

합성 펩타이드 및 불순물 분석

Agilent AdvanceBio Peptide Plus 컬럼과 함께 질량
분석법 호환 이동상을 이용한 분석 방법

저자

Andrew Coffey 및 Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

개요

일반적으로, UV 검출을 통한 크로마토그래피 펩타이드 분리는 C18 역상 HPLC 컬럼과 이온 쌍 시약으로 TFA(trifluoroacetic acid)를 포함하는 이동상을 사용하여 수행됩니다. 그러나 TFA가 향상된 분리능을 제공하기는 하지만 질량 분석법(MS) 신호가 억제될 수 있습니다. 포름산(FA)은 MS 검출에 선호되는 이온 쌍 시약이지만 기존의 많은 C18 컬럼에서 최적화되지 않은 분리로 이어질 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 컬럼과 함께 MS 호환 FA를 이동상 변형제로 사용하여 합성 펩타이드 불순물을 분리하는 방법을 설명합니다.

서론

대부분의 펩타이드 약물은 고체상 펩타이드 합성을 사용하여 제조됩니다. 합성 펩타이드 관련 불순물은 원료 또는 제조 공정에서 유입되거나 제조 또는 보관 중 분해에 의해 생성될 수 있습니다.¹ 지금까지 펩타이드 분리는 이동상 변형제로 TFA(trifluoroacetic acid)를 사용하고 검출기로 UV를 사용하여 역상 컬럼에서 이루어졌습니다. 그러나 TFA는 MS 신호를 억제할 수 있어 질량 분석법(MS)에 적합하지 않습니다.

LC/MS 분석법에서 불순물 피크를 식별하기 위해 포름산(FA)이 이동상 변형제로 주로 이용되지만 기존 C18 컬럼보다 최적화되지 않은 분리 결과를 제공합니다.

TFA(pKa ~ 0.23)는 pH를 낮추어 고정상 표면에서 잔류(불완전하게 알킬화되거나 말단이 막힌) 실라놀 부위를 양성자화함으로써 양전하를 띤 펩타이드와 상호 작용하여 양호한 피크 모양을 촉진시킬 음전하를 고갈시킬 수 있습니다. 또한 TFA 음이온은 양전하를 띤 펩타이드와 이온 쌍을 형성하여 소수성을 높이고 머무름 시간을 증가시킵니다. 이와 대조적으로, FA(pKa ~ 3.77)는 TFA보다 약한 산이며 모든 실라놀 부위를 양성자화할만큼 pH를 낮출 수 없으므로 실라놀과 펩타이드 간의 상호 작용이 완전히 막히지 않습니다. 이로 인해 종종 TFA를 조절제로 사용할 때보다 피크가 더 넓어지고 테일링이 증가하며 전체적으로 분리능과 피크 용량이 낮아지는 결과가 발생합니다.

Agilent AdvanceBio Peptide Plus 고정상은 양전하를 띤 하이브리드 표면을 가지고 있으며, 조절제로 FA를 사용하여 기존 C18 컬럼보다 더 우수한 피크 모양과 분리를 제공할 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 UV 또는 MS 검출로 실행할 수 있는 이동상 변형제로 FA를 사용하여 합성 펩타이드 불순물을 분리하는 LC 분석법에 대해 설명합니다. 이를 통해 LC/UV와 LC/MS 간에

분석법 이전이 더 쉬워집니다. LC/MS와 LC/MS/MS는 모두 시료에서 발견되는 일부 불순물인 합성 bivalirudin을 확정적으로 식별하는 데 사용됩니다(그림 1 참조).

Bivalirudin은 트롬빈을 가역적으로 억제하는 20개 아미노산 합성 펩타이드입니다.

합성 펩타이드의 품질 관리를 위해서는 불순물을 식별하고 확인해야 합니다. Bivalirudin(FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL)의 아미노산 서열은 2178.9858 Da의 단일 동위원소 질량을 갖습니다.

따라서 LC/MS를 사용하면 펩타이드의 질량을 정확하게 파악할 수 있지만, MS/MS 분석을 함께 이용하면 표 1과 같이 조각화 패턴 예측을 통해 서열을 확인할 수 있습니다.

실험

시약 및 화학물질

모든 시약은 HPLC 등급 이상입니다.

시료 전처리

숙성된 합성 펩타이드 bivalirudin trifluoroacetate hydrate를 Selleckchem에서 구입했으며 0.1% FA 수용액에서 1mg/mL까지 재용해시켰습니다.

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

그림 1. 합성 bivalirudin의 아미노산 서열

표 1. Bivalirudin에 대해 예측된 MS/MS 단편화 패턴

서열	번호	b	y	번호 (+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

기기

HPLC 실험을 위해 다음을 포함하는 Agilent 1290 Infinity LC를 사용했습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 자동 시료 주입기 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(DAD) (G7115A)

LC/MS 실험을 위해 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 검출기와 함께 동일한 1290 Infinity LC 구성이 사용되었습니다.

데이터 처리

LC/UV 데이터는 Agilent OpenLab 2.2 CDS를 사용하여 처리했습니다. LC/MS 데이터는 Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 소프트웨어를 사용하여 처리했습니다. MS/MS 스펙트럼을 사용하여 합성 펩타이드와 그 불순물의 ID를 확인했습니다.

분석법 조건

HPLC 조건	
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150mm(품목 번호 695775-949)
이동상	A) 0.1% 포름산 수용액 B) 0.1% 포름산 아세트오니트릴 용액
그라디언트	0분: 17% B 2분: 17% B 22분: 37% B 24분: 95% B 26분: 95% B 26.1분: 17% B
사후 시간	5분
유속	0.4mL/min
컬럼 온도	60°C
주입부피	5μL (UV); 1μL (MS)

파라미터	값
기기	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
이온화원	Dual Agilent Jet Stream
가스 온도	350°C
건조 가스 유속	10L/분
Nebulizer 가스	30psi
Sheath 가스 온도	275°C
Sheath 가스 유속	12L/분
캐필러리 전압	4,000V
노즐 전압	0V
Fragmentor	125V
스키머	65V
Oct 1 RF Vpp	750V
질량 범위	m/z 100 ~ 1,700 (MS); m/z 50 ~ 1,700 (MS/MS)
MS 스캔 속도	초당 8 스펙트럼
MS/MS 스캔 속도	초당 3 스펙트럼
수집 모드	양수, 확장된 동적 범위(2GHz)
충돌 에너지	$3.6 \times (m/z)/100 - 4.8$

결과 및 토의

그림 2는 UV 검출과 함께 이동상 변형제로 FA를 사용하여 숙성된 bivalirudin 펩타이드 시료를 분리한 결과를 보여줍니다. 표 2와 같이 프로파일에서 몇 가지 주요 불순물 피크를 식별하는 데 LC/MS/MS를 사용했으며 질량 오차가 매우 낮게 유지되었습니다.

일반적인 불순물에는 결실 서열(개별 아미노산이 없는 경우), 불완전하게 제거된 보호기의 잔류 또는 보호기 제거 중 펩타이드의 변형, 수분 손실 등이 포함되며, 이 특정한 펩타이드 서열에서는 제조 중 또는 보관시 Asn에 탈아미드화가 쉽게 일어날 수 있습니다.

LC/MS 및 LC/MS/MS를 조합적으로 사용한 식별 기법을 나타내기 위해 총 5개의 피크를 선택했습니다.

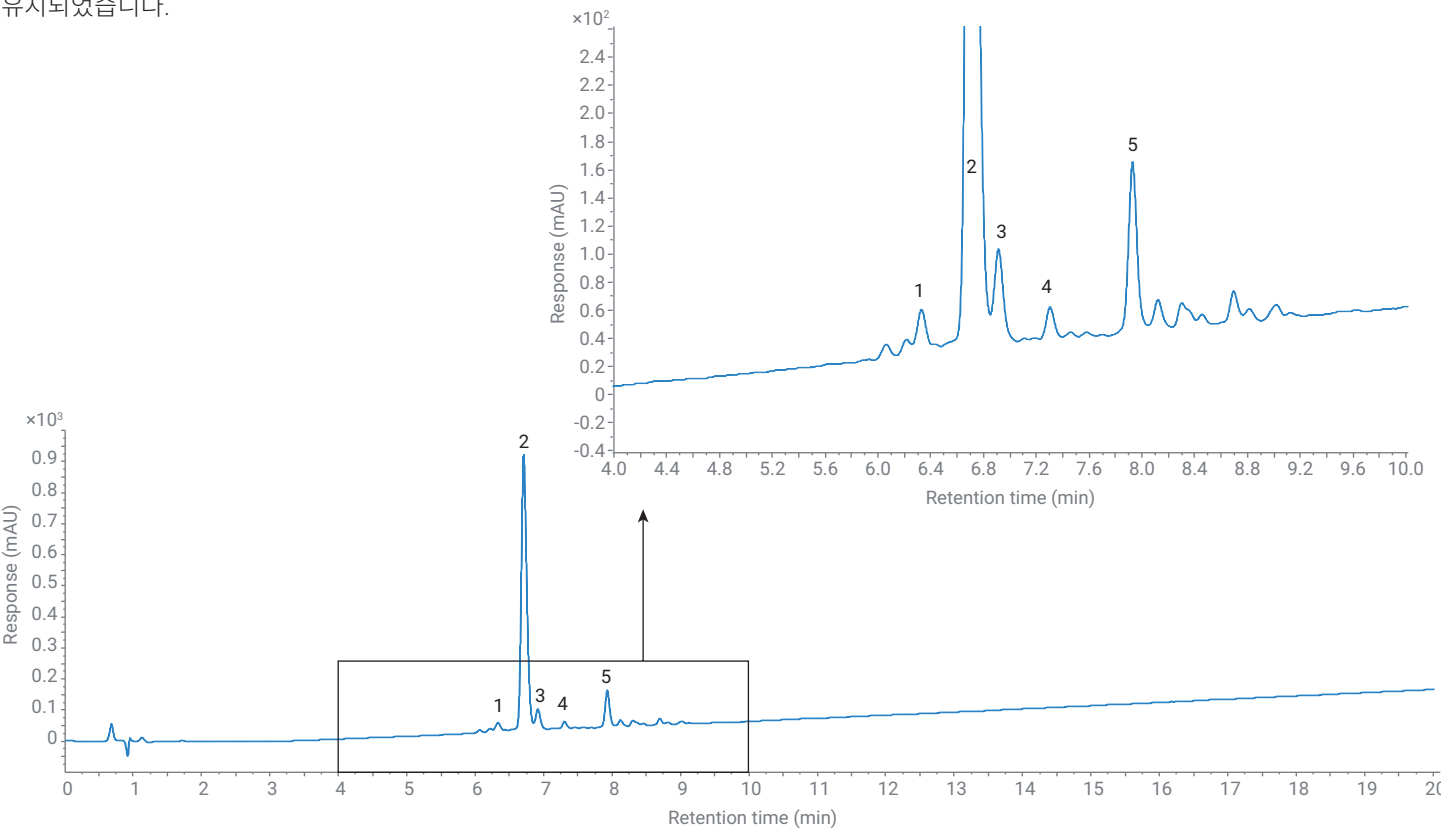


그림 2. 합성 bivalirudin의 LC/UV 크로마토그램. 합성 bivalirudin의 확대한 기준선 영역을 나타냈습니다.

표 2. 시효 처리된 bivalirudin 펩타이드 및 주요 불순물의 피크 식별

피크	질량(Da)	피크 ID	타겟 질량(Da)	질량 오차(ppm)
1	2,049.9467	Glu 결실	2,049.9432	1.71
2	2,178.9894	제품	2,178.9858	1.65
3	2,121.9663	Gly 결실	2,121.9644	0.90
4	2,160.9764	H ₂ O 손실	2,160.9705	2.73
5	2,179.9742	탈아미드화	2,179.9698	2.02

LC/UV 크로마토그램의 주요 성분인 피크 2는 그림 3에 표시된 MS 스펙트럼을 제공했습니다. 이는 $[M + 2H]^{2+}$ 및 $[M + 3H]^{3+}$ 에 해당하며 디컨벌루션 시 bivalirudin의 전체 길이 펩타이드 서열인 FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL에 해당하는 2178.9894의 질량을 제공합니다.

유사한 접근 방식을 사용하여 초기 용출 불순물인 피크 1을 식별합니다. 이 경우 유사한 MS 스펙트럼이 얻어지지만 (그림 4A), 불순물의 질량은 디컨벌루션 후 2049.9467입니다. 질량 차이는 글루탐산 손실을 나타내는 -129 Da입니다. LC/MS/MS 스펙트럼을 면밀히 살펴보면 누락된 Glu 잔류물의 위치를 식별할 수 있습니다(그림 4B).

BioConfirm 소프트웨어는 19개 아미노산 서열인 FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL에 대한 b_{15} 및 y_4 단편을 식별하여 서열에서 17 또는 18 위치에 글루탐산이 없음을 나타냈습니다.

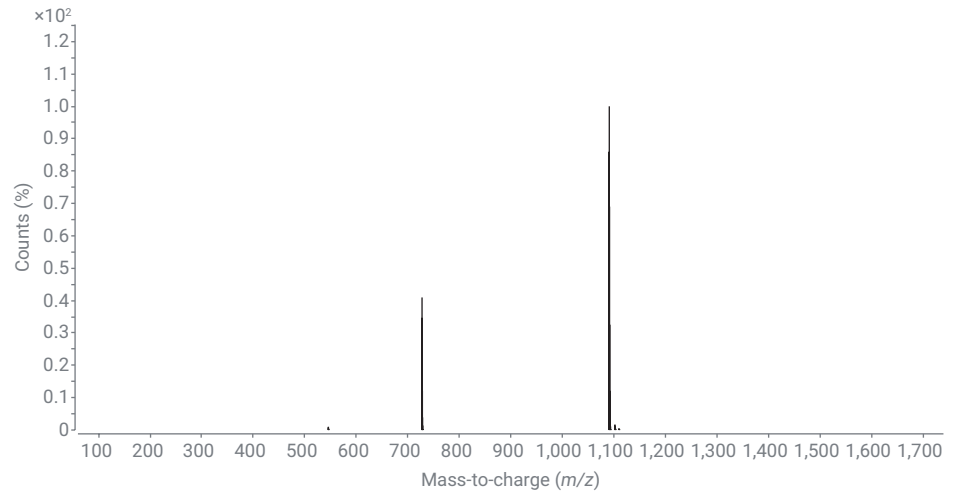


그림 3. 주 부산물의 MS 스펙트럼(피크 2)

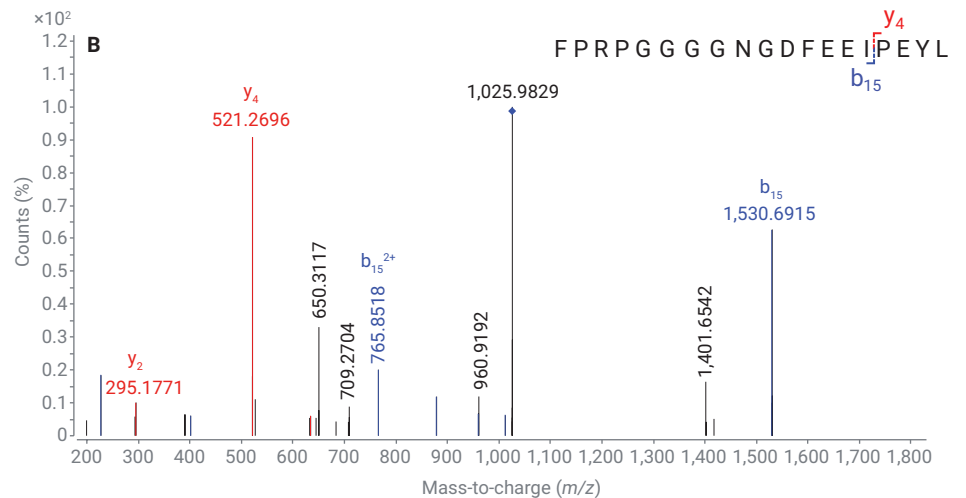
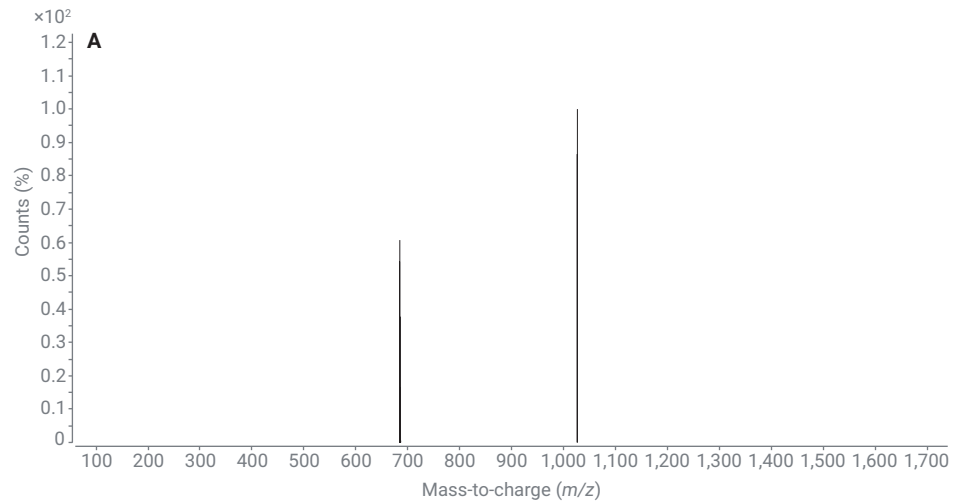


그림 4. (A) 불순물의 MS 스펙트럼, 피크 1. (B) 불순물의 MS/MS 스펙트럼, 피크 1.

불순물 피크 3을 분석하면 글리신이 없음을 나타내는 -57 Da의 질량 차이가 나타납니다 (그림 5). 한편, 불순물 피크 4는 질량 차이가 18로, H₂O 손실로 인한 탈수를 나타냅니다 (MS 스펙트럼은 표시되지 않음).

마지막으로, 불순물 피크 5를 분석하면 탈아미드화를 나타내는 +1 Da의 질량 차이가 확인됩니다(그림 6A). 이 불순물에 대한 MS/MS 데이터를 자세히 살펴보면 위치 9(N)의 Asn이 탈아미드화로 인해 Asp (D)로 전환되었음을 소프트웨어에서 확인한 것을 알 수 있습니다.

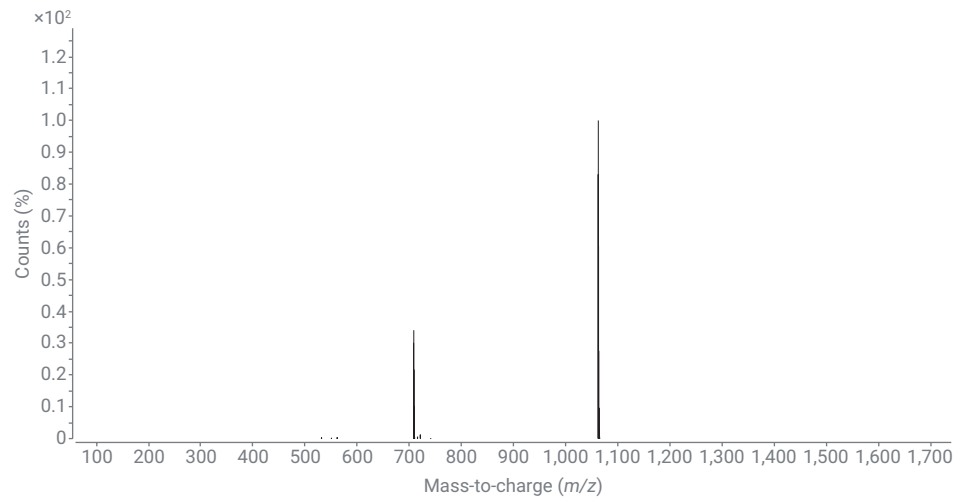


그림 5. 불순물의 MS 스펙트럼, 피크 3

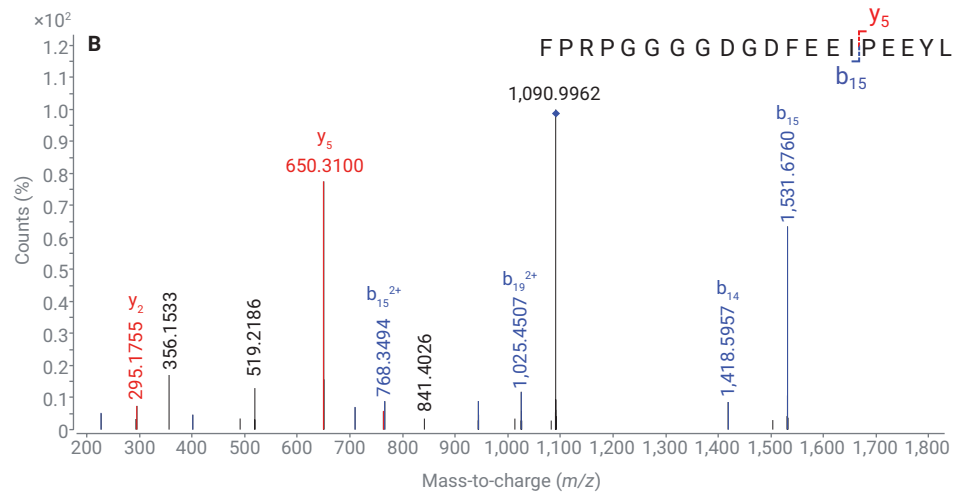
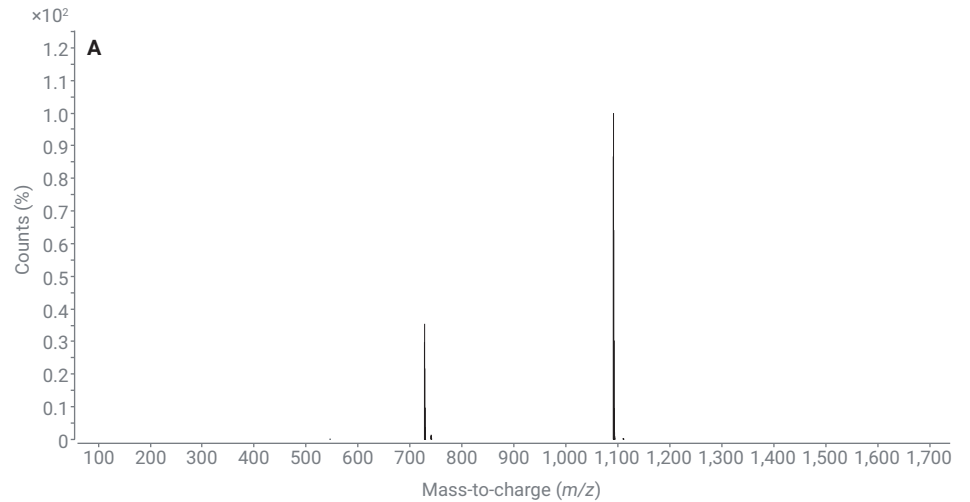


그림 6. (A) 불순물의 MS 스펙트럼, 피크 5. (B) 불순물의 MS/MS 스펙트럼, 피크 5.

결론

이 연구에서는 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 컬럼에서 이동상 변형제로 포름산을 사용하여 합성 펩타이드와 그 불순물을 분석했습니다. 사용된 분석법은 LC/UV와 LC/MS 사이에서 쉽게 이전할 수 있습니다.

참고 문헌

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

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 11월 10일, 한국에서 인쇄
5994-2760KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

