

Vanquish Duo 多中心二维在线除盐串联高分辨质谱对司美格鲁肽药物杂质进行鉴定

杨艳 张劭阳 祝翔 冉良骥

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键字： 司美格鲁肽原料药，Vanquish Duo，多中心 2D-LC，Orbitrap Exploris 120

1. 前言

化学合成多肽是介于小分子化学药物和蛋白质药物之间的一类药物，与小分子化学药物相比，其在制备工艺、结构确证和质量研究等方面均具有特殊性。多肽药物的工艺杂质一般包括氨基酸缺失、取代或插入肽、截断肽、异构体等；降解杂质一般包括乙酰化杂质、脱酰胺杂质、二硫键错配杂质、氧化杂质、消旋体、 β -消除杂质、低聚物等。欧洲药典将多肽药物相关杂质的报告限、鉴定限和界定限分别规定为 0.1%、0.5% 和 1.0%。FDA 规定多肽类化学仿制药（胰高血糖素、利拉鲁肽、奈西立肽、特立帕肽和替度鲁肽）的鉴定限和界定限分别为 0.1% 和 0.5%，其他多肽药物遵循具体问题具体分析的原则^[1]。2023 版《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则（试行）》规定多肽相关杂质的报告限、鉴定限和质控限为 0.1%、0.5% 和 1.0%。若发现多肽药物杂质存在安全隐患，应适当收紧杂质限度要求。

司美格鲁肽，结构见图 1^[2]，是一种长效的胰高血糖素样肽-1（glucagon like peptide-1, GLP-1）受体激动剂，适应症有糖尿病、糖尿病肾病及肥胖等。司美格鲁肽现有的合成工艺分

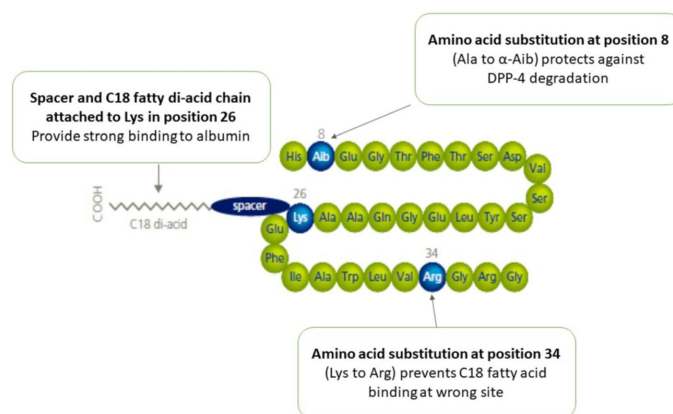


图1 司美格鲁肽结构

两类，一类是原研选择的生物发酵结合化学合成的方法完成成品的制备；一类是多肽固相合成以及片段缩合的合成方法。多肽合成工艺过程产生的杂质如氨基酸缺失、取代或插入肽、截断肽等，这些杂质与目标多肽的性质接近，给常规反相色谱的分离带来挑战。司美格鲁肽及其相关杂质的反相液相色谱分离使用酸性磷酸氢二铵作为流动相，而磷酸氢二铵是质谱不兼容的流动相。

二维液相（2D-LC）是一种不改变一维液相分离度且能在线对杂质和目标多肽进行高效鉴定的途径。多中心切割 2D-LC 可以实现一针样品在线切割多个杂质，然后通过二维泵依次冲洗到二维色谱柱中进行除盐、洗脱和质谱鉴定，图 2 为仪器流路图。

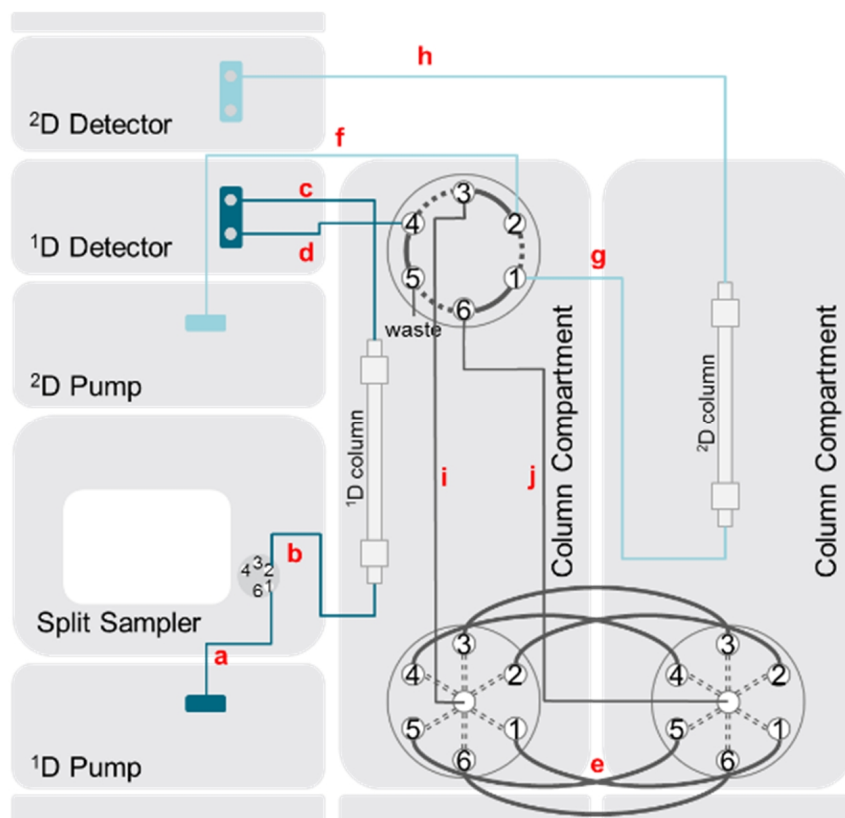


图2 多中心2D-LC串联高分辨质谱仪器流路图（e为loop）

2. 实验方法

2.1 仪器

Thermo Fisher Vanquish Duo 多中心二维液相色谱仪串联高分辨质谱 Orbitrap Exploris 120

泵：Binary Pump F（P/N:VF-P10-A）

Binary Pump F（P/N:VF-P10-A）

自动进样器：Split Sampler FT（P/N:VF-A10-A）

柱温箱：Column Compartment H（P/N:VH-C10-A）

Column Compartment H（P/N:VH-C10-A）

VWD 检测器：Variable Wavelength Detector F（P/N:VF-D40-A）

质谱检测器：Orbitrap Exploris 120（P/N BRE725531）

2.2 试剂

磷酸二氢铵（HPLC 级，CNW）、异丙醇（HPLC 级，Merck）、乙腈（LC-MS 级，Fisher）、甲酸（LC-MS 级，CNW）、去离子水（18.2 MΩ，Millipore 纯水机）。

2.3 样品信息

司美格鲁肽固体粉末，来自客户企业。称取适量样品用超纯水溶解至 1.35 mg/mL

2.4 色谱条件

表1 一维色谱条件

参数	具体信息	
色谱柱	Hypersil gold peptide 2.1*150 mm 1.9 μm	
流动相	A:80 mM 磷酸二氢铵 pH3.6; 乙腈（9:1）	
	B: 乙腈：异丙醇：水（3:1:1）	
流速	0.2 mL/min	
进样量	2 μL	
梯度	时间（min）	B%
	0	46
	5	62
	27	62
	36	90
	38	90
	39	46
	45*	46
柱温	30℃（Still air）	
自动进样器	8℃	
UV检测波长	210 nm	

* 若一维和二维一起运行，一维的运行时间根据二维适当延长

二维单个 loop 运行时间见表 2，若是分别将 5 个 loop 中的馏分依次进到二维分析，则需要将表 2 的梯度进行 5 次循环。

表2 二维色谱条件

参数	具体信息	
色谱柱	Hypersil gold C8 2.1*50 mm 1.9 μm	
流动相	A:0.1% 甲酸 - 水	
	B:0.1% 甲酸 - 乙腈	
流速	0.3 mL/min	
梯度	时间（min）	B%
	0	5
	5	5
	15	95
柱温	50℃（Still air）	

表3 质谱参数

扫描参数	
质谱扫描方式	数据依赖扫描
分辨率	一级120k；二级15k
扫描范围	一级200-3000；二级 Auto
HCD碎裂能量（NCE）	24,27,30
离子源参数	
鞘气	40
辅助气	10
吹扫气	0
离子传输管温度	320℃
雾化温度	350℃

3. 实验结果

3.1 一维方法重复性

本文采用 Hypersil gold peptide 小粒径色谱柱和 Vanquish Flex 超高效液相对司美格鲁肽原料药进行纯度分析，连续进样 3 次，色谱结果重复性好，见图 3 和表 4。

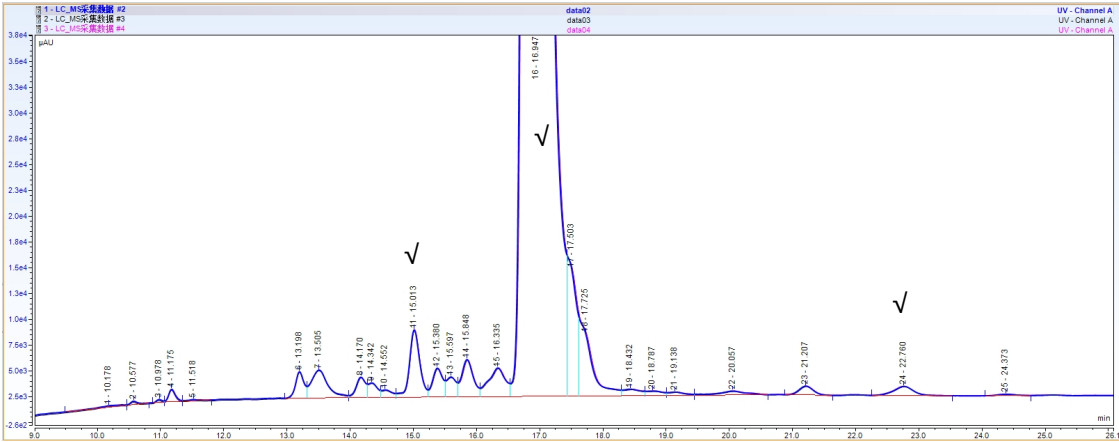


图3 司美格鲁肽3针一维纯度分析结果叠图

表4 连续进样3次的峰（图3 “√” 的3个色谱峰）保留时间和峰面积RSD

	主峰前	主峰	主峰后
保留时间 RSD	0.02%	0.05%	0.04%
峰面积 RSD	0.29%	0.32%	0.31%

3.2 多中心 2D-LC-MS 鉴定

面积归一法进行峰面积计算，对于图 4 中含量远低于 0.1% 的峰 peak1，分别进行 5 次在线 loop 富集，考察在线富集效果。peak1 未在线富集进行二维除盐后的质谱图见图 5 的 A 和 C，C 为质荷比 1032 处放大；peak1 进行在线富集 5 次后进行二维除盐后的质谱图见图 5 的 B 和 D，D 为质荷比 1032 处放大，可以看出在线富集效果显著，质谱图的响应达到 2.4E⁵，可以进行有效数据解析。peak1 单同位素分子量 4125.1021 Da, 在线富集 5 次后的二级碎片离子覆盖度见图 6。

图 4 中含量高于 0.1% 的 peak2-peak11 及主峰，进行直接在线除盐和质谱鉴定。图 7 和图 8 展示主峰前的 peak2 和 peak3 的质谱定性结果。通过上述方法结合 Thermo BioPharmaFinder5.3 软件鉴定该司美格鲁肽的杂质有氧化肽、酰胺化肽、缺失肽等。

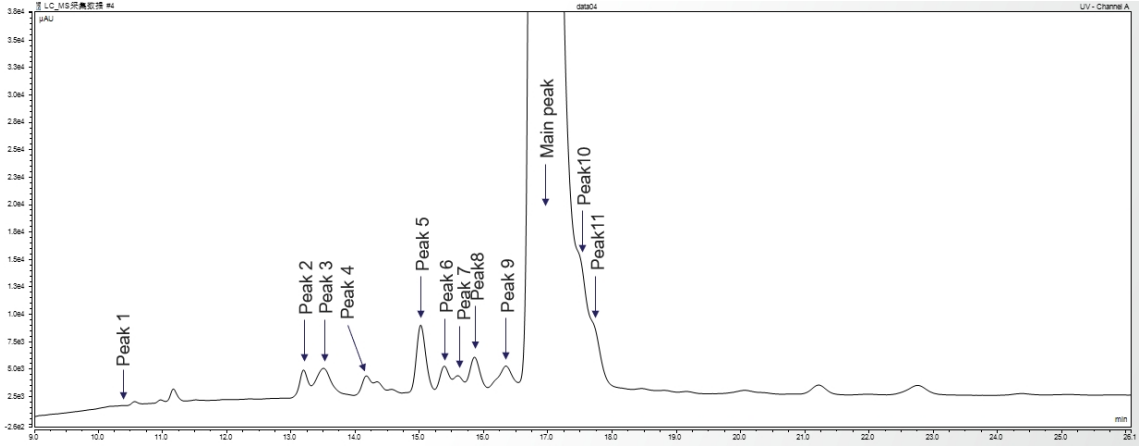


图4 多中心2D-LC-MS鉴定的峰

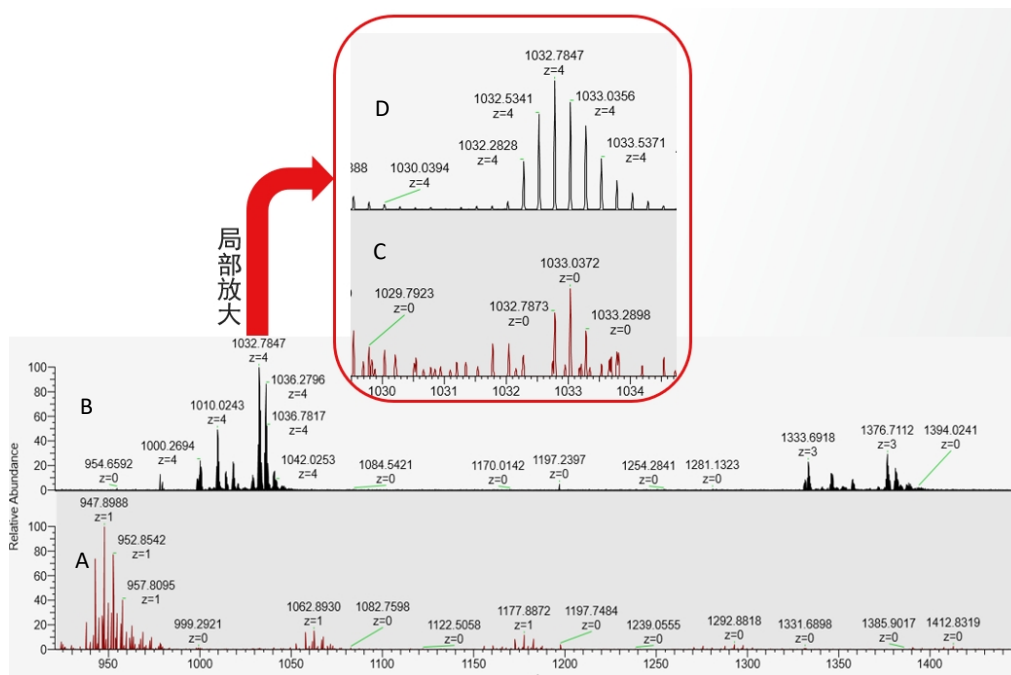


图5 未富集的peak1的质谱图和5次进样在线富集到loop后的质谱图

Fragment Coverage Map

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG (A2+CH2) (K20+729.40550) (4+)

Average Structural Resolution = 1.1 residues

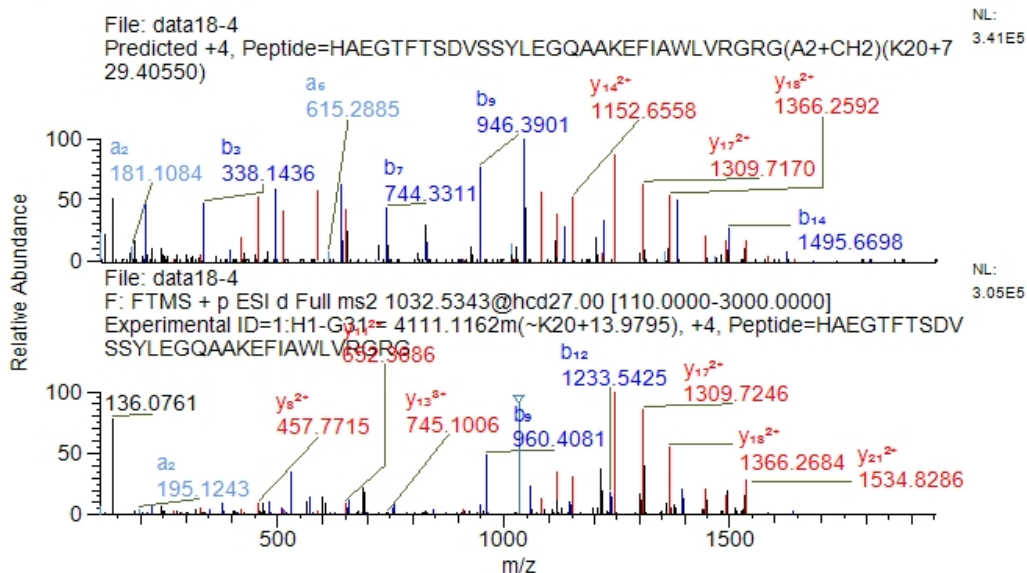
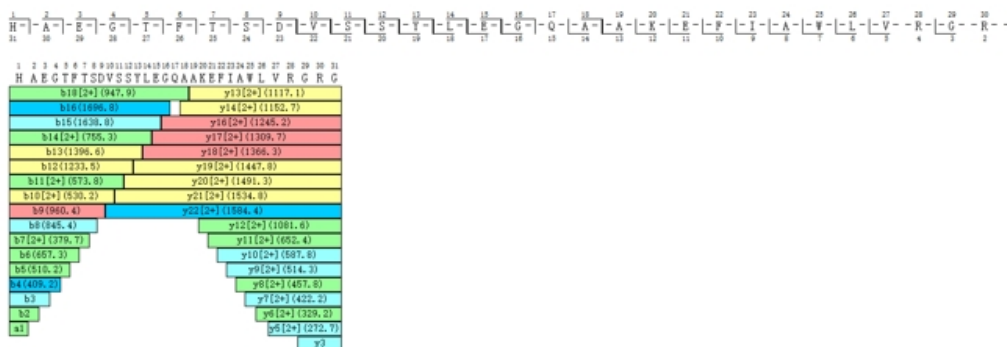


图6 5次富集后的peak1 (4125.1021 Da) 的二级碎片离子覆盖度

Fragment Coverage Map

HAEGTFTSDVSSYLEGQAQKEFIW (A2+CH2) (K20+SMGLTSidechain) (3+)

Average Structural Resolution = 1.0 residues

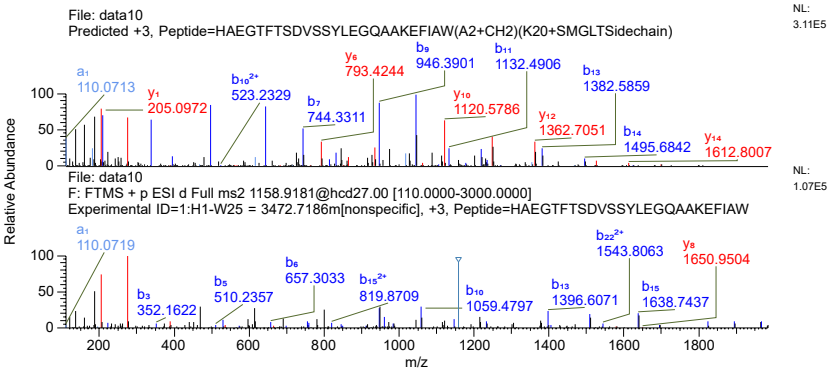
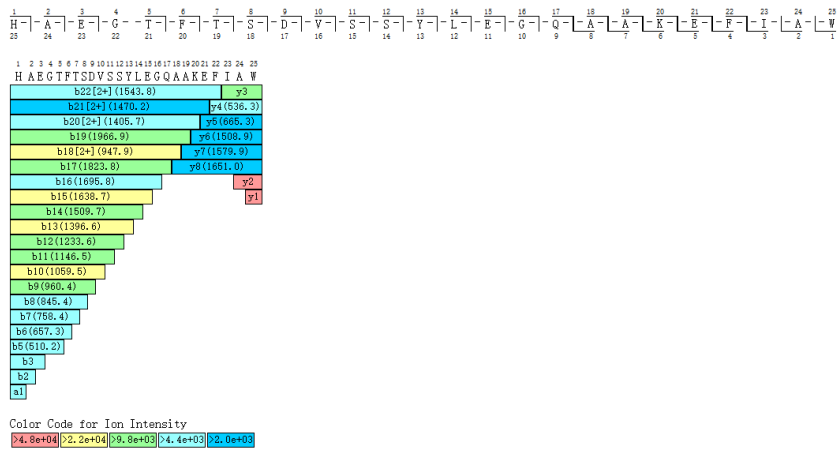


图7 peak2 (分子量为单同位素峰为3472.7290 Da的缺失肽杂质) 的二级碎片离子覆盖度

Fragment Coverage Map

HAEGTFTSDVSSYLEGQAQKEFIWLVGRG (A2+CH2) (K20+SMGLTSidechain) (W25+Oxidation) (5+)

Average Structural Resolution = 1.1 residues

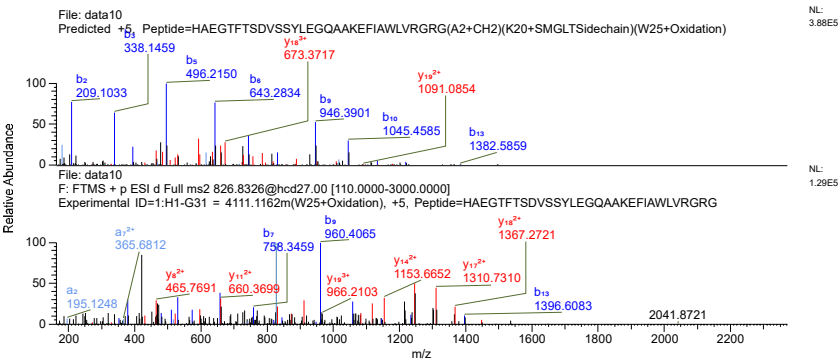
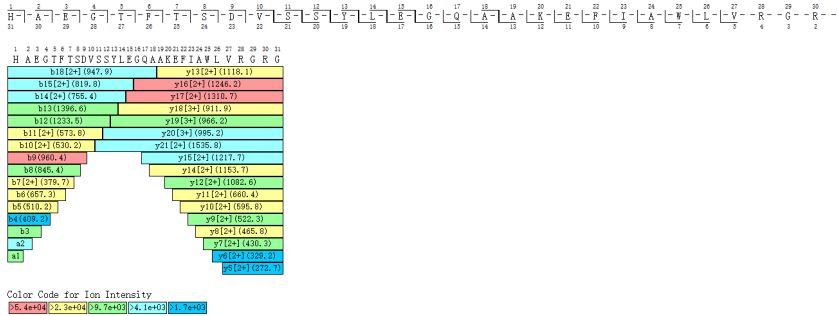


图8 peak3 (分子量为单同位素峰为4127.1172 Da的氧化肽杂质) 的二级碎片离子覆盖度

4. 结论

- 1、利用 Hypersil gold peptide 专用色谱柱和超高效液相色谱 Vanquish Flex 能对该司美格鲁肽原料药的纯度进行较好的分离，且重复性好。
- 2、多中心 2D-LC-MS 对含量非常低的 peak1 进行在线富集再除盐进质谱响应，比未富集的 peak1 的质谱响应明显提高。未富集的 peak1 的质谱数据质量没法进行解析。通过此在线富集方式，可以提高至少 5 倍的检测灵敏度，该方法对于低含量的物质的鉴定，具有很好的借鉴价值。
- 3、本方法对于含量不低于 0.1% 的杂质和主峰进行至少一次实验可以切割 5 个馏分，然后依次在线除盐进质谱鉴定，鉴定出该司美格鲁肽具有杂质：W25 氧化肽、E21 酰胺化肽、缺失肽等。多中心 2D-LC 方法相比较传统的单中心 2D-LC 方法效率提高 5 倍。
- 4、借助变色龙软件 eWorkflow 的优势，该方法可以便捷地转移到各种多肽类药物、小分子药物、生物药等 2D-LC-MS 的杂质鉴定。

参考文献：

- [1] 姜喜凤, 胡玉玺, 章俊麟.《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则（试行）》解读 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023(09).
- [2] Sanjay Kalra, Rakesh Sahay. A review on semaglutide: an oral glucagon-like peptide 1 receptor agonist in management of type2 diabetes mellitus [J]. 2020.06.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

thermo scientific