

# 스트레스 조건에서 티르제파타이드의 불순물 프로파일링

Agilent Pro iQ Plus 사용

## 저자

Mahsan Miladi 박사  
Agilent Technologies, Inc.

## 개요

글루카곤 유사 펫타이드-1(GLP-1) 작용제에 대한 수요와 사용이 증가함에 따라, 안전성과 효능에 영향을 줄 수 있는 불순물을 선별하기 위한 견고한 분석법에 대한 필요성이 커지고 있습니다. 합성 GLP-1 펫타이드는 스트레스 조건 하에서 산화와 같은 경로를 통해 분해되기 쉽습니다.<sup>1</sup> 본 연구에서는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템과 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 질량 검출기를 결합하여 다양한 pH 및 보관 조건에서 티르제파타이드 불순물을 모니터링했습니다. 이 연구는 고감도 SQ LC/MS 시스템이 저농도 펫타이드 불순물의 검출과 모니터링을 간소화할 수 있어 일상적인 품질 관리(QC) 및 품질 보증(QA) 환경에서 구현하기에 적합함을 보여줍니다.

## 소개

글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1) 작용제는 2형 당뇨병(T2DM)과 비만을 치료하는 데 사용되는 화합물 계열입니다. GLP-1 작용제의 기능은 혈청 내 포도당 수치를 낮추어, 대사 조절에 도움을 주는 역할을 합니다. GLP-1과 포도당 의존성 인슐린 분비 촉진 펩타이드(GIP)는 모두 디펩ти딜펩티다제-4에 의해 불활성화되는 인크레틴 호르몬입니다. 이러한 호르몬은 경구 포도당 섭취 후 인크레틴 효과를 통해 인슐린 분비를 자극합니다.<sup>2,3</sup> 제 2형 당뇨병 환자의 경우, 이 작용이 둔화되거나 사라질 수 있으나 약리학적 수준의 GLP-1은 인슐린 분비를 회복시킬 수 있습니다.

미국 식품의약국(FDA)은 제안된 제네릭 의약품에 존재하는 불순물의 유형과 양을 대조약(RLD)과 비교하여 고려합니다. FDA에 따르면, 제안된 제네릭 합성 펩타이드는 (i) RLD에서 발견되는 것보다 높은 수준의 불순물을 포함해서는 안 되며 (ii) 약물 물질의 0.5%를 초과하는 새로운 펩타이드 관련 지정 불순물을 포함해서는 안 됩니다.<sup>4</sup>

이중 GIP 및 GLP-1 수용체 작용제인 티르제파타이드는 유망한 치료적 잠재력을 제공하지만 탈아미드화, 산화, 펩타이드 백본 절단을 포함한 화학적 분해에 취약하기 때문에 분석에 어려움이 있습니다. 제품의 무결성, 안전성, 효능을 보장하기 위해서는 이러한 분해 경로를 반드시 모니터링해야 합니다.

Agilent InfinityLab Pro iQ Plus SQ 질량 분석기(MS)는 낮은 농도 (sub-ppm)의 불순물 검출을 위해 향상된 감도와 동적 범위를 제공합니다. Agilent 1290 Infinity II LC 시스템과 Pro iQ Plus LC/MS 기기를 결합하면, QC 실험실에서 일상적 분석을 수행하기 위한 비용 효율적인 질량 검출 워크플로를 구현할 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 다양한 pH와 보관 조건에서 티르제파타이드 및 관련 불순물을 분석한 결과를 자세히 설명합니다.

## 실험

### 화학물질 및 표준물질

- 포름산, 98%(LC-MS grade LiChropur), Millipore Sigma(제품 번호 5.33002)
- InfinityLab 아세토니트릴(LC/MS 등급), 1 × 1L, Agilent (제품 번호 5191-5101-001)
- 티르제파타이드, AstaTech(제품 번호 AT40456)
- 포름산 암모늄(LC-MS grade LiChropur), Millipore Sigma (제품 번호 70221)
- 수산화암모늄, HPLC용, 35% 수용액, Thermo Fisher Scientific(카탈로그 번호 460801000)

### 시료 전처리

티르제파타이드 원액은 15% 아세토니트릴/탈이온수에 2mg/mL 농도로 제조했습니다. 분석용 용액은 pH 5, 7, 9로 조절된 완충 용액에서 50ng/μL로 희석되었습니다. 추가적인 정제 없이 시료를 직접 주입했습니다. 분주된 시료는 자동 시료 주입기에 넣어 5°C에서 보관하고, 최대 7일 동안 보관하면서 여러 날에 걸쳐 분석했습니다.

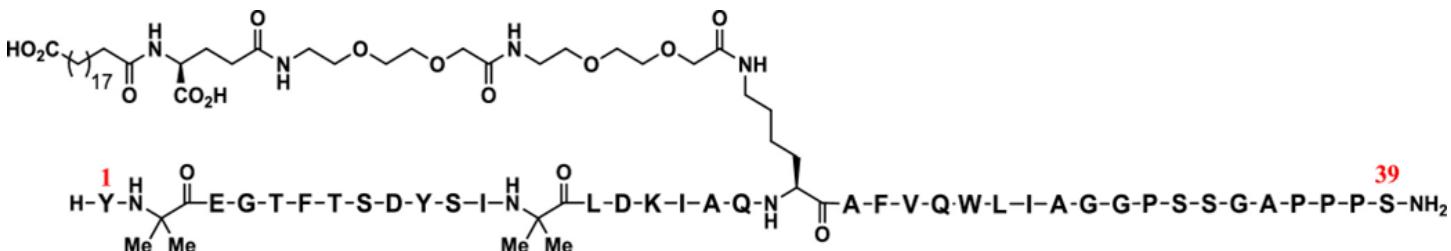


그림 1. 티르제파타이드 아미노산 조성.<sup>5</sup>

## 기기

LC/MS 분석은 Pro iQ Plus 질량 검출기와 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템을 사용하여 수행했습니다. 크로마토그래피 분리는 Agilent ZORBAX RRHD 300Å StableBond C18 컬럼을 사용하여 수행했습니다. 자세한 LC 및 MS 작동 파라미터를 표 1과 표 2에 요약했습니다.

표 1. LC 분석법 파라미터.

1290 Infinity II Bio LC 시스템	
컬럼	ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2.1 x 150mm, 1.8µm(제품 번호 863750-902)
이동상 A	LC/MS-grade water + 0.1% formic acid
이동상 B	Acetonitrile + 0.1% formic acid
유량	0.400mL/분
Injection	Standard
주입량	1µL
컬럼 온도	60°C
그레이디언트 프로그램	시간(분) %B 0 20 5 48 10 58 11 60 12 80 14 80 14.1 20 15 20

표 2. MS 파라미터.

Pro iQ Plus SQ LC/MS	
소스	
이온화원	Agilent Jet Stream ESI 소스
극성	Positive
가스 온도	300°C
건조 가스 유량	11L/분
네뷸라이저	30psi
Sheath 가스 온도	250°C
Sheath 가스 유량	12L/분
캐필러리 전압	3,500V
노즐 전압	0V
Pro iQ Plus	
Fragmentor	95V
스캔 유형	스캔
스캔 시간	500ms
데이터 저장	Profile
MS 스펙트럼 범위	$m/z$ 500–2,500

## 소프트웨어 및 데이터 분석

Pro iQ Plus LC/MS 시스템은 Agilent OpenLab CDS 2.8 소프트웨어를 사용하여 운영되었으며, 이 소프트웨어에는 GLP-1 펙타이드 데이터를 처리하기 위한 내장형 spectral deconvolution 기능이 포함되어 있습니다. OpenLab CDS의 deconvolution 알고리즘은 다중 하전 이온, 특히 단위 질량 분해능 기기를 사용하여 얻은 이온에서 생성된 복잡한 스펙트럼을 단순화하기 위해 특별히 최적화되었습니다. 이 연구에 사용된 구체적인 데이터 프로세싱 파라미터를 표 3에 요약했습니다.

표 3. GLP-1 펙타이드 분석을 위해 OpenLab CDS 2.8에서 사용된 데이터 프로세싱 파라미터.

파라미터	값
Spectrum Extraction Type	Peak apex spectrum
Background Mode	Spectrum at peak start and end
Use $m/z$ Range	Disabled
Run Automatic Deconvolution	Enabled
Low Molecular Weight	500
High Molecular Weight	10,000
Maximum Charge	6
Minimum Peaks in Set	3
MW Agreement (0.01%)	5
Absolute Noise Threshold	1,000
Relative Abundance Threshold (%)	10
MW Algorithm	Curve Fit
MW Algorithm Threshold	40
Envelope Threshold	50

## 결과 및 토의

티르제파타이드 분해산물은 pH와 보관 기간의 영향을 크게 받았습니다. Pro iQ Plus SQ LC/MS 시스템은 미량 수준의 불순물 관련 생성물을 성공적으로 검출했습니다.

### OpenLab CDS를 이용한 펩타이드 분석

OpenLab CDS 소프트웨어는 펩타이드 특성화 및 불순물 평가를 위한 통합 플랫폼을 제공합니다. 그림 2는 5°C, pH 7의 환경에서 7일간 보관한 후의 티르제파타이드에 대한 데이터 검토 결과를 보여줍니다. 그림 2에서 볼 수 있듯이 불순물 피크가 미량 수준으로 검출되었으며, 티르제파타이드 주요 피크에 가깝게 용출되었습니다. 정확한 deconvolution을 위해서는 고품질 질량 스펙트럼을 얻는 것이 중요하다는 점에 주목해야 합니다. Pro iQ Plus 질량 검출기는 미량 불순물에 대해서도 매우 고품질의 질량 스펙트럼을 제공합니다.

소프트웨어 레이아웃에는 크로마토그램 보기, MS 스펙트럼 창, spectral deconvolution results와 같은 유용한 도구가 포함되어 있어 주요 펩타이드와 저농도 불순물을 모두 효율적으로 검토할 수 있습니다.

총 이온 크로마토그램(TIC)은 티르제파타이드와 관련 불순물 생성물에 해당하는 피크를 보여줍니다. 7.89분의 질량 스펙트럼은 +3, +4 및 +5 전하 상태가 존재하는 티르제파타이드의 용출을 확인시켜줍니다(그림 2). deconvoluted 질량 스펙트럼은 4,813.1Da의 분자량을 보여주는데, 이는 티르제파타이드의 이론적 평균 질량(4,813.5Da)과 일치하며 기기의 예상 질량 정확도( $\pm 0.3\text{Da}$ ) 내에 있습니다.

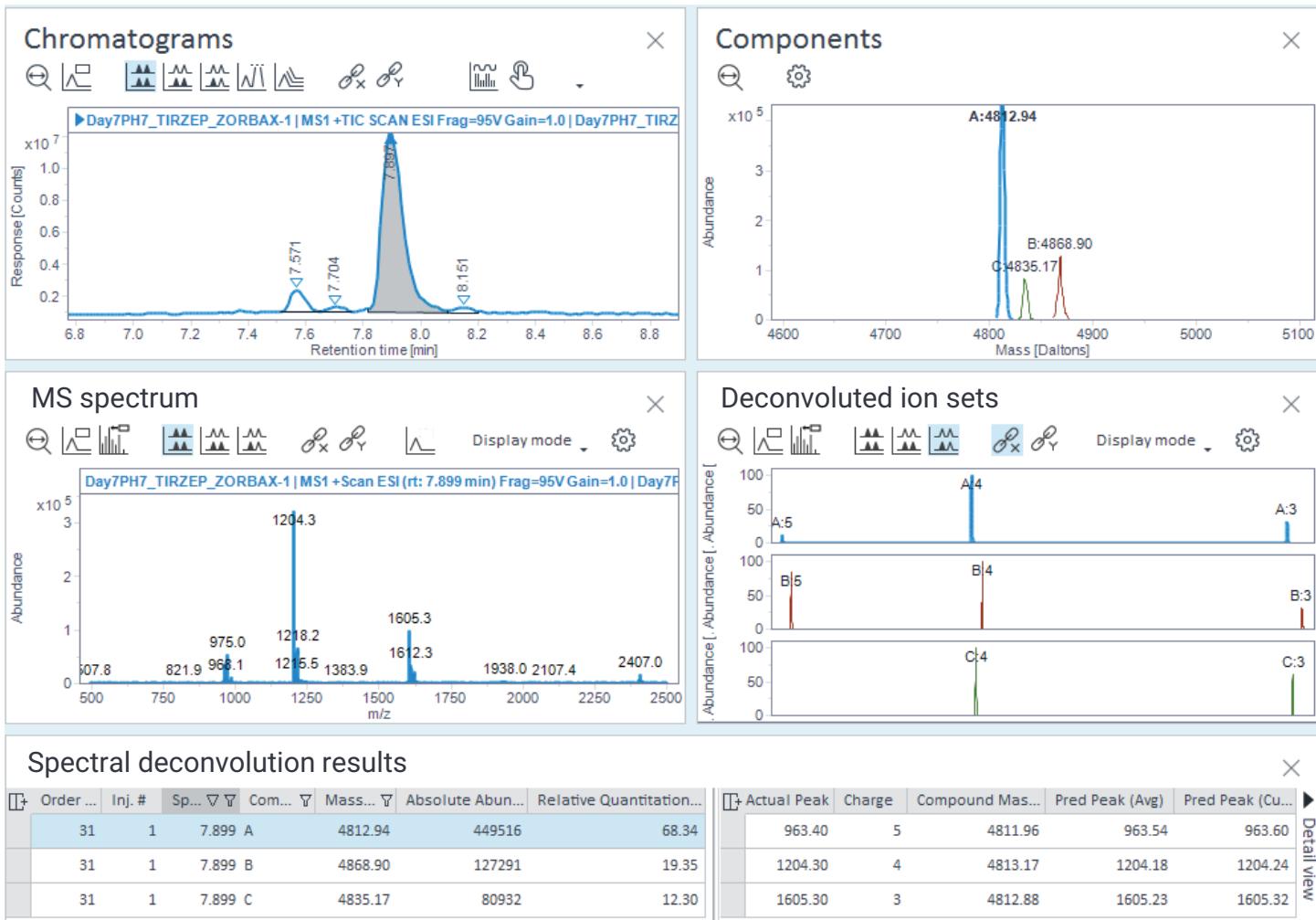


그림 2. 5°C, pH 7에서 7일간 보관한 후의 티르제파타이드에 대한 데이터 검토 결과.

Pro iQ Plus LC/MS 시스템은 티르제파타이드 시료에서 낮은 수준의 불순물을 고감도로 검출하고 특성 규명할 수 있습니다. 그림 3은 7.57분과 7.71분에 용출된 두 가지 불순물의 질량 스펙트럼을 보여주며(그림 2 참조), deconvoluted 질량은 각각 4,845.2와 4,817.9Da입니다. 이러한 화학종은 기본 티르제파타이드의 이론적 평균 질량(4,813.5Da)에 비해 질량이 +32 및 +4.4Da 이동한 것에 해당합니다. 질량 이동은 스트레스 조건에서 펩타이드의 일반적인 분해 경로인 산화적 변형과 일치합니다. 메티오닌, 트립토판 및 히스티딘과 같은 아미노산은 특히 산화되기 쉽습니다. 특히 트립토판 산화는 특정 구조적 변형( $+O_2-CO$ )으로 인해 +4Da 이동이 발생할 수 있습니다.<sup>6</sup>

표 4에 티르제파타이드와 관련 불순물(산화된 형태와 알려지지 않은 불순물 포함)의 deconvoluted 분자량을 요약했습니다.

표 4. 티르제파타이드와 관련 불순물의 deconvoluted 분자량.

Native Peptide Molecular Weight (Da)	불순물 생성물		
	산화 ( $+O_2$ )	산화 ( $O_2-CO$ )	알려지지 않은 불순물
티르제파타이드	4,813.1	4,845.2	4,817.9

산화 관련 불순물 외에도 8.15분의 머무름 시간에 알려지지 않은 화학종이 검출되었습니다. 이 종의 deconvoluted 질량 스펙트럼은 -4,689.6Da의 분자량을 나타내는데, 이는 기본 티르제파타이드와 비교하여 +124Da의 질량 차이에 해당합니다. 이 불순물을 식별하려면 추가적인 MS 특성 규명(즉, MS/MS)이 필요합니다.

Pro iQ Plus LC/MS 기기는 감도가 높고 동적 범위가 넓어 한 번의 실험으로 주요 화학종과 미량 수준의 화학종을 모두 확실하게 검출할 수 있습니다. 중요한 점은 이 질량분석기가 상대적 피크 면적이 2% 미만인 불순물도 성공적으로 검출한다는 것인데, 이는 펩타이드 시료에서 미량 분해물을 모니터링하기에 Pro iQ Plus LC/MS가 적합함을 보여줍니다. 그뿐 아니라, OpenLab CDS에 내장된 spectral deconvolution 기능은 다중 전하 스펙트럼의 해석을 단순화하여 데이터 분석을 간소화하고 외부 소프트웨어의 필요성을 없애줍니다.

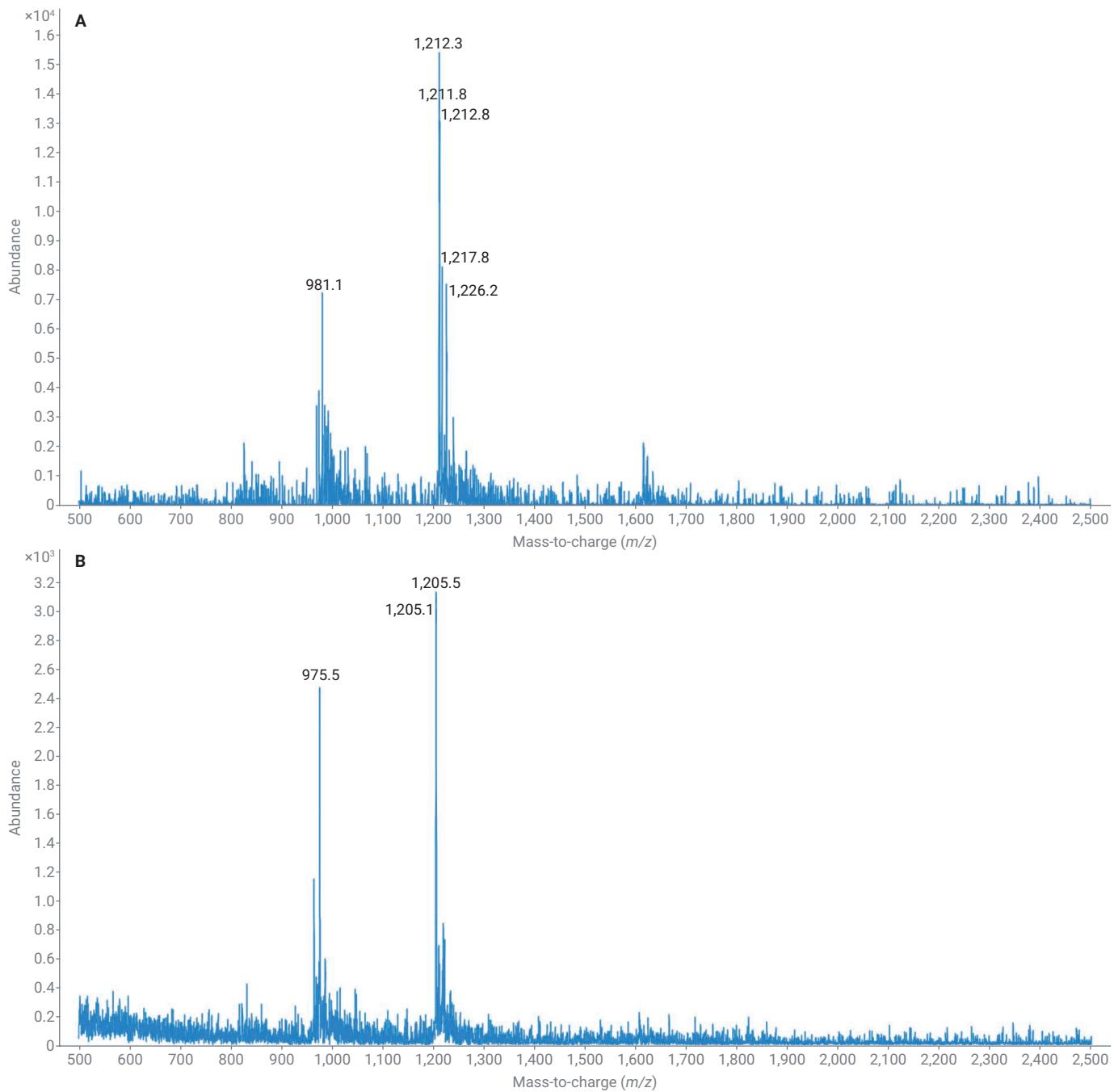


그림 3. 머무름 시간 7.57분(패널 A) 및 7.71분(패널 B)에서 용출된 티르제파타이드 불순물의 질량 스펙트럼. 질량 spectral deconvolution 결과, 패널 A에서는 불순물의 분자량이 4,845.2Da이고, 패널 B에서는 불순물의 분자량이 4,817.9Da인 것으로 나타났습니다.

## 불순물 생성의 시간 경과 모니터링

GLP-1 약물의 안정성, 효능 및 전반적인 효과를 유지하려면 적절한 보관과 취급이 필수적입니다. 부적절한 보관 조건은 분해, 치료 효능 감소, 잠재적 안전 위험으로 이어질 수 있습니다. 따라서 다양한 보관 기간과 조건이 분해산물 형성에 어떤 영향을 미치는지 평가하는 것은 제품 품질과 환자 안전을 보장하는 데 매우 중요합니다.

그림 4는 다양한 용액 pH 값에서 티르제파타이드의 산화 생성물 생성을 보여주는 시간 도표입니다. 그림 4의 데이터는 티르제파타이드가 pH 5에서 가장 불안정하며 5°C에서도 상당한 산화가 일어날 수 있음을 보여줍니다.

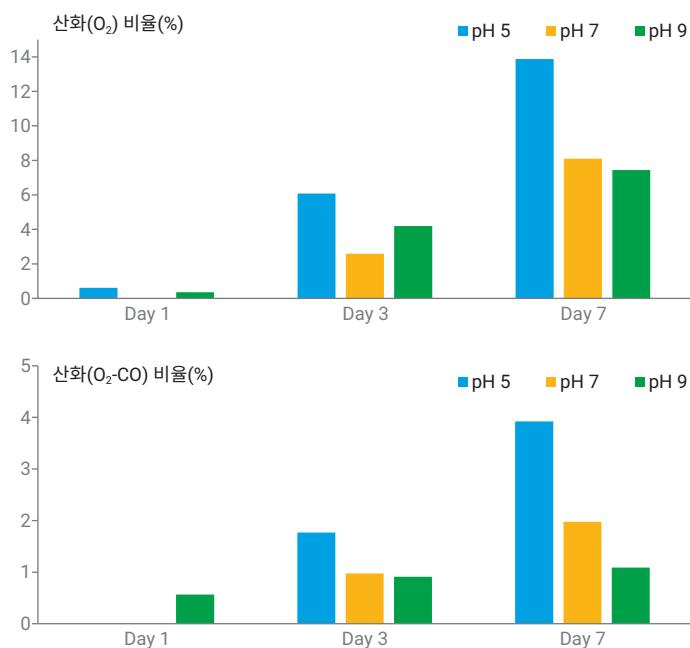


그림 4. 다양한 pH 조건에서 시간에 따른 티르제파타이드 관련 불순물의 산화 비율.

## 결론

결론적으로, Agilent Pro iQ Plus 질량 검출기를 사용하여 스트레스 조건에서 티르제파타이드의 불순물 프로파일링을 실시한 결과, 이 분석법이 저농도 펩타이드 불순물을 검출하고 모니터링하는데 효과적임을 알 수 있었습니다. 특히, 이 분석법은 상대적 피크 면적이 2% 미만인 불순물을 검출할 수 있었으며, 이는 저농도 불순물 식별에 대한 높은 감도를 보여주는 결과입니다. 본 연구는 특히 다양한 pH와 보관 조건에서 티르제파타이드가 산화로 인해 분해되기 쉽다는 점을 강조합니다. 이러한 연구 결과는 GLP-1 약물의 안정성과 효능을 유지하기 위해서는 적절한 보관과 취급이 중요하다는 것을 명확하게 보여줍니다. Pro iQ Plus 질량 검출기는 높은 감도, 비용 효율성 및 간단한 운용의 장점을 가지고 있어 일상적인 제약 QC 및 QA 워크플로에 실용적이고 접근하기 쉬운 도구로 적합합니다.

## 참고 자료

1. Badgjar, D.; Bawake, S.; Sharma, N. A Comprehensive Study on the Identification and Characterization of Major Degradation Products of Synthetic Liraglutide Using Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. *J. Pept. Sci.* **2025**, 31, e3652. DOI: 10.1002/psc.3652.
2. Vilsbøll, T.; Christensen, M.; Junker, A. E.; Knop, F. K.; Gluud, L. L. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists on Weight Loss: Systematic Review and Meta-Analyses of Randomised Controlled Trials. *BMJ* **2012**, 344, d7771. DOI: 10.1136/bmj.d7771.
3. Davidson, M. H. Cardiovascular Effects of Glucagonlike Peptide-1 Agonists. *Am. J. Cardiol.* **2011**, 108 (3 Suppl), 33B–41B. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.03.002.
4. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation Research. 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*, May 19, **2021**. DOI: 10.1002/psc.3652.
5. Wang, J.; Berglund, M. R.; Braden, T.; Embry, M. C.; Johnson, M. D.; Groskreutz, S. R.; Sayyed, F. B.; Tsukanov, S. V.; White, T. D.; Jalan, A.; et al. Mechanistic Study of Diketopiperazine Formation during Solid-Phase Peptide Synthesis of Tirzepatide. *ACS Omega* **2022**, 7, 46809–46824. DOI: 10.1021/acsomega.2c06809.
6. Datola, A.; Pistacchio, A.; Simone, P.; Colarusso, L.; Melchiorre, M.; Rinaldi, G.; Amidi, M.; Politi, J.; Angiuoni, G. Characterization by LC-MS/MS of Oxidized Products Identified in Synthetic Peptide Somatostatin and Cetrorelix Submitted to Forced Oxidative Stress by Hydrogen Peroxide: Two Case Studies. *J. Mass Spectrom.* **2023**, 58(5), e4919. DOI: 10.1002/jms.4919.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE-006263

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025  
2025년 5월 19일 한국에서 인쇄  
5994-8359KO

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
DF타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090(고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: korea-inquiry\_lsca@agilent.com

 **Agilent**  
Trusted Answers