

· 技术方法 ·

索马鲁肽原料中 N-羟基琥珀酰亚胺残留量 反相高效液相色谱检测方法的 建立及验证

杨庆¹, 马鲁南¹, 刘忠¹, 张贵民²

1. 山东新时代药业有限公司 山东省蛋白类药物工程实验室, 山东 临沂 273400;

2. 鲁南制药集团股份有限公司 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室, 山东 临沂 276006

摘要: **目的** 建立检测索马鲁肽原料中 N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxy succinimide, NHS)残留量的反相高效液相色谱(reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)法, 并进行验证。**方法** 筛选色谱柱并优化流动相条件(磷酸盐浓度与有机相比比例), 建立检测索马鲁肽原料中 NHS 残留量的 RP-HPLC 法, 并验证方法的专属性、适用性、准确度、重复性和稳定性, 确定线性范围及定量限、检测限。用建立的方法检测 3 批索马鲁肽中 NHS 含量。**结果** 确定的色谱条件如下: 色谱柱为 CAPCELL PAK ADME(4.6 mm × 150 mm, 3 μm); 流动相 A 为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈(98:2), 流动相 B 为 70% 乙腈溶液; 洗脱梯度为 0 min 0% B, 10 min 0% B, 19 min 90% B, 19.1 min 0% B, 25 min 0% B; 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 260 nm; 柱温为 30 °C。建立的方法在 0.2 ~ 3.0 μg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系, $R^2 = 1.0000$, 检测限和定量限分别为 4.8 和 9.6 ng; 专属性、系统适用性良好; 3 种不同浓度 NHS 加样样品回收率的相对标准偏差(RSD)为 0.58%, 准确度良好; 6 份供试品溶液中 NHS 含量的 RSD 为 0.16%, 重复性良好; 室温放置 0、4、8、12、16、20 和 24 h NHS 峰面积的 RSD 为 0.34%, 稳定性良好。3 批索马鲁肽中均未检出 NHS。**结论** 建立的 RP-HPLC 法简单、灵敏度高, 可用于索马鲁肽原料中 NHS 含量的测定。

关键词: 反相高效液相色谱法; N-羟基琥珀酰亚胺; 索马鲁肽

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2023)01-0085-04

Development and validation of reverse phase-high performance liquid chromatography for determination of residual N-hydroxy succinimide content in semaglutide

YANG Qing*, MA Lu-nan, LIU Zhong, ZHANG Gui-min

*Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Shandong Provincial Engineering Laboratory of
Protein Pharmaceutical, Linyi 273400, Shandong Province, China

Corresponding author: ZHANG Gui-min, E-mail: lunanzhangguimin@163.com

Abstract: **Objective** To develop and validate a reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for determination of residual N-hydroxy succinimide (NHS) content in semaglutide. **Methods** A RP-HPLC method was developed based on the screening of chromatographic column and optimization of mobile phase (phosphate concentration and the ratio of acetonitrile), validated for specificity, suitability, accuracy, reproducibility and stability, and determined for linear range, limit of quantitation (LOQ) and limit of detection (LOD). The NHS contents in three batches of semaglutide were determined by the developed method. **Results** The optimal condition for RP-HPLC was as follows: CAPCELL PAK ADME column (4.6 mm × 150 mm, 3 μm) was adopted, serving 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile (98:2) as mobile phase A, and 70% acetonitrile as mobile phase B with gradient elution (0 min, 0% B; 10 min, 0% B; 19 min, 90% B; 19.1 min, 0% B; 25 min, 0% B) at a flow rate of 0.8 mL/min. The detection wave length was set at 260 nm, while the column temperature was 30 °C. The developed method showed good specificity and systemic suitability, of which the linear range was 0.2 ~ 3.0 μg/mL ($R^2 = 1.0000$), while the LOD and

基金项目: 山东省重点研发计划(2019JZZY010516).

通信作者: 张贵民, E-mail: lunanzhangguimin@163.com

LOQ were 4.8 and 9.6 ng respectively. The *RSD* of recovery rates of NHS samples at three concentrations was 0.58%, indicating a high accuracy. The *RSD* of NHS contents in six test samples was 0.16%, indicating a high reproducibility. The *RSD* of peak areas of NHS after storage at room temperature for 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h was 0.34%, indicating a high stability. No NHS was detected in three batches of semaglutide by the developed method. **Conclusion** The developed RP-HPLC method is simple and sensitive, which may be used for the determination of NHS content in semaglutide.

Keywords: Reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC); N-hydroxy succinimide; Semaglutide

糖尿病严重威胁人类健康,2019 年全球 20 ~ 79 岁糖尿病患者约 4.63 亿,预计 2045 年将增长至 7 亿,其中 II 型(非胰岛素依赖型)糖尿病患者占患者总数的 90% 以上^[1]。研究发现,胰高血糖素样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1) 在 II 型糖尿病的治疗上效果显著,能够在较低副作用的前提下降低血糖水平,但其在体内的半衰期非常短,极易被清除^[2-5]。因此,研究人员开发了多种长效的 GLP-1 类似物,包括利拉鲁肽 (liraglutide)、杜拉鲁肽 (dulaglutide)、索马鲁肽 (semaglutide) 等,其中利拉鲁肽和索马鲁肽均是通过氨基酸替换和脂肪酸链修饰技术来达到长效^[6-7]。随着口服索马鲁肽的上市,其应用将越来越广泛^[8-12]。

索马鲁肽在结构上将 GLP-1 (7-37) 链上第 8 位丙氨酸替换为 α -氨基异丁酸,第 34 位赖氨酸被精氨酸取代,第 26 位赖氨酸进行了酰化修饰。酰化剂结构中包含 2 个 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸基团,1 个 γ -谷氨酸基团,1 个 1,18-十八烷脂肪二酸^[13]。在酰化反应过程中,修饰剂中的 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 作为离去基团,成为索马鲁肽原料中的一个工艺杂质。《中国药典》三部(2020 版)明确指出^[14],生物制品应对工艺相关杂质进行控制,而且 NHS 毒理学作用尚不明确,因此有必要对其进行深入研究,并对其在产品中的残留量进行控制。

有文献报道采用分子排阻色谱法测定聚乙二醇化重组人干扰素 $\alpha 2b$ 注射液中 NHS 含量^[15]。分子排阻色谱法是根据样品的分子大小进行分离,NHS 的分子量较小,与样品中常用的缓冲盐分子量非常接近,因此,在检测时易造成干扰。本文建立了测定索马鲁肽原料中 NHS 残留量的反相高效液相色谱法 (reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC),并对方法进行验证,以期避免缓冲盐干扰。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 NHS 购自美国 Sigma-Aldrich 公司(批号:MKBG2519V,含量 98.0%);索马鲁肽原料药为山东新时代药业有限公司自制(批号:F027-

201203、F027201204、F027201205);乙腈(色谱纯)购自德国 Merck 公司;磷酸二氢钾(分析纯)购自西陇科学股份有限公司;U3000 高效液相色谱仪购自美国 Thermo Fisher 公司;CAPCELL PAK ADME 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μ m) 购自日本 OSAKA SODA 公司;Symmetry Shield RP8 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μ m) 购自美国 Waters 公司;Jupiter C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μ m) 购自美国 Phenomenex 公司。

1.2 色谱条件的优化

1.2.1 色谱柱 分别采用 Symmetry Shield RP8、Jupiter C18 及 CAPCELL PAK ADME 色谱柱,流动相 A 为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈 (98 : 2),流动相 B 为 70% 乙腈溶液。考察不同色谱柱对 NHS 检测的影响。

1.2.2 流动相 配制不同浓度磷酸二氢钾 (0.02、0.05 和 0.1 mol/L),并调整流动相中磷酸盐溶液与乙腈比例 (90 : 10、95 : 5 和 98 : 2)。考察不同盐浓度和不同有机相比对 NHS 检测的影响。

1.3 方法的验证

1.3.1 专属性 取 NHS,用水稀释至 10 μ g/mL,作为对照品储备液,稀释 2 倍作为 NHS 对照品溶液;取索马鲁肽原料样品 (F027201203 批),用水稀释至 2.0 mg/mL,作为供试品储备液,将供试品储备液与 NHS 对照品储备液按 1 : 1 (v : v) 比例混匀,作为混合样品溶液。取水、NHS 对照品溶液及混合样品溶液,按优化后的色谱条件进行检测,记录色谱峰保留时间。

1.3.2 系统适用性 取 NHS 对照品储备液,用水稀释至 1.0 μ g/mL,作为系统适用性溶液,按优化后的色谱条件进行检测,连续测定 6 次,计算主峰理论塔板数和拖尾因子,记录主峰保留时间和峰面积,并计算其相对标准偏差 (*RSD*)。

1.3.3 线性范围 取 NHS 对照品储备液,用水分别稀释至 3.0、2.0、1.0、0.6、0.4、0.2 μ g/mL,按优化后的色谱条件进行检测,记录主峰峰面积。以 NHS 对照品储备液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算相关系数。

1.3.4 准确度 分别取供试品溶液 8 mL 置量瓶中,分别加入 NHS 对照品储备液 1.0、0.6、0.4 mL,加水定

容至刻度,摇匀,制成浓度为 1.0、0.6、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的加样回收率样品,每个浓度平行操作 3 次,按优化后的色谱条件进行检测。

1.3.5 定量限及检测限 取 NHS 对照品储备液,2 倍连续稀释,记录 S/N 约为 3 和 10 时的浓度,即为检测限和定量限浓度。

1.3.6 重复性 同一操作人员配制 NHS 对照品溶液 1 份和含 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NHS 的供试品溶液 6 份,按优化后的色谱条件进行检测,记录色谱图,按外标法计算 NHS 含量,并计算 RSD 。

1.3.7 溶液稳定性 将含 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NHS 的供试品溶液 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0、4、8、12、16、20 和 24 h,按优化后的色谱条件进行检测,计算主峰面积的 RSD 。

1.4 方法的初步应用 用建立的方法检测 3 批(F0-27201203、F027201204、F027201205)索马鲁肽原料中 NHS 含量。

2 结果

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 色谱柱 采用 Symmetry Shield RP8 和 Jupiter C18 色谱柱均无法对 NHS 形成较好的保留(保留时间均 $< 4\text{ min}$);采用 CAPCELL PAK ADME 色谱柱的保留时间约 7.5 min。因此选则 CAPCELL PAKADME 色谱柱进行后续试验。

2.1.2 流动相 随着有机相比例的增加,NHS 保留时间逐渐减小,当磷酸盐溶液与乙腈比例分别为 98 : 2、95 : 5 和 90 : 10 时,NHS 保留时间分别为 7 ~ 8、4 ~ 5 和 2 ~ 3 min。流动相中磷酸二氢钾浓度变化对 NHS 保留时间影响不大,均为 6 ~ 8 min。综合考虑,选择 0.05 mol / L 磷酸二氢钾溶液-乙腈(98 : 2)作为流动相 A,70% 乙腈溶液作为流动相 B。

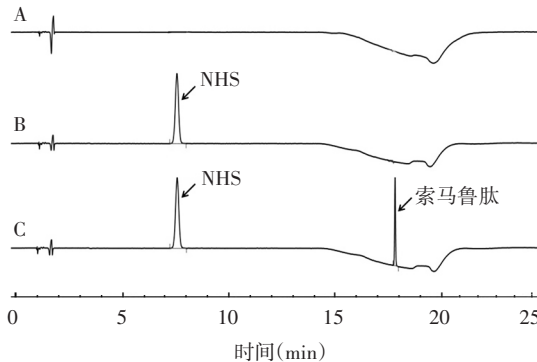
确定的色谱条件:色谱柱为 CAPCELL PAK ADME (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm);流动相 A 为 0.05 mol / L 磷酸二氢钾溶液-乙腈(98 : 2),流动相 B 为 70% 乙腈溶液;洗脱梯度为 0 min 0% B, 10 min 0% B, 19 min 90% B, 19.1 min 0% B, 25 min 0% B;流速为 0.8 mL / min;检测波长为 260 nm;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 100 μL 。

2.2 方法的验证

2.2.1 专属性 结果表明,NHS 保留时间约 7.5 min,峰对称性良好,拖尾因子为 1.05,空白溶剂不干扰 NHS 的检测,见图 1。

2.2.2 系统适用性 结果显示,NHS 系统适用性溶液连续测定 6 次,主峰理论塔板数为 12 840,拖尾因

子为 1.06,主峰保留时间和峰面积 RSD 均为 0.1%,表明系统适用性良好。



A:空白溶剂;B:NHS对照品;C:供试品溶液 + NHS溶液。

图 1 索马鲁肽中 NHS RP-HPLC 色谱图

Fig. 1 RP-HPLC profile of NHS in semaglutide

2.2.3 线性范围 结果显示,NHS 对照品在 0.2 ~ 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,线性关系良好,回归方程为 $Y = 1.0106X - 0.0098$, $R^2 = 1.0000$ 。

2.2.4 准确度 结果显示,3 种不同浓度(1.0、0.6、0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) NHS 加样样品,平均加样回收率分别为 98.35%、98.73% 和 99.60%,所有样品加样回收率的 RSD 为 0.58%,见表 1。表明该方法准确度良好。

表 1 准确度验证结果

Tab. 1 Validation for accuracy

加样浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加入量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测 次数	检测值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)	回收率 平均值(%)
0.4	0.19840	1	0.1953	98.44	98.35
		2	0.1946	98.08	
		3	0.1955	98.54	
0.6	0.39674	1	0.3916	98.70	98.73
		2	0.3911	98.58	
		3	0.3924	98.91	
1.0	0.59510	1	0.5931	99.66	99.60
		2	0.5928	99.61	
		3	0.5922	99.51	

2.2.5 定量限及检测限 结果显示,NHS 浓度为 0.048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 S/N 约为 3,浓度为 0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 S/N 约为 10,按进样量 100 μL 换算,该方法检测限为 4.8 ng,定量限为 9.6 ng。

2.2.6 重复性 结果显示,平行制备的 6 份供试品溶液中 NHS 含量的 RSD 为 0.16%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性 结果显示,在 0、4、8、12、16、20 和 24 h 检测的 NHS 峰面积的 RSD 为 0.34%,表明样品

溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.3 方法的初步应用 结果显示,3 批样品中均未检出 NHS,表明样品中 NHS 含量均低于 0.048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

本研究首先比较了 3 个不同厂家的色谱柱,即 CAPCELL PAK ADME (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm)、Symmetry Shield RP8 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μm) 和 Jupiter C18 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 3 μm) 色谱柱。结果显示,在相同条件下,Symmetry Shield RP8 和 Jupiter C18 色谱柱对 NHS 保留较弱,均 < 4 min,只有 CAPCELL PAK ADME 色谱柱对其保留较好,保留时间 7 ~ 8 min。因此在建立的方法中选择该色谱柱。

本研究还考察了流动相中的盐浓度与有机相比比例对 NHS 保留的影响,结果显示,流动相中磷酸二氢钾的浓度对 NHS 的保留时间影响不大,有机相比比例越高保留时间越小。在此基础上,确定了最适色谱条件并进行了方法的验证。结果显示,NHS 在 0.2 ~ 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,线性关系良好,回归方程为 $Y = 1.0106X - 0.0098$, $R^2 = 1.0000$;检测限和定量限分别为 4.8 和 9.6 ng;高中低浓度下的平均加样回收率分别为 98.35%、98.73% 和 99.60%。

本研究成功建立了索马鲁肽中 NHS 残留量的 RP-HPLC 检测方法,该方法专属性强、灵敏度高、重复性好,可进行快速检测,且样品检测结果准确可靠。本研究为索马鲁肽原料药的质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] THOMAS R L, HALIM S, GURUDAS S, *et al.* IDF diabetes atlas: A review of studies utilising retinal photography on the global prevalence of diabetes related retinopathy between 2015 and 2018 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107840.
- [2] HANSEN L, DEACON C F, ORSKOV C, *et al.* Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36) amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine [J]. *Endocrinology*, 1999, 140 (11): 5356-5363.
- [3] SHEAHAN K H, WAHLBERG E A, GILBERT M P. An overview of GLP-1 agonists and recent cardiovascular outcomes trials [J]. *Postgraduate Med J*, 2020, 96 (1133): 156-161.
- [4] THETHI T K, PRATLEY R, MEIER J J. Efficacy, safety and cardiovascular outcomes of once-daily oral semaglutide in patients with type 2 diabetes: The PIONEER programme [J]. *Diabetes Obesity & Metab*, 2020, 22 (8): 1263-1277.
- [5] MARSO S P, DANIELS G H, BROWN-FRANDSEN K, *et al.* Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes [J]. *New Engl J Med*, 2016, 375 (4): 311-322.
- [6] JIANG J Q, FU L, TAN M L, *et al.* Studies on glucagon like peptide-1 (GLP-1) analogues: a review [J]. *J Chem Engi Chin Univ*, 2020, 34 (6): 1327-1338. (in Chinese)
蒋镜清, 符玲, 谈梦璐, 等. 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物研究进展 [J]. *高校化学工程学报*, 2020, 34 (6): 1327-1338.
- [7] TAHRANI A A, BARNETT A H, BAILEY C J. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12 (10): 566-592.
- [8] ZHANG W Z, SUN T H, SHI J. Semaglutide: first oral glucagon-like peptide-1 receptor agonist [J]. *Chin J New Drugs*, 2020, 29 (22): 2552-2556. (in Chinese)
张文竹, 孙韬华, 石杰. 首个口服胰高血糖素样肽-1 受体激动剂索马鲁肽 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29 (22): 2552-2556.
- [9] DAHL K, BROOKS A, ALMAZEDI F, *et al.* Oral semaglutide improves postprandial glucose and lipid metabolism, and delays gastric emptying, in subjects with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obesity & Metab*, 2021, 23 (7): 1594-1603.
- [10] SINGH G, KRAUTHAMER M, BJALME-EVANS M. Wegovy (semaglutide): a new weight loss drug for chronic weight management [J]. *Investig Med*, 2022, 70 (1): 5-13.
- [11] NIMAN S, HARDY J, GOLDFADEN R F, *et al.* A review on the efficacy and safety of oral semaglutide [J]. *Drugs in R&D*, 2021, 21 (2): 133-148.
- [12] SEMENYA A M, WILSON S A. Oral semaglutide (rybelsus) for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Am Fam Physician*, 2020, 102 (10): 627-628.
- [13] LAU J, BLOCH P, SCHAFFER L, *et al.* Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide (GLP-1) analogue semaglutide [J]. *J Med Chem*, 2015, 58 (18): 7370-7380.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (三部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 42-45.
- [15] LI Z L, XU P, CHU C F, *et al.* Determination of N-hydroxy succinimide content in PEGylated recombinant human interferon $\alpha 2b$ injection by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Biologicals*, 2017, 30 (5): 536-539. (in Chinese)
李增礼, 许培, 储成凤, 等. 高效液相色谱法检测聚乙二醇化重组人干扰素 $\alpha 2b$ 注射液中 N-羟基琥珀酰亚胺含量 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30 (5): 536-539.