

利用系统化方案和MaxPeak™高性能表面技术开发GLP-1合成肽的分离方法

Brianna R Clements, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

GLP-1类药物是用于治疗II型糖尿病和肥胖症的合成肽类药物。近来，索马鲁肽等GLP-1类药物的需求激增。目前尚无一种方法能够分离并鉴定当前在临床处方中使用的全部GLP-1类药物。在本研究中，我们开发了一种可重现的HPLC-UV/MS方法，能够覆盖市售的多种GLP-1类药物。本研究还展示了该方法分离和鉴定相关杂质的能力。最后，我们证明了与传统不锈钢系统相比，采用MaxPeak™高性能表面(HPS)技术在合成肽分析中的优势。

优势

使用MaxPeak Premier反相色谱柱筛选套件中概述的系统化方案可以成功创建合成肽的分离方法。

PDA峰纯度处理等Empower工具以及ACQUITY™ QDa™生成的质谱数据可以提高杂质鉴定的可信度。

与传统不锈钢系统相比，MaxPeak HPS技术可改善合成肽及其杂质的色谱峰面积、峰高和拖尾现象。

简介

胰高血糖素样肽-1激动剂(GLP-1)是一类合成肽药物，用于治疗和管理肥胖症和II型糖尿病¹。近年来，索马鲁肽等药物在临床试验中取得成功后，作为体重管理疗法迅速风靡市场²。鉴于GLP-1类药物的广泛应用，确保此类药物的质量控制需要依赖于通用、灵敏且可重现的色谱方法。尽管针对部分常见GLP-1类药物已有可用的色谱方法，但据我们所知，目前尚无一种方法能够分离这一合成肽类药物的更新组合³⁻⁶。此外，美国食品药品监督管理局(FDA)近期针对市场上部分合成肽产品发布了特定产品指南(Product Specific Guidelines, PSG)⁷。FDA在报告中强调了合成肽杂质分析的重要性。

在本研究中，我们通过结合Waters™ MaxPeak HPS技术，采用系统化的方法开发方案，开发了一种单一的HPLC-UV/MS方法，用于分析多种GLP-1类药物。先前的研究已证明，该技术可以减轻不良的金属和肽相互作用，从而改善色谱分离参数，例如色谱峰面积计数、拖尾和保留时间重现性^{8,9}。

实验

制备标准储备液

度拉糖肽、艾塞那肽、胰高血糖素、利司那肽和替尔泊肽均购自Selleck Chem（得克萨斯州休斯顿）。利拉鲁肽和索马鲁肽（醋酸盐）购自Cayman Chemical（密歇根州安娜堡）。储备液浓度因溶解度和所购物质的数量而异（表1）。制备过程中考虑了盐因素。有时会通过超声处理来促进标准品溶解于溶液中。

储备液储存于2~8 °C下。鉴于DMSO的物理特性，储备液在冷藏环境下为凝固状态。制备标样之前，将解冻的储备液平衡至环境室温。

标样制备

使用0.1:0.5:99.4三氟乙酸:乙腈:去离子水（标准稀释剂）稀释储备液。混合配制储备液，使所有分析物的浓度均为100 µg/mL（GLP-1药物组）。

此外，还配制了一份仅含胰高血糖素的单标溶液，用于展示聚焦梯度的使用方法及其在优化杂质分离中的应用。该标准品的配制方法为：使用标准稀释剂将各胰高血糖素储备液稀释至750 µg/mL浓度。

数据管理

仪器控制：Empower™ 3.7.0

数据处理：Empower 3.7.0

结果与讨论

使用筛选梯度的分离方法

系统化方法开发方案建议筛选多种色谱柱和反相流动相组合，以确定最合适的条件来优化色谱分离。

根据MaxPeak Premier反相色谱柱筛选套件的定义（表2），研究了四种不同的色谱柱与流动相洗脱液组合。

每组条件的代表性色谱图如图1所示，清楚地展示了不同色谱柱和流动相组合对本研究所用GLP-1药物组的保留性差异。

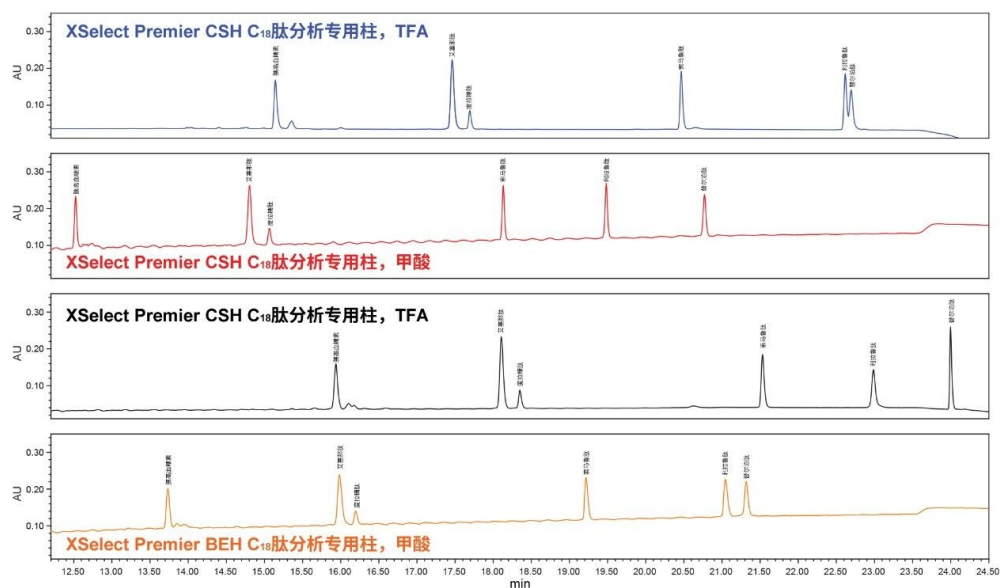


图1.展示了各色谱柱和流动相组合下GLP-1混标保留性与选择性差异的叠加色谱图。

基于筛选实验的结果，我们最终选用XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱搭配甲酸流动相体系作为方法条件，因其整体分析速度与分离度表现最优。同时，该条件能大幅提高胰高血糖素的色谱峰高性能（表3），这也是选择依据之一。

此外，与其他色谱柱和流动相组合相比，XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱可更好地分离胰高血糖素脱酰胺基杂质，如图2所示。胰高血糖素常见的脱酰胺杂质共有四种，均由肽链氨基酸残基的脱氨基作用产生^{4,11}。

使用聚焦梯度分离胰高血糖素杂质

图2显示，使用初始筛选梯度时，胰高血糖素脱酰胺杂质的分离效果较差。为改善这些杂质的分离，我们将聚焦梯度与XSelect Premier CSH C₁₈肽分析专用柱和甲酸流动相体系结合使用，如MaxPeak Premier肽分析反相色谱柱筛选套件中所述。梯度程序详见方法条件部分的梯度表。图3展示了采用优化聚焦梯度分离胰高血糖素及其相关脱酰胺基杂质的结果。

通过PDA检测器和ACQUITY QDa质谱检测器获取的UV与质谱数据（图4a至4c），确认了胰高血糖素及其脱酰胺杂质的峰纯度。

Premier技术与传统不锈钢技术比较

在研究不同色谱柱与流动相组合的过程中，我们考察了采用MaxPeak HPS的Premier色谱柱和系统对GLP-1药物组的影响，并将药物组中部分分析物的结果与传统不锈钢色谱柱和系统进行对比。

使用XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱结合甲酸流动相体系的聚焦梯度分离胰高血糖素及其杂质时，MaxPeak HPS使峰面积增加高达19%，峰高增加高达30%，峰拖尾降低高达36%（图5，表4~6）。

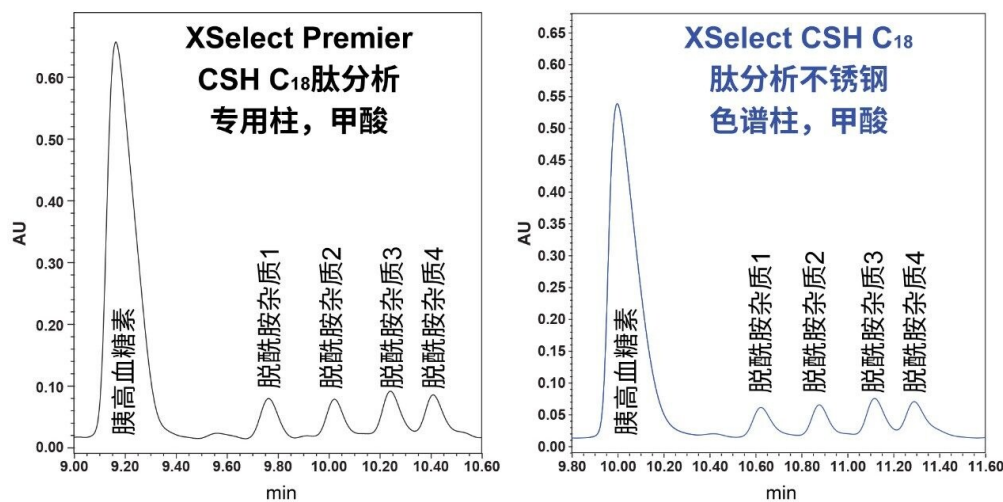


图5.使用MaxPeak HPS技术和传统不锈钢系统分析胰高血糖素及其相关脱酰胺杂质的方法性能代表性色谱图。

色谱柱与洗脱液组合	胰高血糖素	脱酰胺杂质1	脱酰胺杂质2	脱酰胺杂质3	脱酰胺杂质4
XSFA Premier平均峰高	641145.1	60307.2	59454.5	68144.7	60924.2
XSFA不锈钢平均峰高	521724.9	46838.5	48271.1	52229.8	48214.2

表5.两种LC系统对胰高血糖素及其脱酰胺杂质的平均峰高（10次进样）比较。

使用XBridge BEH C₁₈肽分析专用柱与三氟乙酸洗脱液的筛选梯度分离GLP-1药物组混标中的索马鲁肽时，MaxPeak HPS使峰面积增加20%，峰高增加高达30%（图6，表7~8）。

最后，使用XSelect CSH C₁₈肽分析专用柱与三氟乙酸洗脱液的筛选梯度分离GLP-1药物组混标中的利拉鲁肽时，MaxPeak HPS使峰面积增加28%，峰高增加51%，峰拖尾降低13%（图7，表9~11）。

结论

在本应用纪要中，我们展示了如何利用MaxPeak Premier肽分析反相色谱柱筛选套件中概述的系统化方案。该方法开发策略使胰高血糖素样肽(GLP-1)、胰高血糖素及其相关脱酰胺杂质实现了高质量分离。通过UV和MS检测手段，胰高血糖素及其脱酰胺杂质实现了基线分离。利用Empower峰纯度处理工具确定色谱峰的纯度，提供有关脱酰胺杂质与胰高血糖素相关性的信息。采用MaxPeak HPS技术使多种GLP-1检测的色谱峰面积增加高达28%，峰高增加高达51%，峰拖尾降低13%。

参考资料

1. Holz G, Chepurny O. Glucagon-Like Peptide-1 Synthetic Analogs: New Therapeutic Agents for Use in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Current Medicinal Chemistry*. 2003 Nov 1;10(22):2471–83. <
<http://online.uspnf.com>>
2. Magda Sara Wojtara, Mazumder A, Syeda Y, Nikodem Mozgała. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists for Chronic Weight Management. *Advances in medicine*. 2023 Sep 20;2023(Article ID 9946924):1–7.
3. United States Pharmacopeia. Exenatide Injection USP Monograph. online.uspnf.com <
<http://online.uspnf.com>> . 2019.
4. United States Pharmacopeia. Glucagon USP Monograph. online.uspnf.com <<http://online.uspnf.com>> . 2022.
5. Kumar Kuna A, Ganapathi S, Radha G. A Novel RP- HPLC Method Development and Forced Degradation Studies for Semaglutide in Active Pharmaceutical Ingredients and Pharmaceutical Dosage Form. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2019 Apr 15;10(2):865–73.
6. Pedaprolu JN, Bonthu M, Vatchavai B, Kamatham S, Kolli S, Kapuganti AN. A New Stability-Indicating and Validated RP-HPLC Method for the Estimation of Liraglutide in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2016 Dec 8;12(2):31–44.
7. Pang E. Assessing Immunogenicity Risk of Peptides: the Synthetic Peptide Guidance and PSGs SBIA 2022: Advancing Generic Drug Development: Translating Science to Approval Day (1), Session 1A: (Peptide Immunogenicity Risk and Impurity Assessment Considerations) [Internet]. U.S. Food and Drug Administration; 2020 [cited 2023 Nov 6]. 参考网站: <https://www.fda.gov/media/166571/download> <
<https://www.fda.gov/media/166571/download>> .
8. Birdsall R, Kellet J, Ippoliti S, Qing Yu Y. 使用 Waters ACQUITY Premier 解决方案提高“酸性”肽的回收率和色谱性能 [Internet]. www.waters.com. 沃特世公司; 2021年. 参考文件: 720007173ZH. 2021年3月.
9. Bigos P, Birdsall R, Walter T. MaxPeak Premier 解决方案: 运用创新科学技术保障消费者安全 [Internet]. www.waters.com. 沃特世公司; 2021年. 参考文件: 720008054ZH <
<https://www.waters.com/nextgen/global/library/library-details.html?documentid=720008054>> .

10. MaxPeak Premier Peptide Reversed-Phase Column and Method Screening Kit: Practical Steps in Developing Robust Peptide Separations Available from [720008131](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720008131en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720008131en.pdf>> .
11. Bao Z, Cheng YC, Luo MZ, Zhang JY. Comparison of the Purity and Impurity of Glucagon-for-Injection Products under Various Stability Conditions. Scientia Pharmaceutica [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Nov 10];90(2):32. 参考网站: <https://www.mdpi.com/2218-0532/90/2/32> <<https://www.mdpi.com/2218-0532/90/2/32>> .

特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720008267ZH, 2024年3月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号