

DAD および ELSD 搭載の Agilent 1290 Infinity III Bio LC による GLP-1 受容体作動薬の HILIC 分析

著者

Piotr Alvarez, Cindy Lecluyse,
Ine Vandendriessche,
Pat Sandra, and Koen Sandra
RIC group
President Kennedypark 6,
8500 Kortrijk, Belgium

Sonja Schneider and
Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.

概要

GLP-1 受容体作動薬は糖尿病および肥満症の治療に広く用いられています。このアプリケーションノートでは、低吸着性と生体適合性を備えた LC 流路でのこれらの治療薬の HILIC 分析について取り上げます。DAD と ELSD を使用することで、有効成分、製品関連の不純物、製剤成分を同時に測定できました。また、LC 流路のステンレス製コンポーネントをすべて排除または不活性化することの利点を検証しました。

はじめに

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬は核酸ベースの治療薬に分類され、2 型糖尿病 (T2DM) や、近年では肥満症の治療に使用されています。自然発生する GLP-1 ホルモンの作用を模倣し、インスリンの放出促進、グルカゴンの分泌抑制、胃排出の遅延、食欲の抑制を行います¹。天然 GLP-1 はクリアランスが高く、臨床的有用性が限られるため、市販品はいくつかの方法で半減期 (アミノ酸置換、脂肪酸共役化など) を延長するように設計されています (図 1)。例えば、最も売れている医薬品であるオゼンピックの有効成分であるセマグルチドと天然 GLP-1 の違いは、短いスペーサーを介してリジンに共役したステアリン二酸が存在することと、2 箇所のアミノ酸が置換されていることです。T2DM において最適なグルコースコントロールを達成するには、多面的な治療戦略が必要になります。そのため、製薬会社は、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドとインスリンデグルデクを含むゾルトファイアや、GLP-1 と胃抑制ポリペプチド (GIP) の機能を同時に発揮するチルゼバチド (マンジャロの有効成分) のような共作動ペプチドなどのコンビネーション製品を開発してきました。T2DM および肥満症の世界的な增加を背景に、GLP-1 およびその他のインクレチニン受容体を標的とした合成ペプチドに対する需要が高まっています。同時に、これらの医薬品の品質を評価する適切な分析法も求められています。医薬品有効成分に関するさまざまな特性 (同定、純度、不純物、含有量) の測定には、逆相液体クロマトグラフィー (RPLC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、および質量分析 (MS) が一般に用いられています。今回の研究では、医薬品 (DP) のさまざまな特性を研究するための相補的手法として、親水性相互作用液体クロマ

トグラフィー (HILIC) を取り上げます。ダイオードアレイ検出器 (DAD) および蒸発光散乱検出器 (ELSD) と組み合わせれば、DP 中の治療用ペプチドやさまざまな製剤成分を同時に測定することができます。これらの成分には緩衝剤、等張化剤、安定剤、酸化防止剤として添加されている無機イオン、糖、アミノ酸が含まれます。金属と反応しやすい成分と金属面および金属で汚染された流路との非特異

的相互作用を防ぐために、ウルトライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Poroshell HILIC-Z カラムと Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムを使用して、低吸着性と生体適合性を備えた LC ハードウェアを実装しました。

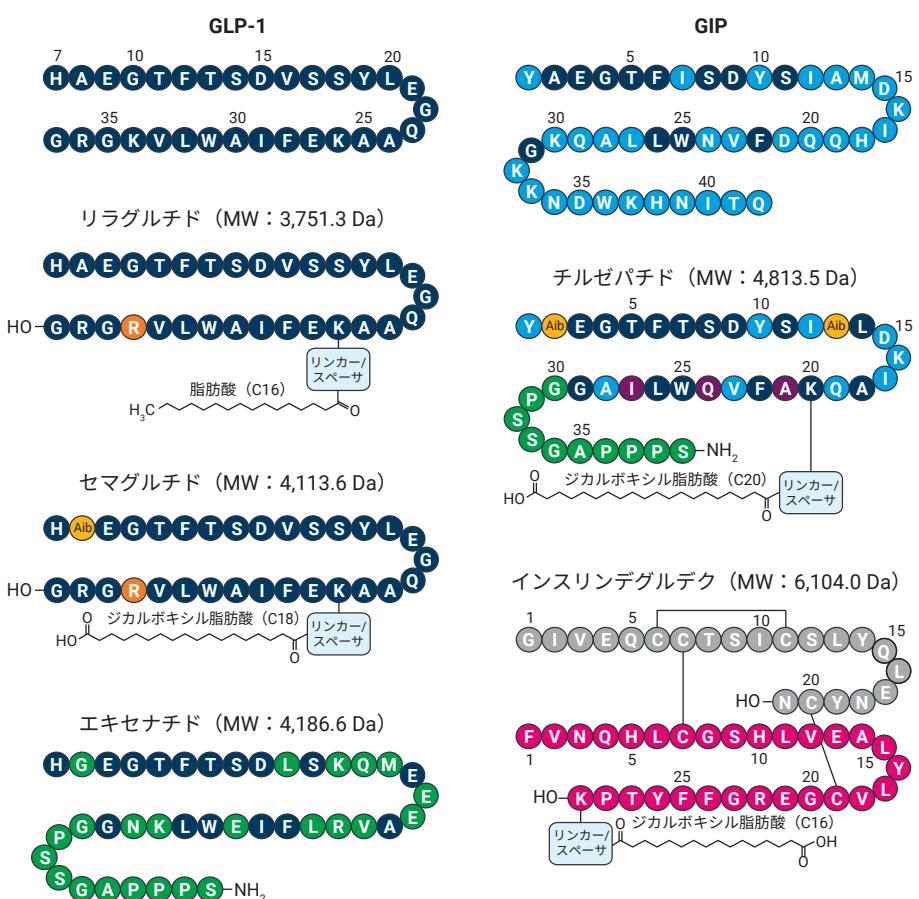


図 1. 天然 GLP-1 および GIP、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチド、セマグルチド、およびエキセナチド、GLP-1 および GIP 受容体共作動薬であるチルゼバチド、インスリンデグルデクの分子構造。治療用ペプチドには分子量を記載しています。

実験方法

材料

水 (ULC/MS グレード) とアセトニトリル (HPLC-S グレード) は Biosolve 社から入手しました。ギ酸アンモニウム (LiChropur)、ジメチルスルホキシド (DMSO, Suprasolv)、過酸化水素 ($\geq 30\%$ 、微量分析用)、D-マンニトール、スクロース、L-メチオニン、塩化ナトリウム、リン酸一ナトリウム、および酢酸亜鉛二水和物は Merck 社から入手しました。グリセリンは Thermo Fisher Scientific 社から購入しました。酢酸セマグルチド ($\geq 95\%$)、エキセンジン-4 (48 ~ 86) アミド酢酸塩 (酢酸エキセナチド、 $\geq 95\%$)、酢酸リラグルチド ($\geq 95\%$)、およびチルゼバチドナトリウム塩 ($\geq 95\%$) は Cayman Chemical 社から入手しました。オゼンピックおよびゾルトファイは Novo Nordisk 社から、またバイエッタは Astra Zeneca 社から入手しました (表 1)。

サンプル調製

セマグルチドおよびリラグルチドは DMSO で 1 mg/mL に調製し、加熱して溶解しました。エキセナチドおよびチルゼバチドは 50/50 (v/v) のアセトニトリル:水に 1 mg/mL の濃度で溶解し、注入前にさらに水で希釈しました。バイエッタ、オゼンピック、およびゾルトファイをカラムに適用しました。賦形剤溶液 (グリセリン、マンニトール、スクロース、NaCl、NaH₂PO₄、酢酸亜鉛) は水で調製しました。

メチオニンの酸化を誘起するために、エキセナチドを 0.004 % 過酸化水素中で、室温で 3 時間インキュベーションしました。その後、1 mM L-メチオニンを加えて反応をクエンチしました。

機器とメソッド

今回の研究では、Agilent 1290 Infinity III LC システム (ステンレス製、SST) および 1290 Infinity III Bio LC システム (BIO) を使用しました。両システムの構成の詳細を表 2 に示します。また、メソッドパラメータを表 3 にまとめます。データの取り込みおよび処理には Agilent OpenLab CDS バージョン 2.7 を使用しました。

表 1. 今回の研究に用いた GLP-1 受容体作動薬 DP

DP	有効成分	賦形剤
バイエッタ	エキセナチド (1.2 mL 中 300 μ g)	マンニトール (43 mg/mL)、メタクレゾール (2.2 mg/mL)、氷酢酸、および酢酸ナトリウム三水和物 (pH 4.5)
オゼンピック	セマグルチド (1.5 mL 中 2 mg)	プロビレングリコール (14 mg/mL)、フェノール (5.5 mg/mL)、リン酸二ナトリウム二水和物 (1.42 mg/mL)、塩酸、および水酸化ナトリウム (pH 7.4)
ゾルトファイ	リラグルチド (3 mL 中 10.8 mg) およびインスリンデグルデク (3 mL 中 300 ユニット)	グリセリン (19.7 mg/mL)、フェノール (5.7 mg/mL)、亜鉛 (55 μ g/mL)、塩酸、および水酸化ナトリウム (pH 8.15)

表 2. 使用した機器構成の詳細

	Agilent 1290 Infinity III LC システム	Agilent 1290 Infinity III Bio LC システム
ポンプ	Agilent 1290 Infinity III ハイスピードポンプ (G7120A)	Agilent 1290 Infinity III Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
オートサンプラー	Agilent 1290 Infinity III マルチサンプラー (G7167B)、一体型サンプルサーモスタット付き	Agilent 1290 Infinity III Bio マルチサンプラー (G7137A)、一体型サンプルサーモスタット付き
カラム コンパートメント	Agilent 1290 Infinity III マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Agilent InfinityLab クイックコネクト熱交換器、標準フロー (G7116-60015) を装着	Agilent 1290 Infinity III マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Agilent InfinityLab クイックコネクト Bio 热交換器、標準フロー (G7116-60071) を装着
検出器 (DAD)	Agilent 1290 Infinity III ダイオードアレイ検出器 (G7117B)	
フローセル	Agilent Max-Light カートリッジセル、標準、10 mm (G4212-60008)	Agilent Max-Light カートリッジセル、LSS、10 mm (G7117-60020)、アパーチャなし
検出器 (ELSD)	Agilent 1290 Infinity III 蒸発光散乱検出器 (G4261B)	

表 3. LC メソッドパラメータ

パラメータ	設定値	
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z、2.1 × 150 mm、2.7 μ m (p/n 683775-924) ウルトラライナートテクノロジー搭載 Agilent Altura Poroshell HILIC-Z、2.1 × 150 mm、2.7 μ m (p/n 227215-924)	
流量	0.4 mL/min	
移動相	A) 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 3 B) ACN	
グラジェント	時間 (分) %B 0 ~ 1 90 1 ~ 19 90 から 45 19 ~ 20 45 から 90 20 ~ 30 90	
カラム温度	40 °C	
オートサンプラー温度	10 °C	
注入	1 μ L	
ニードル洗浄	10 秒間、50/50 (v/v) のアセトニトリル:水	
DAD 検出	280/4 nm、リファレンス波長 360/100 nm、2.5 Hz	
ELSD 検出	エバボレータ温度 : 50 °C ネプライザ温度 : 50 °C ガス流量 : 1.0 SLM データレート : 80 Hz スムージング : 30 PMT ゲイン : 1.0	

結果と考察

HILIC では極性およびイオン性の溶質が保持・分離され、RPLC とは異なる選択性が得られます。分離は、固定相に固定化された水性層と有機移動相との間での溶質の親水性分配と、それに重なって起こる静電結合や水素結合などその他の相互作用（固定相の化学的性質および移動相の条件により異なる）にもとづきます²。HILIC は 35 年前に出現して以来、アミノ酸、ペプチド、(糖) タンパク質、糖、(オリゴ) ネクレオチド、有機酸、無機イオンをはじめとする幅広い物質の分析に適用され、成果をあげきました。

GLP-1 受容体作動薬の賦形剤として一般的に見られる、HILIC で対応可能な溶質の分析結果を図 2 に示します。クロマトグラフィー条件は、HILIC-Z カラムと ELSD による無機アニオンおよび無機カチオンの測定に関する以前の論文にもとづいています³。それと同じメソッドにより、合成 GLP-1 受容体作動薬ペプチドであるエキセナチド、セマグルチド、リラグルチド、およびチルゼバチドを分離できました。その結果を図 3 に示します。ペプチドの溶出は、アミノ酸の組成と共に脂肪酸にもとづきます。

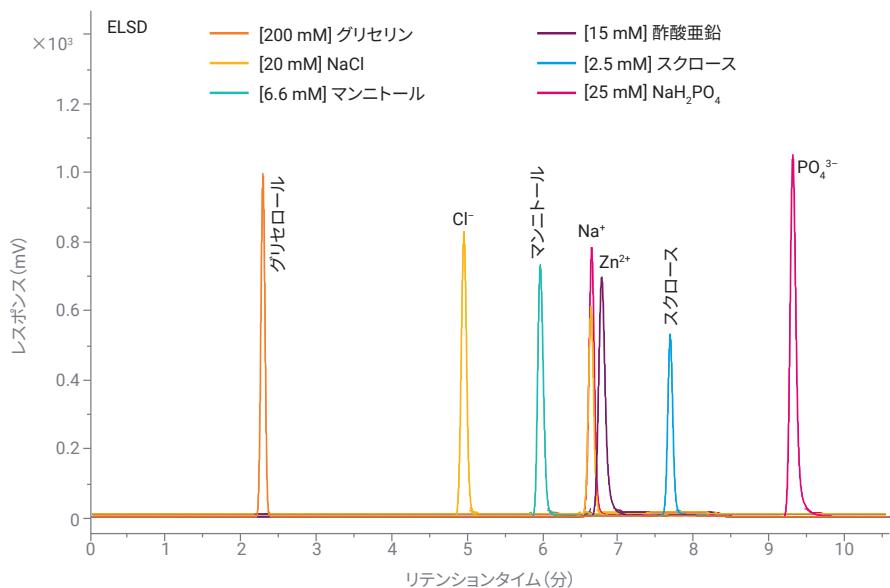


図 2. さまざまな製剤成分の HILIC-ELSD クロマトグラムの重ね表示。各成分について同様の検出器強度が得られるように濃度を調整しています。酢酸塩はその揮発性から ELSD で測定できません。実験には、ウルトライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Poroshell HILIC-Z カラムを装着した Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムを使用しました。

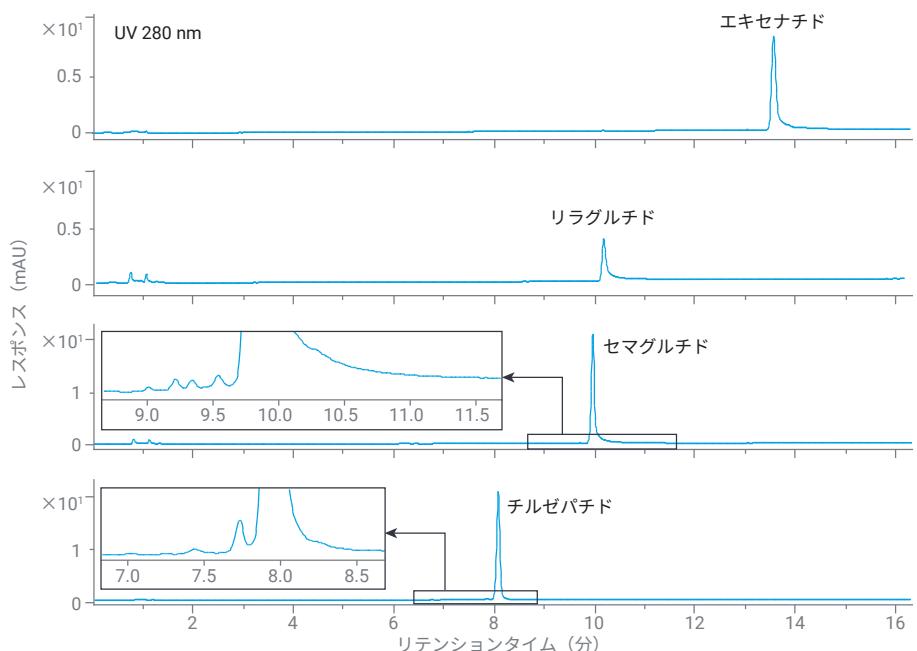


図 3. GLP-1 受容体作動薬であるエキセナチド、リラグルチド、セマグルチド、およびチルゼバチド（それぞれ 0.5 mg/mL）の HILIC-UV 280 nm クロマトグラム。実験には、ウルトライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Poroshell HILIC-Z カラムを装着した Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムを使用しました。

DAD と ELSD での連続検出を用いた HILIC-Z メソッドにより、図 4 に示すように、GLP-1 受容体作動薬 DP 中の有効成分と賦形剤成分を同時に評価できる可能性が開かれます。ELSD データからは、共溶媒（グリセリン）、等張化剤（マンニトール）、および緩衝/pH 調整物質（リン酸ナトリウム、HCl、NaOH）に関する情報が得られ、UV データでは、合成ペプチドとその不純物のほか、保持されない防腐剤（フェノール、メタクレゾール）を検出できます。保持されない防腐剤は、その揮発性から ELSD で検出できません。また、バイエッタ中に 43 mg/mL で存在するマンニトールの信号は飽和しています。

これまでに示したデータは、ウルトライナートテクノロジー搭載の Altura Poroshell HILIC-Z カラムと生体適合性を備えた 1290 Infinity III Bio LC を使用して低吸着性の流路で生成されたものです。理論的には、リン酸塩やカルボン酸塩を含む成分は金属面に吸着したり浸出金属と相互作用する傾向にあり、これがピークの広がりや回収率の低下を招きます⁴。この現象は、流路を不動態化するか移動相に金属キレート剤を添加することによりある程度軽減できます。これらの手段に代わる優れた方法が、ステンレス表面の排除または不活性化です。

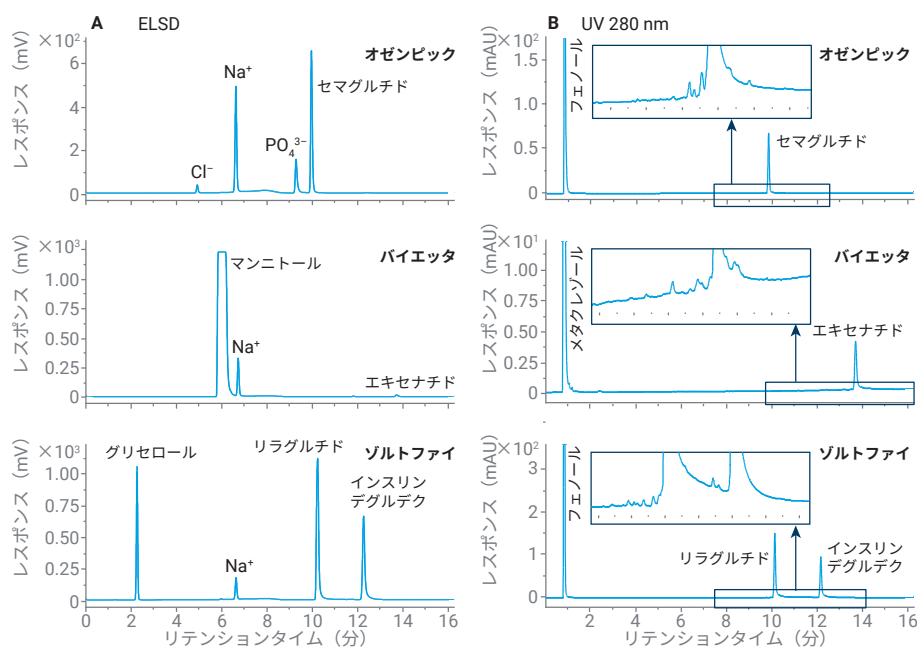


図 4. オゼンピック、バイエッタ、およびゾルトファイの (A) HILIC-ELSD クロマトグラムと (B) UV 280 nm クロマトグラム。実験には、ウルトライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Poroshell HILIC-Z カラムを装着した Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムを使用しました。

今回の研究に用いたサンプルに対する不活性化の効果を図 5 および図 6 に示します。NaH₂PO₄ 標準物質およびオゼンピックで観察された、無機リン酸塩のピーク形状と回収率は、ステンレス製の流路を低吸着性の流路に (1290 Infinity III LC およびステンレス製 HILIC-Z カラムを 1290 Infinity III Bio LC およびウルトラライナートテクノロジー搭載の Altura HILIC-Z カラムに) 変えることで、大幅に改善しています。ピーク面積精度についても、1290 Infinity II Bio LC とウルトラライナート HILIC-Z カラムにすると、大幅に向かいます (データ不掲載)。チルゼバチドとセマグルチドの溶出はどちらの構成でも同等に良好なのに対し、リラグルチドおよびエキセナチドはステンレス製構成においてピーク形状のゆがみが大きくなっています。このような状況でも、有効成分についてほぼ完全な回収率が得られています。ポストピークとして酸化エキセナチドが溶出していることからわかるように、製品関連の不純物の検出は、低吸着性の流路を用いた方が大幅に改善しています。この種は、ステンレス製の流路では DP のメインピークのテール部に埋もれて検出できず、H₂O₂ によるストレスを与えたエキセナチドのリテンションにゆがみが現れています。これに対し、HILIC では、メチオニンスルホキシド S- および R-ジアステレオマーの形成の結果として、部分的に分離された 2 つのピークが観察されました。

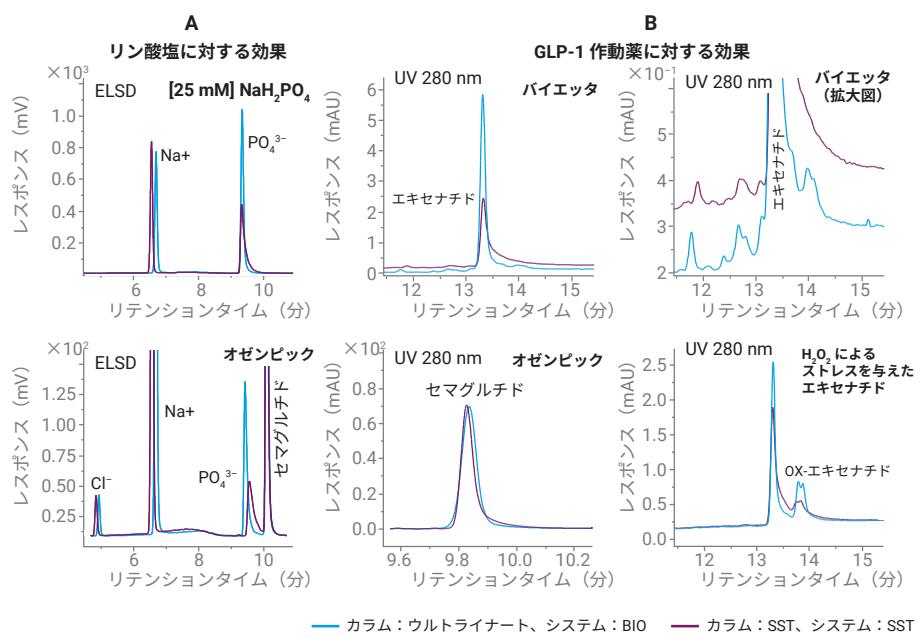


図 5. (A) 低吸着性のステンレス製流路で得られた 25 mM の NaH₂PO₄ 標準物質およびオゼンピックの HILIC-ELSD クロマトグラム。(B) 低吸着性のステンレス製流路で得られたセマグルチド (オゼンピック)、エキセナチド (バイエッタ)、および酸化ストレスを与えたエキセナチド (0.25 mg/mL) の溶出物に注目した HILIC-UV 280 nm クロマトグラム。解釈しやすくするため、メインピークが中央にくるようにクロマトグラムのリテンションタイムの位置を合わせています。BIO : Agilent 1290 Infinity III Bio LC, SST : Agilent 1290 Infinity III LC (ステンレス製、SST)。ウルトラライナートカラム : ウルトラライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Poroshell HILIC-Z, SST カラム : ステンレス製カラムハードウェアの Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z

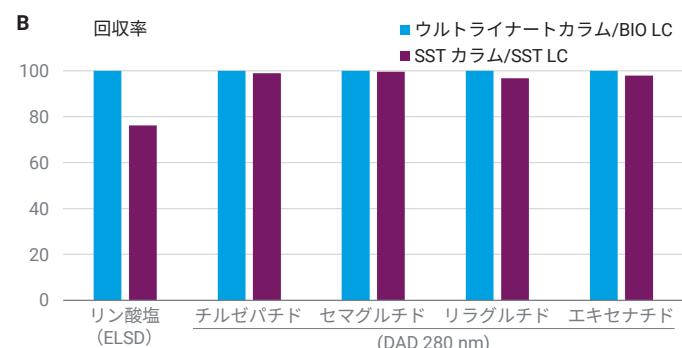
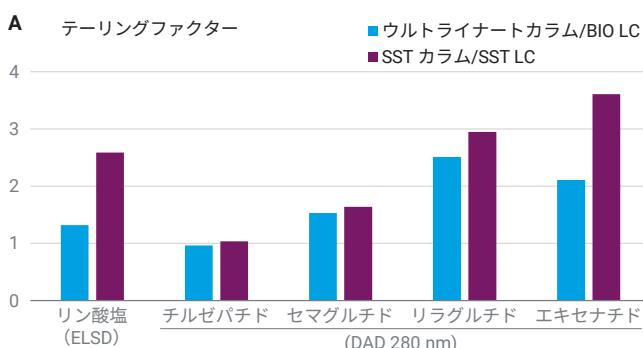


図 6. 25 mM の NaH₂PO₄ (図 5 を参照) と 0.5 mg/mL のチルゼバチド、セマグルチド、リラグルチド、およびエキセナチドの (A) ピークテーリングファクターと (B) 回収率 (低吸着性の流路での回収率を 100 とした相対的なピーク面積)。BIO: Agilent 1290 Infinity III Bio LC, SST: Agilent 1290 Infinity III LC (ステンレス製、SST)。ウルトラライナートカラム : ウルトラライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura Poroshell HILIC-Z, SST カラム : ステンレス製カラムハードウェアの Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z

結論

今回の研究では、GLP-1 受容体作動薬の有効成分、製品関連の不純物、および賦形剤を、HILIC と DAD および ELSD を組み合わせたシステムで同時に測定しました。溶質と流路の金属成分との非特異的相互作用を防ぐため、ウルトライナートテクノロジー搭載の Agilent Altura HILIC-Z カラムと Agilent 1290 Infinity III Bio LC システムを使用しました。ここでは汎用メソッドを紹介しましたが、このメソッドは特定の種の分解能をさらに最適化するために確実に微調整できます。

参考文献

1. Yu, M.; Benjamin, M. M.; Srinivasan, S.; Morin, E. E.; Shishatskaya, E. I.; Schwendeman, S. P.; Schwendeman, A. Battle of GLP-1 Delivery Technologies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, 130, 113–130.
2. McCalley, D. V. Understanding and Manipulating the Separation in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1523, 49–71.
3. 親水性相互作用液体クロマトグラフィーによる金属、ハロゲン化物、無機イオンの分析 Agilent Technologies アプリケーションノート, 資料番号 5991-8602JAJP, 2017.
4. Guimaraes, G. J.; Bartlett, M. G. Managing Nonspecific Adsorption to Liquid Chromatography Hardware: a Review. *Anal. Chim. Acta* **2023**, 1250, 340994.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-005834

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, October 16, 2025

5994-8308JAJP