

Entwicklung einer *rapid* HPLC Methode zur Analyse eines synthetischen Peptids und Identifikation der Verunreinigungen und der Zersetzungsprodukte mittels LC/MS, LC/MS/MS oder MS/MS

Rihm Silvan

Molecular Life Sciences, Chemie

Bachem AG, 4416 Bubendorf

KURZZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel, eine *rapid* HPLC Methode für das Prüfverfahren *related substances* (HPLC) zu entwickeln, wurde erreicht. Es liessen sich mit der Methode Verunreinigungen ab einer Konzentration von 0.05% quantitativ bestimmen. Dabei wurden die Anforderungen an die Methode mittels Validierung bestätigt. Weiter wurden die Verunreinigungen $\geq 0.10\%$ und die Zersetzungsprodukte $\geq 0.25\%$ erfolgreich identifiziert. Es konnten Isomere des Peptids, Derivate der N-terminalen Aminosäure Asparaginsäure und ein Argininderivat nachgewiesen und deren möglichen Entstehungswege aufgezeigt werden.

EINLEITUNG

Für die Methodenentwicklung wurden verschiedene Säulen und Eluentensysteme getestet. Weiter wurde die Methode bezüglich der Säulentemperatur, der Flussrate, der Gradientensteigung, des Injektionsvolumens und der Probenkonzentration optimiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Nebenkomponenten mit dem Hauptpeak eluierten. In regelmässigen Abständen wurde die Entwicklung mittels MS-Detektion überprüft, um eventuell koeluiierende Nebenkomponenten auszuschliessen. Die *rapid* HPLC Methode wurde validiert und die Parameter Spezifität, Linearität, Richtigkeit, Präzision, Empfindlichkeit,

Robustheit und Stabilität der Probenlösung kontrolliert. Die Verunreinigungen $\geq 0.10\%$ und die Zersetzungsprodukte $\geq 0.25\%$ wurden eruiert und die Massen mit Hilfe von LC/MS und ESI-TOF Messungen bestimmt. Darauf basierend wurden mögliche Strukturen vorgeschlagen und diese anschliessend mittels Nanospray-MSⁿ-Messungen bestätigt oder korrigiert. Zur Identifizierung der Zersetzungsprodukte wurden eine Lösung eines thermisch gestressten Peptids und die Lösungen des *stress tests* gemäss ICH guideline Q1A der sauren, basischen und oxidativen Bedingungen berücksichtigt.

RESULTATE

Die entwickelte Methode (Abb. 1 c) zeigte hohe Selektivität ohne koeluiierende Nebenkomponenten (Abb. 1 b).

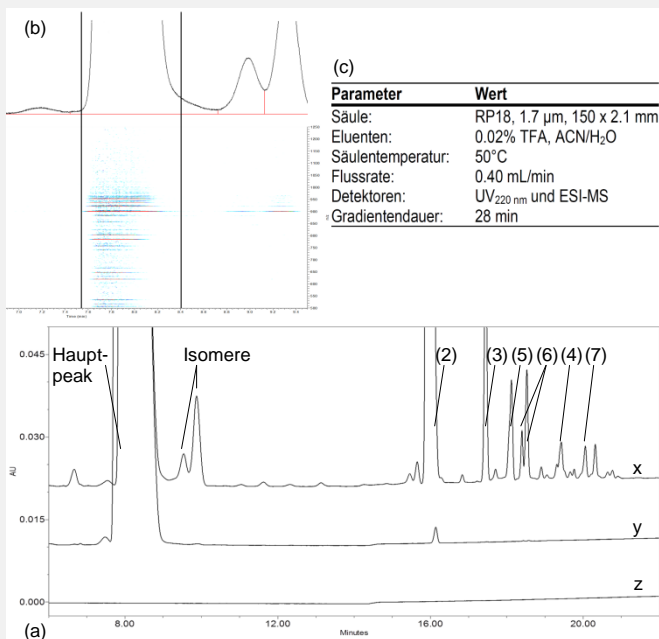


Abb. 1: (a) Overlay vom Blank (z), vom Peptid (y) und vom thermisch behandelten Peptid (x) mit Kennzeichnung der Nebenkomponenten; (b) Kontrolle auf koeluiierende Nebenkomponenten mittels ESI-MS; (c) *rapid* HPLC Methode

Die meisten identifizierten Nebenkomponenten waren auf die N-terminale Asparaginsäure (Nr. 1 in Abb. 2) zurückzuführen.

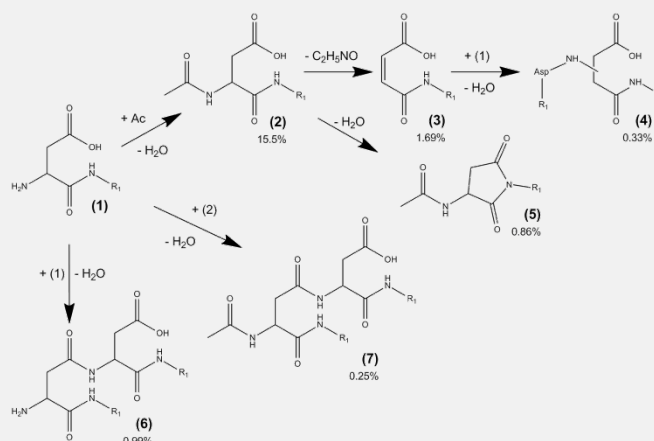


Abb. 2 Peptid (1) und sechs identifizierte Nebenkomponenten (2-7); jeweils mit Reaktionsweg und Angabe der relativen Peakfläche in der thermisch gestressten Probe.

[in Zusammenarbeit mit Dr. Patrik Plattner, Bachem AG]

Zusätzlich wurden zwei Isomere in der thermisch gestressten Probe identifiziert (Abb. 1 a). In der basischen Lösung des *stress tests* wurden zwei weitere Isomere und ein Argininderivat nachgewiesen (Nr. 8 in Abb. 3).

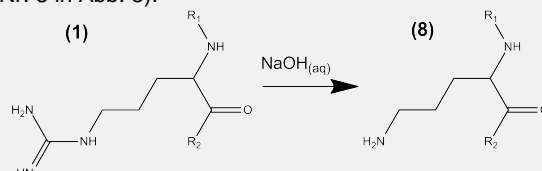


Abb. 3 Hydrolyse von Arginin des Peptids (1) zu Ornithin (8) [1]

SCHLUSSFOLGERUNG

Die *rapid* HPLC Methode für den Test *related substances* (HPLC) wurde erfolgreich entwickelt. Während der Validierung wurde gezeigt, dass Verunreinigungen ab 0.05% bestimmt werden können. Weiter konnten alle Verunreinigungen $\geq 0.10\%$ und alle Zersetzungsprodukte $\geq 0.25\%$ mittels entsprechender MS-Experimenten identifiziert werden.

Begleitdozent/in: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck

Expert/in: Dr. Markus Ehrat

Betreuer: Dominik Weber, Bachem AG

Dr. Rolf Jiricek, Bachem AG

REFERENZEN

[1] K. Murray, P. Stroier Rasmussen, Joan Neustaedter, J. Murray Luck, *J. Biol. Chem.*, 1965, vol. 240, no. 2, 705-709.