

强制降解条件下替尔泊肽的杂质谱分析

使用 Agilent Pro iQ Plus

作者

Mahsan Miladi 博士
安捷伦科技有限公司

摘要

随着胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 受体激动剂的市场需求与使用日益增长，亟需建立可靠的杂质分析方法来确保这类药物的安全性和有效性。合成 GLP-1 多肽在强制降解条件下容易通过氧化等途径发生降解^[1]。本研究采用高效液相色谱 (HPLC) 系统结合 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 质谱检测器，监测不同 pH 值和储存条件下替尔泊肽的杂质情况。本研究表明，高灵敏度单四极杆 LC/MS 系统可简化低浓度多肽杂质的检测和监测，非常适合常规质量控制 (QC) 和质量保证 (QA) 环境。

前言

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂是一类用于治疗 II 型糖尿病 (T2DM) 和肥胖症的化合物。GLP-1 激动剂通过降低血清葡萄糖水平来调节患者的代谢。GLP-1 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP) 均为肠促胰岛素激素，可被二肽基肽酶-4 降解而失活。这些激素通过肠促胰岛素效应在口服葡萄糖后刺激胰岛素分泌^[2,3]。在 T2DM 患者中，这一过程可能减弱或完全消失，但通过补充药理剂量的 GLP-1 可恢复胰岛素分泌功能。

美国食品药品监督管理局 (FDA) 在评估仿制药申请时，会将其所含杂质的种类和含量与原研药 (RLD) 进行比较。根据 FDA 的规定，申报的合成肽类仿制药必须满足以下两个条件：(i) 杂质含量不得超过 RLD 的杂质含量，(ii) 若存在原研药中没有的特定肽类杂质，其含量不得超过原料药总量的 0.5%^[4]。

替尔泊肽是一种 GIP 和 GLP-1 双受体激动剂，具有良好的治疗前景，但由于其容易发生化学降解（包括脱酰胺、氧化和多肽骨架裂解），分析起来存在一定难度。对此类降解途径进行监测对于确保药品的完整性、安全性和有效性至关重要。

Agilent InfinityLab Pro iQ Plus 单四极杆质谱仪 (MS) 为低丰度 (亚 ppm 级) 杂质检测提供了更高的灵敏度和动态范围。Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统与 Pro iQ Plus LC/MS 仪器相结合, 为 QC 实验室的常规分析带来了经济高效的质谱检测工作流程。本应用简报详细介绍了在不同 pH 和储存条件下分析替尔泊肽及其相关杂质获得的结果。

实验部分

试剂与标准品

- 甲酸, 98% (LC-MS 级, LiChropur) , Millipore Sigma (部件号 5.33002)
 - InfinityLab 乙腈 (LC/MS 级) , 1 × 1 L, 安捷伦 (部件号 5191-5101-001)
 - 替尔泊肽, AstaTech (部件号 AT40456)
 - 甲酸铵 (LC-MS 级, LiChropur) , Millipore Sigma (部件号 70221)
 - 氢氧化铵, 用于 HPLC, 35% 水溶液, Thermo Fisher Scientific (目录号 460801000)

样品前处理

配制 2 mg/mL 的替尔泊肽储备液（溶剂为 15% 乙腈/去离子水）。用 pH 为 5、7、9 的缓冲液进行稀释，得到 50 ng/μL 的工作溶液。样品可直接进样，无需额外纯化。将等分试样储存在 5 °C 的自动进样器中，并在 7 天内分批检测。

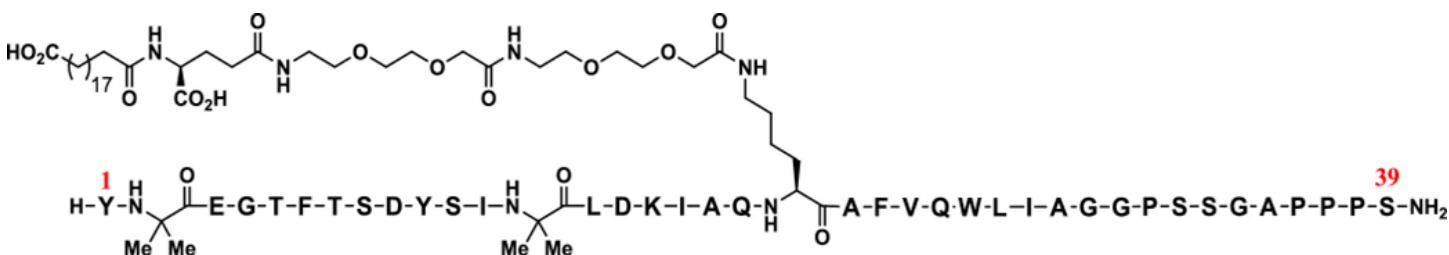


图 1. 替尔泊肽氨基酸组成^[5]

仪器

使用配备 Pro iQ Plus 质谱检测器的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行 LC/MS 分析。使用 Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18 色谱柱进行色谱分离。LC 和 MS 操作参数详见表 1 和表 2。

表 1. 液相色谱方法参数

1290 Infinity II 生物液相色谱系统	
色谱柱	ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 µm (部件号 863750-902)
流动相 A	LC/MS 级水 + 0.1% 甲酸
流动相 B	乙腈 + 0.1 % 甲酸
流速	0.400 mL/min
进样	标准
进样量	1 µL
柱温	60 °C
梯度程序	时间 (min) %B 0 20 5 48 10 58 11 60 12 80 14 80 14.1 20 15 20

表 2. 质谱参数

Pro iQ Plus 单四极杆 LC/MS	
离子源	
离子源	安捷伦喷射流 ESI 离子源
极性	正
气体温度	300 °C
干燥气流量	11 L/min
雾化器	30 psi
鞘气温度	250 °C
鞘气流量	12 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	0 V
Pro iQ Plus	
碎裂电压	95 V
扫描类型	扫描
扫描时间	500 ms
数据存储	轮廓图模式
MS 谱图范围	m/z 500–2500

软件和数据分析

采用 Agilent OpenLab CDS 2.8 软件运行 Pro iQ Plus LC/MS 系统，该软件内置谱图解卷积功能，可用于处理 GLP-1 多肽数据。OpenLab CDS 中的解卷积算法经过专门优化，可简化多电荷离子生成的复杂谱图，特别是使用单位质量分辨率仪器采集的谱图。表 3 概述了本研究中使用的具体数据处理参数。

表 3. OpenLab CDS 2.8 进行 GLP-1 多肽分析的数据处理参数

参数	设定值
谱图提取类型	峰顶点谱图
背景模式	峰起点和终点处的谱图
使用 m/z 范围	已禁用
运行自动解卷积	已启用
低分子量	500
高分子量	10000
最大电荷	6
组内最小峰数	3
MW 一致性 (0.01%)	5
绝对噪音阈值	1000
相对丰度阈值 (%)	10
MW 算法	曲线拟合
MW 算法阈值	40
分布包迹阈值	50

结果与讨论

替尔泊肽的降解产物主要受 pH 和储存时长的影响。Pro iQ Plus 单四极杆 LC/MS 系统成功检出了痕量水平的杂质相关产物。

使用 OpenLab CDS 进行多肽分析

OpenLab CDS 软件为多肽表征和杂质评估提供了统一平台。图 2 为替尔泊肽在 5 °C 和 pH 7 条件下储存七天后的检测数据。如图所示，系统检测到了痕量杂质峰，洗脱时间与替尔泊肽主峰接近。需要特别说明的是，准确的解卷积离不开高质量的质谱图。Pro iQ Plus 质谱检测器能够提供所需的高质量质谱图，即使痕量杂质也是如此。

软件界面提供了色谱图视图、质谱图窗口和谱图解卷积结果等实用工具，有助于高效地审查多肽主成分和任何低含量杂质的检测结果。

总离子流色谱图 (TIC) 显示了替尔泊肽及其相关杂质的特征峰。7.89 分钟处的质谱证实了洗脱的确实是替尔泊肽，并观察到 +3、+4 和 +5 三种电荷态 (图 2)。解卷积质谱显示分子量为 4813.1 Da，与替尔泊肽的理论平均质量数 (4813.5 Da) 相符，且在仪器预期的质量精度 (± 0.3 Da) 范围内。

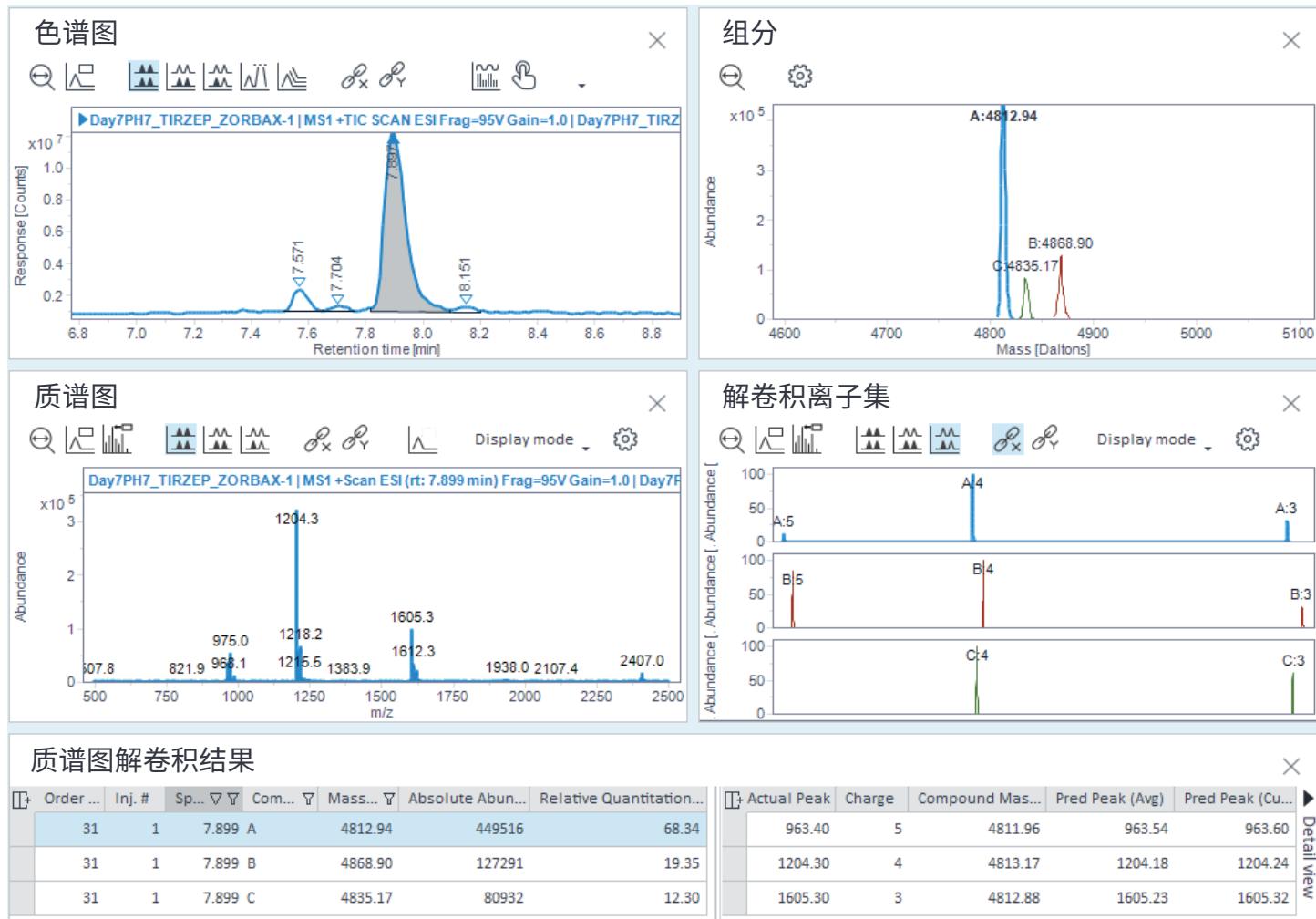


图 2. 替尔泊肽在 5 °C 和 pH 7 条件下储存七天后的检测数据

Pro iQ Plus LC/MS 系统能够对替尔泊肽样品中的低浓度杂质实现灵敏的检测和表征。图 3 为 7.57 和 7.71 分钟处（如图 2 所示）洗脱的两个杂质的质谱图，解卷积质量分别为 4845.2 和 4817.9 Da。相对于天然替尔泊肽的理论平均质量数（4813.5 Da），这两种物质的质量偏移分别为 +32 和 +4.4 Da。这一质量偏移符合氧化修饰的特点，而氧化修饰是多肽在强制降解条件下的常见降解途径。其中，甲硫氨酸、色氨酸和组氨酸等氨基酸尤其容易发生氧化。值得注意的是，色氨酸氧化会引入特定的结构修饰 ($+O_2-CO$)，从而导致 +4 Da 的质量偏移^[6]。

表 4 汇总了替尔泊肽及其相关杂质（包括氧化形式和未知杂质）的解卷积分子量。

表 4. 替尔泊肽及其相关杂质的解卷积分子量

GLP-1 多肽 天然多肽分子量 (Da)		杂质产物		
		氧化 ($+O_2$)	氧化 (O_2-CO)	未知杂质
替尔泊肽	4813.1	4845.2	4817.9	4689.6

除氧化相关杂质外，在 8.15 分钟保留时间处还检出了一种未知物质。该物质的解卷积质谱图表明其分子量约为 4689.6 Da，与天然替尔泊肽的质量数差值为 +124 Da。需要通过进一步质谱表征（即 MS/MS）来鉴定该杂质。

Pro iQ Plus LC/MS 仪器凭借高灵敏度和宽动态范围，能够在单次进样中可靠地检测主成分和痕量物质。尤为重要的是，该质谱仪成功检测到相对峰面积 < 2% 的杂质，充分证明了 Pro iQ Plus LC/MS 适用于监测多肽样品中的微量降解产物。此外，OpenLab CDS 的谱图解卷积功能通过简化多电荷质谱图的解析优化了数据分析流程，无需借助外部软件即可完成数据处理。

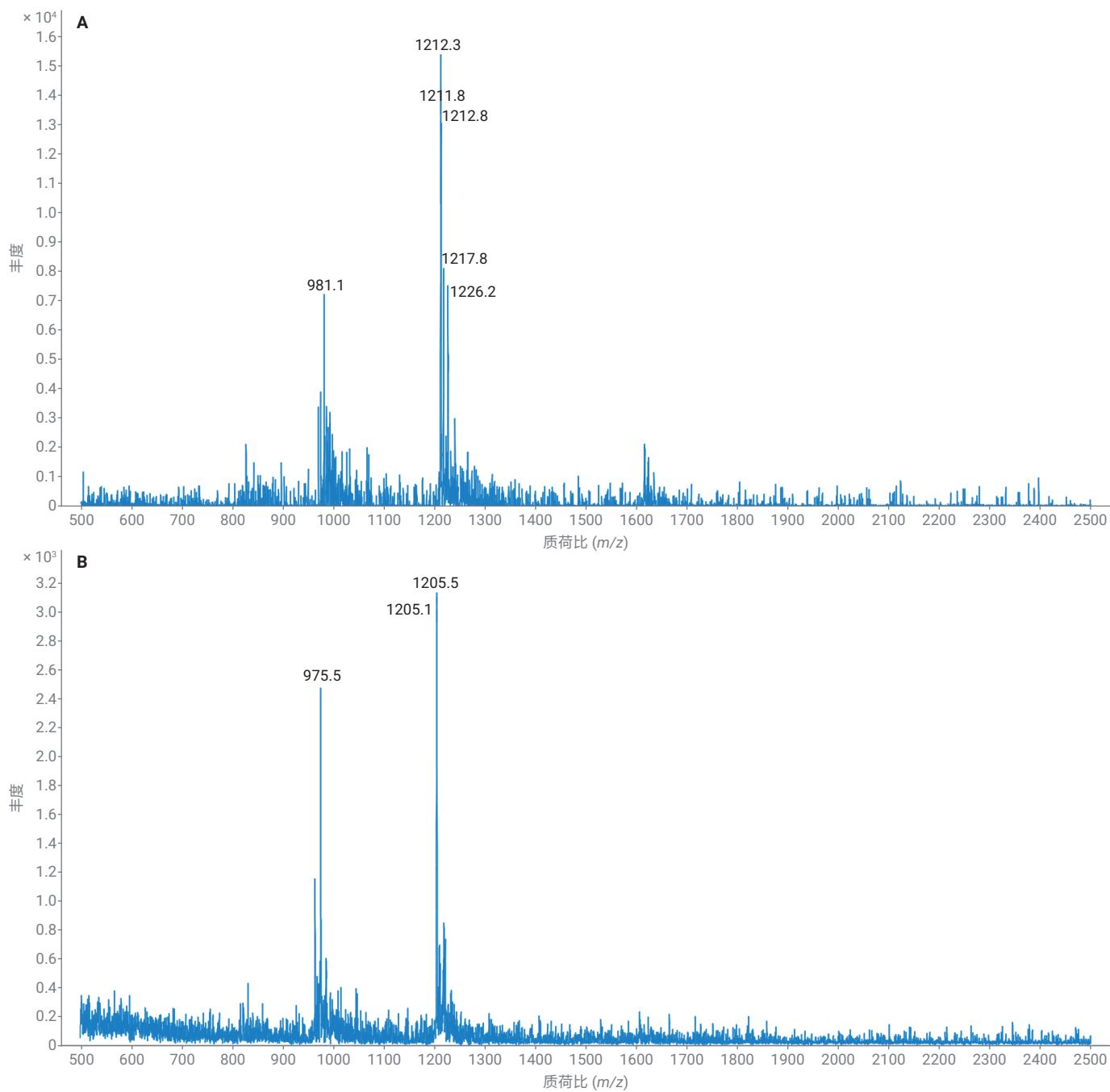


图3. 7.57分钟（图A）和7.71分钟（图B）处洗脱的替尔泊肽杂质的质谱图。质谱解卷积结果显示，图A杂质的分子量为4845.2 Da，图B杂质的分子量为4817.9 Da

杂质生成的动态监测

GLP-1 药物的规范储存和操作对于保持其稳定性、效价和总体有效性至关重要。储存不当会导致药物降解、疗效降低及潜在的安全风险。因此，评估不同的储存时长与条件如何影响降解产物的形成，对于保障药品质量和患者安全至关重要。

图 4 给出了不同 pH 值的溶液中替尔泊肽氧化产物的生成情况随时间的变化。图 4 中的数据表明，替尔泊肽在 pH 5 条件下稳定性最差，即使在 5 °C 下也可能发生严重氧化。

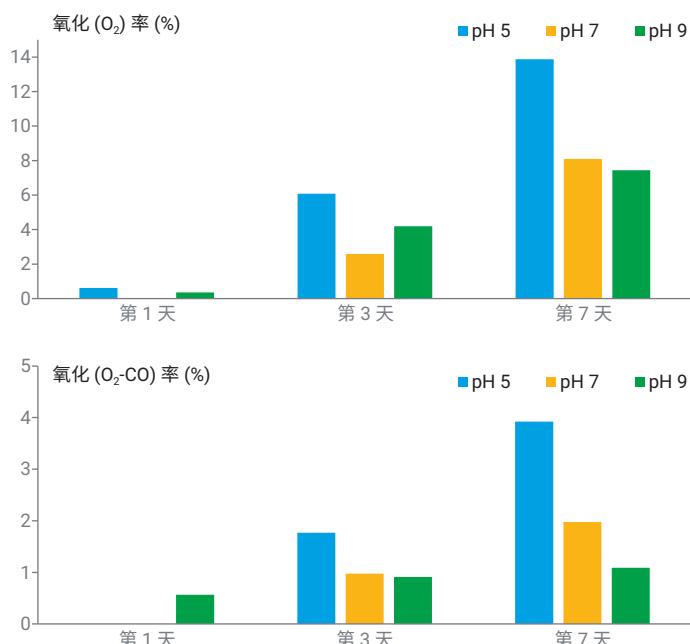


图 4. 不同 pH 条件下替尔泊肽相关杂质随时间的氧化率

结论

综上所述，本研究使用 Agilent Pro iQ Plus 质谱检测器在强制降解条件下对替尔泊肽进行了杂质分析，结果表明该分析方法能够有效检测和监测低浓度多肽杂质。该方法能够检测相对峰面积低于 2% 的杂质，证明其在低浓度杂质鉴定方面具有出色的灵敏度。本研究还表明，替尔泊肽容易发生氧化降解，尤其易受 pH 和储存条件的影响。这些研究结果表明，规范储存和操作对于保持 GLP-1 药物的稳定性和有效性非常重要。这款单四极杆 LC/MS 系统灵敏度高、经济高效、操作简便，使其成为常规药品 QC 和 QA 工作流程的实用分析工具。

参考文献

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

DE-006263

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5月19日, 中国出版,
5994-8359ZHCN

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

