

合成肽及其杂质的分析

将质谱兼容的流动相与 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱配合使用

作者

Andrew Coffey 和 Veronica Qin
安捷伦科技有限公司

摘要

通常情况下，使用 C18 反相 HPLC 色谱柱和三氟乙酸 (TFA) 作为离子对试剂的流动相，对多肽进行色谱分离，并使用 UV 进行检测。虽然 TFA 提供了更高的分离度，但是它可能会抑制质谱 (MS) 信号。甲酸 (FA) 是用于 MS 检测的首选流动相离子对试剂，但它会导致许多传统 C18 柱无法达到最佳分离效果。本应用简报介绍了使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱和 MS 兼容的 FA（作为流动相改性剂）分离合成多肽杂质。

前言

大多数多肽药物通过固相多肽合成法进行生产。合成多肽相关杂质可能来自原辅料、生产过程，或者在生产或储存过程中因降解而产生^[1]。传统上，使用反相色谱柱实现多肽分离，并以三氟乙酸 (TFA) 作为流动相改性剂，UV 作为检测器。然而，TFA 会抑制质谱 (MS) 信号，因此它并不是 MS 的理想选择。

通过 LC/MS 方法鉴定杂质峰时，甲酸 (FA) 是首选的流动相改性剂，但它会导致传统 C18 柱无法达到最佳分离效果。

TFA (pKa ~0.23) 可以降低 pH 值，使固定相表面残留的 (未完全烷基化或封端) 硅醇基位点质子化，从而没有负电荷与带正电荷的肽相互作用，有利于形成良好的峰形。此外，TFA 阴离子与带正电荷的肽形成离子对，增强了疏水性并延长了保留时间。与此相反，FA (pKa = 3.77) 的酸性比 TFA 弱，无法将 pH 降低到使所有硅醇基位点质子化的程度，因此硅醇基与多肽之间的相互作用不会被完全掩盖。与使用 TFA 作为流动相改性剂相比，FA 会导致峰展宽、拖尾增加、整体分离度以及峰容量降低。

与传统的 C18 柱相比，Agilent AdvanceBio Peptide Plus 固定相具有杂化且带正电荷的表面，使用 FA 作为改性剂时也可以提供更好的峰形和分离效果。本简报介绍了一种使用 FA 作为流动相改性剂来分离合成肽杂质的液相色谱方法，此方法可以使用 UV 或 MS 检测器，因此更容易在 LC/UV

和 LC/MS 之间进行方法转移。LC/MS 和 LC/MS/MS 均可用于鉴定样品 (合成比伐卢定，图 1) 中的某些杂质。

比伐卢定是一种含有 20 个氨基酸的合成肽，能够可逆性地抑制凝血酶。

合成肽的质量控制要求对杂质进行检测和鉴定。比伐卢定氨基酸序列 (FPRPGGGNGDFEEIPEEYL) 的单一同位素质量为 2178.9858 Da。

因此，使用 LC/MS 可以准确测定肽的质量，但是使用 MS/MS 分析还可以通过预测的碎裂模式来确定序列，如表 1 所示。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。

样品前处理

陈化的合成多肽三氟醋酸比伐卢定水合物购自 Selleckchem，与 0.1 % 甲酸水溶液复溶至 1 mg/mL。

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

图 1. 合成比伐卢定的氨基酸序列

表 1. 预测的比伐卢定 MS/MS 碎裂模式

序列	编号	b	y	编号 (+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

仪器

对于 HPLC 实验，使用 Agilent 1290 Infinity LC，其中包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (DAD) (G7115A)

对于 LC/MS 实验，将相同的 1290 Infinity LC 配置与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 检测器配合使用。

数据处理

使用 Agilent OpenLab 2.2 CDS 处理 LC/UV 数据。使用 Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 软件处理 LC/MS 数据。MS/MS 谱图用于确认合成肽及其杂质的身份。

方法条件

HPLC 条件	
色谱柱	Agilent AdvanceBio Peptide Plus, 2.1 × 150 mm (部件号 695775-949)
流动相	A) 0.1 % 甲酸水溶液 B) 0.1 % 甲酸乙腈溶液
梯度	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
后运行时间	5 min
流速	0.4 mL/min
柱温	60 °C
进样量	5 µL (UV); 1 µL (MS)

参数	值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
离子源	双安捷伦喷射流
干燥气温度	350 °C
干燥气流速	10 L/min
雾化器气体	30 psi
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
质量范围	<i>m/z</i> 100–1700 (MS); <i>m/z</i> 50–1700 (MS/MS)
MS 扫描速率	8 幅谱图/秒
MS/MS 扫描速率	3 幅谱图/秒
采集模式	正离子, 扩展动态范围 (2 GHz)
碰撞能量	$3.6 \times (m/z)/100 - 4.8$

结果与讨论

图 2 展示了陈化的比伐卢定多肽样品的分离谱图，其中使用 FA 作为流动相改性剂，并通过 UV 进行检测。如表 2 所示，LC/MS/MS 用于鉴定谱图中的几个主要杂质峰时，具有非常低的质量偏差。

常见的杂质包括缺失序列（缺少单个氨基酸）、存在未完全去除的保护基团或在去除保护基团期间发生对肽的修饰、失水以及在此特定多肽序列中 Asn 易发生脱酰胺化（可能发生在生产或储存过程中）。

总共选择了 5 个峰来说明联合使用 LC/MS 和 LC/MS/MS 的鉴定技术。

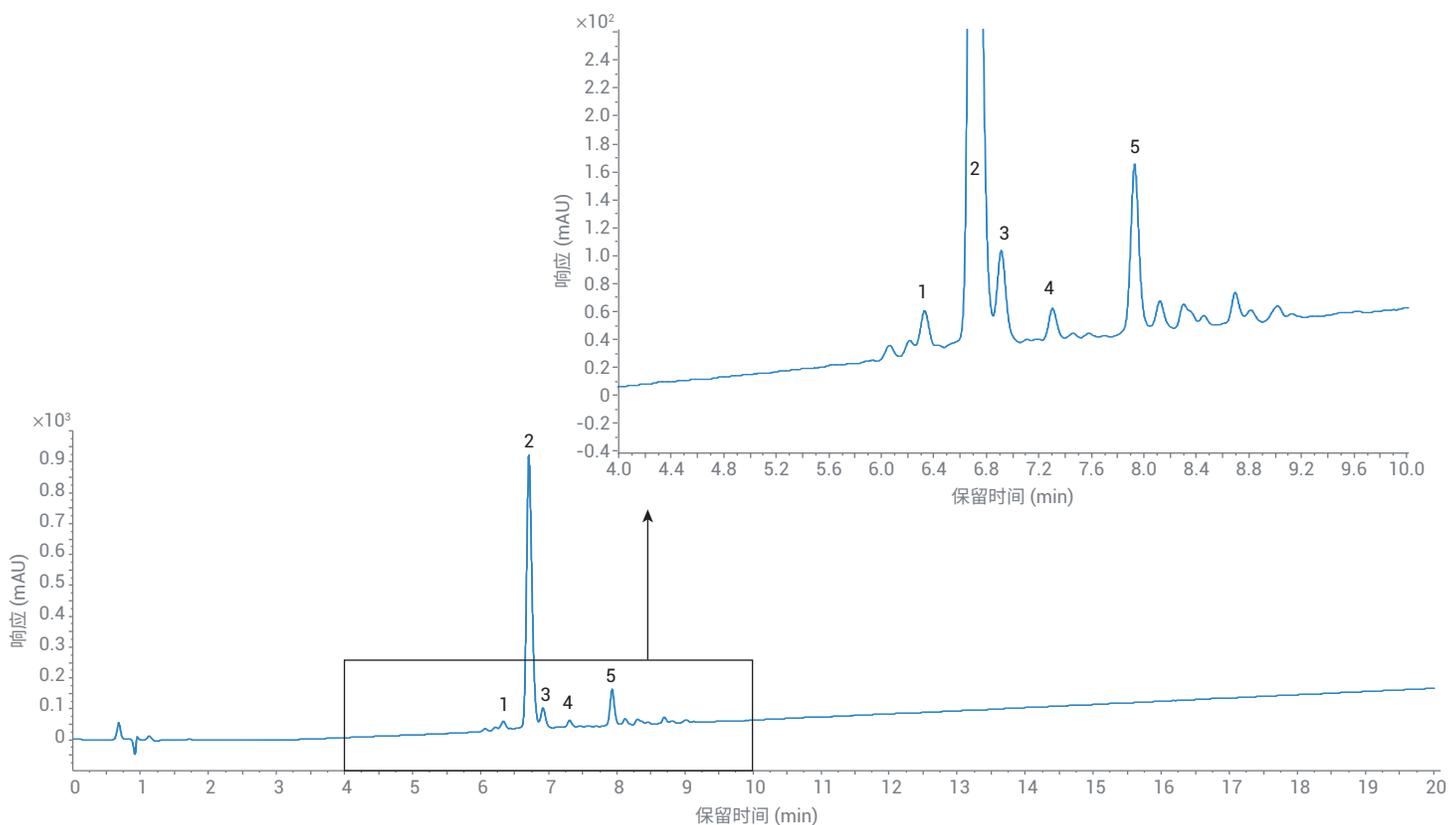


图 2. 合成比伐卢定的 LC/UV 谱图。展示了放大的合成比伐卢定的基线区域

表 2. 陈化的比伐卢定多肽和主要杂质的峰鉴定

峰	质量 (Da)	峰归属	目标质量 (Da)	质量偏差 (ppm)
1	2049.9467	Glu 缺失	2049.9432	1.71
2	2178.9894	产品	2178.9858	1.65
3	2121.9663	Gly 缺失	2121.9644	0.90
4	2160.9764	失水	2160.9705	2.73
5	2179.9742	脱酰胺基化	2179.9698	2.02

LC/UV 色谱图的主要成分（峰 2）的 MS 谱图如图 3 所示。该质谱图对应 m/z $[M + 2H]^{2+}$ 和 $[M + 3H]^{3+}$ ，解卷积后质量为 2178.9894，对应比伐卢定的完整肽序列 FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL。

使用类似的方法来鉴定较早洗脱的杂质峰 1。在本例中，得到了相似的质谱图（图 4A），但是解卷积之后，杂质的质量为 2049.9467。质量差为 -129 Da，表明该杂质只比比伐卢定少了一个谷氨酸。仔细查看 LC/MS/MS 谱图，可以确定丢失的 Glu 残基的位置（图 4B）。

BioConfirm 软件鉴定出

FPRPGGGGNGDFEEIPEYL（一个 19 个氨基酸的序列）的 b_{15} 和 y_4 片段，表明该序列在 17 或 18 号位丢失一个谷氨酸。

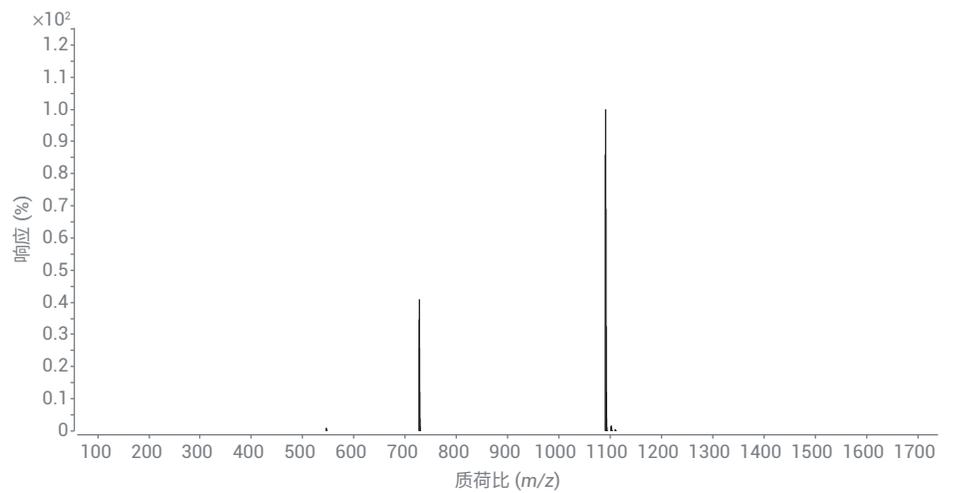


图 3. 主成分（峰 2）的 MS 谱图

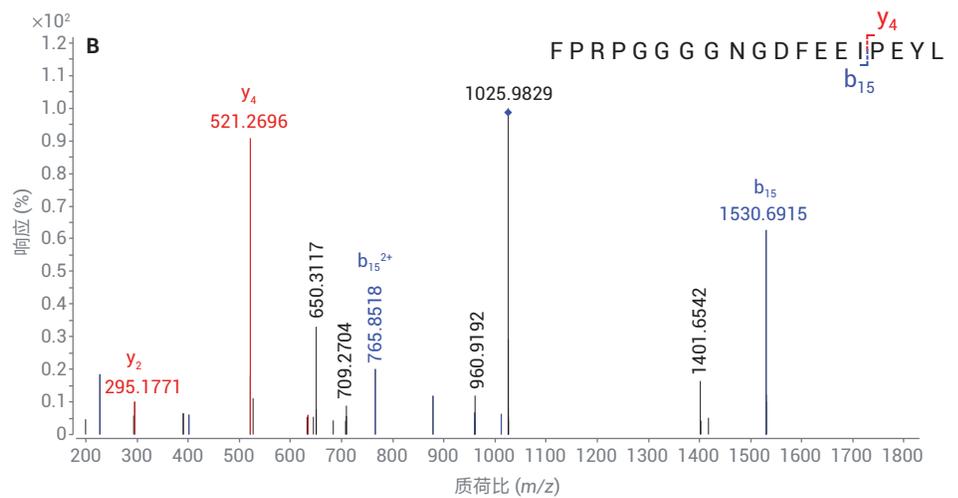
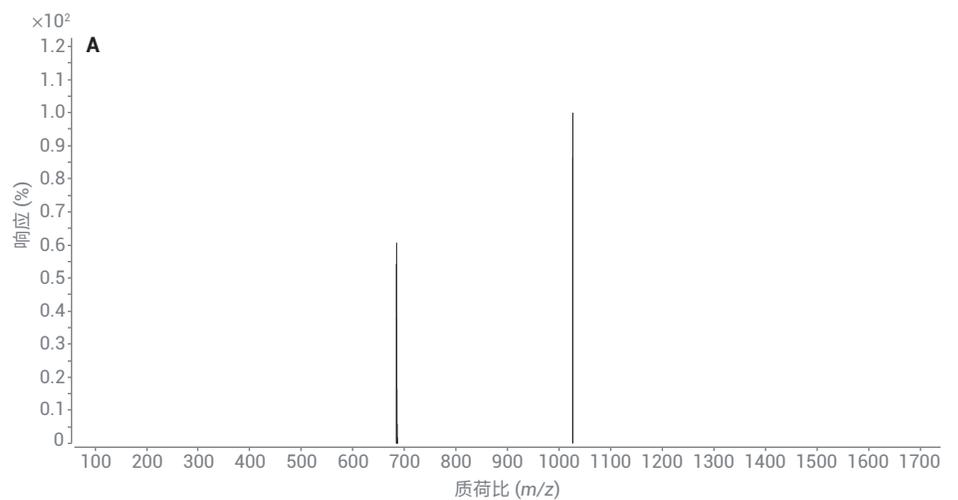


图 4. (A) 杂质峰 1 的 MS 谱图。(B) 杂质峰 1 的 MS/MS 谱图

分析杂质峰 3 得出的质量差为-57 Da，表明该杂质丢失一个甘氨酸（图 5）。同时，杂质峰 4 的质量差为 18，表明由于脱水丢失了一个 H₂O 分子（MS 谱图未显示）。

最后，分析杂质峰 5 得出的质量差为 +1 Da，表明发生了脱酰胺反应（图 6A）。仔细查看该杂质的 MS/MS 数据后发现，该软件已确定位置 9 的 Asn (N) 已通过脱酰胺作用转化为 Asp (D)。

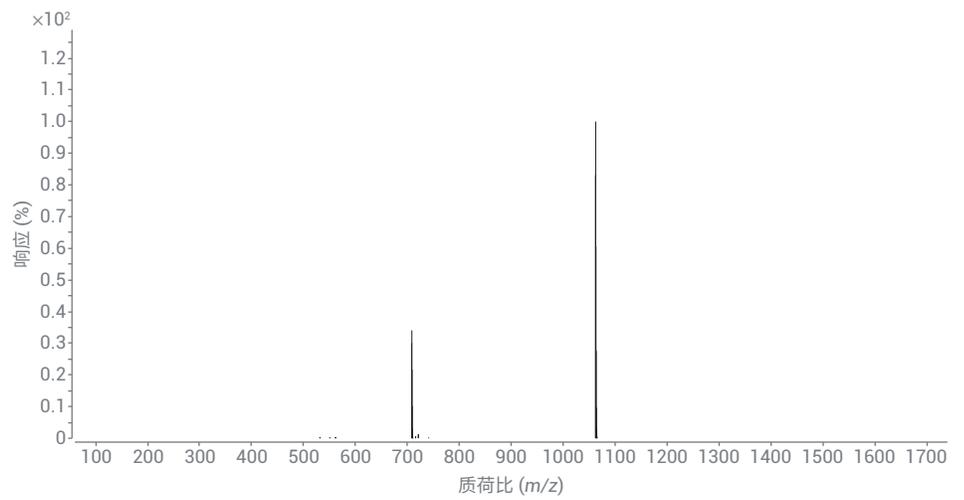


图 5. 杂质峰 3 的 MS 谱图

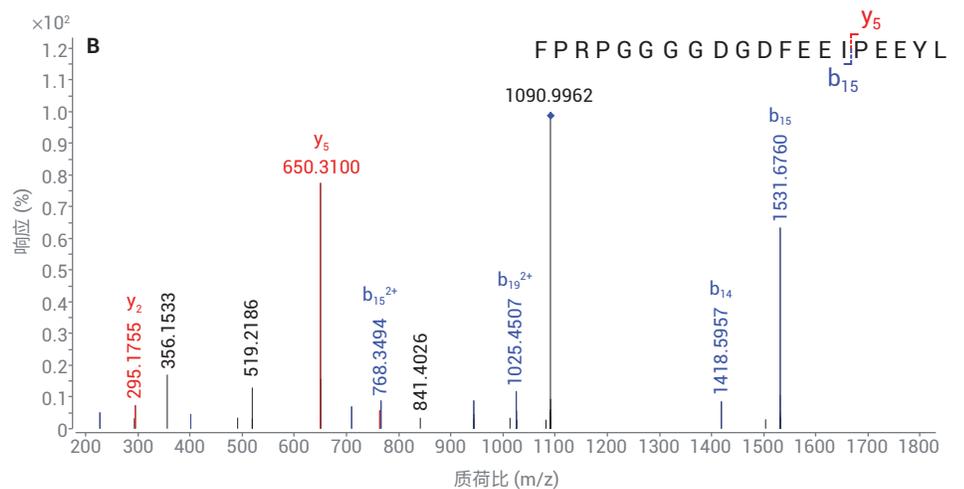
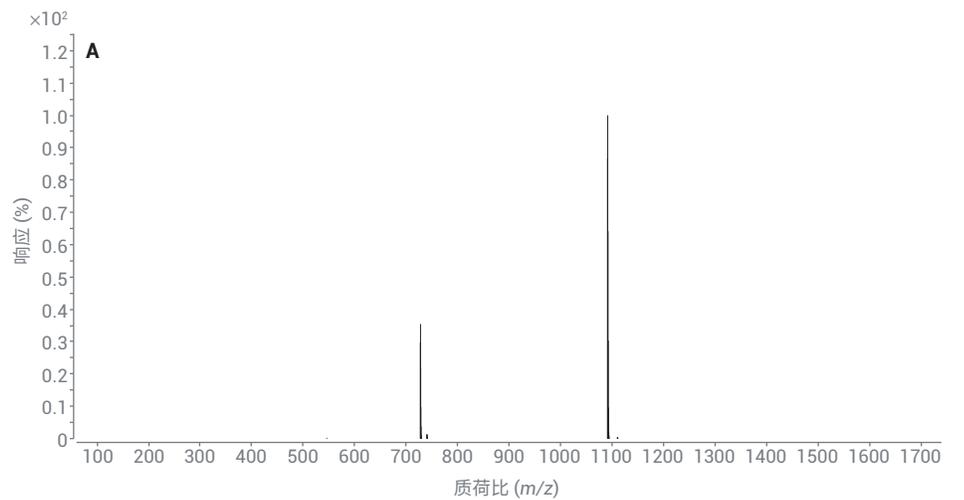


图 6. (A) 杂质峰 5 的 MS 谱图。(B) 杂质峰 5 的 MS/MS 谱图

结论

在本研究中，使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱并以甲酸作为流动相改性剂来分析合成肽及其杂质。采用的方法可以在 LC/UV 和 LC/MS 之间轻松转移。

参考文献

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

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

RA.2046990741

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020年11月10日，中国出版
5994-2760ZHCN

