

Mejora del desempeño cromatográfico en el mapeo de péptidos

Uso de la columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus

Autores

Jordy Hsiao, Mahsan Miladi,
Li Gu, Stephen Sciuto,
Guannan Li, y
Anne Blackwell
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

Este estudio destaca las ventajas de la columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus para el mapeo de péptidos. En comparación con el hardware de acero inoxidable, la columna Altura mejora la forma de los picos, la reproducibilidad y la resolución, especialmente para los péptidos hidrófobos y modificados. En el análisis por LC/MS de péptidos sintéticos de AcM y de Herceptin digerido con tripsina, la columna inerte permitió la identificación fiable de modificaciones postraduccionales, con una mejora en la forma de los picos y la resolución de los péptidos desamidados. Al mejorar la separación de las variantes desamidadas, esta columna demuestra ser útil para los flujos de trabajo biofarmacéuticos que requieren una alta sensibilidad y precisión.

Introducción

El mapeo de péptidos, utilizado para confirmar secuencias de proteínas e identificar modificaciones postraduccionales (PTM), es una técnica clave en el desarrollo biofarmacéutico. No obstante, las interacciones entre los analitos y las superficies metálicas del hardware de cromatografía líquida (LC) pueden afectar a la sensibilidad y a la resolución, especialmente en el caso de los péptidos con carga o fosforilados. En estudios recientes se ha destacado la importancia de que las rutas de flujo y el hardware de la columna sean inertes para mitigar estos problemas.^{1,2}

En un estudio anterior, se optimizó un método de mapeo de péptidos utilizando la columna AdvanceBio Peptide Mapping para reducir el tiempo de análisis de 2,5 horas a 1 hora mediante el aprovechamiento de partículas de la columna de C18 ZORBAX RRHD Eclipse Plus con un tamaño inferior a 2 µm y un sistema de UHPLC.³ A pesar de la significativa reducción del tiempo de análisis, se observaron perfiles de elución de péptidos comparables entre la columna de mapeo de péptidos AdvanceBio y la columna de C18 ZORBAX RRHD Eclipse Plus, lo que garantiza que los métodos se pueden trasladar y obtenerse resultados analíticos uniformes en diferentes tecnologías de columna. Esta mejora permite analizar un mayor número de muestras y reduce el consumo de disolventes sin afectar al desempeño.

Para mejorar todavía más el desempeño, las columnas C18 inertes Altura ZORBAX Eclipse Plus de Agilent incorporan la tecnología Ultra Inert, diseñada para minimizar las interacciones entre el metal y los analitos a la vez que se mantiene la resistencia mecánica del acero inoxidable (SS). En este estudio se compara el desempeño de las columnas inertes Altura con el de otras columnas de acero inoxidable convencionales usando el sistema de LC Agilent 1290 Infinity II Bio y el sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio para el análisis por LC/MS/MS de péptidos sintéticos y muestras de anticuerpos monoclonales (AcM) digeridas.

Sección experimental

Preparación de las muestras

Herceptin se digirió con tripsina siguiendo un protocolo⁴ descrito anteriormente, aunque con modificaciones. En concreto, la digestión se llevó a cabo con tripsina utilizando una relación proteína:enzima de 50:1. En el protocolo anterior, se utilizó tripsina/Lys-C con una relación proteína:enzima de 25:1 sin etapa de limpieza de las muestras.

Antes del análisis por LC/MS, las muestras se limpiaron en una columna de C18 de centrifugación para eliminar impurezas y prolongar la vida útil de la columna.

Columnas analíticas

Columna de C18 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus 2,1 × 150 mm, 1,8 µm; (ref. 959759-902)
Columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus 2,1 × 150 mm, 1,8 µm; (ref. 204215-308)

Instrumentos

Se llevó a cabo un análisis por LC/MS utilizando una de las siguientes configuraciones del instrumento:

- Bomba de alta velocidad Agilent 1290 Infinity II Bio (G7132A)
- Muestreador múltiple Agilent 1290 Infinity II Bio con termostato de muestras (G7137A)
- Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio (G6549AA)

Tabla 1. Parámetros del sistema de LC.

Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II Bio		
Parámetro	Valor	
Fase móvil A	Agua con ácido fórmico al 0,1 %	
Fase móvil B	Acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %	
Temperatura de la columna	60 °C	
Flujo	0,4 ml/min	
Temperatura del muestreador	8 °C	
Gradiente 1 para péptidos sintéticos	Tiempo (min)	%B
	0,00	2
	1,00	2
	7,00	38
	7,10	80
	9,00	80
	9,10	2
	14,0	2
Gradiente 2 para la muestra de Herceptin digerida con tripsina	Tiempo (min)	%B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

Tabla 2. Parámetros del sistema de MS.

Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio	
Parámetro	Valor
Fuente	AJS ESI dual en modo de ionización positiva
Fuente	
Temperatura del gas de secado (TGS)	250 °C
Flujo de gas de secado	10 l/min
Temperatura del gas envolvente	250 °C
Flujo de gas envolvente	12 l/min
Presión del nebulizador	25 psi
Voltaje del capilar	3500 V
Tensión de la boquilla	0 V
Fragmentador	95 V
Skimmer	50 V

Parámetro	Valor
Adquisición: MS	
Modo de adquisición	Intervalo analítico ampliado (2 GHz)
Intervalo de masas	m/z de 100 a 3000
Velocidad de barrido	1 espectro/s
Masa de referencia	121,0509, 922,0098
Adquisición: MS/MS	
Modo de adquisición	MS/MS automatizada
Intervalo de masas	m/z de 100 a 3000
Velocidad de barrido	3 espectros/s
Anchura del aislamiento (MS/MS)	Medio (~4 uma)
Precusores máximos por ciclo	5
Umbral para MS/MS	6000 recuentos y 0,001 %
Carga del ion precursor	2+, 3+, > 3+
Objetivo	50 000 recuentos/espectro

Tabla 3. Parámetros de energía de colisión del sistema de MS/MS.

Energía de colisión en rampa		
Carga	Pendiente	Compensación
2	3,1	1
3	3,6	-4,8
> 3	3,6	-4,8

Tabla 4. Software Agilent MassHunter BioConfirm. Parámetros de procesamiento de la versión 12.1.

Flujo de trabajo y secuenciaciones		
Flujo de trabajo	Muestra de proteína digerida	
Condiciones	Reducidas	
Secuencias	Herceptin (alquilación directa), tripsina	
Modificaciones variables	Desamidación, G0, G0F, G0F-GlcNAc, G2, G2F, H5N3F1-1, metilación, oxidación (M, W), pirrolidona-glutámico (Glu)	
Enzimas	Tripsina	
Encontrar péptidos		
Filtros de biomoléculas	Mostrar moléculas que contengan espectros de MS/MS	Activado
Extracción	Usar picos con altura	≥ 600 recuentos
Especies iónicas	Iones positivos	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
Estado de carga	Modelo isotópico	Péptidos
	Limitar los estados de carga asignados a un intervalo de	1 a 5
Filtros de picos (MS/MS)	Filtros de altura, altura absoluta activada	≥ 50 recuentos
Tolerancias de coincidencia		
Coincidencia de masas	± 5 ppm MS1, ± 20 ppm MS2	
Grado de coincidencia	Avisar si el grado de coincidencia es < 7,00	
	No aceptar coincidencias si el grado de coincidencia es < 5,00 (cobertura de secuencias)	
Reglas de coincidencia	Tipo de fragmentación en MS/MS	CID
	Número de escisiones no detectadas	2
	Número máximo de coincidencias por biomolécula	3
	Intervalo de longitudes del péptido	De 3 a 70
	Permitir únicamente el truncamiento en el extremo aminoterminal o en el extremo carboxiterminal	Seleccionado
	Número máximo de modificaciones	2

Resultados y comentarios

Evaluación de las mejoras cromatográficas proporcionadas por el hardware de columna inerte

Para evaluar las ventajas del hardware de la columna de C18 inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus en flujos de trabajo de mapeo de péptidos, esta se comparó con la columna de C18 de acero inoxidable ZORBAX RRHD Eclipse Plus. Se analizó una mezcla de péptidos sintéticos que contenía secuencias de AcM con el sistema de LC 1290 Infinity II Bio acoplado a un LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio.

Las superposiciones iniciales de los cromatogramas de iones seleccionados (Figura 1) mostraron tiempos de retención comparables entre ambas columnas. No obstante, la inspección detallada de los péptidos individuales reveló diferencias notables en la intensidad de la señal, la forma de los picos y la resolución (Figura 2). Por ejemplo, VVSVLTVLHQDWLNGK, un péptido hidrófobo y básico, presentó picos más anchos y una menor intensidad de la señal en la columna de acero inoxidable en comparación con la columna Altura. Esto sugiere que las interacciones entre el analito y el metal en el hardware de acero inoxidable pueden afectar a la recuperación de las muestras y al desempeño cromatográfico.

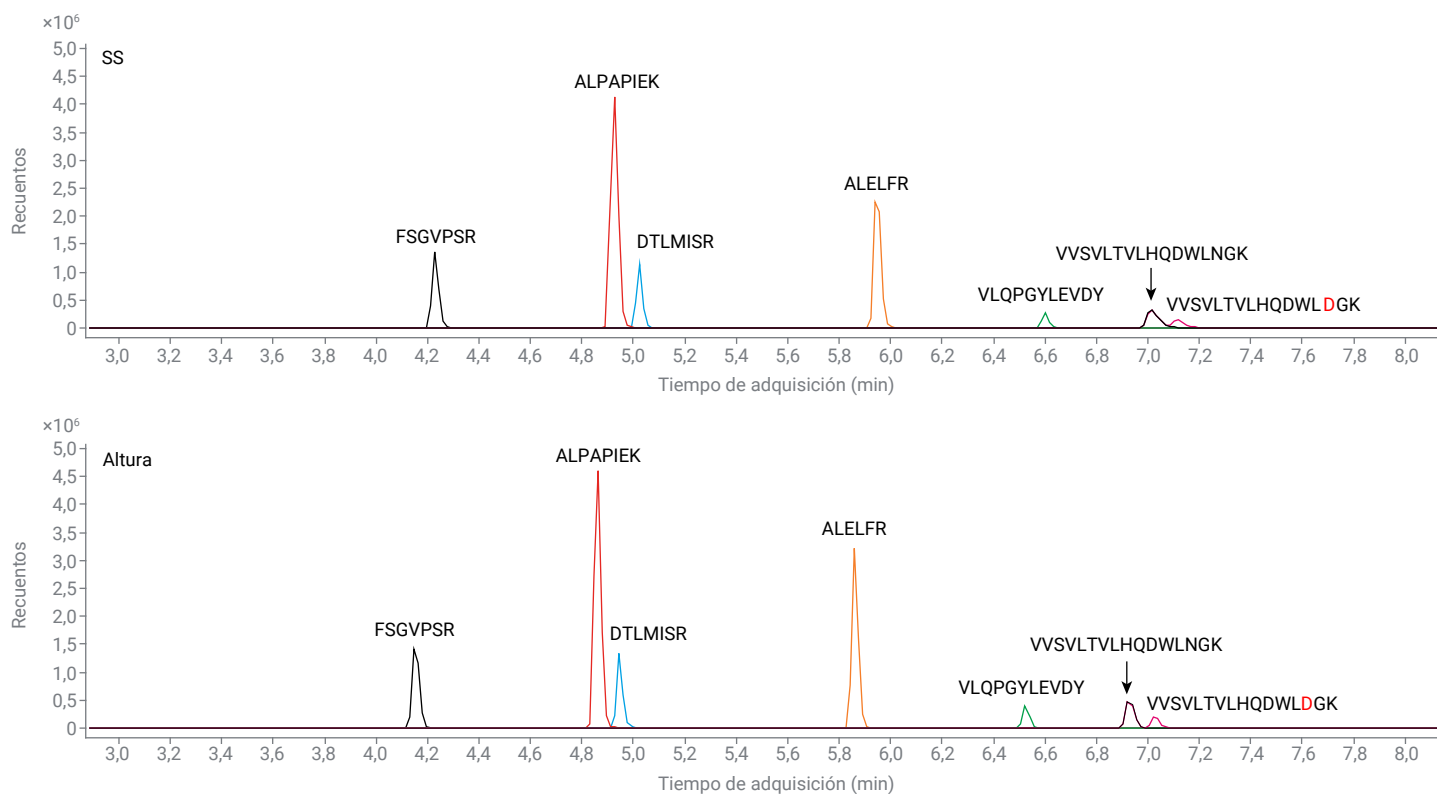


Figura 1. Separación cromatográfica de péptidos de anticuerpos monoclonales sintéticos mediante hardware de columna de acero inoxidable y hardware de columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus.

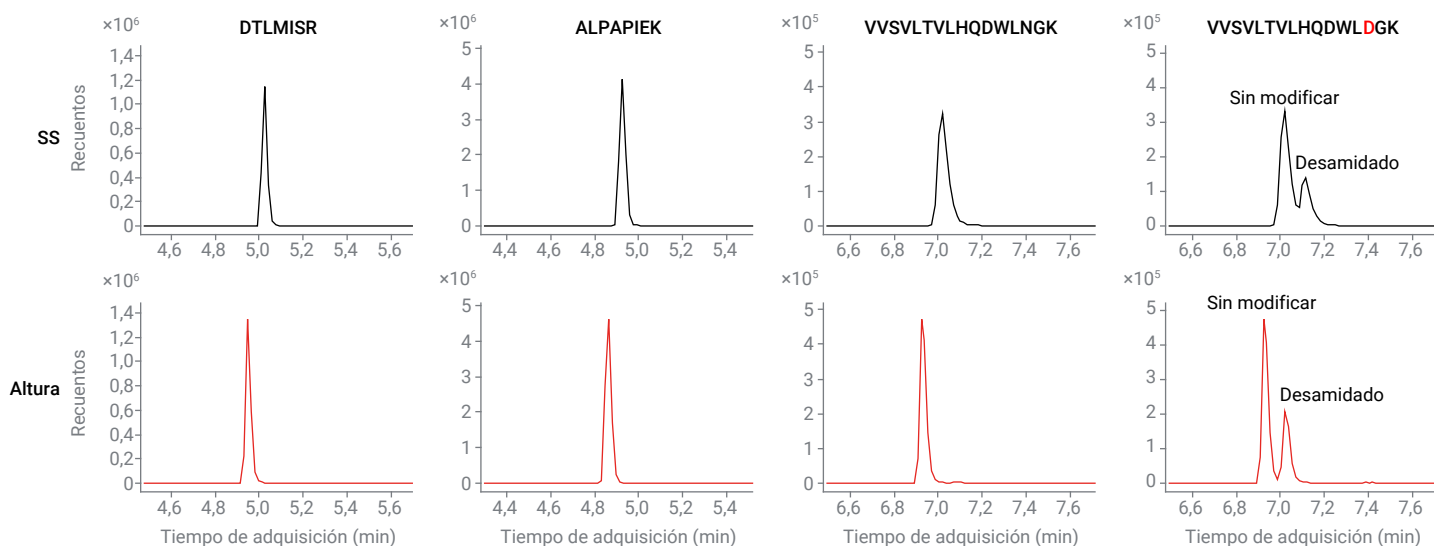


Figura 2. Mejora de la forma de los picos y la resolución de los péptidos desamidados mediante hardware de columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus en comparación con hardware de columna de acero inoxidable.

El análisis adicional de la variante desamidada VVSVLTVLHQDWLDGK (donde la asparagina en la posición 14 se convierte en ácido aspártico) demostró una mejor separación con respecto a su homóloga no modificada al utilizar la columna Altura. Esta resolución mejorada resulta especialmente valiosa para detectar modificaciones químicas y postraduccionales, como la desamidación, que constituye un atributo crítico de la calidad que debe caracterizarse en el desarrollo biofarmacéutico.

Con el fin de cuantificar el beneficio del hardware inerte, se inyectó un blanco en nuevas columnas de acero inoxidable y Altura para lograr un acondicionamiento rápido, seguido de 30 inyecciones consecutivas de la mezcla de péptidos de AcM sintéticos (Figura 3). Los resultados mostraron que la columna de acero inoxidable requirió al menos 10 inyecciones para lograr una recuperación del área de pico similar a la de la columna Altura para los péptidos ALPAPIEK y DTLMISR. En el caso del péptido VVSVLTVLHQDWLNGK, más hidrófobo y básico, la columna de acero inoxidable necesitó casi 20 inyecciones para igualar el desempeño de la columna Altura, lo que destaca la mayor rapidez de estabilización y reproducibilidad superior de la columna inerte.

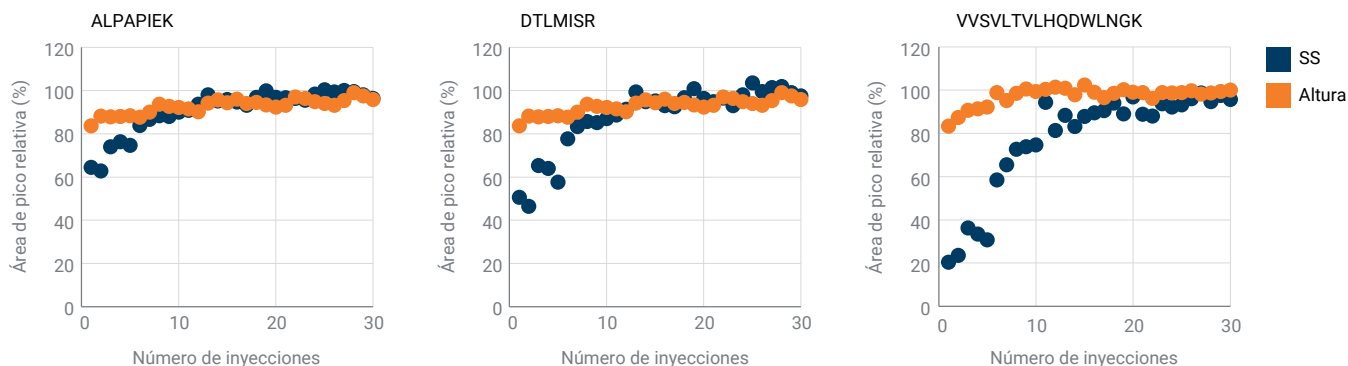


Figura 3. Comparaciones cuantitativas de péptidos sintéticos utilizando una columna de acero inoxidable y una columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus. Las tendencias del área relativa de los picos se representan a lo largo de 30 inyecciones. El hardware Altura muestra una estabilización más rápida y una mayor reproducibilidad en comparación con las columnas de acero inoxidable, concretamente para los péptidos hidrófobos y básicos.

Los parámetros de calidad del método cromatográfico, como el factor de cola (TF), un parámetro utilizado para cuantificar la asimetría de los picos, también respaldaron estos hallazgos (Figura 4). Los valores de TF de ALPAPIEK y DTLMISR fueron similares en ambas columnas, lo que indica que las formas de los picos son comparables. Sin embargo, el péptido VVSVLTVLHQDWLNGK presentó un TF significativamente mejor con la columna Altura (TF promedio = 1,3; n = 30) en comparación con la columna de acero inoxidable (TF promedio = 1,7; n = 30). Esto se corresponde con las observaciones cualitativas de la Figura 2 y sugiere que el hardware inerte mejora la simetría de los picos en péptidos difíciles.

Los valores de TF durante las 30 inyecciones revelaron que la columna de acero inoxidable mejoró gradualmente con el acondicionamiento, acercándose finalmente al desempeño de la columna Altura. No obstante, la forma inicial deficiente de los picos en la columna de acero inoxidable afectó negativamente a la separación de analitos con tiempos de elución cercanos, como la del péptido desamidado VVSVLTVLHQDWLDGK de su análogo no modificado. Como se muestra en la Figura 4C, la columna Altura logró una mayor resolución entre estas variantes, lo que permite una identificación más fiable de la modificación química.

A pesar del uso de un gradiente relativamente pronunciado (6 % B/min durante 6 minutos), la columna Altura logró una separación de mayor calidad. Este hallazgo indica que existe potencial para una optimización adicional, bien mediante la ampliación del gradiente o bien mediante la reducción de su pendiente para mejorar todavía más la resolución. En general, estos resultados demuestran que la columna de C18 inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus no solo mejora el desempeño cromatográfico en la resolución de modificaciones químicas y postraduccionales, sino que también permite analizar más muestras y aporta una mejor caracterización de las impurezas, lo que la convierte en una herramienta muy valiosa para flujos de trabajo robustos de mapeo de péptidos.

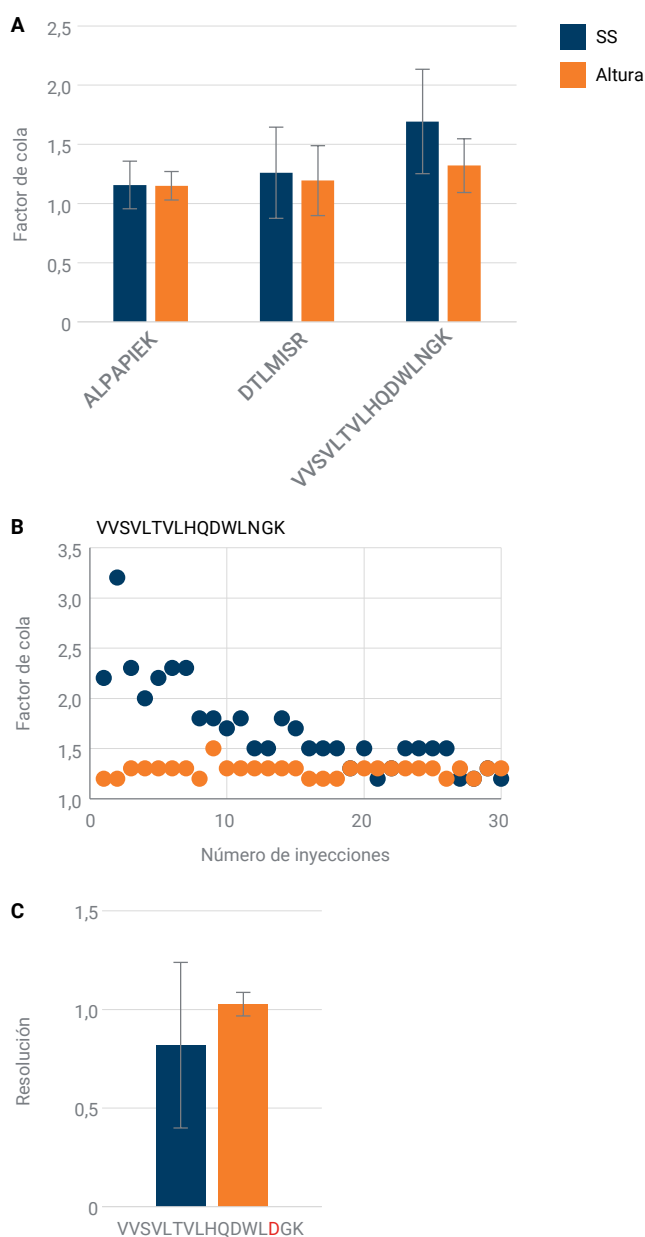
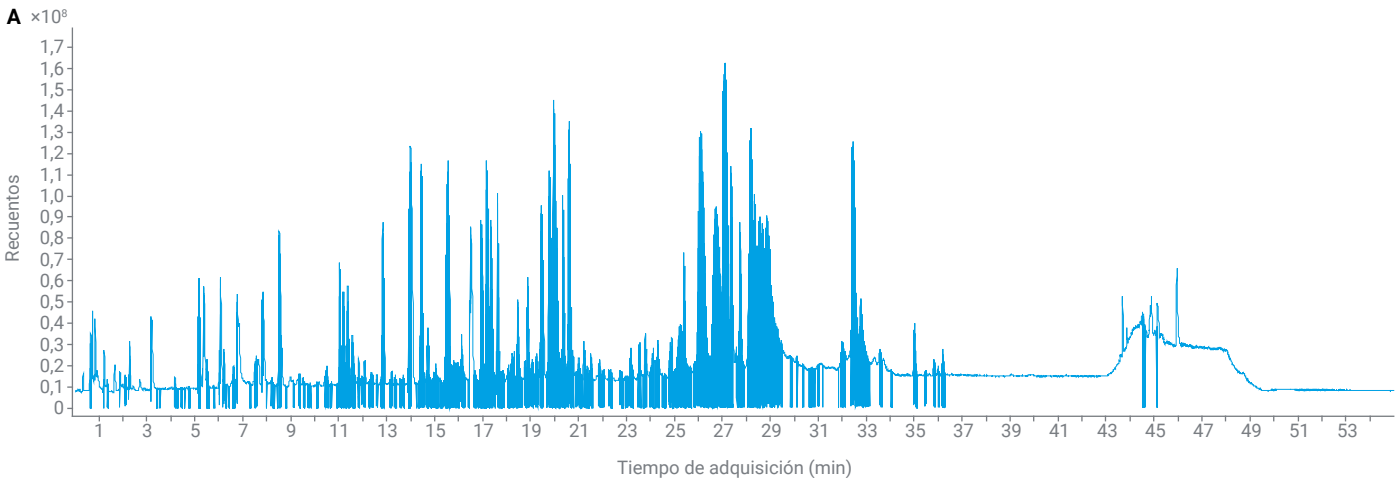


Figura 4. Parámetros de calidad del método cromatográfico para péptidos sintéticos utilizando una columna de acero inoxidable y una columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus. (A) Factores de cola promedio para ALPAPIEK, DTLMISR y VVSVLTVLHQDWLNGK. (B) Las tendencias del factor de cola se representan a lo largo de 30 inyecciones. (C) Resolución entre el par de péptidos desamidados VVSVLTVLHQDWLDGK y VVSVLTVLHQDWLNGK. La columna Altura demuestra una mejor simetría de los picos y una mayor resolución en las variantes con tiempos de elución cercanos en comparación con el hardware de acero inoxidable.

Mapeo de péptidos de Herceptin digerido con tripsina

Partiendo de las ventajas demostradas de la columna de C18 inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus, aplicamos esta tecnología al mapeo de péptidos de una muestra de Herceptin digerida con tripsina. La muestra digerida se analizó por LC/MS/MS con la columna Altura, y el cromatograma de corriente iónica total (TIC) resultante y la cobertura de la secuencia se muestran en la Figura 5. El análisis resultó en una cobertura de la secuencia del 87,03 %, donde los péptidos obtenidos mediante digestión con tripsina no detectados eran más cortos y más hidrófilos.

Cabe mencionar que la etapa de purificación en la columna de C18 llevada a cabo antes del análisis por LC/MS/MS, tal y como se describe en la sección experimental, puede haber contribuido a la pérdida de estos péptidos hidrófilos más cortos. Esta observación subraya una consideración importante para futuros diseños experimentales que tengan como objetivo lograr una cobertura de secuencia completa. En una nota de aplicación anterior en la que no se purificó la muestra para la digestión de Herceptin se logró una cobertura de secuencia de alrededor un 98% .⁴



B Mapeo de péptidos de Herceptin digerido con tripsina (cobertura de secuencia: 87,03%)

Cadena pesada

1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR
51	IYPTNGYTRY	ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG
101	GDGFYAMDYW	GQGLTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
151	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
201	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP
251	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
351	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV
401	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPG

Cadena ligera

1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVLT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
51	ASFLYSGVPS	RFGSGRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ
101	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN	RGEC			

Figura 5. Mapeo de péptidos de Herceptin digeridos con tripsina utilizando la columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus. (A) Cromatograma de corriente iónica total (TIC) obtenido durante el análisis por LC/MS/MS de Herceptin digerido con tripsina. (B) Mapa de cobertura de la secuencia que muestra una cobertura del 87,03 %, con los péptidos identificados resaltados en color azul oscuro. Los péptidos obtenidos mediante digestión con tripsina no detectados (en azul claro) son cortos e hidrófilos, lo que los hace susceptibles a pérdidas durante el paso de purificación en C18.

En la Figura 6 se muestran los espectros de MS/MS por CID del péptido NTAYLQMDSLRL en su forma desamidada. Los datos de los fragmentos iónicos permitieron asignar de manera fiable el sitio de desamidación a la posición 8, lo que demostró la utilidad de la MS/MS a la hora de caracterizar modificaciones químicas y postraduccionales.

Para enfatizar la importancia de la separación cromatográfica en la caracterización de péptidos desamidados, la Figura 7 muestra los EIC del péptido NTAYLQMNSLR tanto en su forma nativa como desamidada. Debido al pequeño desplazamiento de masa de 0,98 Da y a la intensidad de señal relativamente baja de la variante desamidada, es fundamental resolver estas formas mediante cromatografía. Por sí sola, la espectrometría de masas no puede distinguirlas de manera efectiva, ya que el pico monoisotópico del péptido desamidado (656.3221 m/z) se solapa con el segundo pico isotópico del péptido nativo (pico monoisotópico: 655.8318 m/z , segundo pico isotópico: 656.3328 m/z) (diferencia de 16 ppm). Por lo tanto, la separación cromatográfica de alta resolución, facilitada por el hardware de columna inerte, es esencial para la identificación y cuantificación precisas de la desamidación de péptidos.

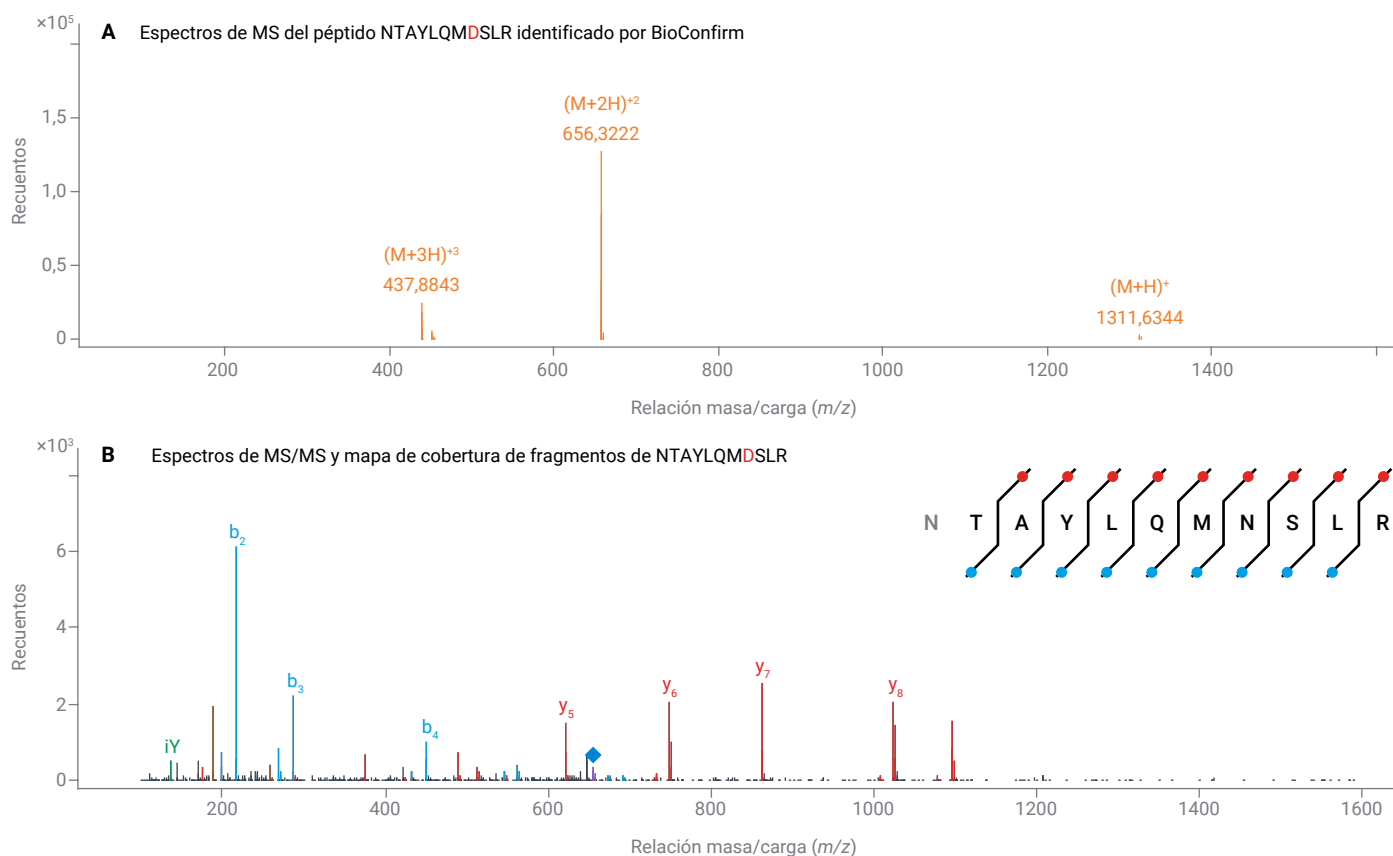


Figura 6. Espectros de MS y mapa de cobertura de fragmentos del péptido NTAYLQMDSLRL. Se utilizaron datos de fragmentación para asignar la desamidación a la posición 8, utilizando el software Agilent MassHunter BioConfirm.

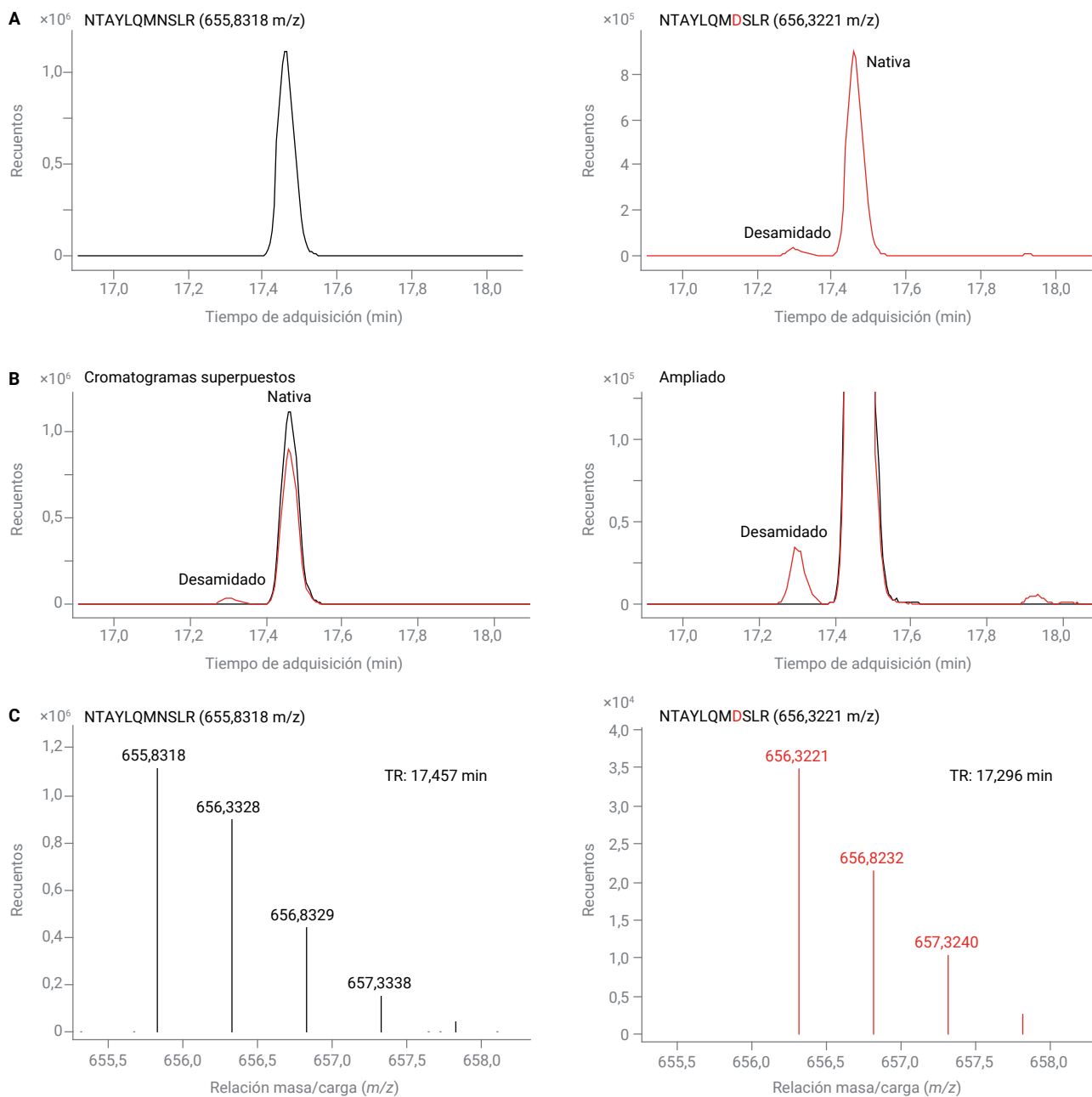


Figura 7. Separación cromatográfica del péptido NTAYLQMNSLR en sus formas nativa y desamidada. (A) Cromatogramas de iones seleccionados (EIC) utilizando masas precursoras de las formas nativa (655,8318 m/z) y desamidada (656,3221 m/z) con una carga de 2+. (B) Los cromatogramas individuales se superpusieron para mostrar la separación cromatográfica entre los péptidos nativos y desamidados; el recuadro ampliado destaca la separación de la impureza presente en baja concentración. (C) Se muestra el espectro de masas de los péptidos nativos y desamidados para ilustrar la necesidad de separar por cromatografía la forma desamidada de la nativa, ya que, de lo contrario, los espectros de masas por sí solos no podrían distinguir las dos formas si estuvieran coeluyendo.

Conclusión

Este estudio demuestra las importantes ventajas del hardware de columna de C18 inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus para los flujos de trabajo de mapeo de péptidos, especialmente en el análisis de péptidos de AcM y modificaciones químicas y postraduccionales. En comparación con el hardware de columna de acero inoxidable convencional, la columna Altura ofreció de manera consistente una mejor forma de los picos, una menor variabilidad y una mayor resolución, especialmente en el caso de los péptidos hidrófobos y modificados, más difíciles de analizar.

Los datos cuantitativos de 30 inyecciones consecutivas revelaron una estabilización más rápida de la columna y una reproducibilidad superior con el hardware Altura, mientras que los parámetros cromatográficos como el factor de cola y la resolución confirmaron su capacidad para separar mejor las especies con tiempos de elución cercanos. Estas ventajas también se validaron en el mapeo de péptidos de Herceptin digerido con tripsina, donde la columna Altura permitió la identificación fiable de las variantes desamidadas.

En conjunto, la combinación de la columna de C18 inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus con los sistemas de LC 1290 Infinity II Bio y LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio ofrece una solución robusta y fiable para lograr una alta productividad en el mapeo de péptidos y la caracterización de modificaciones, respaldando tanto la precisión analítica como la eficiencia operativa en el desarrollo biofarmacéutico.

Referencias

1. Hsiao, J.; *et al.* Pushing the Boundaries of Chromatographic Separation with Inert HPLC Column Hardware. *Agilent Technologies application note*, 5994-8618EN, **2025**.
2. Vanluchene, H.; *et al.* mRNA Mapping with IO-RPLC-MS on a Low-Adsorption Flow Path. *Agilent Technologies application note*, 5994-8055EN, **2025**.
3. Feith, A. Robust and Reliable Peptide Mapping. *Agilent Technologies application note*, 5994-2718EN, **2024**.
4. Sciuto, S. Peptide Mapping of Trastuzumab Tryptic Digests on an Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. *Agilent Technologies application note*, 5994-7969EN, **2024**.