

Ottimizzazione delle prestazioni cromatografiche nella mappatura dei peptidi

Utilizzando la colonna inerte Agilent Altura ZORBAX
Eclipse Plus C18

Autori

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

Abstract

Questo studio evidenzia i vantaggi prestazionali della colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 per la mappatura di peptidi. Rispetto all'hardware in acciaio inossidabile, la colonna Altura migliora la riproducibilità, la risoluzione e la forma dei picchi, soprattutto per quanto riguarda i peptidi idrofobi e modificati. Nell'analisi LC/MS di peptidi mAb sintetici e di Herceptin digerito mediante tripsina, la colonna inerte ha permesso un'identificazione affidabile di modificazioni post-traduzionali, con un miglioramento delle forme dei picchi e della risoluzione per i peptidi deamidati. La separazione migliorata di varianti deamidate mostra il valore della colonna nei flussi di lavoro biofarmaceutici che richiedono sensibilità e precisione elevate.

Introduzione

La mappatura dei peptidi è una tecnica critica nello sviluppo biofarmaceutico, utilizzata per confermare le sequenze delle proteine e identificare modificazioni post-traduzionali (PTM). Tuttavia, le interazioni tra analiti e superfici metalliche nell'hardware della cromatografia liquida (LC) possono compromettere la sensibilità e la risoluzione, soprattutto per i peptidi carichi o fosforilati. Recenti studi hanno sottolineato l'importanza dei percorsi di flusso inerti e dell'hardware della colonna nella mitigazione di queste problematiche.^{1,2}

In uno studio precedente, un metodo di mappatura dei peptidi che utilizza la colonna AdvanceBio Peptide Mapping è stato ottimizzato per ridurre i tempi di esecuzione da 2,5 ore a 1 ora sfruttando le particelle di dimensioni inferiori a 2 µm della colonna ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 e di un sistema UHPLC.³ Nonostante la riduzione significativa dei tempi di esecuzione, sono stati osservati pattern di eluizione peptidica confrontabili tra la colonna AdvanceBio Peptide Mapping e la colonna ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, assicurando la trasferibilità del metodo e risultati analitici coerenti tra differenti tecnologie di colonna. Tale miglioramento supporta una maggiore produttività in termini di campioni analizzati e riduce il consumo di solvente senza compromettere le prestazioni.

Per migliorare ulteriormente le prestazioni, le colonne inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 incorporano la tecnologia Ultra Inert, progettata per ridurre al minimo le interazioni dei metalli con gli analiti, mantenendo al contempo la forza meccanica dell'acciaio inossidabile (SS). In questo studio, confrontiamo le prestazioni delle colonne inerte Altura con colonne SS convenzionali utilizzando i sistemi LC Bio Agilent 1290 Infinity II e Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF per l'analisi LC/MS/MS di peptidi sintetici e campioni di anticorpi monoclonali (mAb) digeriti.

Condizioni sperimentali

Preparazione del campione

Herceptin è stato digerito con tripsina seguendo un protocollo descritto in precedenza⁴, con modificazioni. Nello specifico, la digestione è stata eseguita con tripsina utilizzando un rapporto proteina-enzima di 50:1. Nel protocollo precedente è stata utilizzata una miscela di tripsina/LysC a un rapporto proteina-enzima di 25:1 senza fase di purificazione del campione.

Prima dell'analisi LC/MS, i campioni sono stati puliti utilizzando una colonna C18 Spin per rimuovere le impurezze e migliorare la longevità della colonna.

Colonne analitiche

Colonna Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (codice 959759-902)

Colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (codice 204215-308)

Strumenti

L'analisi LC/MS è stata condotta utilizzando la seguente configurazione dello strumento:

- Pompa High Speed Bio Agilent 1290 Infinity II (G7132A)
- Multicampionatore Bio Agilent 1290 Infinity II con termostato del campione (G7137A)
- Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA)

Tabella 1. Parametri LC.

Sistema LC Agilent 1290 Infinity II Bio		
Parametro	Valore	
Fase mobile A	Acqua con acido formico allo 0,1%	
Fase mobile B	Acetonitrile con acido formico allo 0,1%	
Temperatura della colonna	60 °C	
Portata	0,4 mL/min	
Temperatura del campionatore	8 °C	
Gradiente 1 per peptidi sintetici	Tempo (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 per digerito triptico di Herceptin	Tempo (min)	%B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

Tabella 2. Parametri MS.

Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent	
Parametro	Valore
Origine	ESI positiva AJS doppia
Origine	
Temperatura del gas di essiccamento	250 °C
Flusso del gas di essiccamento	10 L/min
Temperatura dello sheath gas	250 °C
Flusso dello sheath gas	12 L/min
Pressione del nebulizzatore	25 psi
Tensione capillare	3.500 V
Tensione ugello	0 V
Fragmentor	95 V

Parametro	Valore
Skimmer	50 V
Acquisizione - MS	
Modalità di acquisizione	Range dinamico esteso (2 GHz)
Intervallo di massa	m/z da 100 a 3.000
Velocità di scansione	1 spettro/s
Massa di riferimento	121,0509, 922,0098
Acquisizione - MS/MS	
Modalità di acquisizione	MS/MS automatizzato
Intervallo di massa	m/z da 100 a 3.000
Velocità di scansione	3 spettro/secondo
Larghezza di isolamento (MS/MS)	Media (~4 amu)
Numero massimo di precursori per ciclo	5
Soglia per MS/MS	6.000 conteggi e 0,001%
Carica precursore	2+, 3+, > 3+
Target	50.000 conteggi/spettro

Tabella 3. Parametri dell'energia di collisione MS/MS.

Energia di collisione con rampa		
Carica	Pendenza	A1
2	3,1	1
3	3,6	-4,8
>3	3,6	-4,8

Tabella 4. Parametri di elaborazione del software Agilent MassHunter BioConfirm, versione 12.1.

Flusso di lavoro e sequenziamenti		
Flusso di lavoro	Digestione proteica	
Condizioni	Ridotti	
Sequenze	Herceptin (direttamente alchilato), tripsina	
Modificazioni variabili	Deamidazione, G0, G0F, G0F-GlcNAc, G2, G2F, H5N3F1-1, metilazione, ossidazione (M, W), pyroGlu (E)	
Enzimi	Tripsina	
Trovare i peptidi		
Filtri biomolecola	Mostrano molecole contenenti scansioni MS/MS	Abilitati
Estrazione	Utilizzo di picchi con altezza	≥ 600 conteggi
Specie ioniche	Ioni positivi	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
Stato di carica	Modello isotopico	Peptidi
	Limita gli stati di carica assegnati a un intervallo da	1 a 5
Filtri di picco (MS/MS)	Filtri altezza, altezza assoluta permessa	≥ 50 conteggi
Tolleranze di abbinamento		
Abbinamento delle masse	± 5 ppm MS1, ± 20 ppm MS2	
Punteggio	Avvisa se il punteggio è < 7,00	
	Nessun abbinamento se il punteggio è < 5,00 (copertura della sequenza)	
Regole di abbinamento	Tipo di frammentazione MS/MS	CID
	Numero di scissioni mancate	2
	Numero massimo di abbinamenti per biomolecola	3
	Intervallo di lunghezza dei peptidi	Da 3 a 70
	Consentito solo troncamento N-terminale o C-terminale	Selezionato
	Numero massimo di modifiche	2

Risultati e discussione

Valutazione dei miglioramenti cromatografici mediante hardware della colonna inerte

Per valutare i vantaggi in termini di prestazioni dell'hardware della colonna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 nei flussi di lavoro della mappatura dei peptidi, l'abbiamo confrontato con la colonna SS ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18. È stata analizzata una miscela di peptidi sintetici contenenti sequenze di mAb utilizzando il sistema LC Bio 1290 Infinity II accoppiato a 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF.

Sovrapposizioni iniziali di cromatogrammi ionici estratti (Figura 1) hanno mostrato tempi di ritenzione paragonabili in entrambe le colonne. Tuttavia, un'ispezione dettagliata di singoli peptidi ha rivelato notevoli differenze in termini di intensità del segnale, forma dei picchi e risoluzione (Figura 2). Ad esempio, il peptide idrofobo e basico VVSVLTVLHQDWLNGK ha mostrato picchi più ampi e un'intensità del segnale ridotta sulla colonna SS rispetto alla colonna Altura. Ciò suggerisce che le interazioni metallo-analita nell'hardware SS potrebbero influire sul recupero del campione e/o sulle prestazioni cromatografiche.

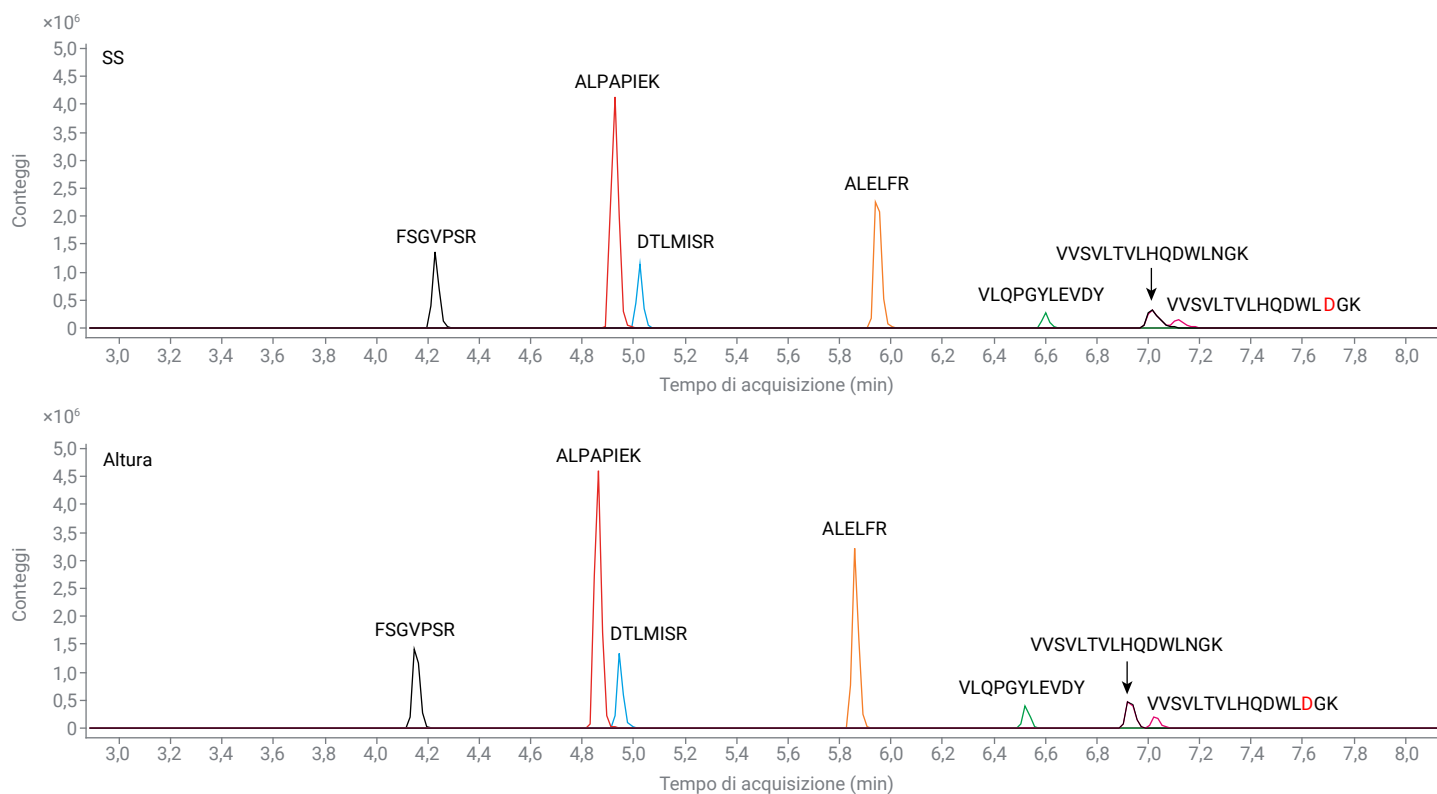


Figura 1. Separazione cromatografica di peptidi di anticorpi monoclonali sintetici mediante hardware della colonna in acciaio inossidabile (SS) e della colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18.

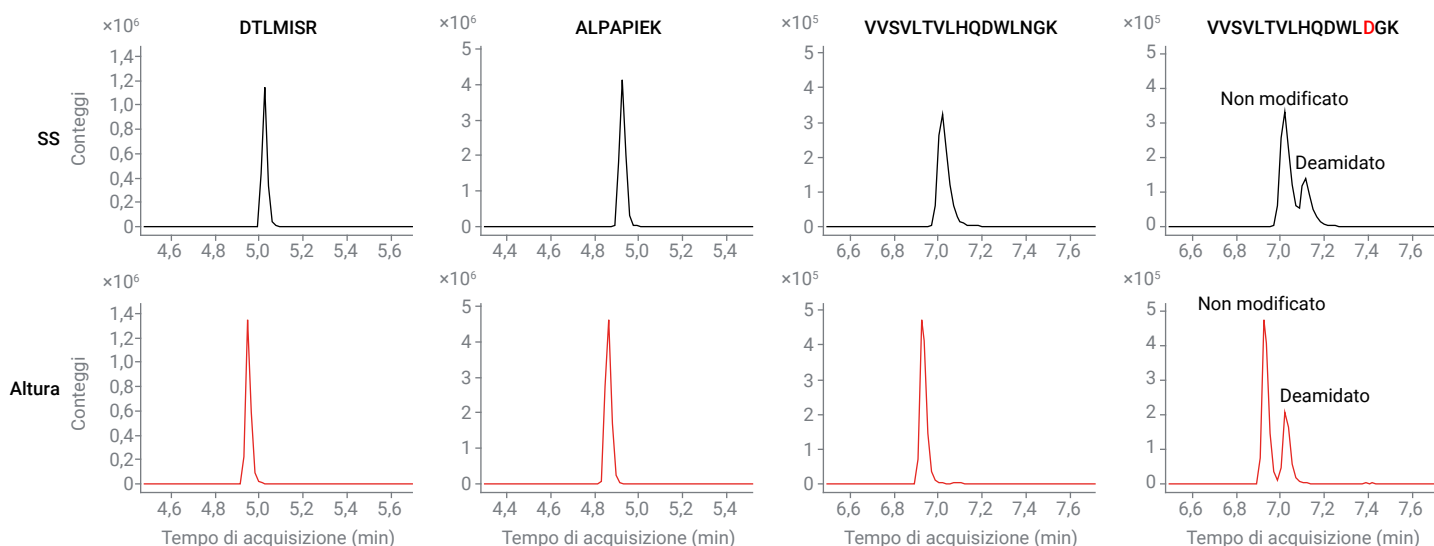


Figura 2. Miglioramento della forma dei picchi e della risoluzione di peptidi deamidati mediante l'hardware della colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 rispetto all'hardware della colonna in acciaio inossidabile (SS).

Un'ulteriore analisi della variante deamidata VVSVLTVLHQDWLDGK, dove l'asparagina in posizione 14 è stata convertita in acido aspartico, ha dimostrato un miglioramento della separazione dalla relativa controparte non modificata quando si utilizza la colonna Altura. Questa risoluzione migliorata è particolarmente valida per una rilevazione post-traduzionale e modificazioni quali deamidazione, che rappresentano attributi critici per la qualità che devono essere caratterizzati nello sviluppo biofarmaceutico.

Per determinare l'entità dei vantaggi dell'hardware della colonna inerte, nuove colonne SS e Altura sono state sottoposte a un'iniezione a vuoto per un rapido condizionamento, seguita da 30 iniezioni consecutive della miscela di peptidi mAb sintetici (Figura 3). Questi risultati hanno mostrato che la colonna SS ha richiesto almeno 10 iniezioni per raggiungere un recupero dell'area di picco simile a quello della colonna Altura per ALPAPIEK e DTLMISR. Per il peptide più idrofobo/basico VVSVLTVLHQDWLNGK, sono state effettuate quasi 20 iniezioni affinché le prestazioni della colonna SS corrispondessero alle prestazioni della colonna Altura, evidenziando la stabilizzazione più rapida e la riproducibilità superiore della colonna inerte.

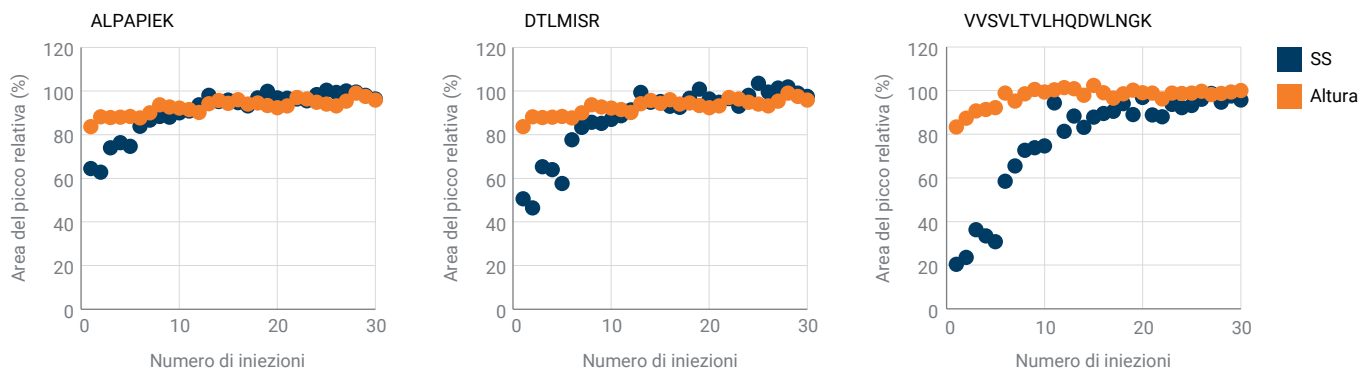


Figura 3. Confronti quantitativi per peptidi sintetici mediante colonna in acciaio inossidabile (SS) e colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18. Le tendenze delle aree di picco relative sono tracciate per 30 iniezioni. L'hardware Altura mostra una stabilizzazione più rapida e una riproducibilità superiore rispetto alle colonne SS, soprattutto per i peptidi idrofobi e basici.

Gli indicatori delle prestazioni cromatografiche, quali gli scodamenti (TF), una metrica utilizzata per quantificare l'asimmetria dei picchi, hanno supportato ulteriormente questi risultati (Figura 4). I TF per ALPAPIEK e DTLMISR erano simili tra le due colonne, a indicare forme dei picchi paragonabili. Tuttavia, VVSVLTVLHQDWLNGK ha mostrato un TF decisamente migliore con la colonna Altura (TF medio = 1,3, n = 30) rispetto alla colonna SS (TF medio = 1,7, n = 30). Tutto ciò si correla bene alle osservazioni qualitative riportate nella Figura 2 e indica che l'hardware inerte migliora la simmetria dei picchi per i peptidi complessi.

La tracciatura dei TF nelle 30 iniezioni ha rivelato che la colonna SS è migliorata gradualmente con il condizionamento, avvicinandosi infine alle prestazioni della colonna Altura. Ciononostante, la scarsa forma dei picchi iniziale sulla colonna SS ha influito negativamente sulla separazione di analiti con eluizione ravvicinata, quali il peptide deamidato VVSVLTVLHQDWLDGK dalla relativa controparte non modificata. Come mostrato nella Figura 4C, la colonna Altura ha ottenuto una risoluzione migliore tra queste varianti, permettendo un'identificazione ancora più affidabile nella modifica chimica.

Nonostante l'impiego di un gradiente relativamente ripido (6% B/min per 6 minuti), la colonna Altura ha ottenuto una separazione superiore. Tale risultato indica un potenziale di ulteriore ottimizzazione mediante estensione del gradiente o riduzione della pendenza di quest'ultimo per migliorare ancora di più la risoluzione. Nel complesso, questi risultati dimostrano che la colonna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 non solo migliora le prestazioni cromatografiche della PTM e la risoluzione delle modifiche chimiche, ma supporta anche una maggiore produttività in termini di campioni analizzati e una migliore profilazione delle impurezze, rendendola uno strumento valido per flussi di lavoro robusti di mappatura dei peptidi.

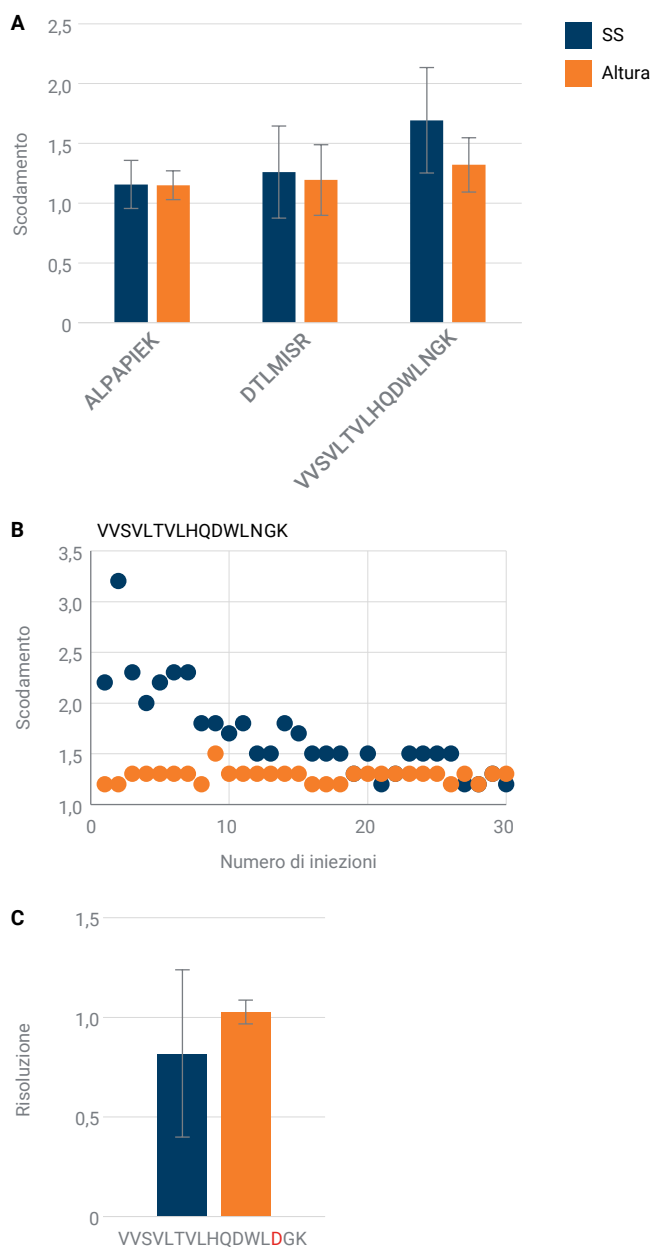
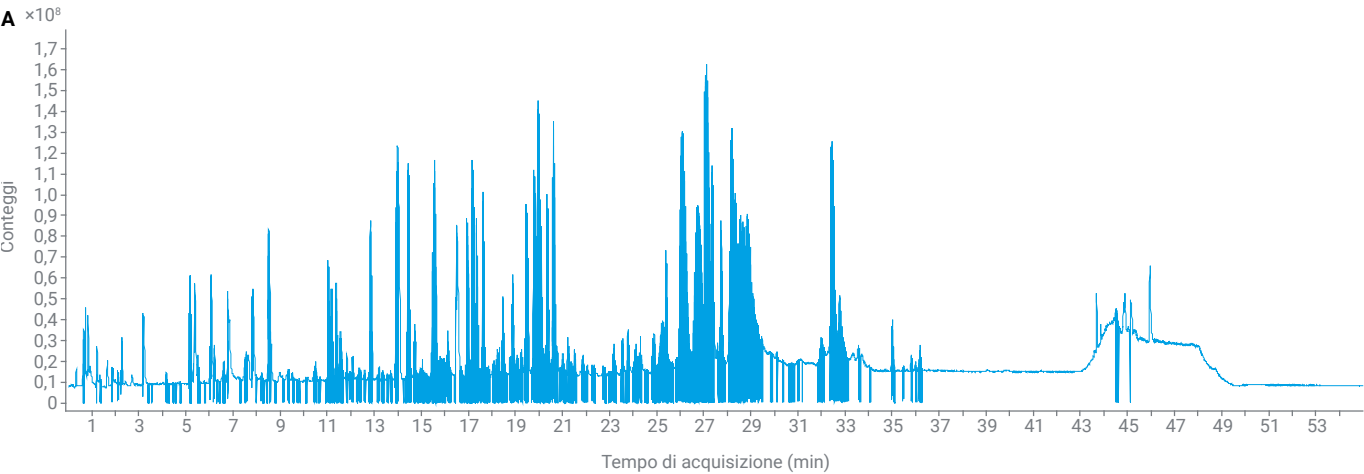


Figura 4. Metriche delle prestazioni cromatografiche per peptidi sintetici mediante colonna in acciaio inossidabile (SS) e colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18. (A) Scodamenti medi per ALPAPIEK, DTLMISR e VVSVLTVLHQDWLNGK. (B) Le tendenze degli scodamenti sono tracciate per 30 iniezioni. (C) Risoluzione tra la coppia di peptidi deamidati VVSVLTVLHQDWLDGK e VVSVLTVLHQDWLNGK. La colonna Altura mostra una simmetria dei picchi migliorata e una separazione ottimizzata di varianti a eluizione ravvicinata rispetto all'hardware SS.

Mappatura dei peptidi di Herceptin digerito mediante tripsina

Basandoci sui vantaggi dimostrati della colonna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18, abbiamo applicato questa tecnologia alla mappatura dei peptidi di un campione di Herceptin digerito mediante tripsina. Il campione digerito è stato analizzato utilizzando LC/MS/MS con la colonna Altura, e il cromatogramma ionico totale (TIC) risultante e la copertura della sequenza sono mostrati nella Figura 5. L'analisi ha fornito una copertura della sequenza dell'87,03%, con i peptidi triptici mancanti più corti e di natura più idrofila.

Va notato che la fase di purificazione C18 eseguita prima dell'analisi LC/MS/MS, come descritto nella sezione Condizioni sperimentali, potrebbe aver contribuito alla perdita di tali peptidi idrofilici più corti. Questa osservazione mette in luce un'importante considerazione per i futuri progetti sperimentali che mirano a una copertura completa della sequenza. Una nota applicativa precedente che non ha utilizzato la purificazione del campione per il digerito Herceptin è riuscita a ottenere una copertura della sequenza di ~98%.⁴



B Mappatura dei peptidi di Herceptin con tripsina (copertura della sequenza: 87,03%)

Catena pesante

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

Catena leggera

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

Figura 5. Mappatura dei peptidi di Herceptin digerito mediante tripsina utilizzando la colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18. (A) Cromatogramma ionico totale (TIC) per l'analisi LC/MS/MS di Herceptin digerito mediante tripsina. (B) Mappa di copertura della sequenza che mostra una copertura dell'87,03% con i peptidi identificati nel testo blu scuro. I peptidi triptici mancanti (testo azzurro) presentano caratteristiche chimiche corte e idrofile che tendono alla perdita del campione durante la fase di purificazione C18.

La Figura 6 presenta gli spettri CID MS/MS per il peptide NTAYLQMDSLRL nella sua forma deamidata. I dati sugli ioni frammento hanno permesso un'assegnazione affidabile del sito di deamidazione alla posizione 8, dimostrando l'utilità di MS/MS nella caratterizzazione delle modificazioni post-traduzionali e chimiche.

Per sottolineare l'importanza della separazione cromatografica per caratterizzare peptidi deamidati, la Figura 7 mostra EIC per NTAYLQMNSLR sia nella sua forma nativa sia nelle forme deamidate. In ragione del piccolo spostamento di massa di 0,98 Da e dell'intensità del segnale relativamente bassa della variante deamidata, la risoluzione di queste forme a livello cromatografico è fondamentale. Con la sola spettrometria di massa non è possibile distinguerli in modo efficace, in quanto il picco monoisotopico del peptide deamidato ($656,3221\ m/z$) si sovrappone al secondo picco isotopico del peptide nativo (picco monoisotopico: $655,8318\ m/z$, secondo picco isotopico: $656,3328\ m/z$) (differenza di 16 ppm). Pertanto, una separazione cromatografica ad alta risoluzione, mediante hardware della colonna inerte, è essenziale per un'identificazione e una quantificazione accurate per la deamidazione dei peptidi.

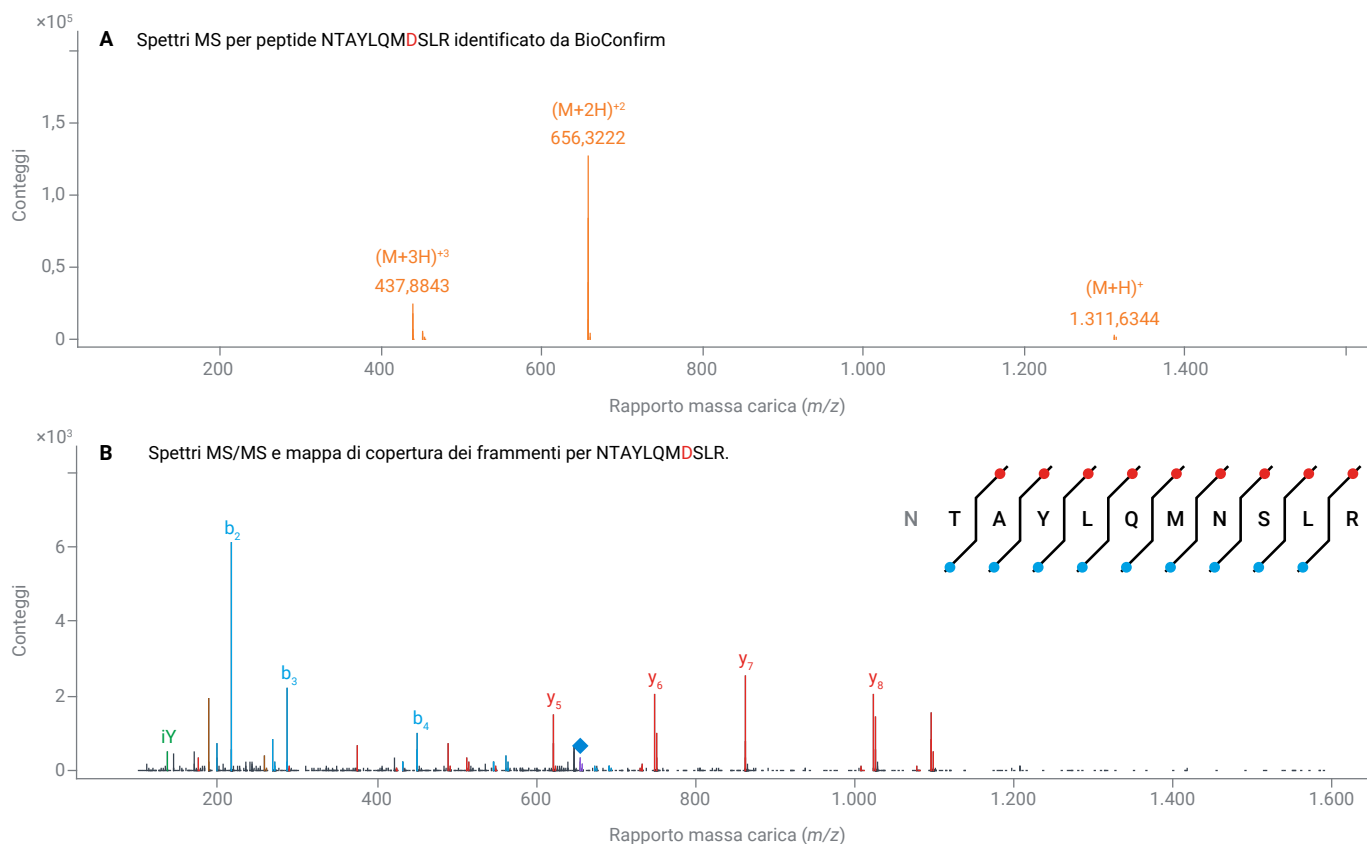


Figura 6. Spettri MS e mappa di copertura dei frammenti per il peptide NTAYLQMDSLRL. I dati di frammentazione sono stati utilizzati per assegnare la deamidazione alla posizione 8, utilizzando il software Agilent MassHunter BioConfirm.

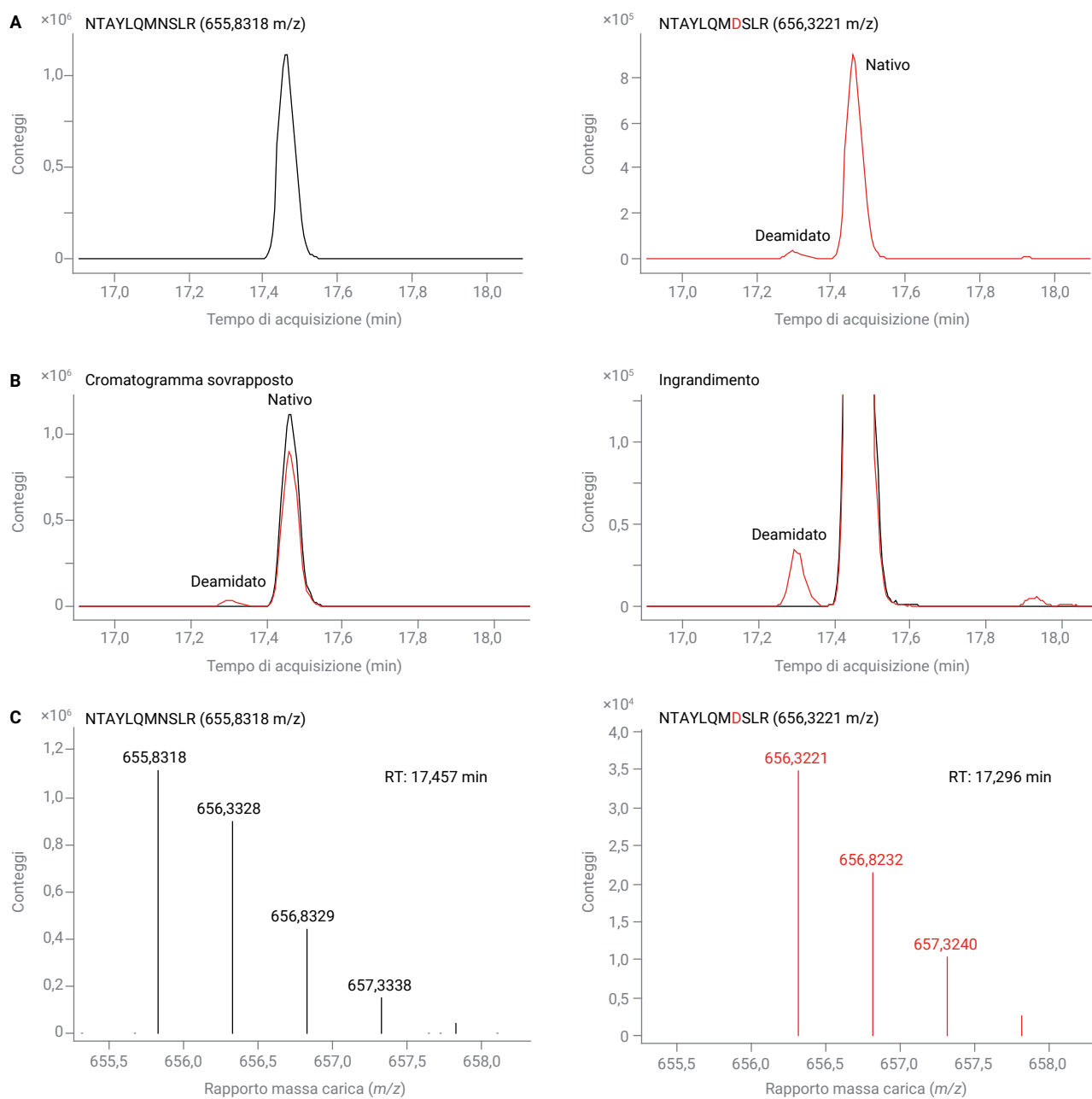


Figura 7. Separazione cromatografica del peptide NTAYLQMNSLR nelle forme nativa e deamidata. (A) Cromatogrammi ionici estratti (EIC) mediante l'utilizzo di masse precursori delle forme nativa (655,8318 m/z) e deamidata (656,3221 m/z) a uno stato di carica 2+. (B) I singoli cromatogrammi sono stati sovrapposti per mostrare la separazione cromatografica tra i peptidi nativi e quelli deamidati, con il cromatogramma ingrandito a indicare la separazione delle impurezze di basso livello. (C) Lo spettro di massa dei peptidi nativo e deamidato è mostrato per indicare la necessità di risolvere a livello cromatografico la forma deamidata da quella nativa, altrimenti con i soli spettri di massa non sarebbe stato possibile distinguere le due forme se fossero stati coeluenti.

Conclusione

Questo studio dimostra i significativi vantaggi dell'hardware della colonna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 per i flussi di lavoro della mappatura dei peptidi, soprattutto nell'analisi di peptidi mAb e modificazioni post-traduzionali e chimiche. Rispetto all'hardware della colonna SS convenzionale, la colonna Altura ha fornito costantemente una forma dei picchi migliorata, una variabilità ridotta e una risoluzione ottimizzata, soprattutto per peptidi idrofobi e modificati complessi.

I dati quantitativi di 30 iniezioni consecutive hanno rivelato una stabilizzazione più rapida della colonna e una riproducibilità superiore con l'hardware Altura, mentre le metriche cromatografiche quali scodamento e risoluzione hanno confermato la sua capacità di separare meglio le specie con eluizione ravvicinata. Questi vantaggi sono stati convalidati ulteriormente nella mappatura dei peptidi di Herceptin digerito mediante tripsina, dove la colonna Altura ha permesso un'identificazione affidabile di varianti deamidate.

Complessivamente, la colonna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18, insieme ai sistemi LC Bio 1290 Infinity II e 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF offre una soluzione solida e affidabile per la mappatura di peptidi ad alta produttività e la caratterizzazione di modificazioni, supportando sia la precisione analitica sia l'efficienza operativa nello sviluppo biofarmaceutico.

Bibliografia

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

www.agilent.com

DE-010885

Le informazioni fornite possono essere soggette a modifica senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
Stampato negli Stati Uniti, 18 novembre 2025
5994-8776ITE