

Verbesserte Charakterisierung und Beurteilung der Stabilität von Peptiden

UV-Vis-Ableitungsspektroskopie zweiter Ordnung auf einem Agilent Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometer

Autor

Suresh Babu C. V.
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Die Überwachung der Stabilität von Peptid-Therapeutika ist in der biopharmazeutischen Entwicklung von entscheidender Bedeutung. Peakverbreiterung Traditionelle Techniken der UV-Vis-Absorptionsspektroskopie, die bei Stabilitätsanalysen üblicherweise verwendet werden, bieten oft keine ausreichende Wellenlängenauflösung, insbesondere für biologische Moleküle wie Proteine und DNA, die in der Regel breite Peaks aufweisen. Dies erschwert es, subtile strukturelle Änderungen zu erkennen, insbesondere wenn sich Spektrenmerkmale überlappen. Diese Application Note zeigt die Vorteile der Nutzung der UV-Vis-Ableitungsspektroskopie zweiter Ordnung mit dem Agilent Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometer, um die Charakterisierung und Beurteilung der Stabilität von Peptiden zu verbessern. Die erweiterten Funktionen des Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometers, einschließlich der Multiküvettenmessung und integrierten Ableitungsberechnung sowie der rationalisierten Datenerfassung und -analyse, machen es zu einem wertvollen Werkzeug für Stabilitätsanalysen von Peptiden in biopharmazeutischen Anwendungen.

Einführung

Biotherapeutika aus der Klasse der synthetischen Peptide werden zunehmend eingesetzt. Glucagon-like-Peptide-1 (GLP-1)-Agonisten sind synthetische Peptide, die natürliche GLP-1-Hormone nachahmen und eine wichtige Rolle in der Stoffwechselregulierung spielen. Sie unterstützen die Insulinausschüttung und fördern die Gewichtsreduzierung.¹ Aufgrund der Anfälligkeit des GLP-1-Moleküls für verschiedene Abbauelemente ist die Beurteilung der Qualität und Stabilität von Therapeutika auf GLP-1-Basis unerlässlich, um ihre Wirksamkeit sicherzustellen.

Die Messung der Stabilität von Peptiden erfolgt in der Regel durch die Beobachtung von Änderungen im Absorptionsspektrum, das durch Ultraviolett-Spektroskopie erzeugt wird.² Da die Technik zerstörungsfrei ist, bietet sie signifikante Vorteile für den Arbeitsablauf. So bleiben z. B. wertvolle Proben nach der Analyse intakt und können nachfolgend mit komplementären Techniken wie der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie analysiert werden. Zusätzlich ist die UV-Vis-Spektroskopie ein schnelles und einfaches Verfahren, was sie für eine breite Palette von Benutzern zugänglich macht.

Konventionelle UV-Vis-Absorptionsspektren sind jedoch bei der Untersuchung kleiner Veränderungen wie leichte Verschiebungen von Peakpositionen oder geringfügige Intensitätsschwankungen mitunter schwierig zu interpretieren – insbesondere für Biomoleküle, die Umweltfaktoren wie oxidativem Stress ausgesetzt sind. Die mangelhafte Auflösung von Spektralmerkmalen stellt ebenfalls eine Herausforderung dar, wenn Biomolekülspektren aus mehreren überlappenden Komponenten bestehen. Die Ableitungsspektroskopie ist ein leistungsstarkes Verfahren, das diese Einschränkungen durch die Hervorhebung subtiler Merkmale adressiert. Dies erlaubt die Auflösung überlappender Peaks, die in einem traditionellen Absorptionsspektrum nicht unterscheidbar wären.

Das Agilent 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometer mit seinem Multiküvetten-Modul ist ein leistungsstarkes Werkzeug für die Analyse von Biomolekülen mittels Messungen und Ableitung zweiter Ordnung. Dieses Gerät ermöglicht die gleichzeitige Messung mehrerer Proben – darunter Standards, Proben und Kontrollproben – unter gleichen Bedingungen. Die Agilent Cary UV Workstation-Software zur Steuerung des Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometers bietet eine integrierte Gleichungsfunktion, die nach Extinktionsmessungen automatisch IR-Spektren der zweiten Ableitung erzeugt, um Berechnungsfehler zu minimieren und die Datenverarbeitung zu optimieren.

Diese Application Note demonstriert den Einsatz der erweiterten Funktionalitäten des Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometers und der UV-Vis-Ableitungsspektroskopie zweiter Ordnung zur Verbesserung der Auflösung sich überlappender Absorptionspeaks von Peptiden und aromatischen Aminosäuren.

Experimentelles

Materialien

Tryptophan (W), Tyrosin (Y), Phenylalanin (F), α -melanozytenstimulierendes Hormon (MSH), Melittin, Liraglutid, Angiotensin II, 30%iges Wasserstoffperoxid (v/v) (H_2O_2) und Natriumphosphat wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Probenvorbereitung

Alle Peptidproben sowie Tryptophan (0,15 mM), Tyrosin (0,5 mM) und Phenylalanin (4,0 mM) wurden in Natriumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 bei einer Konzentration von 1 mg/ml zubereitet. Für die Stressbedingungen wurden die Peptide mit 0,07 % H_2O_2 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der UV-Vis-Analyse war keine weitere Probenvorbereitung erforderlich.

Geräte

Die Datenakquisition wurde mit dem Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometer und der Cary Workstation-Software mit den in Tabelle 1 angegebenen Parametern durchgeführt. Das Multiküvetten-Design ermöglicht die gleichzeitige Messung von bis zu sieben Proben zusammen mit einer Referenzprobe. Die Messungen wurden mithilfe einer rechteckigen Ultra-Mikrovolumen-Küvette mit einer Pfadlänge von 10 mm durchgeführt (Agilent Bestellnummer 5062-2496). Die Spektren wurden über mehrere Läufe hinweg ($n = 5$) gemittelt, um die Reproduzierbarkeit sicherzustellen und Rauschen zu minimieren.

Tabelle 1. Methodenparameter des Agilent Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometers.

Parameter	Wert
Erfassungsmodus	Scan
Scanbereich	200 bis 500 nm
Mittelungszeit	0,02 s
Datenintervall	1,00 nm
Scanrate	3000 nm/min
Spektrale Bandbreite	2,00 nm
Ableitung	Zweite Ableitung
Glättungsfilter	9

Ergebnisse und Diskussion

UV-Vis-Spektren von aromatischen Aminosäuren

Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin sind aromatische Aminosäuren, die häufig in Peptiden und Proteinen vorkommen und charakteristische UV-Vis-Absorptionsprofile besitzen. Abbildung 1A zeigt die UV-Vis-Spektren der nullten Ordnung von Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin. Die sich überlappenden Peaks in den Spektren der nullten Ordnung machen es schwierig, feine Spektralmerkmale bei den Aminosäuren zu unterscheiden.

Um die Auflösung und Genauigkeit der Absorptionsspektren zu verbessern, wurden Spektren der Ableitung zweiter Ordnung basierend auf der Savitzky-Golay-Methode analysiert. Die Abbildungen 1B, 1C und 1D zeigen die UV-Vis-Spektren der Ableitung zweiter Ordnung für Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Nach der Erfassung der

Probenmessungen wurden die Spektren der zweiten Ordnung mit der integrierten Berechnungsfunktion der Cary UV Workstation-Software automatisch berechnet. Die Spektren der Ableitung zweiter Ordnung zeigen Peaks mit Maxima und Minima (Wendepunkte), die verwendet werden können, um die unterschiedlichen Spektralabsorptionsbanden der verschiedenen aromatischen Aminosäuren zu unterscheiden. Dies ermöglicht die Untersuchung der geringfügigen Spektralveränderungen, die entstehen, wenn Biomoleküle Stressbedingungen ausgesetzt werden. Die Absorptionsmaxima der Aminosäuren waren wie folgt:

- **Tryptophan:** Absorptionsmaximum bei etwa 273, 280 und 288 nm
- **Tyrosin:** Absorptionsmaximum bei etwa 275 und 282 nm
- **Phenylalanin:** Absorptionsmaximum bei etwa 246, 252, 257, 264 und 268 nm

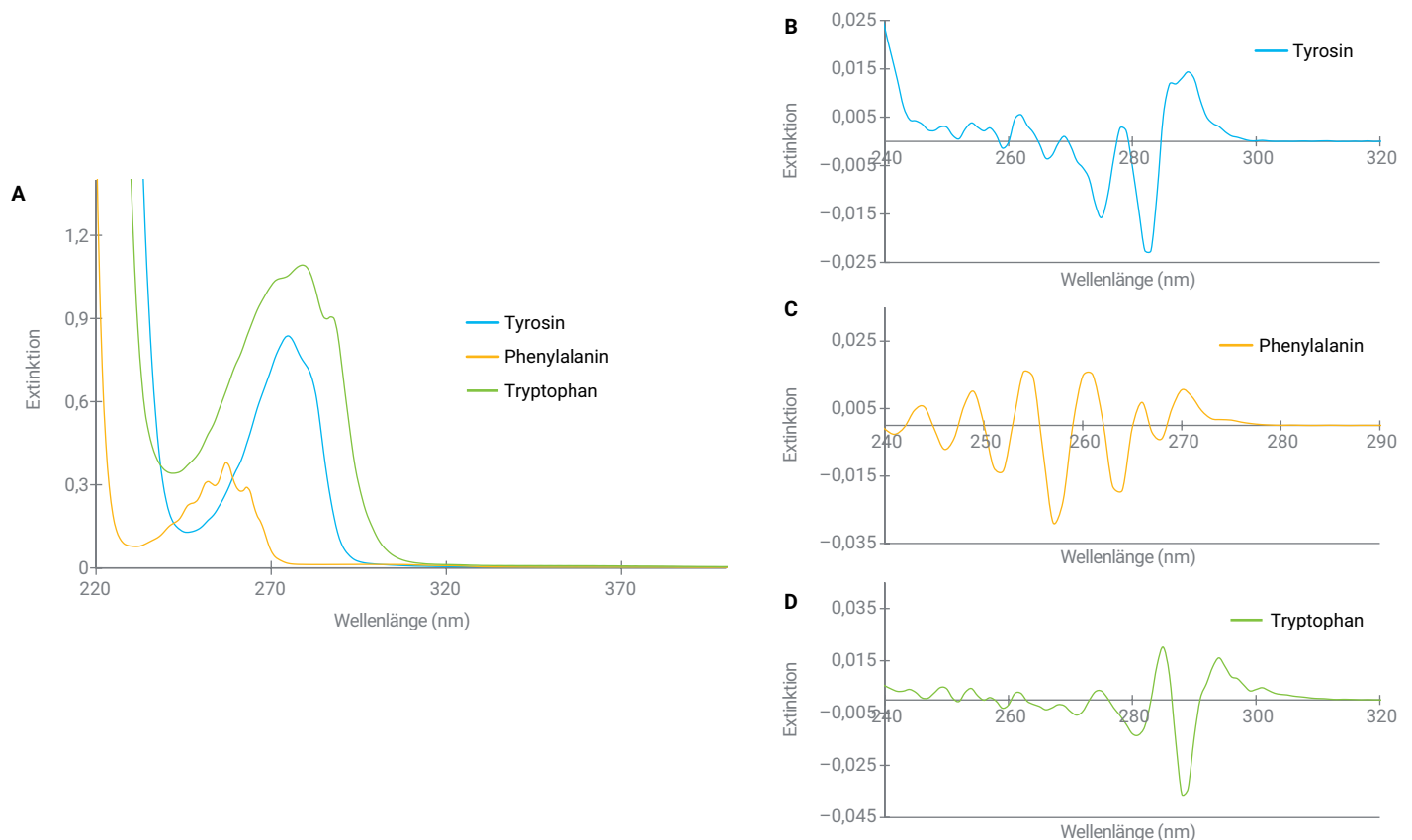


Abbildung 1. UV-Vis-Absorptionsspektren von aromatischen Aminosäuren. (A) UV-Vis-Absorptionsspektren der Ableitung nullter Ordnung und (B, C und D) der Ableitung zweiter Ordnung.

UV-Vis-Spektren von Peptiden

Um verschiedene Absorptionsspektren zum Vergleich zu erzeugen, hatten die für die Studie ausgewählten Peptide unterschiedliche Anteile an aromatischen Aminosäuren. Abbildung 2 zeigt die Ableitung zweiter Ordnung der Absorptionsspektren der vier Peptide Melittin, MSH, Angiotensin II und Liraglutid. Die Peakpositionen in den Absorptionsspektren der Ableitung zweiter Ordnung korrelierten gut mit den bekannten Absorptionsmerkmalen der enthaltenen aromatischen Aminosäuren. Insgesamt boten die Spektren der Ableitung zweiter Ordnung eine

besser aufgelöste Darstellung der Spektreneigenschaften der Peptide. Die Anzahl der in den untersuchten Peptiden enthaltenen aromatischen Aminosäuren ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Melittin zeigte charakteristische Peaks bei 291, 283 und 275 nm, die primär Tryptophan zugeordnet wurden. Für MSH und Liraglutid zeigten sich Peaks bei 290, 283 und 266 nm, was Beiträge von allen drei aromatischen Aminosäuren widerspiegelt. Angiotensin II hatte Peaks bei 283, 276, 264, 258 und 252 nm, was dem Vorhandensein von Tyrosin und Phenylalanin entspricht.

Tabelle 2. Aminosäurezusammensetzung der analysierten Peptide.

Peptide	Sequenz	Anzahl Tryptophan (W)	Anzahl Tyrosin (Y)	Anzahl Phenylalanin (F)
Liraglutid	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVGRGRG	1	1	1
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	1	0	0
α-melanozytenstimulierendes Hormon (MSH)	SYSMEHFRWGKPV	1	1	1
Angiotensin II	DRVYIHPF	0	1	1
Substanz P	RPKPQQFFGLM	0	0	2

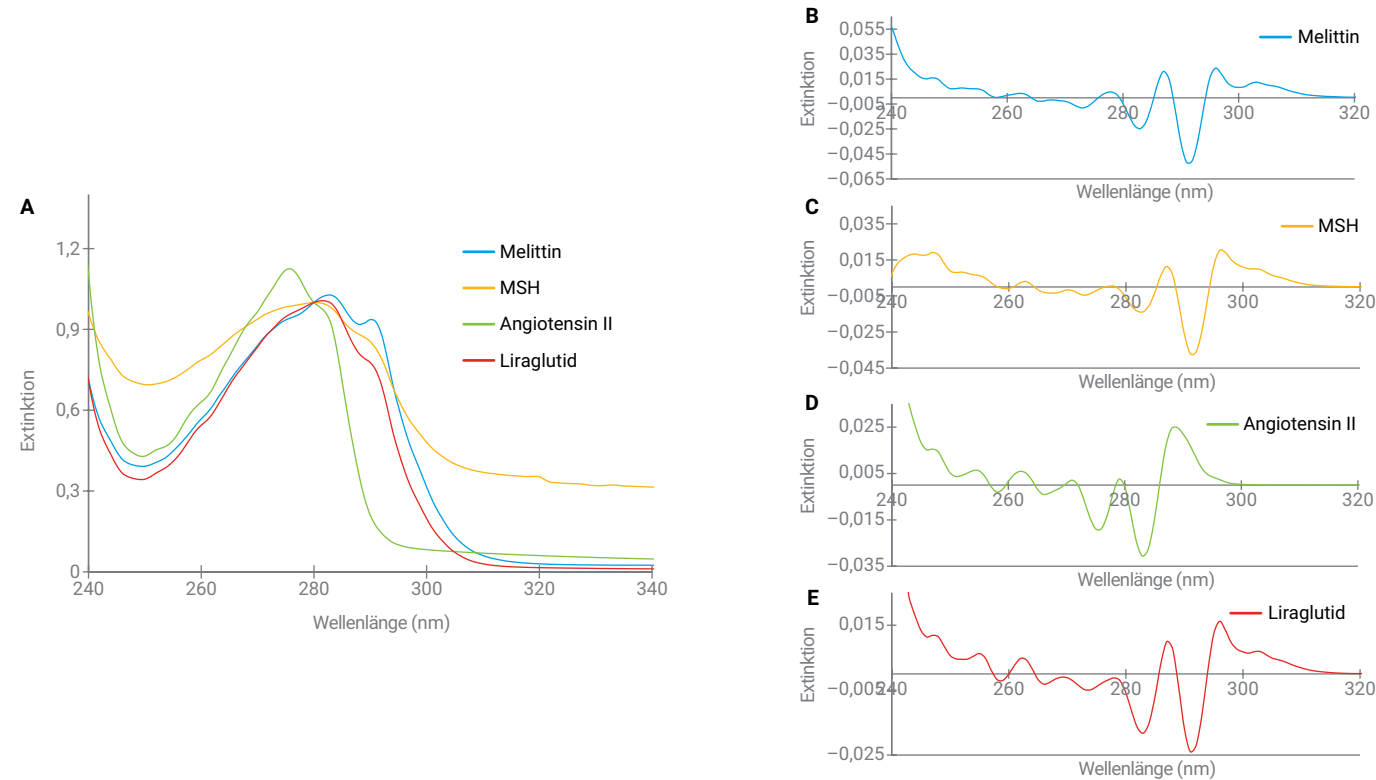


Abbildung 2. UV-Vis-Absorptionsspektren von Peptiden. (A) UV-Vis-Absorptionsspektren der Ableitung nullter Ordnung und (B, C, D und E) der Ableitung zweiter Ordnung.

Überwachung der Stabilität von Peptiden unter oxidativem Stress

Um den Nutzen der Ableitungsspektroskopie für die Stabilitätsüberwachung zu beurteilen, wurden die Peptide mit H_2O_2 behandelt. Abbildung 3 zeigt den Vergleich der Ableitung zweiter Ordnung der UV-Vis-Spektren für unbehandelte und mit H_2O_2 behandelte Peptide. Die minutlichen Änderungen bei der Absorption der Peptid-Wellenlänge aufgrund der H_2O_2 -Behandlung wurden in der Ableitung zweiter Ordnung der Spektren effektiv erfasst. Bei Angiotensin-II-Peptid gibt es keinen Tryptophan-Rest, sodass nach der H_2O_2 -Behandlung um die 291-nm-Region herum keine signifikante Veränderung festgestellt wurde. In der Ableitung zweiter Ordnung des Spektrums von Melittin wurden nur minimale Änderungen festgestellt, was darauf hinweist, dass es

weniger anfällig für Oxidation ist. Tryptophan-haltiges MSH und Liraglutid zeigten nach der H_2O_2 -Behandlung einen ausgeprägten Verlust bei der Größenordnung des 291-nm-Peaks. Dies weist auf die Anfälligkeit der Verbindung gegen Oxidation hin, die sich primär auf Tryptophan-Reste auswirkt, was weiterhin die Spezifität der Methode der Ableitung zweiter Ordnung für den Nachweis von Tryptophan-Oxidation belegt. Um den Oxidationsstatus von Liraglutid weiter zu bestätigen, wurden mit H_2O_2 behandelte Proben mittels Flüssigkeitschromatographie-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (LC/Q-TOF-MS) analysiert. Abbildung 4 zeigt das Gesamt-Ionenchromatogramm von mit H_2O_2 behandeltem Liraglutid. Das dekonvolvierte Massenspektrum bestätigte die Oxidationsformen mit Massenverschiebungen von +16 Da und +32 Da, die Mono- bzw. Dioxidationsprodukten entsprechen.³

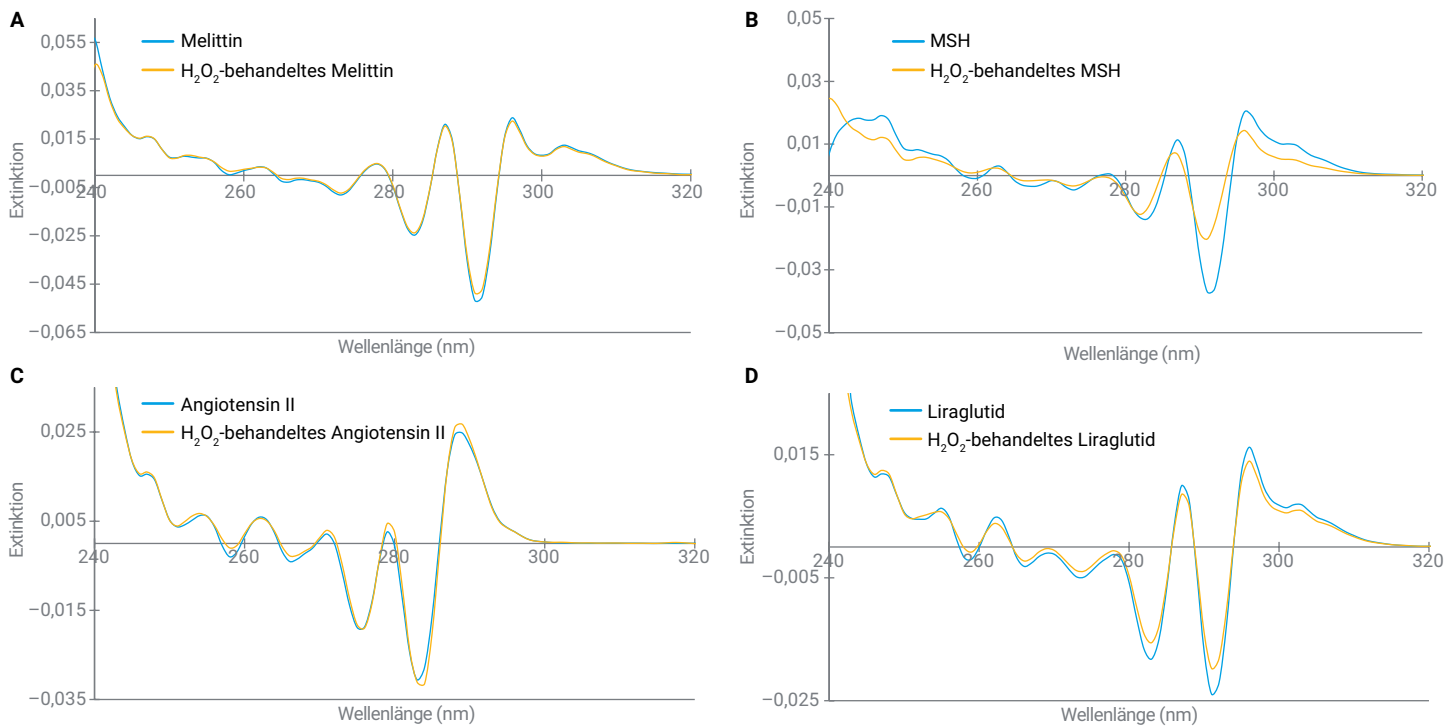


Abbildung 3. UV-Vis-Absorptionsspektren der Ableitung zweiter Ordnung für unbehandelte und mit H_2O_2 behandelte Peptide.

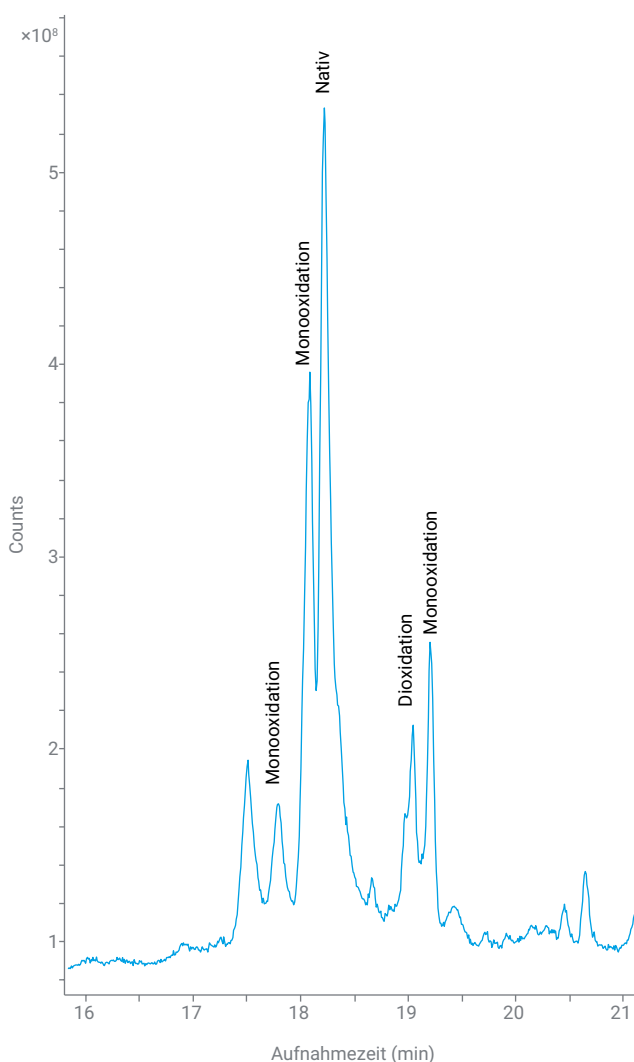


Abbildung 4. LC/MS-Totalionen-Chromatogramm von oxidiertem Liraglutid.

Fazit

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Fähigkeit der UV-Vis-Ableitungsspektroskopie zweiter Ordnung auf, feinste Spektrenunterschiede infolge von Änderungen an den aromatischen Resten von Peptiden präzise zu identifizieren und zu überwachen. Diese Fähigkeit macht sie zu einem unentbehrlichen Werkzeug für die Überwachung der Stabilität von Peptiden. Die Multiküvetten-Funktion des Agilent Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometers reduziert die Messdauer, indem Sie die gleichzeitige Beobachtung von acht Proben ermöglicht. Die integrierte Berechnungsfunktion rationalisiert die Analyse durch automatisierte Berechnungen, was Benutzern die Interpretation von Daten und Entscheidungsfindung vereinfacht. Diese Fähigkeit ist insbesondere für die biopharmazeutische Analytik von Nutzen, in der eine genaue und effiziente Überwachung der Stabilität von Peptiden für die Arzneimittelentwicklung und Qualitätskontrolle unverzichtbar ist. Die zerstörungsfreie UV-Vis-Spektroskopie ermöglicht die Verwendung von Proben für nachfolgende Analysen wie die komplementäre LC-MS-Analyse. Das Cary 3500 Multiküvetten-UV-Vis-Spektralphotometer ist die ideale Wahl für die Arzneimittelentwicklung und Labore, die Qualitätskontrolltests (QK) durchführen, bei denen Geschwindigkeit, Benutzerfreundlichkeit und die Möglichkeit zur Wiederverwendung wertvoller Proben im Vordergrund stehen.

Referenzen

1. Müller, T. D.; Finan, B.; Bloom, S. R.; D'Alessio, D.; Drucker, D. J.; Flatt, P. R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H. J.; Habener, J. F.; *et al.* Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). *Mol. Metab.* **2019**, *30*, 72–130.
2. Liyanage, M. R.; Bakshi, K.; Volkin, D. B.; Middaugh, C. R. Ultraviolet Absorption Spectroscopy of Peptides. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1088*, 225–236.
3. Suresh Babu, C.V. Characterization of Forced Degradation Impurities of Glucagon-Like Peptide-1 Agonists by LC/Q-TOF Mass Spectrometry. Agilent Technologies Application Note, 5994-7794DEE. **2025**.