二阶导数紫外-可见光谱。样品测量完成

后，使用 Cary UV Workstation 软件内置的计算功能自动生成二阶光谱。二阶导数光谱会显示波峰和波谷（拐点），可用于区分各种芳香族氨基酸的不同光谱吸收带，从而可以研究生物分子在应激条件下发生的微小光谱变化。各氨基酸的最大吸收波长分别为：

- **色氨酸**：最大吸收波长约为 273、280 和 288 nm
- **酪氨酸**：最大吸收波长约为 275 和 282 nm
- **苯丙氨酸**：最大吸收波长约为 246、252、257、264 和 268 nm

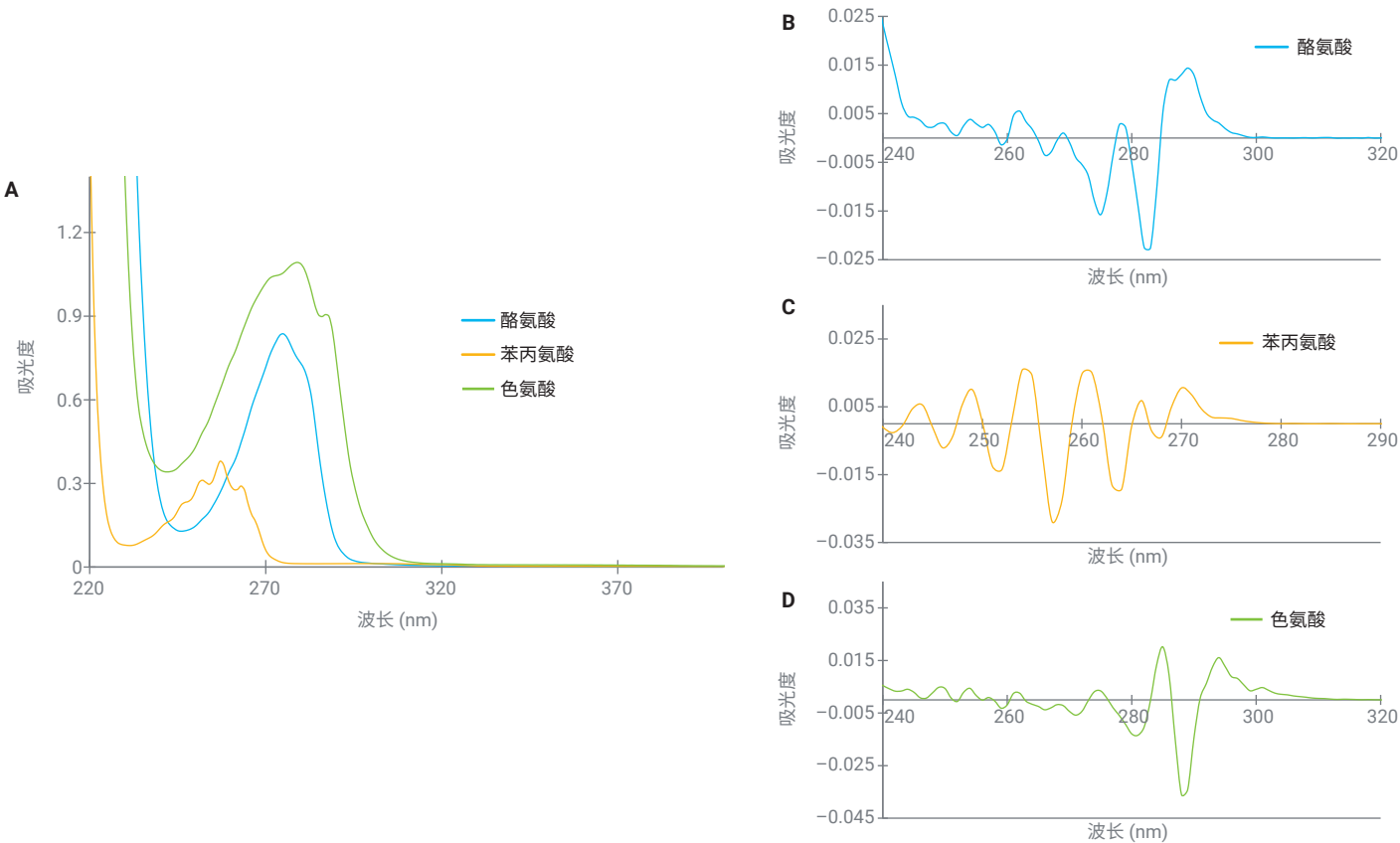


图 1. 芳香族氨基酸的紫外-可见吸收光谱。(A) 零阶和 (B、C、D) 二阶导数紫外-可见吸收光谱

多肽的紫外-可见光谱

为获得不同的吸收光谱以进行对比，本研究所选的多肽含有不同比例的芳香族氨基酸。图 2 为蜂毒肽、MSH、血管紧张素 II 和利拉鲁肽四种多肽的二阶导数吸收光谱。二阶导数光谱中峰的位置与其所含芳香族氨基酸的已知吸收特征高度吻合。总体而言，二阶导数光谱提供了更清晰的多肽光谱特征。

表 2. 所分析多肽的氨基酸组成

多肽	序列	色氨酸 (W) 数量	酪氨酸 (Y) 数量	苯丙氨酸 (F) 数量
利拉鲁肽	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVGRGRG	1	1	1
蜂毒肽	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	1	0	0
α-促黑素细胞激素 (MSH)	SYSMEHFRWGKPV	1	1	1
血管紧张素 II	DRVYIHPF	0	1	1
P 物质	RPKPQQFFGLM	0	0	2

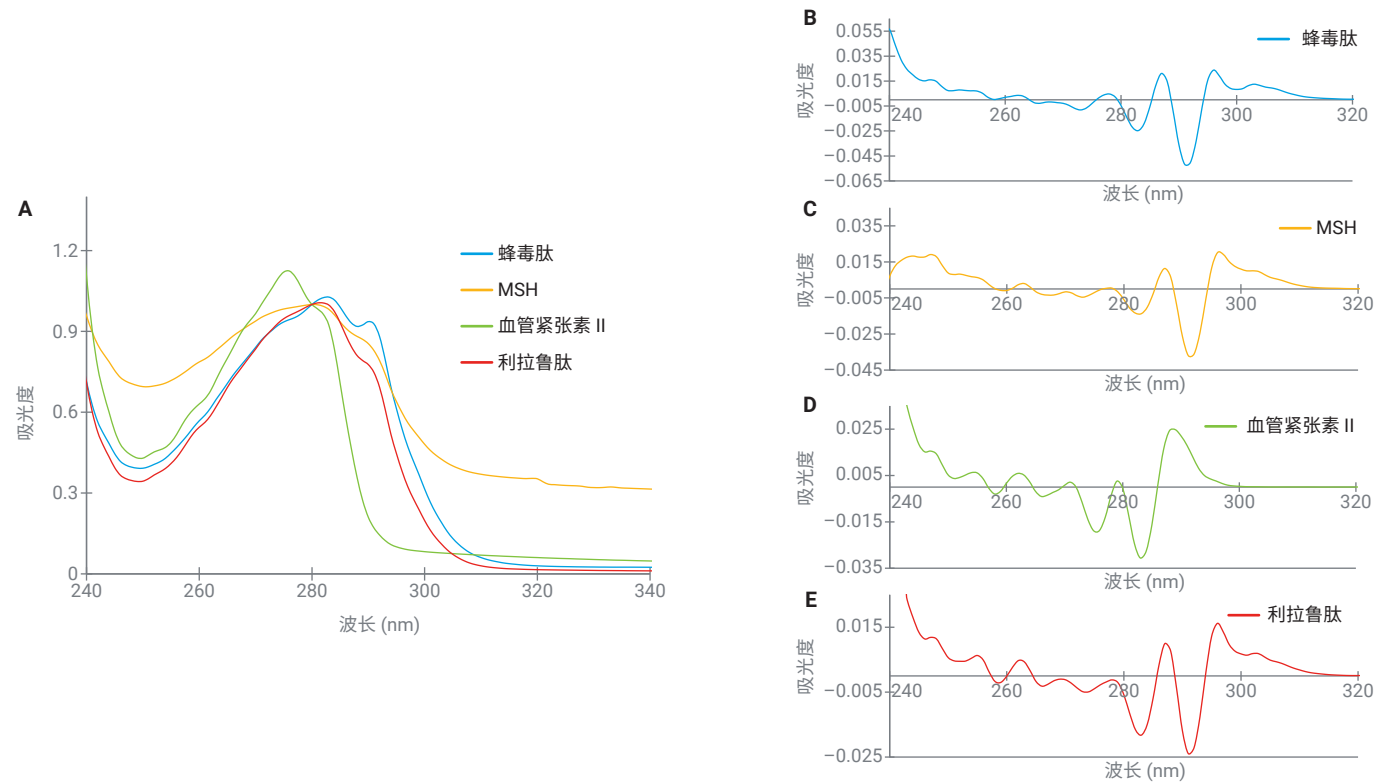


图 2. 多肽的紫外-可见吸收光谱。(A) 零阶和 (B、C、D、E) 二阶导数紫外-可见吸收光谱

表 2 总结了所研究多肽中三种芳香族氨基酸的数量。蜂毒肽在 291、283 和 275 nm 处显示色氨酸相关特征峰。MSH 和利拉鲁肽在 290、283 和 266 nm 处的吸收峰反映了三种芳香族氨基酸的共同贡献。血管紧张素 II 在 283、276、264、258 和 252 nm 处出现特征峰，与其含有酪氨酸和苯丙氨酸的情况相符。

监测氧化应激下的多肽稳定性

为评估导数光谱在稳定性监测中的应用价值，使用 H₂O₂ 对多肽进行处理。图 3 比较了未经处理和经 H₂O₂ 处理的多肽样品的二阶导数紫外-可见光谱。二阶导数光谱有效捕捉到了由 H₂O₂ 处理所引起的多肽吸收光谱的细微变化。血管紧张素 II 肽因缺乏色氨酸残基，经 H₂O₂ 处理后在 291 nm 附近未观察到显著变化。蜂毒肽的二阶导数光谱仅呈现微小变化，表明其不易发生氧化。而含有色氨酸的 MSH 和利拉鲁肽在经 H₂O₂

处理后，291 nm 处的峰强度出现明显下降。这表明这两种多肽易受氧化影响，且氧化作用主要发生于色氨酸残基，进一步证明了二阶导数光谱法在检测色氨酸氧化方面具有高度特异性。为确证利拉鲁肽的氧化状态，我们对 H₂O₂ 处理后的样品进行了液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (LC/Q-TOF-MS) 分析。图 4 显示了经 H₂O₂ 处理的利拉鲁肽的总离子流色谱图 (TIC)。解卷积质谱图确认存在 +16 Da 和 +32 Da 的质量位移，分别对应单氧化和双氧化产物^[3]。

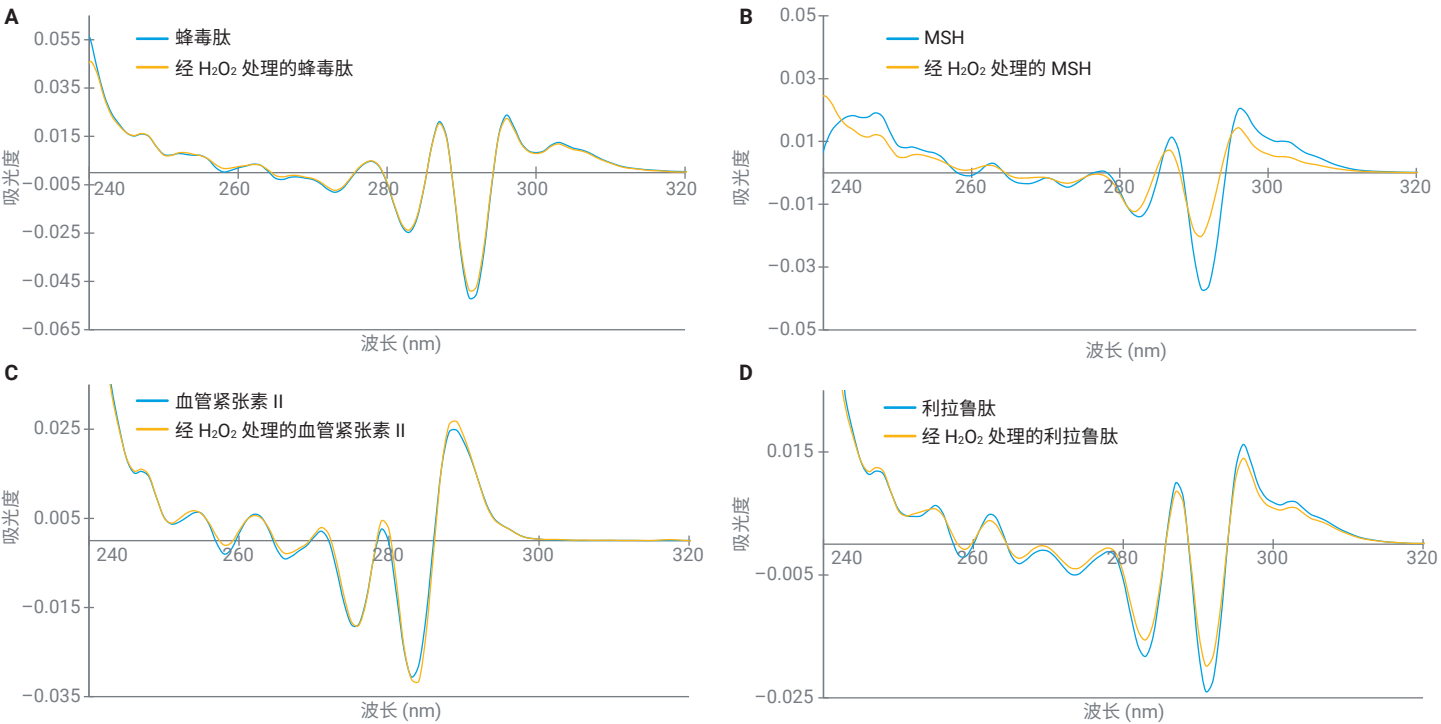


图 3. 未经处理和经 H₂O₂ 处理的多肽样品的二阶导数紫外-可见吸收光谱

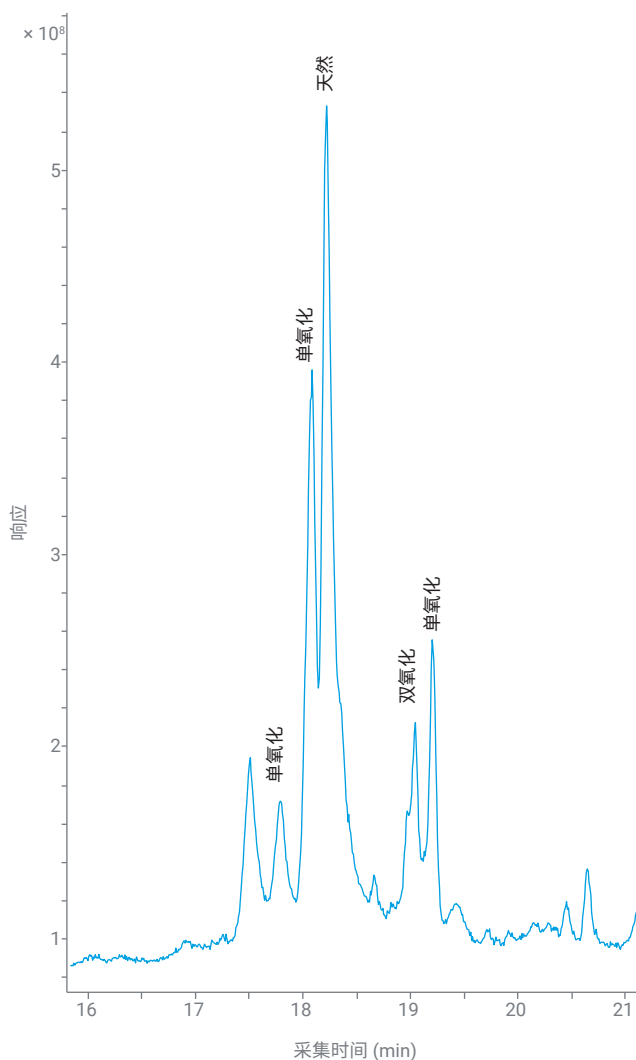


图 4. 利拉鲁肽氧化后的 LC/MS 总离子流色谱图

结论

本研究证明，紫外-可见二阶导数光谱技术能够准确鉴别并监测多肽中芳香族残基变化引起的细微光谱差异，是评估多肽稳定性的有力工具。Agilent Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计的多池设计可同时监测八个样品，从而缩短检测时间。内置计算功能通过自动化运算简化分析流程，帮助用户提升数据解析与决策效率。这对于生物制药分析尤其有价值，因为准确高效地监测多肽稳定性对于药物研发和质量控制至关重要。这种非破坏性的紫外-可见光谱分析还能完整保留样品，以用于后续 LC-MS 等互补分析。Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计是药物研发与质量控制 (QC) 实验室的理想选择，在这些应用场景中，检测速度、操作便捷性以及保留珍贵样品以便重复使用具有至关重要的意义。

参考文献

1. Müller, T. D.; Finan, B.; Bloom, S. R.; D'Alessio, D.; Drucker, D. J.; Flatt, P. R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H. J.; Habener, J. F.; et al. Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). *Mol. Metab.* **2019**, *30*, 72–130
2. Liyanage, M. R.; Bakshi, K.; Volkin, D. B.; Middaugh, C. R. Ultraviolet Absorption Spectroscopy of Peptides. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1088*, 225–236
3. Suresh Babu, C.V. Characterization of Forced Degradation Impurities of Glucagon-Like Peptide-1 Agonists by LC/Q-TOF Mass Spectrometry (使用 LC/Q-TOF MS 表征胰高血糖素样肽-1 激动剂的强制降解杂质), 安捷伦科技公司应用简报, 5994-7794EN, **2025**

www.agilent.com

DE-008586

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 8 月 14 日，中国出版
5994-8551ZHCN

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