

Analisi di un peptide sintetico e delle sue impurezze

Utilizzando fasi mobili compatibili con
la spettrometria di massa con una colonna
Agilent AdvanceBio Peptide Plus

Autori

Andrew Coffey e Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

La separazione cromatografica dei peptidi con rivelazione UV viene tradizionalmente eseguita utilizzando colonne per HPLC C18 a fase inversa e fasi mobili contenenti acido trifluoroacetico (TFA) come reagente per coppia ionica. Tuttavia, nonostante fornisca una migliore risoluzione, il TFA può sopprimere il segnale in spettrometria di massa (MS). L'acido formico (FA) è un buon reagente per coppia ionica per la rivelazione MS, ma può dare come risultato una separazione non ottimale con molte colonne C18 tradizionali. Questa nota applicativa presenta l'uso della colonna Agilent AdvanceBio Peptide Plus per separare impurezze di peptidi sintetici con FA, che è compatibile con la tecnica MS, come modificatore della fase mobile.

Introduzione

La maggior parte dei farmaci a base di peptidi sono fabbricati utilizzando la sintesi di peptidi in fase solida. Le impurezze relative ai peptidi sintetici possono provenire dalle materie prime o dai processi di fabbricazione, oppure essere generate mediante degradazione durante la fabbricazione o lo stoccaggio.¹ La separazione dei peptidi viene tradizionalmente ottenuta utilizzando colonne a fase inversa con acido trifluoroacetico (TFA) come modificatore della fase mobile e la rivelazione UV. Il TFA non è tuttavia ideale per la spettrometria di massa (MS), in quanto può sopprimere il segnale MS. Per identificare i picchi delle impurezze in un metodo in LC/MS, l'acido formico (FA) è preferito come modificatore della fase mobile, ma dà come risultato una separazione non ottimale con colonne C18 tradizionali.

Il TFA (pKa ~0,23) può ridurre il pH per protonare i siti silanolici residui (con alchilazione o endcapping incompleti) sulla superficie della fase stazionaria, non lasciando alcuna carica negativa a interagire con i peptidi carichi positivamente favorendo una buona forma dei picchi. Gli anioni di TFA formano inoltre una coppia ionica con i peptidi a carica positiva, aumentandone l'idrofobicità e il tempo di ritenzione. Al contrario, l'FA (pKa ~3,77) è un acido più debole del TFA e non può ridurre il pH sufficientemente da protonare tutti i siti silanolici, per cui l'interazione tra i silanoli e i peptidi non viene completamente mascherata. Ciò comporta spesso picchi più larghi, maggiore scodamento e complessivamente peggiori livelli di risoluzione e capacità di picco rispetto al caso in cui si utilizza il TFA come modificatore.

La fase stazionaria Agilent AdvanceBio Peptide Plus possiede una superficie ibrida carica positivamente e può fornire migliori livelli di forma dei picchi e separazione con l'FA come modificatore rispetto alle

colonne C18 tradizionali. In questa nota si descrive un metodo in LC per separare le impurezze di peptidi sintetici, utilizzando l'FA come modificatore della fase mobile, che può essere utilizzato con rivelazione UV o MS, semplificando di conseguenza il trasferimento del metodo tra tecniche LC/UV ed LC/MS. Sia la tecnica LC/MS che la tecnica LC/MS/MS vengono usate per l'identificazione di alcune delle impurezze del campione, bivalirudina sintetica, della Figura 1.

La bivalirudina è un peptide sintetico costituito da 20 amminoacidi che inibisce la trombina in modo reversibile. Il controllo della qualità del peptide sintetico richiede l'identificazione e la determinazione delle impurezze. La sequenza di amminoacidi della bivalirudina (FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL) presenta una massa monoisotopica di 2178,9858 Da.

H-D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

Figura 1. La sequenza di amminoacidi della bivalirudina sintetica.

Tabella 1. Il pattern di frammentazione MS/MS previsto per la bivalirudina.

Seq	n.	b	y	n. (+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
Si	19	2048,899	295,165	2
L	20	2161,983	132,102	1

Pertanto, l'uso della tecnica LC/MS consente di determinare accuratamente la massa del peptide, ma utilizzando anche l'analisi MS/MS è possibile confermare la sequenza mediante il pattern di frammentazione previsto, come mostrato nella Tabella 1.

Condizioni sperimentali

Reagenti e prodotti chimici

Tutti i reagenti erano di grado HPLC o superiore.

Preparazione del campione

Il peptide invecchiato trifluoroacetato idrato di bivalirudina è stato acquistato da Selleckchem e ricostituito con 0,1% di FA in acqua alla concentrazione di 1 mg/mL.

Strumentazione

Per gli esperimenti di HPLC è stato utilizzato un sistema LC Agilent 1290 Infinity comprendente:

- pompa binaria Agilent 1290 Infinity (G4220A)
- autocampionatore Agilent 1290 Infinity (G4226A)
- comparto colonna termostato Agilent 1290 Infinity (G1316C)
- rivelatore a serie di diodi (DAD) Agilent 1260 Infinity II (G7115A)

Per gli esperimenti di LC/MS è stata utilizzata la stessa configurazione del sistema LC 1290 Infinity con un rivelatore LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio.

Elaborazione dei dati

I dati di LC/UV sono stati elaborati utilizzando un sistema di gestione dati cromatografici (CDS) Agilent OpenLab 2.2. I dati di LC/MS sono stati elaborati utilizzando il software Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00. Spettri MS/MS sono stati utilizzati per confermare le identità dei peptidi sintetici e delle loro impurezze.

Condizioni del metodo

Condizioni di HPLC	
Colonna	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2,1 × 150 mm (codice 695775-949)
Fase mobile	A) 0,1% di acido formico in acqua B) 0,1% di acido formico in acetonitrile
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
Tempo post-analisi	5 min
Flusso	0,4 mL/min
Temperatura della colonna	60 °C
Volume di iniezione	5 µL (UV); 1 µL (MS)

Parametro	Valore
Strumento	LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio
Sorgente	Dual Agilent Jet Stream
Temperatura del gas	350 °C
Flusso del Drying Gas	10 L/min
Gas del nebulizzatore	30 psi
Temperatura dello sheath gas	275 °C
Flusso dello sheath gas	12 L/min
Tensione capillare	4.000 V
Tensione ugello	0 V
Fragmentor	125 V
Skimmer	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
Intervallo di massa	m/z tra 100 e 1.700 (MS); m/z tra 50 e 1.700 (MS/MS)
Velocità di scansione MS	8 spettri/s
Velocità di scansione MS/MS	3 spettri/s
Modalità di acquisizione	Positiva, range dinamico esteso (2 GHz)
Energia di collisione	$3,6 \times (m/z)/100 - 4,8$

Risultati e discussione

La Figura 2 mostra il profilo di separazione di un campione di peptide bivalirudina invecchiato, utilizzando FA come modificatore della fase mobile con rivelazione UV. La tecnica LC/MS/MS viene utilizzata per identificare i picchi delle varie impurezze principali nel profilo, come mostrato nella Tabella 2, con errore di massa molto ridotto.

Impurezze comuni includono sequenze di delezione (in cui un singolo amminoacido è mancante), la presenza di gruppi di protezione non completamente rimossi o modificazioni del peptide durante la rimozione dei gruppi di protezione, perdita d'acqua e, in questa particolare sequenza peptidica, l'Asn è soggetta a deamidazione, che può verificarsi durante la fabbricazione o al momento dello stoccaggio.

Cinque picchi in totale sono stati selezionati per illustrare le tecniche utilizzate per l'identificazione utilizzando una combinazione di LC/MS e LC/MS/MS.

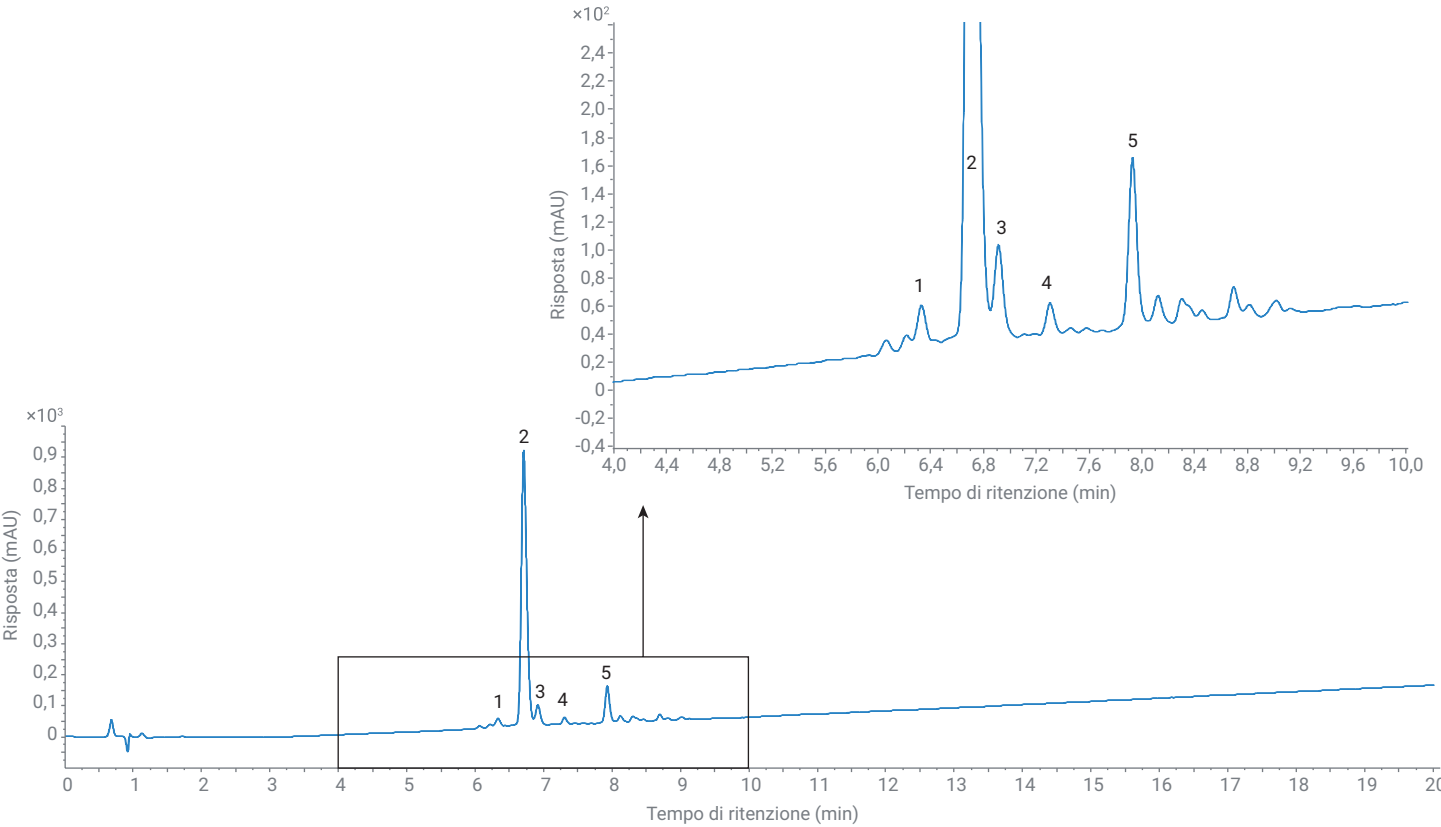


Figura 2. Cromatogramma LC/UV di bivalirudina sintetica. È mostrato un ingrandimento della linea di base della bivalirudina sintetica.

Tabella 2. Identificazione dei picchi del peptide bivalirudina e delle principali impurezze.

Picco	Massa (Da)	ID picco	Massa target (Da)	Errore di massa (ppm)
1	2.049,9467	Delezione di Glu	2.049,9432	1,71
2	2.178,9894	Prodotto	2.178,9858	1,65
3	2.121,9663	Delezione di Gly	2.121,9644	0,90
4	2.160,9764	Perdita di H ₂ O	2.160,9705	2,73
5	2.179,9742	Deamidazione	2.179,9698	2,02

Il componente principale del cromatogramma LC/UV (Picco 2) ha dato lo spettro di MS mostrato nella Figura 3. Questo corrisponde a valori di m/z di $[M + 2H]^{2+}$ e $[M + 3H]^{3+}$ che, una volta deconvoluti, danno la massa di 2178,9894 corrispondente alla sequenza peptidica a lunghezza completa della bivalirudina, FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL.

Un approccio simile viene usato per identificare l'impurezza che eluisce precedentemente (Picco 1). In questo caso si ottiene uno spettro MS simile (Figura 4A), tuttavia la massa dell'impurezza dopo la deconvoluzione è di 2049,9467. La differenza di massa è di -129 Da, indicativa della perdita di acido glutammico. Esaminando più in dettaglio lo spettro di LC/MS/MS è possibile identificare la posizione del residuo di Glu mancante (Figura 4B).

Il software BioConfirm ha identificato i frammenti b_{15} e y_4 per FPRPGGGGNGDFEEIPEYL, una sequenza di 19 amminoacidi, a indicare che la sequenza è priva di un acido glutammico nella posizione 17 o 18.

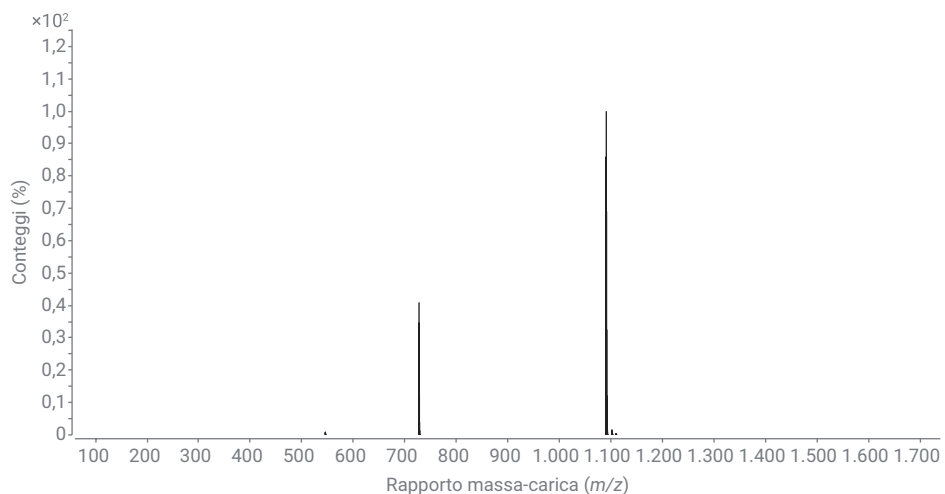


Figura 3. Spettro MS del prodotto principale (picco 2)

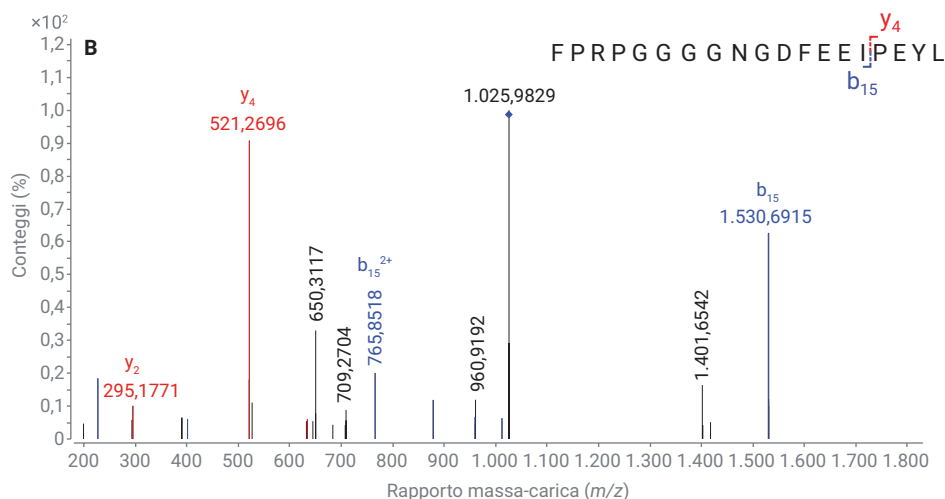
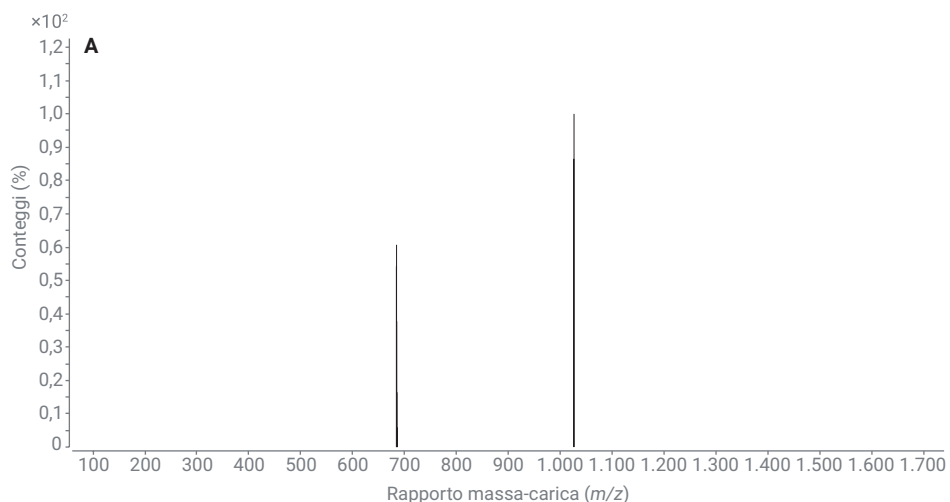


Figura 4. (A) Spettro MS di impurezza, picco 1. (B) Spettro MS/MS di impurezza, picco 1.

L'analisi del Picco 3 delle impurezze dà una differenza di -57 Da, indicativa di una glicina mancante (Figura 5). Il Picco 4 delle impurezze ha d'altro canto una differenza di massa di 18, indicativa di disidratazione mediante perdita di H_2O (spettro MS non mostrato).

Infine, l'analisi del Picco 5 delle impurezze dà una differenza di $+1$ Da, indicativa di una deamidazione (Figura 6A). Una più attenta osservazione dei dati di MS/MS per questa impurezza rivela che il software ha riscontrato che l'Asn nella posizione 9 (N) è stata convertita in Asp (D) mediante deamidazione.

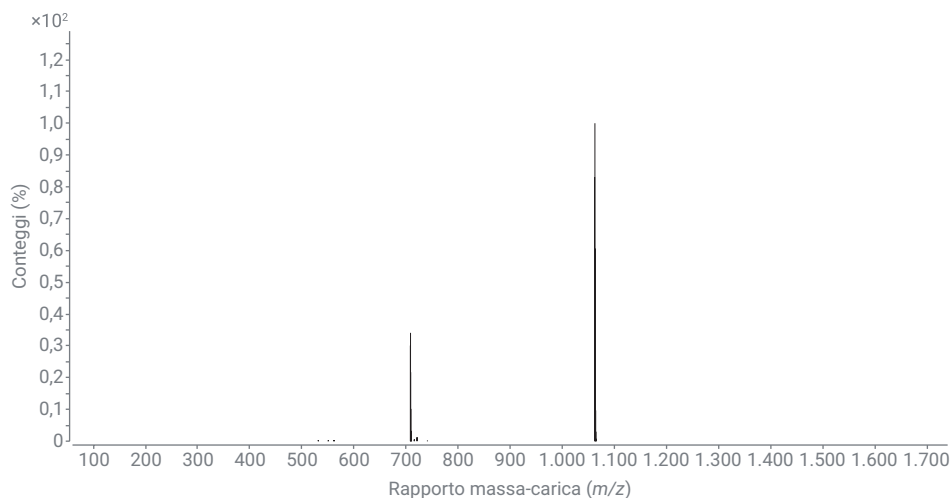


Figura 5. Spettro MS di impurezza, picco 3

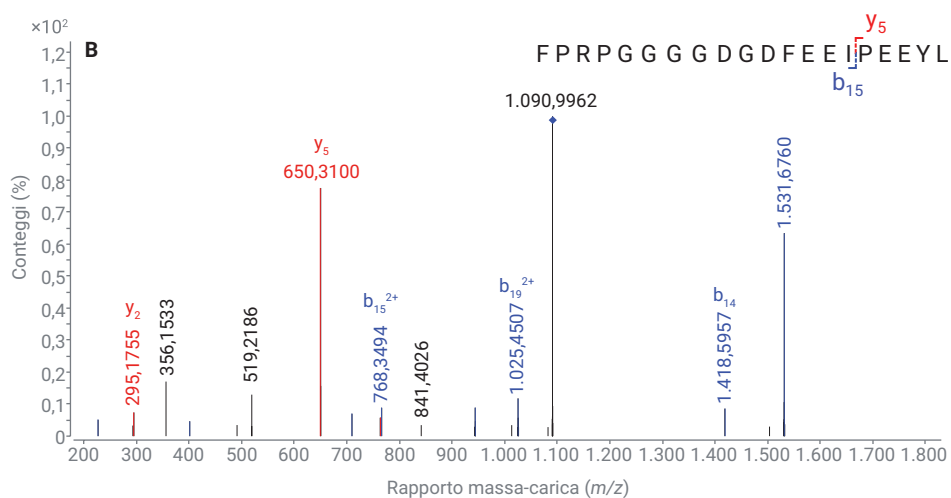
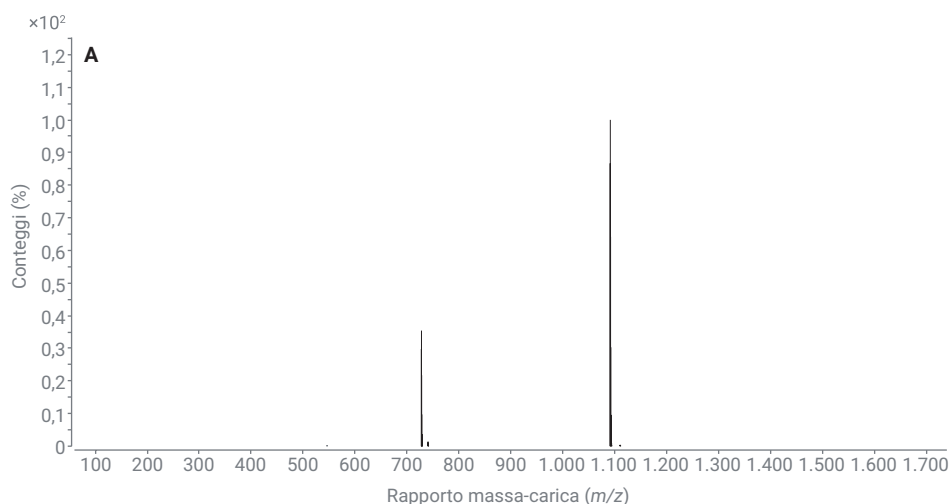


Figura 6. (A) Spettro MS di impurezza, picco 5. (B) Spettro MS/MS di impurezza, picco 5.

Conclusione

In questo studio, una colonna Agilent AdvanceBio Peptide Plus è stata utilizzata con acido formico come modificatore della fase mobile per analizzare un peptide sintetico e le sue impurezze. Il metodo impiegato può essere facilmente trasferito tra LC/UV ed LC/MS.

Bibliografia

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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Stampato negli Stati Uniti, 10 novembre 2020
5994-2760ITE

