

# 生物惰性液相结合尺寸排阻色谱法分析多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质

LC-336

**摘要：** 本文采用岛津生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种检测多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体杂质的新方法。优选的洗脱液和 SEC 色谱柱可以实现多肽主成分、共价结合二聚体和非共价结合二聚体的有效分离，分离度大于 1.5。连续六次进样，三个目标峰保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）分别在 0.024~0.025% 和 0.048~0.130% 之间，重复性良好。多肽药物强制性降解实验样品中检出非共价结合二聚体，峰面积百分比为 6.934%。

**关键词：** 生物惰性液相 尺寸排阻色谱法 多肽药物 共价结合聚集体 非共价结合聚集体

多肽药物在受到加热、冷冻、搅拌等外力作用时可能发生结构改变，产生聚集体。多肽聚集现象可能会降低药物活性，改变半衰期及增加免疫原性。多肽药物中聚集体杂质的分析是多肽药物开发过程中备受关注的环节，意义重大。

多肽药物中的聚集体有可能是通过二硫键、酯或酰胺键等化学键连接而形成的共价结合聚集体，也可能是通过氢键、疏水相互作用或静电引力等非特异性相互作用形成的非共价结合聚集体。其中共

价结合聚集体结构相对稳定，研究得较多；非共价结合的聚集体分析难度更大，研究得较少，因为非特异性相互作用力很弱，容易受到聚集体与尺寸排阻色谱柱间存在的相互作用力影响，而导致聚集体状态发生改变。

本文采用生物惰性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种检测多肽药物中共价结合二聚体和非共价结合二聚体的新方法，方法分离度好、稳定可靠，供相关检测人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津生物惰性超高效液相色谱系统 Nexera XS inert。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40lite	脱气机：	DGU-405
输液泵：	LC-40D XSi	自动进样器：	SIL-40C XSi
柱温箱：	CTO-40C	检测器：	SPD-M40
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.111		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	SHIMSEN Ankylo SEC-120 (300 × 7.8 mm I.D., 3.0 μm) 岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 380-01215-41		
洗脱液：	100 mM 硫酸铵水溶液（含 20% 乙腈和 0.1% TFA）		
洗脱方式：	等度洗脱	流速：	0.5 mL/min
洗脱时间：	35 min	进样体积：	20 μL
柱温：	35°C	检测波长：	220 nm

### 1.3 样品前处理

共价结合二聚体、非共价结合二聚体、多肽药物非破坏样品和通过强制降解实验得到的破坏样品，使用洗脱液适当稀释后上机分析。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 分离度评价

使用优选的洗脱液和色谱柱组合，按照 1.2 分析条件，通过非破坏多肽药物样品中添加共价结合二聚体和非共价结合的二聚体，以评价分离度。色谱图和分离结果分别见图 1 和表 1，三个目标峰分离度大于 1.5，分离良好。

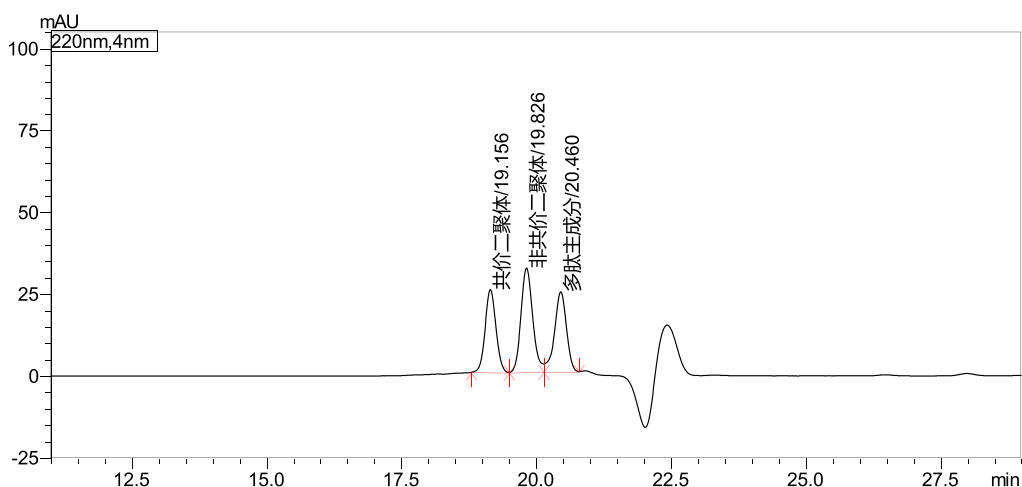


图 1 多肽主成分、非共价结合二聚体和共价结合二聚体的分离色谱图

表 1 分离度结果

#	目标物名称	保留时间 (min)	分离度 (USP)
1	共价结合二聚体	19.150	-
2	非共价结合二聚体	19.820	1.710
3	多肽主成分	20.456	1.560

### 2.2 重复性考察

以“2.1 分离度评价”用样品，重复进样 6 次，考察重复性。6 次重复进样重叠色谱图见图 2。三个目标峰保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.024~0.025 % 和 0.048~0.130 % 之间，重复性良好。

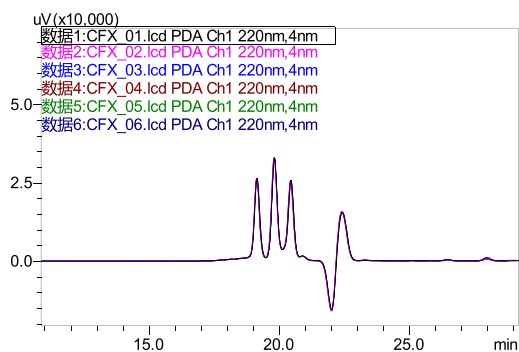


图 2 重叠色谱图 (n=6)

表 2 重复性结果 (n=6)

目标物名称	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
共价结合二聚体	0.025	0.130
非共价结合二聚体	0.024	0.048
多肽主成分	0.024	0.126

### 2.3 破坏样品分析结果

破坏样品色谱图和分析结果如图 3 和表 3 所示。样品中检测到非共价结合二聚体杂质，峰面积百分比为 6.934%，未检测到共价结合二聚体。

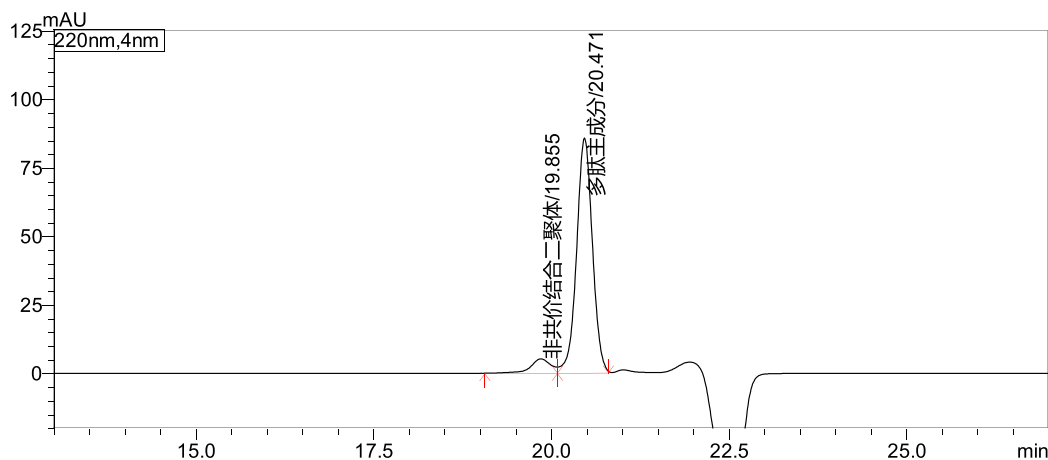


图 3 破坏样品色谱图

表 3 破坏样品分析结果

名称	保留时间	峰面积	峰面积 %
非共价结合二聚体	19.855	98529	6.934
多肽主成分	20.471	1322445	93.066

### ■ 结论

使用岛津生物惰性液相色谱系统结合尺寸排阻色谱，建立了多肽药物中非共价结合二聚体和共价结合二聚体杂质检测的新方法。生物惰性液相系统可耐受高盐洗脱液，优选的岛津尺寸排阻色谱柱 SHIMSEN Ankylo SEC-120 和洗脱液组成可最大程度地减少聚集体杂质和色谱柱之间的非特异性作用，获得良好的分离和分析稳定性。本方法分离度好、重复性好，适用于多肽药物中非共价结合二聚体和共价结合二聚体杂质含量测定和评估。

岛津应用云

