

生物兼容性液相结合尺寸排阻色谱法分析司美格鲁肽制剂中聚集体

LC-431

摘要： 本文采用岛津生物兼容性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种检测司美格鲁肽注射液制剂中聚集体的方法。优选的流动相条件和 SEC 色谱柱可以实现司美格鲁肽主成分、聚集体和制剂中抑菌剂的有效分离，分离度均大于 2.5。连续六次进样，司美格鲁肽保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）在 0.044% 以内，重复性良好。

关键词： 生物兼容性液相 尺寸排阻色谱法 司美格鲁肽 聚集体

技术特点：

- ❖ 样品前处理简单，采用尺寸排阻色谱法，对多肽类药物中聚集体进行分离分析。
- ❖ 分析速度快、稳定性高，非常适用于制药相关行业对多肽类药物的分析检测工作。

多肽药物是由 2 个到 50 个氨基酸残基通过肽键连接而成的生物大分子，可以在生物体内执行多种生理或药理功能，具有高特异性和低毒性等特点。然而多肽药物在外部因素的作用下，如温度变化、机械剪切等，容易发生结构变化和聚集现象^[1]。这种聚集现象可能会改变多肽的生物活性、影响药物稳定性，甚至是产生免疫原性，引起免疫系统的反应^[2]。因此在多肽药物开发过程中，需要特别关注聚集体杂质的分析，以确保药物的安全性、有效性和稳定性。

司美格鲁肽是一款胰高血糖素样肽 -1（GLP-1）受体激动剂，适应症为 2 型糖尿病的血糖控制以及成人肥胖 / 超重的体重管理^[3]。司美格鲁肽注射液中除了主要成分司美格鲁肽之外，还包括磷酸盐、盐酸、氢氧化钠和苯酚等辅料，其中，苯酚被用作抑菌剂。

本文采用生物兼容性液相系统结合尺寸排阻色谱法，开发了一种检测司美格鲁肽制剂中聚集体的方法，该方法分离度好、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兼容性高效液相色谱系统 Nexera Bio 具体配置为：

系统控制器：	CBM-20	脱气机：	DGU-20A 5R
输液泵：	LC-20AD XR	自动进样器：	SIL-20AC XR
柱温箱：	CTO-20A	检测器：	SPD-20A
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.120		

1.2 分析条件

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		
流动相：	详见下方“结果与讨论”部分		
洗脱方式：	等度洗脱	流速：	流速
洗脱时间：	30 min	进样体积：	进样体积
柱温：	30°C	检测波长：	检测波长

1.3 样品前处理

取司美格鲁肽注射液，直接上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 流动相中乙腈含量对分析结果的影响

首先我们探究了在 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200mM 氯化钠，pH 6.8）中添加不同比例乙腈对样品分离的影响。从图 1 可以看出，在不添加乙腈的情况下，司美格鲁肽峰展宽严重且峰高低，几乎不可见；随着乙腈比例的提高，司美格鲁肽峰宽逐渐变窄且峰高相对较高，但是在过高比例有机相条件下多肽中氢键会发生破坏，疏水键削弱，还会降低介电常数，使分子内斥力增加，造成肽链伸展、变性，因此我们最终选择 20% 乙腈添加量。在这种流动相条件下，司美格鲁肽二聚体和单体峰分离效果较好，但是单体峰有“前延”现象（图 2）。

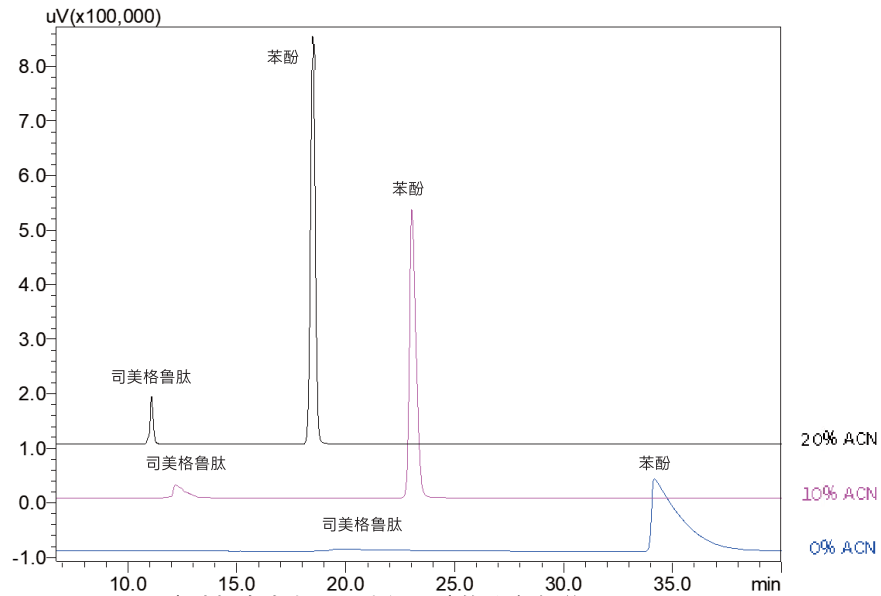


图 1 流动相中含有不同比例乙腈的分离色谱图

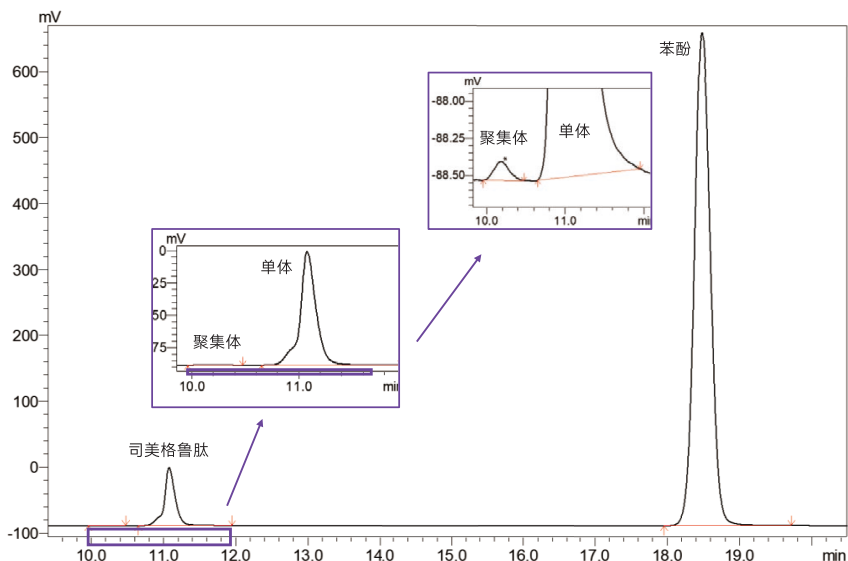


图 2 流动相中含 20% 乙腈的分离色谱图

2.2 流动相中精氨酸含量对分析结果的影响

据文献报道，在流动相中添加一定浓度精氨酸可以改善多肽和蛋白类物质的峰型，改善分离效果^[4]。随后我们在 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200mM 氯化钠、20% 乙腈，pH 6.8）流动相中添加了不同浓度的精氨酸，分别为 5 mM、10 mM 和 20 mM。图 3 结果显示，加入精氨酸后单体峰的峰型得到明显的改善，但同时我们观察到基线波动随着精氨酸浓度的升高而增大；综合考虑以上因素，最终确定在流动相中加入 5mM 精氨酸。

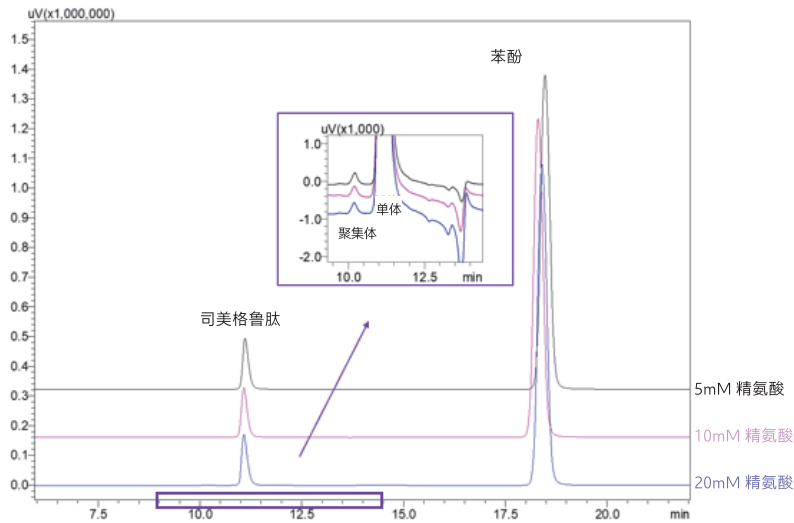


图 3 流动相中含有不同浓度精氨酸的分离色谱图

2.3 优选条件下分离度评价

使用 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200 mM 氯化钠、5 mM 精氨酸和 20% 乙腈，pH 6.8）作为流动相，按照 1.2 分析条件，以评价分离度；同时与未优化的流动相（50 mM 磷酸盐水溶液（含 200 mM 氯化钠、20% 乙腈，pH 6.8））进行峰型对比，色谱图和分离结果分别见图 4 和表 1，司美格鲁肽与聚集体分离度大于 1.5，分离良好。

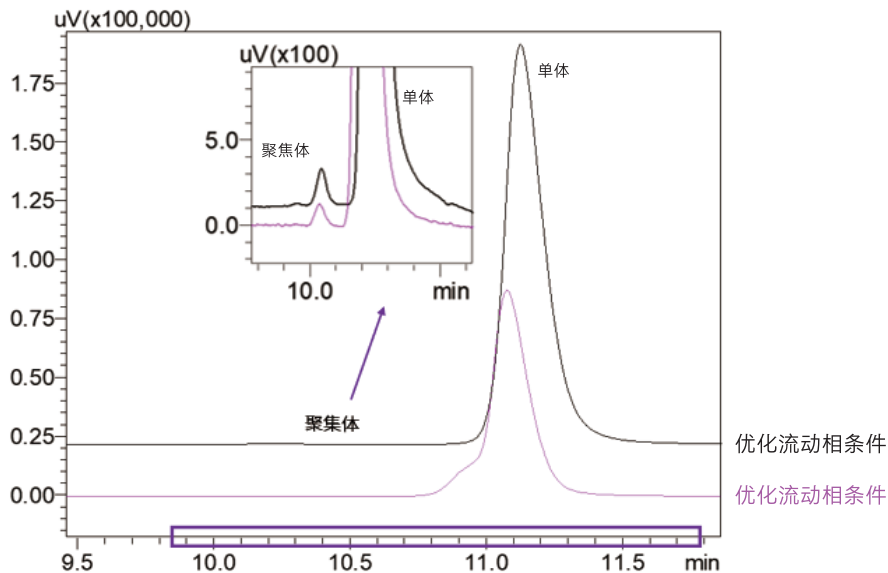


图 4 优化前后分离色谱图

表 1 优选条件分离度结果

#	目标物名称	保留时间 (min)	分离度 (USP)
1	司美格鲁肽聚集体	10.232	-
2	司美格鲁肽单体	11.137	2.921
3	苯酚	18.543	20.526

2.4 优选条件下重复性考察

将司美格鲁肽注射液重复进样 6 次，考察仪器重复性（图 5）。司美格鲁肽及其聚集体保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）分别在 0.022~0.044 % 和 0.035~0.457 % 之间，重复性良好。

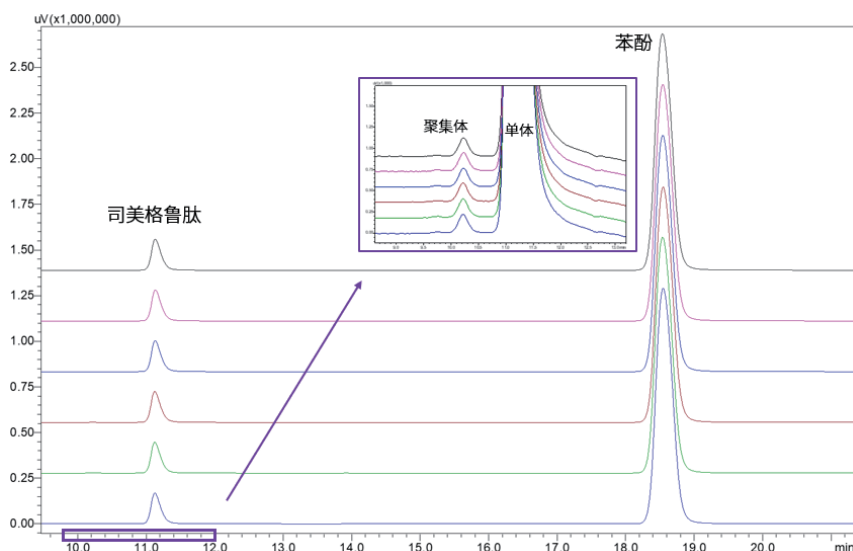


图 5 优选条件下重复性色谱图 (n=6)

表 2 优选条件下重复性结果

#	目标物名称	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	司美格鲁肽二聚体	0.044	0.457
2	司美格鲁肽单体	0.035	0.035
3	苯酚	0.022	0.201

■ 结论

使用岛津生物兼容性液相色谱系统结合尺寸排阻色谱，建立了多肽药物制剂中聚集体杂质分析方法。优选的岛津尺寸排阻色谱柱 SHIMSEN Ankylo SEC-120 和流动相 50 mM 磷酸盐水溶液（含 200 mM 氯化钠、5 mM 精氨酸和 20% 乙腈，pH 6.8）作为流动相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，获得良好的分析稳定性。本方法分离度高、重复性好，适用于多肽药物中聚集体杂质的测定。

参考文献

- [1]. Zapadka KL, Becher FJ, Gomes Dos Santos AL, Jackson SE. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus*. 2017;7(6):20170030. doi:10.1098/rsfs.2017.0030
- [2]. Fernandez L, Bustos RH, Zapata C, Garcia J, Jauregui E, Ashraf GM. Immunogenicity in Protein and Peptide Based-Therapeutics: An Overview. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(10):958-971. doi:10.2174/1389203718666170828123449
- [3]. Chao AM, Tronieri JS, Amaro A, Wadden TA. Semaglutide for the treatment of obesity. *Trends Cardiovasc Med*. 2023;33(3):159-166. doi:10.1016/j.tcm.2021.12.008
- [4]. Gupta MN, Uversky VN. Biological importance of arginine: A comprehensive review of the roles in structure, disorder, and functionality of peptides and proteins. *Int J Biol Macromol*. 2024;257(Pt 1):128646. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.128646

岛津应用云

