

Análisis de un péptido sintético y sus impurezas

Utilización de fases móviles compatibles con la espectrometría de masas con una columna Agilent AdvanceBio Peptide Plus

Autores

Andrew Coffey y Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

Convencionalmente, la separación cromatográfica de péptidos con detección UV se realiza utilizando columnas C18 de HPLC de fase reversa y fases móviles que contienen ácido trifluoroacético (TFA) como reactivo de emparejamiento iónico. Sin embargo, aunque el ácido trifluoroacético proporciona una mejor resolución, puede suprimir la señal de la espectrometría de masas (MS). El ácido fórmico (FA) es uno de los reactivos de emparejamiento iónico preferidos para la detección por MS, pero puede dar lugar a una separación subóptima con muchas columnas C18 tradicionales. Esta nota de aplicación presenta el uso de la columna Agilent AdvanceBio Peptide Plus para separar impurezas de péptidos sintéticos con ácido fórmico compatible con MS como modificador de la fase móvil.

Introducción

La mayoría de los medicamentos peptídicos se fabrican mediante síntesis peptídica en fase sólida. Las impurezas relacionadas con los péptidos sintéticos pueden provenir de las materias primas, de los procesos de fabricación o ser generadas por la degradación durante la fabricación o el almacenamiento.¹ Tradicionalmente, la separación de péptidos se consigue utilizando columnas de fase reversa con ácido trifluoroacético (TFA) como modificador de la fase móvil y UV como detector. Sin embargo, el ácido trifluoroacético no es ideal para la espectrometría de masas (MS), ya que puede suprimir la señal de la MS.

Para identificar los picos de impurezas en un método LC/MS, uno de los modificadores de fase móvil preferidos es el ácido fórmico (FA), pero da lugar a una separación subóptima con las columnas C18 tradicionales.

El ácido trifluoroacético (pKa de aproximadamente 0,23) puede reducir el pH para protonar las concentraciones de silanol residuales (incompletamente alquilados o con tapón terminal) en la superficie de la fase estacionaria, sin dejar carga negativa para interactuar con los péptidos cargados positivamente, facilitando una buena forma del pico. Además, los aniones ácido trifluoroacético forman un par de iones con los péptidos de carga positiva, lo que aumenta su hidrofobicidad e incrementa su tiempo de retención. Por el contrario, el ácido fórmico (pKa de aproximadamente 3,77) es un ácido más débil que el ácido trifluoroacético y no puede bajar el pH lo suficiente como para protonar todas las concentraciones de silanol, por lo que la interacción entre los silanoles y los péptidos no se enmascara completamente. Esto suele dar lugar a picos más amplios, un aumento de las colas y, en general, una menor resolución y capacidad de picos en comparación con el uso de ácido trifluoroacético como modificador.

La fase estacionaria de la Agilent AdvanceBio Peptide Plus posee una superficie híbrida con carga positiva y puede proporcionar una mejor forma de pico y separación con ácido fórmico como modificador que las columnas C18 tradicionales. Esta nota describe un método de LC para separar impurezas de péptidos sintéticos utilizando ácido fórmico como modificador de la fase móvil que puede ejecutarse con detección UV o MS, facilitando así la transferencia del método entre LC/UV y LC/MS. Tanto la LC/MS como la LC/MS/MS se utilizan para identificar positivamente algunas de las impurezas encontradas en la muestra, la bivalirudina sintética, Figura 1.

La bivalirudina es un péptido sintético de 20 aminoácidos que inhibe reversiblemente la trombina.

El control de calidad del péptido sintético requiere la identificación y determinación

de impurezas. La secuencia de aminoácidos de la bivalirudina (FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL) tiene una masa monoisotópica de 2178,9858 Da.

Por lo tanto, con el LC/MS se puede determinar con precisión la masa del péptido, pero utilizando además el análisis MS/MS es posible confirmar la secuencia a través del perfil de fragmentación previsto, como se muestra en la Tabla 1.

Experimento

Reactivos y sustancias químicas

Todos los reactivos fueron de calidad HPLC o superior.

Preparación de muestras

El péptido sintético de bivalirudina envejecida de hidrato de trifluoroacetato se compró a Selleckchem y se reconstituyó con 0,1 % de ácido fórmico en agua hasta 1 mg/ml.

H-D-Fe-Pro-Arg-Pro-Gli-Gli-Gli-Gli-Asn-Gli-Asp-Fe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tir-Leu-OH

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la bivalirudina sintética.

Tabla 1. Perfil de fragmentación MS/MS previsto para la bivalirudina.

N.º	sec.	b	y	N.º (+1)
F	1	148,076	2179,993	20
P	2	245,129	2032,925	19
R	3	401,230	1935,872	18
P	4	498,282	1779,771	17
G	5	555,304	1682,718	16
G	6	612,325	1625,697	15
G	7	669,347	1568,675	14
G	8	726,368	1511,654	13
N	9	840,411	1454,632	12
G	10	897,433	1340,589	11
D	11	1012,460	1283,568	10
F	12	1159,528	1168,541	9
E	13	1288,571	1021,472	8
E	14	1417,613	892,430	7
I	15	1530,697	763,387	6
P	16	1627,750	650,303	5
E	17	1756,793	553,250	4
E	18	1885,835	424,208	3
Y	19	2048,899	295,165	2
L	20	2161,983	132,102	1

Instrumentos

Para los experimentos de HPLC se utilizó un sistema LC Agilent 1290 Infinity compuesto de:

- Bomba binaria Agilent 1290 Infinity (G4220A)
- Inyector automático Agilent 1290 Infinity (G4226A)
- Compartimento termostatzado de columnas Agilent 1290 Infinity (G1316C)
- Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity II (DAD) (G7115A)

Para los experimentos de LC/MS, se utilizó la misma configuración 1290 Infinity LC con un detector Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF.

Sección Data Processing

Los datos de LC/UV fueron procesados con OpenLab Agilent 2.2 CDS. Los datos de LC/MS fueron procesados con el software Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00. Se utilizaron los espectros MS/MS para confirmar las identidades de los péptidos sintéticos y sus impurezas.

Condiciones del método

Condiciones de HPLC	
Columna	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2,1 × 150 mm (ref. 695775-949)
Fase móvil	A) Ácido fórmico al 0,1 % en agua B) Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo
Gradiente	0 min: 17 % B 2 min: 17 % B 22 min: 37 % B 24 min: 95 % B 26 min: 95 % B 26,1 min: 17 % B
Tiempo posterior	5 min
Flujo	0,4 ml/min
Temperatura de la columna	60 °C
Volumen de inyección	5 µl (UV); 1 µl (MS)

Parámetro	Valor
Instrumento	LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio
Fuente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	350 °C
Flujo de gas de secado	10 l/min
Gas del nebulizador	30 psi
Temperatura del gas de focalización	275 °C
Flujo de gas de focalización	12 l/min
Voltaje del capilar	4.000 V
Tensión de la boquilla	0 V
Fragmentador	125 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Rango de masas	m/z 100 a 1.700 (MS); m/z 50 a 1.700 (MS/MS)
Velocidad de barrido MS	8 espectros/segundo
Velocidad de barrido MS/MS	3 espectros/segundo
Modo de adquisición	Modo de rango dinámico ampliado (2 GHz)
Energía de colisión	$3,6 \times (m/z)/100 - 4,8$

Resultados y comentarios

La Figura 2 muestra el perfil de separación de una muestra de péptido de bivalirudina envejecida utilizando ácido fórmico como modificador de la fase móvil con detección UV. La LC/MS/MS se utiliza para identificar varios picos de impurezas importantes en el perfil, como se muestra en la Tabla 2, con un error de masa muy bajo.

Entre las impurezas más comunes se encuentran las secuencias de eliminación (en las que falta un aminoácido individual), la presencia de grupos protectores eliminados de forma incompleta o las modificaciones del péptido durante la eliminación de los grupos protectores, la pérdida de agua y, en esta secuencia peptídica concreta, la asparagina es propensa a la desamidación, lo que podría ocurrir durante la fabricación o el almacenamiento.

Se seleccionaron un total de cinco picos para ilustrar las técnicas utilizadas para la identificación mediante una combinación de LC/MS y LC/MS/MS.

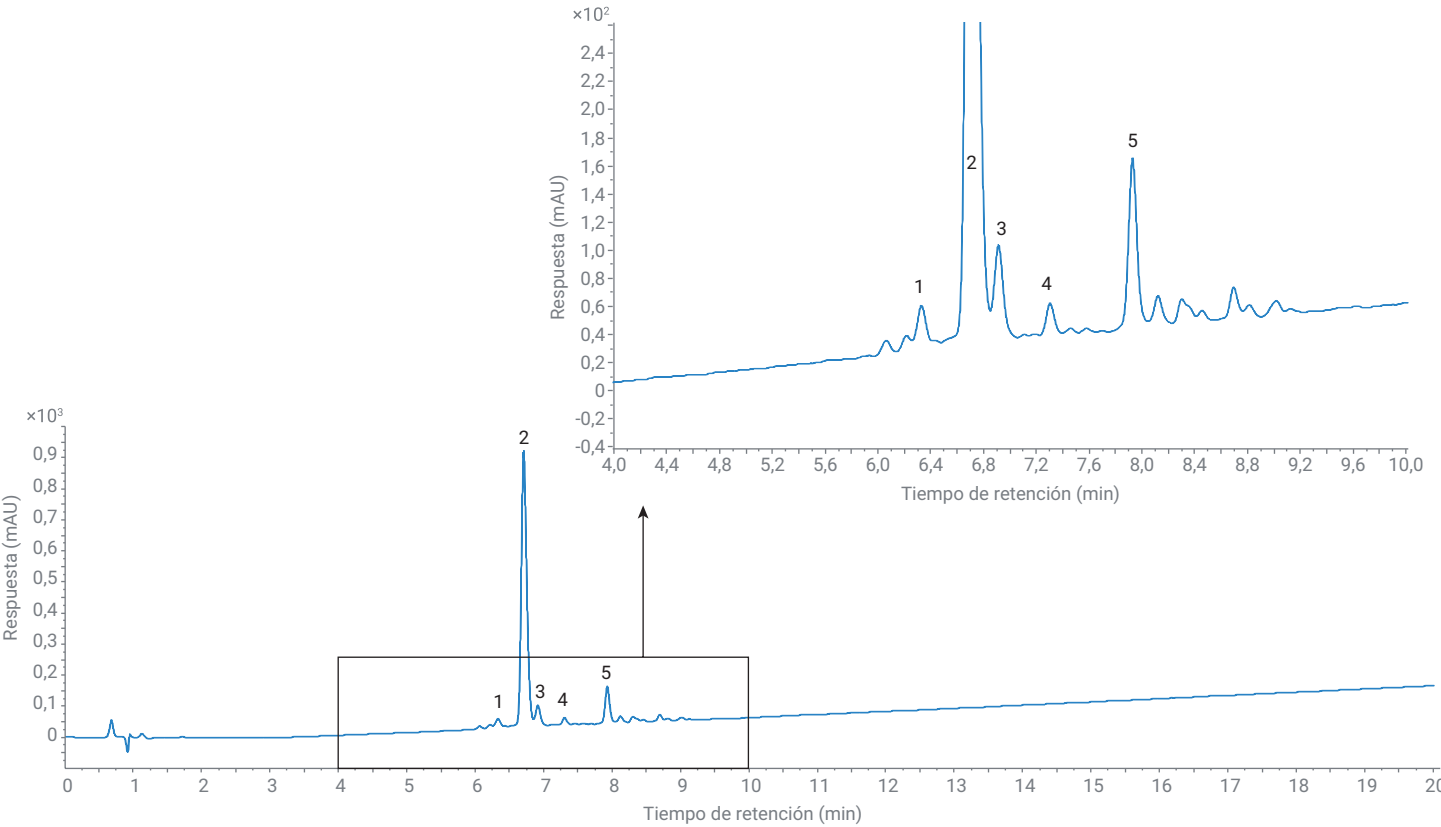


Figura 2. Cromatograma LC/UV de la bivalirudina sintética. Se muestra una región de línea base ampliada de la bivalirudina sintética.

Tabla 2. Identificación de picos del péptido de bivalirudina envejecido y de las principales impurezas.

Pico	Masa (Da)	N.º de pico	Masa diana (Da)	Error de masa (ppm)
1	2.049,9467	Eliminación de Glu	2.049,9432	1,71
2	2.178,9894	Producto	2.178,9858	1,65
3	2.121,9663	Eliminación de Gli	2.121,9644	0,90
4	2.160,9764	Pérdida de H ₂ O	2.160,9705	2,73
5	2.179,9742	Desamidación	2.179,9698	2,02

El componente principal del cromatograma LC/UV, el pico 2, dio un espectro de MS que se muestra en la Figura 3. Esto corresponde a $[M + 2H]^{2+}$ y $[M + 3H]^{3+}$ m/z que, al deconvolucionar, da la masa de 2178,9894 correspondiente a la secuencia peptídica de longitud completa de la bivalirudina, FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL.

Se utiliza un enfoque similar para identificar la impureza de elución más temprana, el pico 1. En este caso, se obtiene un espectro MS similar (Figura 4A), sin embargo, la masa de la impureza es de 2049,9467 tras la deconvolución. La diferencia de masa es de -129 Da, lo que indica la pérdida de ácido glutámico. Mediante una inspección más detallada del espectro LC/MS/MS, es posible identificar la posición del residuo Glu que falta (Figura 4B).

El software BioConfirm ha identificado los fragmentos b_{15} y y_4 para FPRPGGGGNGDFEEIPEYL, una secuencia de 19 aminoácidos, lo que indica que a la secuencia le falta un ácido glutámico en la posición 17 o 18.

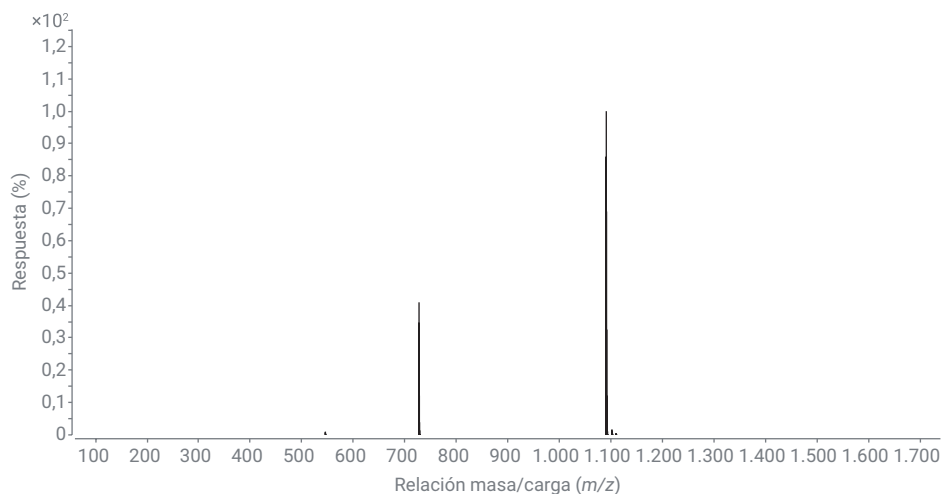


Figura 3. Espectro MS del producto principal (pico 2)

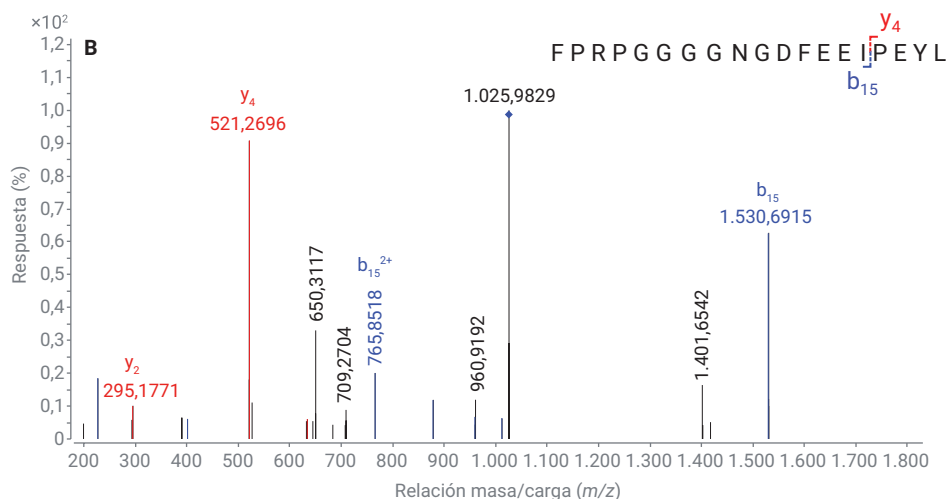
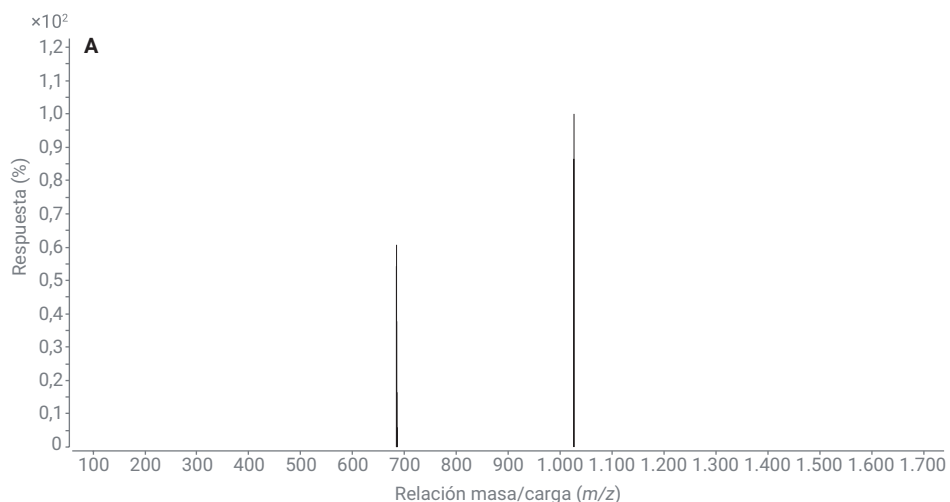


Figura 4. (A) Espectro MS de la impureza, pico 1. (B) Espectro MS/MS de la impureza, pico 1.

El análisis del pico de impureza 3 da una diferencia de masa de -57 Da, lo que indica que falta una glicina (Figura 5). El pico de impureza 4, por su parte, tiene una diferencia de masa de 18 que indica una deshidratación por pérdida de H₂O (espectro de MS no mostrado).

Finalmente, el análisis del pico de impureza 5 da una diferencia de masa de +1 Da, lo que indica desamidación (Figura 6A). Un examen más detallado de los datos MS/MS de esta impureza revela que el software ha identificado que el Asn en la posición 9 (N) se ha convertido en asparagina (D) mediante desamidación.

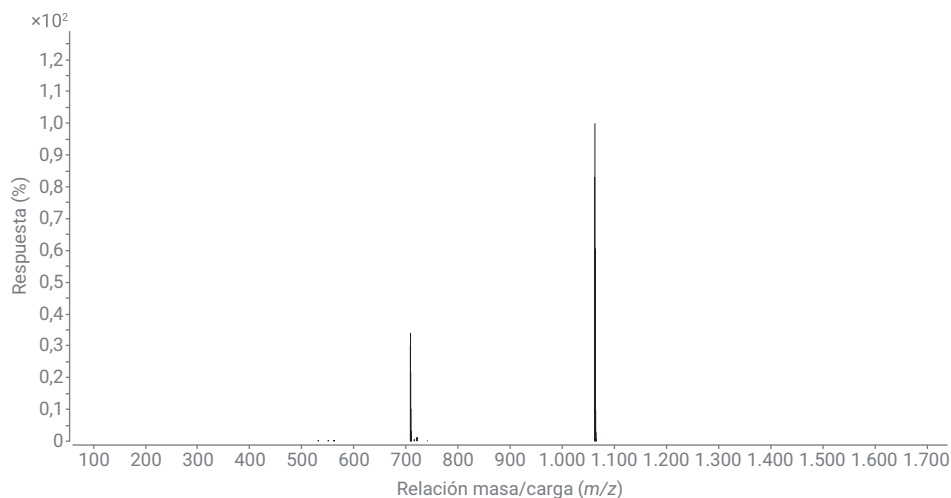


Figura 5. Espectro MS de la impureza, pico 3.

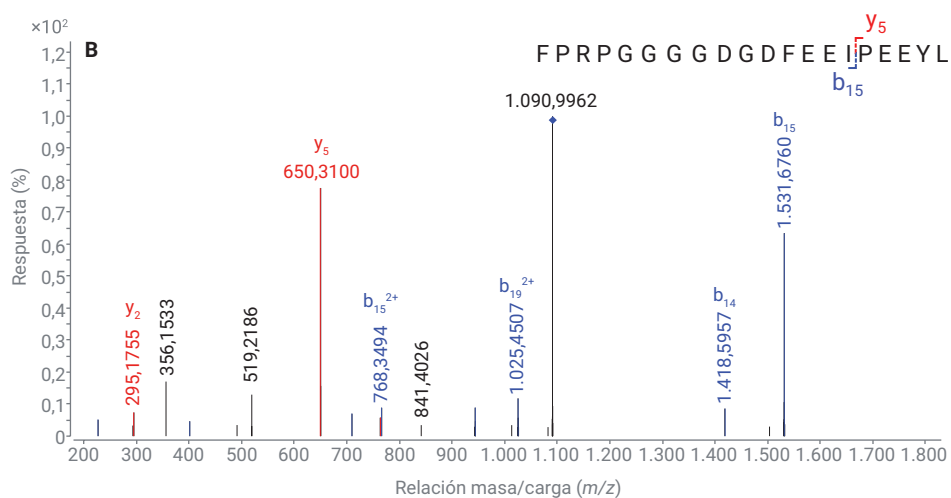
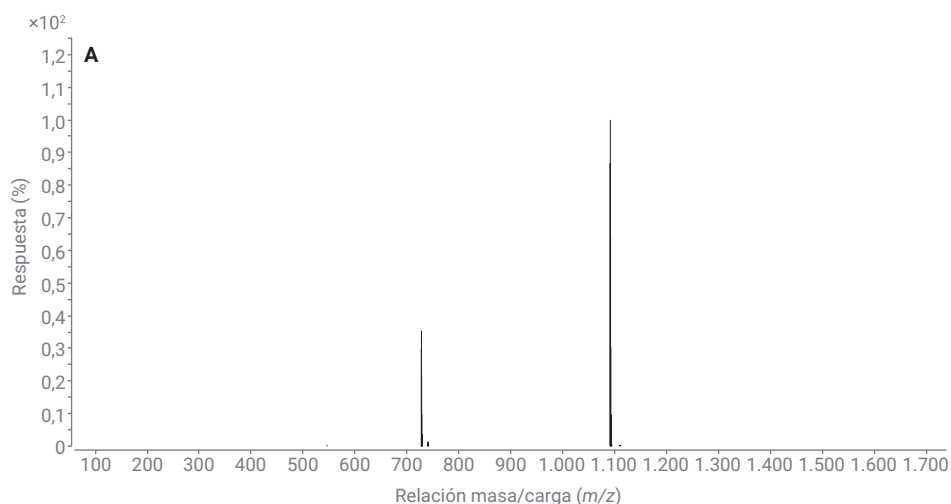


Figura 6. (A) Espectro MS de la impureza, pico 5. (B) Espectro MS/MS de la impureza, pico 5.

Conclusión

En este estudio, se utilizó una columna Agilent AdvanceBio Peptide Plus con ácido fórmico como modificador de la fase móvil para analizar un péptido sintético y sus impurezas. El método empleado puede transferirse fácilmente entre LC/UV y LC/MS.

Referencias

1. Eggen, I. *et al.* Control Strategies for Synthetic Therapeutic Peptide APIs Part III: Manufacturing Process Considerations. *Pharm. Technol.* **2014**, 38(5).

www.agilent.com/chem

RA.2046990741

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Impreso en EE. UU., 10 de noviembre de 2020
5994-2760ES

