

Chromai 柱前自动衍生-司美格鲁肽氨基酸组成及氨基酸比值分析

司美格鲁肽是一种新型的长效胰高糖素样肽-1 受体激动剂 (glucagon-like peptide-1 receptor agonist, GLP-1RA), 由 17 种 31 个氨基酸组成, 其结构与天然的人胰高糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 相似, 具有高达 94% 的氨基酸序列同源性, 主要用于治疗 2 型糖尿病及其相关并发症, 同时也在减肥和心血管疾病预防等领域展现出广阔的应用前景。目前, 它已获得欧盟的批准, 用于降低患有心血管病且超重/肥胖的成年人患心脏病、中风乃至癌症的风险。在减肥领域, 司美格鲁肽也表现出色, 能够显著降低患者的主要不良心血管事件风险, 包括心血管死亡、非致死性心肌梗死等。

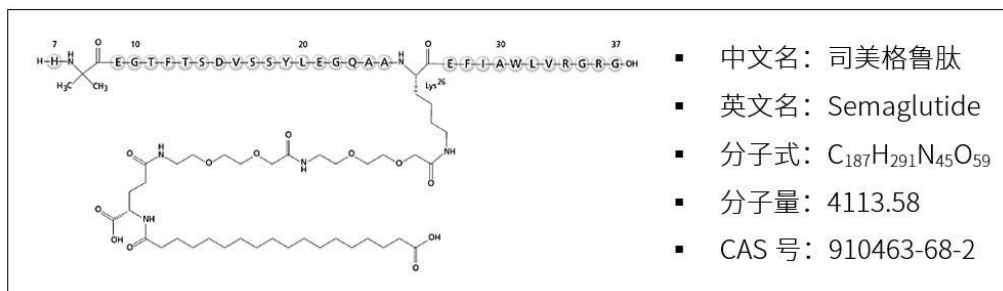


图 1 司美格鲁肽化合物信息

在化学合成多肽药物的药学研究中, 氨基酸组成及比值分析是重要的质量控制项目之一。氨基酸组成分析是鉴定多肽/蛋白药物的有效方法, 特定的多肽/蛋白由特定的氨基酸组成, 测定每个氨基酸含量是控制产品质量的有效手段。

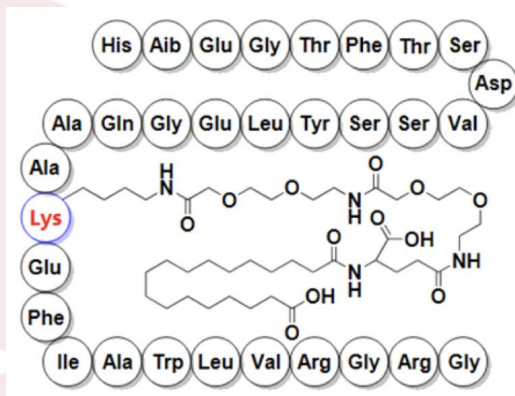


图 2 司美格鲁肽分子结构图

本文参考指导原则对司美格鲁肽样品分别进行盐酸水解和氢氧化钠水解处理, 结合 Chromai OPA 和 FMOC 柱前自动衍生氨基酸分析技术, 测定司美格鲁肽氨基酸组成, 并将测定结果与理论的氨基酸组成及比值进行对比分析。

1. 仪器:

Chromai Leaps 系统 (四元泵 P40、自动进样器 A10CV、柱温箱 C10、紫外检测器 D10)

2. 标准品溶液:

氨基酸混合标准品 (天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、氨基异丁酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、正缬氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸)

3. 衍生试剂:

OPA: 称取 40 mg 邻二苯甲醛, 加入硼酸盐缓冲液 3.5 mL、乙腈 0.5 mL、3-巯基丙酸 64 μ L, 溶解并混合均匀



FMOC: 称取 40 mg FMOC, 加入乙腈 8 mL, 溶解并混合均匀

4. 司美格鲁肽水解:

盐酸水解: 使用 6 mol/L HCl 水解, 产生 16 种氨基酸, 谷氨酰胺水解为谷氨酸, 色氨酸被破坏。

氢氧化钠水解: 使用 5mol/L NaOH 水解, 产生色氨酸

5. 色谱条件:

流动相 A: 0.05 mol/L 乙酸钠溶液-三乙胺-四氢呋喃 (950: 0.14: 5, 用 2 %乙酸调 pH 至 6.8)

流动相 B: 0.16 mol/L 乙酸钠溶液 (用 2 %乙酸调 pH 至 6.8) -甲醇-乙腈 (200: 400: 400)

洗脱梯度: 0-27 min A 相 92%-40%; 27-31 min A 相 40%-0%; 31-38 min A 相 0%; 38.01-41 min A 相 92%

色谱柱: Chromai Lotus C18 4.6*250 mm, 5 μ m

流速: 1 mL/min

柱温: 40 $^{\circ}$ C

进样体积: 20 μ L

检测波长: 338 nm (0-27min) ; 262 nm (27-41min)

自动进样器柱前衍生程序:

步骤	内容
1	吸取硼酸盐缓冲液 40 μ L
2	吸取待测样品 10 μ L
3	吸取 OPA 衍生液 10 μ L
4	在样品瓶混合 5 次
5	吸取 FMOC 衍生液 10 μ L
6	在样品瓶混合 5 次
7	吸取稀释液 120 μ L
8	在样品瓶混合 10 次

6. 结果与讨论

如图 3 所示, 19 种氨基酸经过 OPA 和 FMOC 衍生后, 各峰均分离良好。

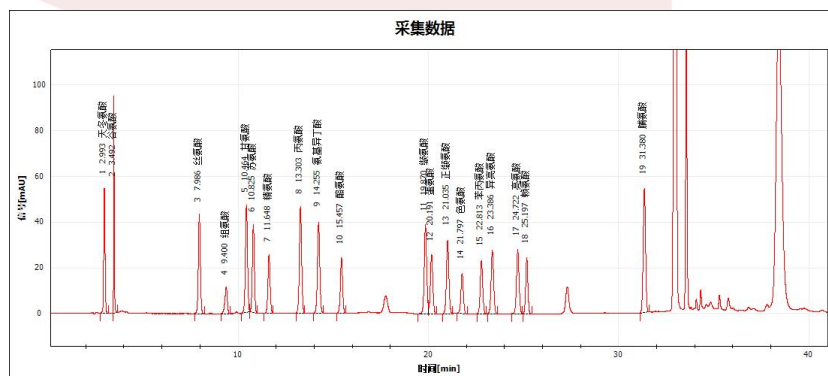


图 3 19 种氨基酸柱前自动衍生标准溶液色谱图

在 5-100 μ g/mL 的浓度范围内, 15 种氨基酸线性良好, 线性相关系数均大于 0.999。

表 1 氨基酸标准曲线线性结果



组分	回归方程	相关系数
天冬氨酸	$y = 2.3672x + 0.0101$	0.9998
谷氨酸	$y = 2.2565x + 1.7434$	0.9999
丝氨酸	$y = 3.1286x - 1.4178$	0.9998
组氨酸	$y = 1.0130x - 0.6022$	1.0000
甘氨酸	$y = 3.3898x - 2.0469$	0.9999
苏氨酸	$y = 2.6991x - 1.1483$	0.9998
精氨酸	$y = 1.9743x - 1.5018$	0.9999
丙氨酸	$y = 4.0059x - 2.1168$	0.9999
氨基异丁酸	$y = 3.1366x - 1.4994$	0.9999
酪氨酸	$y = 1.6926x - 1.1088$	0.9998
缬氨酸	$y = 3.1900x - 1.8271$	0.9999
蛋氨酸	$y = 2.3108x - 1.5256$	0.9999
正缬氨酸	$y = 2.9771x - 2.1928$	0.9999
色氨酸	$y = 1.5244x - 2.1811$	0.9999
苯丙氨酸	$y = 2.0992x - 0.8944$	0.9999
异亮氨酸	$y = 2.6104x - 1.9208$	0.9999
亮氨酸	$y = 2.5233x + 0.6652$	0.9999
赖氨酸	$y = 1.8628x - 2.8022$	0.9996
脯氨酸	$y = 4.7763x + 12.3955$	0.9998

如图 4 所示，司美格鲁肽样品中检出 17 种氨基酸，与理论氨基酸组成一致。氨基酸比值与理论值的相对误差在 10%之内，结果准确。

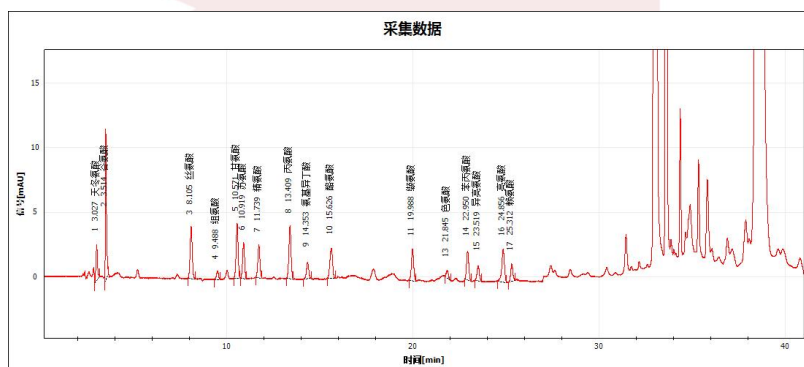


图 4 司美格鲁肽酸水解液色谱图

表 2 司美格鲁肽样品测试结果

组分	理论氨基酸数	实测氨基酸数
----	--------	--------



天冬氨酸	1	1
谷氨酸+谷氨酰胺	3+1	4.2
丝氨酸	3	2.8
组氨酸	1	1.1
甘氨酸	4	3.8
苏氨酸	2	1.9
精氨酸	2	2.1
丙氨酸	3	2.7
氨基异丁酸	1	0.9
酪氨酸	1	0.9
缬氨酸	2	1.8
色氨酸	1	1.0
苯丙氨酸	2	2.0
异亮氨酸	1	1.0
亮氨酸	2	2.1
赖氨酸	1	1.1

7. 结论

使用 Chromai Leaps 系统自动进样器标配的柱前衍生功能, 选择 OPA 和 FMOC 两种衍生试剂, 可实现一级和二级氨基酸的在线自动化衍生。本实验中将司美格鲁肽样品分别进行盐酸水解和氢氧化钠水解处理, 测定司美格鲁肽氨基酸组成, 并将测定结果与理论的氨基酸组成及比值进行对比, 样品中氨基酸组成与理论组成一致, 样品氨基酸比值与理论值的相对误差在 10% 之内, 方法准确可靠。

