

Caracterización mejorada de péptidos y evaluación de la estabilidad

Espectroscopia de segunda derivada UV-Vis en un espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda

Autor

Suresh Babu C. V.
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

La monitorización de la estabilidad de los tratamientos terapéuticos con péptidos es fundamental en el desarrollo biofarmacéutico. Las técnicas convencionales de espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) que se utilizan habitualmente en los estudios de estabilidad a menudo no proporcionan una resolución de longitud de onda suficiente, especialmente en el caso de moléculas biológicas como las proteínas y el ADN, que suelen presentar bandas amplias. Esto dificulta la detección de cambios estructurales sutiles, especialmente cuando las características espectrales coinciden. Esta nota de aplicación muestra las ventajas de utilizar la espectroscopia UV-Vis de segunda derivada con el espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda para mejorar la caracterización de péptidos y evaluar la estabilidad. Las funciones avanzadas del espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda, que incluyen el análisis en múltiples celdas y el cálculo derivativo integrado, agilizan la adquisición y el análisis de datos, lo que lo convierte en una herramienta valiosa para los estudios de estabilidad de péptidos en aplicaciones biofarmacéuticas.

Introducción

Los péptidos sintéticos son una clase de productos bioterapéuticos en auge. Los agonistas del péptido análogo al glucagón de tipo 1 (GLP-1) son péptidos sintéticos que simulan la acción de la hormona GLP-1 endógena y desempeñan un papel importante en la regulación metabólica, además de favorecer tanto la secreción de insulina como la pérdida de peso.¹ Dado que la molécula de GLP-1 puede degradarse en diversas vías de degradación, evaluar la calidad y la estabilidad de los tratamientos con GLP-1 es fundamental para garantizar su eficacia.

La estabilidad de los péptidos se determina habitualmente observando los cambios en los espectros de absorbancia obtenidos mediante espectroscopia ultravioleta.² Al ser una técnica no destructiva, ofrece importantes ventajas en el flujo de trabajo. Por ejemplo, las muestras valiosas permanecen intactas tras el análisis y pueden analizarse posteriormente mediante técnicas complementarias, como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Además, la espectroscopia UV-Vis es rápida y fácil, lo que la hace accesible a una amplia gama de usuarios.

Sin embargo, los espectros de absorción UV-Vis convencionales pueden ser difíciles de interpretar cuando se monitorizan cambios sutiles, como pequeños desplazamientos en las posiciones de las bandas o variaciones menores en la intensidad, especialmente en el caso de biomoléculas expuestas a factores ambientales como el estrés oxidativo. La baja resolución de las características espectrales también supone un reto cuando los espectros de biomoléculas contienen múltiples componentes superpuestos. La espectroscopia derivativa es una potente técnica que soluciona estas limitaciones al realzar características sutiles, lo que permite resolver bandas superpuestas que serían indistinguibles en un espectro de absorción convencional.

El espectrofotómetro de UV-Vis Agilent 3500 Multicelda con su módulo de múltiples celdas es una potente herramienta para el análisis de biomoléculas mediante análisis de segunda derivada. El instrumento permite el análisis simultáneo de múltiples muestras —incluidos patrones, muestras y controles— en las mismas condiciones. El software Agilent Cary UV Workstation, que controla el espectrofotómetro de UV-Vis Cary 3500 Multicelda, incluye una función de ecuación integrada que genera automáticamente espectros de segunda derivada tras la determinación de la absorbancia, con el fin de minimizar los errores de cálculo y agilizar el procesamiento de datos.

Esta nota de aplicación muestra cómo usar las funciones avanzadas del espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda y la espectroscopia UV-Vis de segunda derivada para mejorar la resolución de las bandas de absorción superpuestas en espectros de péptidos y aminoácidos aromáticos.

Experimento

Materiales

El triptófano (W), la tirosina (Y), la fenilalanina (F), la hormona estimulante de los melanocitos α (MSH), la melitina, la liraglutida, la angiotensina II, el peróxido de hidrógeno al 30 % (v/v) (H_2O_2) y el fosfato sódico se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri, EE. UU.).

Preparación de muestras

Todas las muestras de péptidos, incluidos el triptófano (0,15 mM), la tirosina (0,5 mM) y la fenilalanina (4,0 mM), se prepararon en tampón de fosfato sódico, pH 7,4, a una concentración de 1 mg/ml. Para las condiciones de estrés oxidativo, los péptidos se incubaron con H_2O_2 al 0,07 % durante toda la noche a temperatura ambiente. No se requirió ninguna otra preparación de muestras antes del análisis por UV-Vis.

Instrumentos

La adquisición de datos se realizó mediante el espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda equipado con el software Cary Workstation, utilizando los parámetros que se indican en la tabla 1. El diseño con múltiples celdas permite el análisis simultáneo de hasta siete muestras junto con una muestra de referencia. Las determinaciones se realizaron con una cubeta rectangular de ultramicrovolumen con un recorrido óptico de 10 mm (número de referencia de Agilent 5062-2496). Los espectros de múltiples determinaciones ($n = 5$) se promediaron para garantizar la reproducibilidad y reducir el ruido.

Tabla 1. Parámetros del método del espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda.

Parámetro	Valor
Modo de adquisición	Barrido
Intervalo de barrido	De 200 a 500 nm
Tiempo promedio	0,02 s
Intervalo de datos	1,00 nm
Velocidad de barrido	3000 nm/min
Ancho de banda espectral	2,00 nm
Derivada	Segunda derivada
Filtro de suavizado	9

Resultados y comentarios

Espectros de UV-Vis de aminoácidos aromáticos

El triptófano, la fenilalanina y la tirosina son aminoácidos aromáticos que se encuentran comúnmente en péptidos y proteínas y tienen perfiles de absorción UV-Vis característicos. La figura 1A muestra los espectros de UV-Vis de orden cero del triptófano, la fenilalanina y la tirosina. Las bandas superpuestas en los espectros de orden cero dificultan la distinción de las características espectrales sutiles de los aminoácidos.

Para mejorar la resolución y la precisión de los espectros de absorción, se analizaron los espectros derivados de segundo orden basándose en el método de Savitzky-Golay. Las figuras 1B, 1C y 1D muestran los espectros de UV-Vis de segunda derivada de la tirosina, la fenilalanina y el triptófano. Una vez obtenidas las determinaciones de la

muestra, se generaron automáticamente los espectros de segundo orden mediante la función de cálculo integrada en el software Cary UV Workstation. Los espectros de derivadas de segundo orden muestran bandas con máximos y mínimos (puntos de inflexión) que pueden utilizarse para distinguir las diferentes bandas de absorción espectral de los distintos aminoácidos aromáticos, lo que permite estudiar cambios pequeños en los espectros que se producen cuando las biomoléculas están expuestas a condiciones de estrés oxidativo. Los máximos de absorción de los aminoácidos fueron:

- **Triptófano:** Absorción máxima a aproximadamente 273, 280 y 288 nm
- **Tirosina:** Absorción máxima a aproximadamente 275 y 282 nm
- **Fenilalanina:** Absorción máxima a aproximadamente 246, 252, 257, 264 y 268 nm

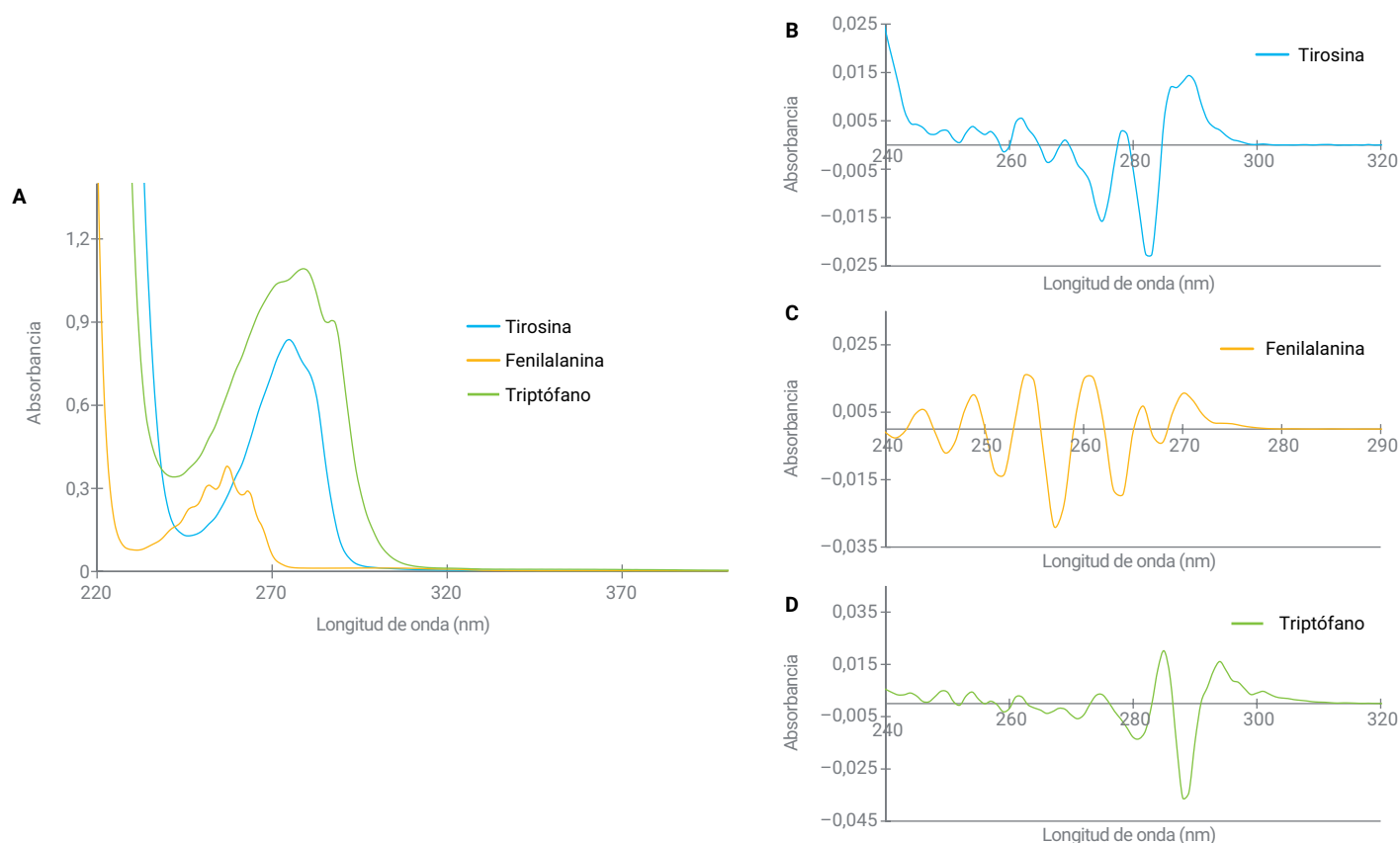


Figura 1. Espectros de absorción UV-Vis de aminoácidos aromáticos. Espectros de absorción UV-Vis de derivada de orden cero (A) y de derivada de segundo orden (B, C y D).

Espectros de UV-Vis de péptidos

Para generar diferentes espectros de absorción para su comparación, los péptidos seleccionados para el estudio tenían proporciones variables de aminoácidos aromáticos. La figura 2 muestra los espectros de absorción de derivada de segundo orden de los cuatro péptidos: melitina, MSH, angiotensina II y liraglutida. Las ubicaciones de las bandas en los espectros de derivadas de segundo orden se correlacionaban bien con las características de absorción conocidas de los aminoácidos aromáticos que

los componen. En general, los espectros de derivadas de segundo orden proporcionaron una visión más detallada de las características espectrales de los péptidos. El número de aminoácidos aromáticos presentes en los péptidos estudiados se resume en la tabla 2. La melitina presentó bandas características a 291, 283 y 275 nm, que se atribuyeron principalmente al triptófano. La MSH y la liraglutida presentaron bandas a 290, 283 y 266 nm, lo que refleja las contribuciones de los tres aminoácidos aromáticos. La angiotensina II presentó bandas a 283, 276, 264, 258 y 252 nm, lo que coincidía con la presencia de tirosina y fenilalanina.

Tabla 2. Composición aminoacídica de los péptidos analizados.

Péptidos	Secuencia	Número de triptófanos (W)	Número de tirosinas (Y)	Número de fenilalaninas (F)
Liraglutida	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVRGRG	1	1	1
Melitina	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	1	0	0
Hormona estimulante de los melanocitos alfa (MSH)	SYSMEHFRWGKPV	1	1	1
Angiotensina II	DRVYIHPF	0	1	1
Sustancia P	RPKPQGFGLM	0	0	2

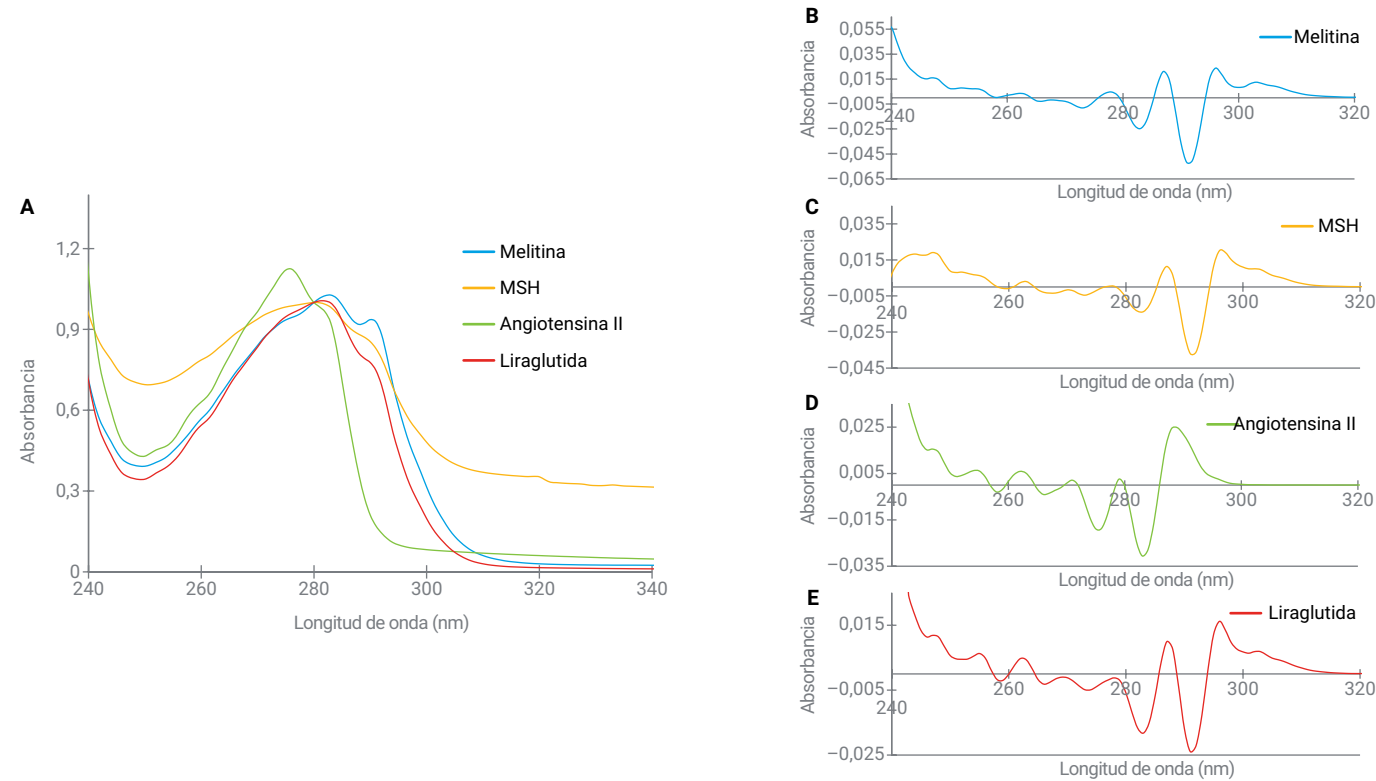


Figura 2. Espectros de absorción UV-Vis de péptidos. Espectros de absorción UV-Vis de derivada de orden cero (A) y de derivada de segundo orden (B, C, D y E).

Monitorización de la estabilidad de los péptidos en condiciones de estrés oxidativo

Para evaluar la utilidad de la espectroscopia derivativa para la monitorización de la estabilidad, los péptidos se trataron con H_2O_2 . La figura 3 muestra la comparación de los espectros de UV-Vis de derivada de segundo orden de péptidos sin tratar y tratados con H_2O_2 . Los cambios mínimos en la absorbancia de la longitud de onda del péptido debidos al tratamiento con H_2O_2 se captaron eficazmente en los espectros de derivada de segundo orden. El péptido angiotensina II carece del residuo de triptófano, por lo que no se observó ningún cambio significativo en torno a la región de 291 nm tras el tratamiento con H_2O_2 . Se observaron cambios mínimos en el espectro de derivada de segundo orden de la melitina, lo que indica que es menos propensa a la oxidación. La MSH y la liraglutida, que contienen triptófano, mostraron una pérdida notable

en la intensidad de la banda de 291 nm tras el tratamiento con H_2O_2 . Esto indica la susceptibilidad de los compuestos a la oxidación, que afecta principalmente a los residuos de triptófano, lo que demuestra aún más la especificidad del método de segunda derivada para detectar la oxidación del triptófano. Para confirmar adicionalmente el estado de oxidación de la liraglutida, las muestras tratadas con H_2O_2 se analizaron mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo (LC/Q-TOF-MS). La figura 4 muestra el cromatograma de corriente iónica total (TIC) de la liraglutida tratada con H_2O_2 . El espectro de masas deconvolucionado confirmó las formas de oxidación, mostrando desplazamientos de masa de +16 Da y +32 Da, que corresponden a productos de monooxidados y dioxidados, respectivamente.³

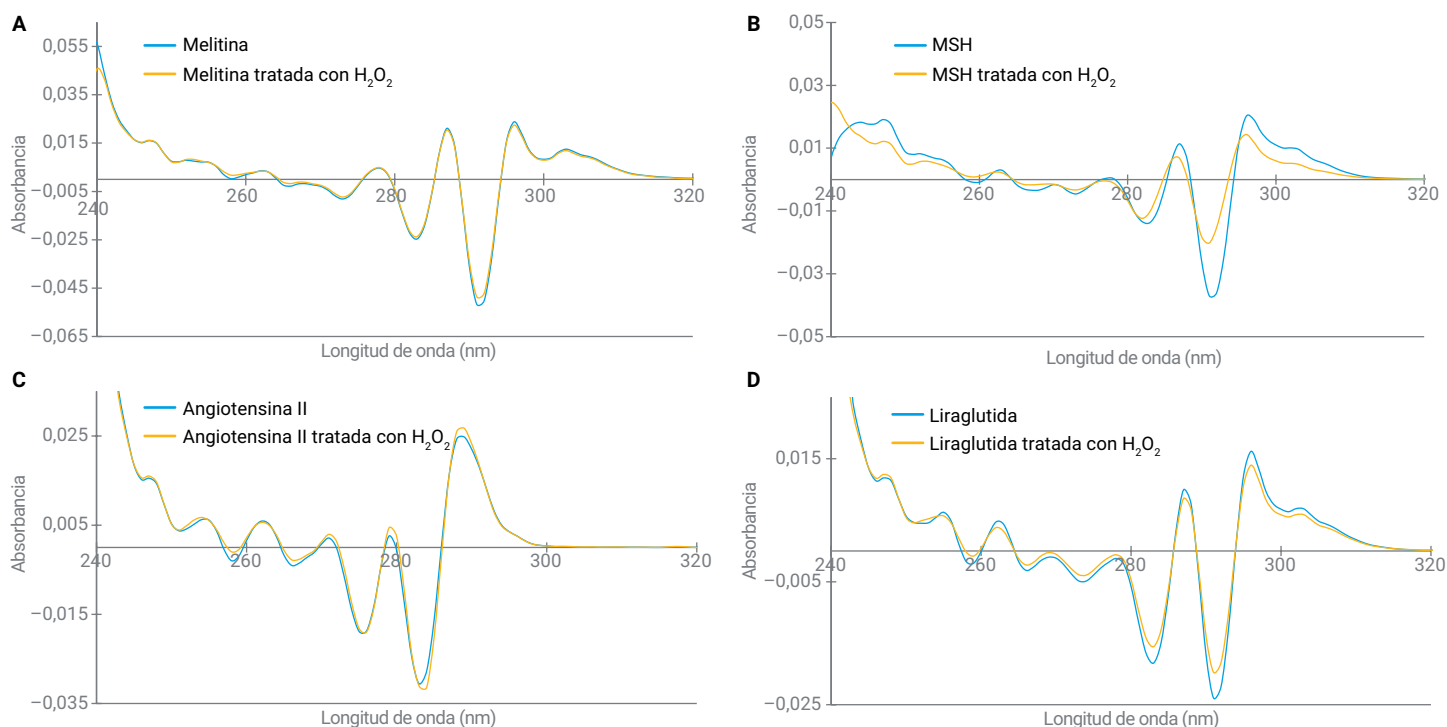


Figura 3. Espectros de absorción UV-Vis de derivada de segundo orden de péptidos sin tratar y tratados con H_2O_2 .

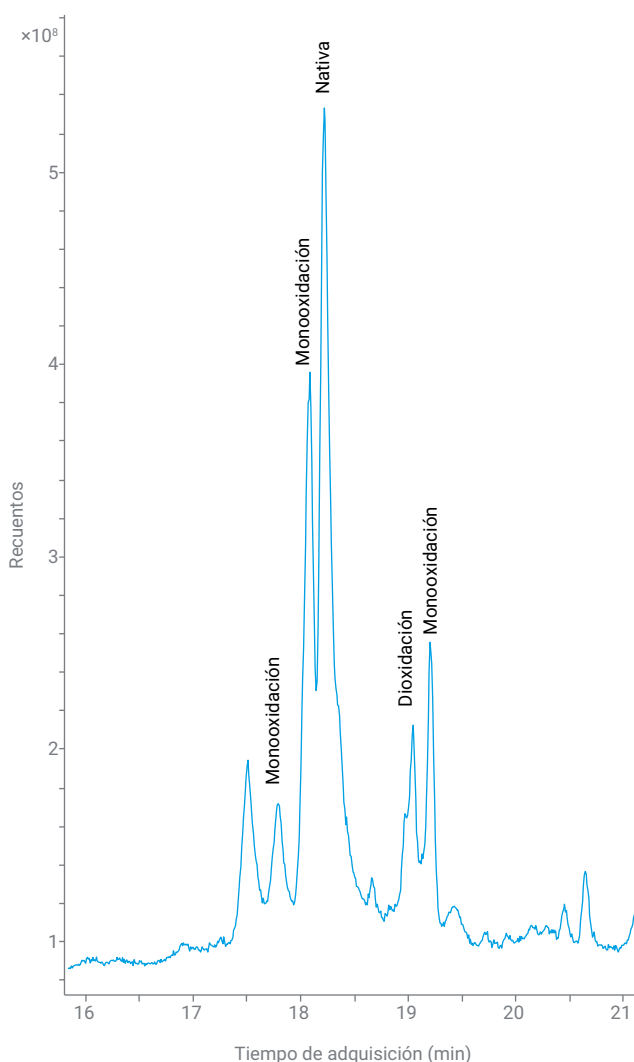


Figura 4. Cromatograma de corriente iónica total por LC/MS de liraglutida oxidada.

Conclusión

Los resultados de este estudio ponen de relieve la capacidad de la espectroscopia UV-Vis de segunda derivada para identificar y monitorizar con precisión las sutiles diferencias espectrales derivadas de los cambios en los residuos aromáticos de los péptidos, lo que la convierte en una herramienta muy valiosa para monitorizar la estabilidad de los péptidos. La función de múltiples celdas del espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda reduce el tiempo de análisis al permitir la monitorización simultánea de ocho muestras. La función de cálculo integrada agiliza el análisis con cálculos automatizados, lo que facilita a los usuarios la interpretación de los datos y la toma de decisiones. Esta capacidad es especialmente valiosa para el análisis biofarmacéutico, donde el control preciso y eficiente de la estabilidad de los péptidos es crucial para el desarrollo de fármacos y el control de calidad. La espectroscopia UV-Vis no destructiva conserva las muestras para análisis posteriores, como el análisis complementario por LC-MS. El espectrofotómetro de UV-Vis Agilent Cary 3500 Multicelda es la opción ideal para laboratorios de desarrollo de fármacos y control de calidad (QC), donde la velocidad, la facilidad de uso y la capacidad de reutilizar muestras valiosas son fundamentales.

Referencias

1. Müller, T. D.; Finan, B.; Bloom, S. R.; D'Alessio, D.; Drucker, D. J.; Flatt, P. R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H. J.; Habener, J. F.; *et al.* Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). *Mol. Metab.* **2019**, *30*, 72–130.
2. Liyanage, M. R.; Bakshi, K.; Volkin, D. B.; Middaugh, C. R. Ultraviolet Absorption Spectroscopy of Peptides. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1088*, 225–236.
3. Suresh Babu, C.V. Characterization of Forced Degradation Impurities of Glucagon-Like Peptide-1 Agonists by LC/Q-TOF Mass Spectrometry. *Agilent Technologies application note* 5994-7794EN. **2025**.