

Sintesis dan Karakterisasi YYGSR-NH₂ sebagai Bahan Baku Kimia Awal untuk Pengembangan Radiofarmaka Theranostik Tiroid

Synthesis and Characterization of YYGSR-NH₂ as a Chemical Starting Point for Thyroid Theranostic Radiopharmaceutical Development

Dalifa Ramadhani^{1*}, Pusva Sandra Dewi², Bilqis Nurganiyu³

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Mulawarman, Jl. Penajam, Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75119, Indonesia. Email: dalifara@ff.unmul.ac.id

²Faculty of Health Sciences ; Universitas kartamulia purwakarta, Sukatani, Kabupaten Purwakarta, 41167, Indonesia. Email: Pusvasandra@univkartamulia.ac.id

³Faculty of Pharmacy, Universitas Mulawarman, Jl. Penajam, Kampus Gunung Kelua, Samarinda 75119, Indonesia. Email: bilqisnurganiyu@ff.unmul.ac.id

Abstrak

Kanker tiroid merupakan salah satu keganasan endokrin yang masih memerlukan pengembangan pendekatan diagnosis dan terapi yang lebih terarah. Peptida merupakan platform kimia yang menjanjikan untuk pengembangan radiofarmaka karena dapat disintesis secara terarah dan dimodifikasi secara kimia. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis dan mengkarakterisasi YYGSR-NH₂ sebagai *chemical starting point* untuk pengembangan radiofarmaka theranostik tiroid. YYGSR-NH₂ disintesis menggunakan metode *Fmoc-solid phase peptide synthesis* pada Fmoc-Rink amide resin melalui kopling bertahap residu Arg, Ser, Gly, Tyr, dan Tyr. Deproteksi dilakukan menggunakan piperidina 20% dalam DMF, sedangkan kopling menggunakan HATU, HOAt, dan DIPEA. Peptida dilepaskan dari resin menggunakan TFA/TIS/H₂O, dimurnikan dengan RP-HPLC semi-preparatif, dan dikarakterisasi menggunakan HPLC analitik serta *time-of-flight mass spectrometry*. Nilai *loading resin* yang diperoleh adalah 0,546 mmol/g dengan massa rata-rata produk kasar sebesar 0,4739 g. HPLC semi-preparatif menunjukkan beberapa komponen dengan kelompok puncak utama sekitar 12–14 menit. HPLC analitik menunjukkan dua puncak pada waktu retensi 1,315 dan 26,412 menit dengan area relatif 96,31% dan 3,69%. Spektrometri massa menunjukkan ion dominan pada m/z 644,3157 yang sesuai dengan ion teoritis [M+H]⁺ YYGSR-NH₂. Berdasarkan hasil tersebut, YYGSR-NH₂ berhasil disintesis dan identitas molekulnya dikonfirmasi melalui spektrometri massa, sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku kimia awal untuk penelitian pengembangan radiofarmaka theranostik tiroid selanjutnya.

Kata kunci: YYGSR-NH₂; sintesis peptida; RP-HPLC; spektrometri massa; radiofarmaka theranostik; SPPS

Abstract

Thyroid cancer is an endocrine malignancy that still requires the development of more targeted diagnostic and therapeutic approaches. Peptides are promising chemical platforms for radiopharmaceutical development because they can be synthesized in a controlled manner and chemically modified. This study aimed to synthesize and characterize YYGSR-NH₂ as a chemical starting point for thyroid theranostic radiopharmaceutical development. YYGSR-NH₂ was synthesized using *Fmoc-solid phase peptide synthesis* on Fmoc-Rink amide resin through sequential coupling of Arg, Ser, Gly, Tyr, and Tyr residues. Deprotection was performed using 20% piperidine in DMF, while coupling was carried out using HATU, HOAt, and DIPEA. The peptide was cleaved from the resin using TFA/TIS/H₂O, purified by semi-preparative RP-HPLC, and characterized using analytical RP-HPLC and *time-of-flight mass spectrometry*. The resin loading obtained was 0.546 mmol/g, with an average crude product mass of 0.4739 g. Semi-preparative HPLC showed several components with major peaks at retention times of approximately 12–14 min. Analytical HPLC showed two peaks at retention times of 1.315 and 26.412 min, with relative areas of 96.31% and 3.69%, respectively. Mass spectrometry showed a dominant ion at m/z 644.3157, which was consistent with the theoretical [M+H]⁺ ion of YYGSR-NH₂. Based on these results, YYGSR-NH₂ was successfully synthesized and its molecular identity was confirmed by mass spectrometry, supporting its use as a chemical starting point for further development of thyroid theranostic radiopharmaceuticals.

Keywords: YYGSR-NH₂; peptide synthesis; RP-HPLC; mass spectrometry; theranostic radiopharmaceutical; SPPS

*Corresponding author: Dalifa Ramadhani, Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

E-mail : dalifara@ff.unmul.ac.id

Doi : 10.35451/jfm.v9i1.3856

Received : August 28, 2026, Accepted: October 27, 2026, Published: October 30, 2026

Copyright: © 2026 Dalifa Ramadhani (s). Creative Commons License This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

1. PENDAHULUAN

Kanker tiroid merupakan salah satu keganasan endokrin dengan insidensi yang tinggi dan terus menjadi perhatian dalam pengembangan pendekatan diagnosis serta terapi yang lebih terarah. Berdasarkan GLOBOCAN 2022, kanker tiroid menempati peringkat ketujuh berdasarkan jumlah kasus baru kanker di dunia, dengan sekitar 821.214 kasus baru dan 47.507 kematian. Insidensinya menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan jenis kelamin dan secara konsisten lebih tinggi pada perempuan [1]. Meskipun sebagian besar differentiated thyroid cancer (DTC) memiliki prognosis yang baik, namun tata laksananya tetap membutuhkan pendekatan diagnosis, terapi, dan pemantauan jangka panjang [2].

Radioiodine merupakan salah satu contoh paling awal dan paling mapan dari pendekatan theranostik dalam kedokteran nuklir. Prinsip tersebut memanfaatkan kemampuan fisiologis sel folikular tiroid dalam mengambil iodida melalui *sodium-iodide symporter* (NIS), sehingga isotop iodium dapat digunakan baik untuk pencitraan maupun terapi [3]. Namun, perkembangan radiofarmaka modern tidak hanya bergantung pada radionuklida, tetapi juga pada kualitas molekul pembawa atau *targeting vector* yang membawa radionuklida menuju jaringan sasaran. Identitas kimia, kemurnian, stabilitas, dan kemampuan molekul pembawa untuk dimodifikasi menjadi aspek yang penting sebelum suatu kandidat memasuki tahap radiolabeling dan evaluasi biologis [4].

Peptida menjadi salah satu kelas molekul yang menarik untuk pengembangan radiofarmaka karena ukurannya relatif kecil, mudah dimodifikasi secara kimia, dan dapat disintesis secara terarah. Selain itu, dibandingkan molekul biologis berukuran besar, peptida umumnya menawarkan penetrasi jaringan yang baik dan dapat dirancang untuk mempunyai sifat farmakokinetik tertentu sehingga banyak dikembangkan sebagai vektor molekuler dalam sistem diagnostik maupun terapeutik [5]. Salah satu pendekatan yang paling banyak digunakan untuk menghasilkan peptida sintetik adalah *solid-phase peptide synthesis* (SPPS). Strategi Fmoc-SPPS memungkinkan perakitan residu asam amino secara berurutan melalui siklus deproteksi dan kopling pada fase padat serta memberikan fleksibilitas dalam pemilihan resin, gugus pelindung, dan reagen kopling. Pendekatan ini sesuai untuk penelitian YYGSR-NH₂ karena ring amide resin memungkinkan pembentukan peptida dengan gugus amida pada ujung C-terminal setelah proses *cleavage* [6].

Landasan rasional pengembangan YYGSR dalam penelitian ini berasal dari pentapeptida YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), yaitu sekuens bioaktif yang berasal dari rantai β 1 laminin. Iwamoto *et al.* (1987) melaporkan bahwa YIGSR berperan dalam interaksi sel dengan laminin dan dapat menghambat invasi serta pembentukan metastasis eksperimental [7]. Selain memiliki aktivitas biologis yang telah banyak dipelajari, keberadaan residu tirosin pada N-terminal YIGSR memberikan peluang untuk modifikasi berbasis iodium. Koliakos *et al.* (1997) menunjukkan bahwa YIGSR diradioiodinasi dan dievaluasi sebagai dasar radiopeptida untuk pencitraan tumor, dengan radiopeptida tersebut menunjukkan akumulasi pada jaringan karsinoma paru [8]. Studi yang lebih baru oleh Mendonça *et al.* (2024) juga melaporkan sintesis YIGSR menggunakan strategi Fmoc, pemurnian dengan RP-HPLC, karakterisasi dengan spektrometri massa, serta evaluasi peptida berlabel radioiodine sebagai penarget kanker [9]. Temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa YIGSR merupakan kerangka peptida yang relevan sebagai landasan konseptual dalam eksplorasi radiopeptida. Berdasarkan kerangka YIGSR, peptida YYGSR-NH₂ dirancang dengan mengganti residu isoleusin pada posisi kedua menjadi tirosin sehingga diperoleh urutan menjadi Tyr-Tyr-Gly-Ser-Arg dengan gugus amida pada C-terminal. Modifikasi ini menghasilkan dua residu tirosin berurutan pada bagian N-terminal yang menyediakan gugus fenolik aromatik yang berpotensi menjadi situs untuk modifikasi kimia lebih lanjut, termasuk pendekatan berbasis iodium. Namun, substitusi Ile menjadi Tyr pada penelitian ini diposisikan sebagai strategi desain kimia dan tidak dimaksudkan untuk menyatakan bahwa YYGSR-NH₂ mempertahankan aktivitas biologis YIGSR. Residu glisin memberikan fleksibilitas terhadap rantai peptida, sedangkan serin bersifat polar dan arginin yang bermuatan positif memberikan kontribusi terhadap karakter fisikokimia dan hidrofilisitas molekul [10,11]. Kombinasi karakter tersebut menjadi dasar rasional pemilihan YYGSR-NH₂ sebagai model peptida dalam penelitian ini.

Sebelum dikembangkan ke tahap modifikasi atau radiolabeling, produk peptida sintetik perlu dimurnikan dan dikarakterisasi secara memadai. *Reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC) banyak digunakan untuk pemurnian serta evaluasi profil kromatografi peptida, sedangkan spektrometri massa digunakan untuk mengonfirmasi identitas molekul berdasarkan kesesuaian nilai massa eksperimental dengan massa teoritis [12,13]. Pengembangan metode kromatografi untuk peptida dapat menjadi kompleks karena pemisahan dipengaruhi oleh berbagai parameter, termasuk komposisi fase gerak, gradien, sifat kimia peptida, konsentrasi sampel, serta kondisi instrumen [12].

Beberapa penelitian sebelumnya mendukung penggunaan Fmoc-SPPS, HPLC, dan spektrometri massa dalam sintesis serta karakterisasi peptida. Maharani *et al.* (2025) melaporkan sintesis analog linear bacicyclin menggunakan strategi Fmoc-SPPS dengan HATU/HOAt sebagai reagen kopling dan DIPEA sebagai basa, yang selanjutnya dimurnikan menggunakan RP-HPLC serta dikarakterisasi menggunakan HR-TOF-ESI-MS dan NMR [13]. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa kombinasi Fmoc-asam amino, HATU, HOAt, DIPEA dapat digunakan secara efektif dalam perakitan peptida linear. Sebelumnya, Maharani *et al.* (2022) juga melaporkan sintesis *reversed-bacicyclin* melalui kombinasi sintesis fase padat dan fase larutan, yang memberikan dasar metodologis untuk pengembangan analog peptida selanjutnya [14]. Aluri *et al.* menunjukkan penerapan Fmoc-SPPS pada Rink amide resin untuk sintesis peptida multiresidu, termasuk penggunaan gugus pelindung pada residu seperti Arg(Pbf) dan Ser(tBu), serta evaluasi produk menggunakan RP-HPLC [15]. Meskipun berbagai penelitian tersebut telah menunjukkan keberhasilan sintesis dan karakterisasi peptida menggunakan Fmoc-SPPS, penelusuran literatur yang dilakukan belum menemukan laporan yang secara spesifik mendokumentasikan sintesis, pemurnian, dan karakterisasi analitik YYGSR-NH₂ sebagai bahan kimia awal dalam konteks pengembangan radiofarmaka theranostik tiroid. Berdasarkan kesenjangan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mensintesis YYGSR-NH₂ menggunakan metode Fmoc-SPPS, memurnikan produk menggunakan RP-HPLC semi-preparatif, serta mengkarakterisasi produk hasil sintesis menggunakan RP-HPLC analitik dan *Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (ESI-TOF-MS) sebagai dasar penyediaan *chemical starting point* untuk pengembangan radiofarmaka theranostik tiroid pada tahap penelitian selanjutnya.

2. METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: *N,N*-dimetilformamida (DMF), diklorometana (DCM), metanol, *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), asam trifluoroasetat (TFA), triisopropilsilana (TIS), dan piperidina yang diperoleh dari Sigma-Aldrich (Singapura). Fmoc-Rink amide resin, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-ilmetilena]-*N*-metilmetanaminium heksafluorofosfat *N*-oksida (HATU), dan 1-hidroksi-7-azabenzotriazol (HOAt) diperoleh dari GL Biochem (Shanghai, China). Asetonitril dan air dengan *grade* HPLC/LC-MS digunakan pada tahap pemurnian dan karakterisasi kromatografi.

Alat

Peralatan utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *rotary suspension mixer* untuk sintesis peptida fase padat, *rotary evaporator* untuk penguapan pelarut, instrumen *analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC) yang dilengkapi dengan Waters 2998 Photodiode Array Detector dan kolom C18, instrumen RP-HPLC semi-preparatif yang dilengkapi dengan Waters 2998 Photodiode Array Detector dan kolom C18, spektrofotometer UV-Vis TECAN Infinite 200 PRO untuk penentuan loading resin, serta Waters Xevo *quadrupole time-of-flight mass spectrometer* dengan sumber ionisasi *electrospray* (ESI-QTOF-MS) untuk karakterisasi massa molekul produk hasil sintesis.

Prosedur

Sintesis Peptida YYGSR-NH₂

Peptida YYGSR-NH₂ disintesis menggunakan metode *solid-phase peptide synthesis* (SPPS) dengan strategi Fmoc pada Fmoc-Rink amide resin. Sebanyak 400 mg resin dimasukkan ke dalam reaktor sintesis dan dikembangkan (swelling) dalam DMF selama 10–20 menit pada suhu ruang. Resin kemudian dicuci menggunakan DMF dan DCM [11]. Deproteksi gugus Fmoc dilakukan menggunakan 4 mL piperidina 20% dalam DMF selama 15 menit dan diulangi sebanyak dua kali [13]. Setelah deproteksi, resin dicuci menggunakan DMF dan DCM untuk menghilangkan sisa piperidina dan produk hasil deproteksi. Keberadaan gugus amina bebas setelah proses deproteksi dipantau menggunakan uji kloranil [31].

Perakitan rantai peptida dilakukan dari arah C-terminal menuju N-terminal melalui kopling Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, dan Fmoc-Tyr(tBu)-OH secara berurutan. Setiap tahap kopling dilakukan menggunakan Fmoc-amino acid sebanyak 3 ekuivalen, HATU 3 ekuivalen, HOAt 3 ekuivalen, dan DIPEA 6 ekuivalen dalam DMF. Reaksi kopling dilakukan pada suhu ruang dan keberhasilan kopling

dipantau menggunakan uji kloranil [31]. Setelah setiap kopling, resin dicuci menggunakan DMF dan DCM sebelum dilakukan deproteksi Fmoc berikutnya.

Capping

Setelah tahap kopling yang memerlukan penutupan gugus amina yang tidak bereaksi, dilakukan proses *capping* menggunakan campuran asam asetat:DIPEA:DMF dengan perbandingan 5:5:90. Sebanyak 5 mL campuran *capping* ditambahkan ke resin dan direaksikan selama 5 menit pada suhu ruang. Perlakuan *capping* dilakukan sebanyak dua kali. Setelah proses selesai, larutan dibuang dan resin dicuci menggunakan DMF dan DCM sebelum dilanjutkan ke tahap sintesis berikutnya [32].

Penentuan Loading Resin

Penentuan loading resin dilakukan setelah kopling residu pertama. Sejumlah resin (0,5 mg) ditambahkan larutan piperidin 20% dalam DMF untuk melepaskan gugus Fmoc, kemudian absorbansi larutan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 290 nm. Nilai absorbansi sampel dikoreksi terhadap blanko dan digunakan untuk menghitung kapasitas loading resin dalam mmol/g [33].

Cleavage dan Deproteksi global

Setelah seluruh tahapan elongasi peptida selesai, peptida dilepaskan dari resin sekaligus dilakukan deproteksi global gugus pelindung rantai samping menggunakan campuran TFA:TIS:H₂O dengan perbandingan 95:2,5:2,5 (v/v/v). Sebanyak 5 mL campuran *cleavage cocktail* ditambahkan ke resin dan direaksikan selama 2-3 jam pada suhu ruang [34].

Preparasi crude peptida YYGSR-NH₂

Hasil krud YYGSR-NH₂ dilarutkan dalam campuran air dan asetonitril dengan perbandingan 7:3 (v/v), sesuai preparasi yang digunakan pada metode RP-HPLC. Kemudian larutan disonikasi hingga homogen, kemudian saring menggunakan *syringe filter* sebelum dimasukkan ke dalam vial HPLC [13].

Pemurnian menggunakan RP-HPLC semi-preparatif

Produk kasar dimurnikan menggunakan RP-HPLC semi preparatif yang dilengkapi Waters 2998 *Photodiode Array Detector* dan LiChrospher 100 C18 5µm, 10 x 250 mm. Pemurnian dilakukan dengan *flow rate* 2,0 mL/menit menggunakan sistem elusi gradien. Fase gerak terdiri atas fase A berupa air dan fase B berupa metanol. Komposisi awal fase gerak adalah 60% A dan 40% B, kemudian secara bertahap diubah menjadi 10% A dan 90% B pada menit ke-30. Komposisi tersebut dipertahankan hingga menit ke-45 dan dikembalikan menjadi 60% A dan 40% B pada menit ke-50. Pemisahan dilakukan pada suhu kolom 25 °C dan laju alir 2,0 mL/menit. Kromatogram dipantau menggunakan detektor PDA pada panjang gelombang 210, 254, dan 365 nm. Fraksi yang dipilih dikoleksi secara terpisah dan pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator*.

Karakterisasi menggunakan RP-HPLC analitik

Fraksi hasil pemurnian dianalisis menggunakan RP-HPLC analitik yang dilengkapi Waters 2998 *Photodiode Array Detector* dan kolom C18. Analisis dilakukan menggunakan sistem elusi gradien dengan fase gerak A berupa air dan fase gerak C berupa asetonitril (ACN). Komposisi awal fase gerak adalah 90% A dan 10% C, kemudian diubah secara bertahap hingga mencapai 20% A dan 80% C pada menit ke-30. Analisis dilakukan dengan laju alir 1,0 mL/menit dan volume injeksi 50 µL. Kromatogram dipantau menggunakan detektor PDA pada panjang gelombang 254 nm. Profil kromatografi dievaluasi berdasarkan waktu retensi dan area relatif masing-masing puncak.

Karakterisasi menggunakan ESI-QTOF-MS

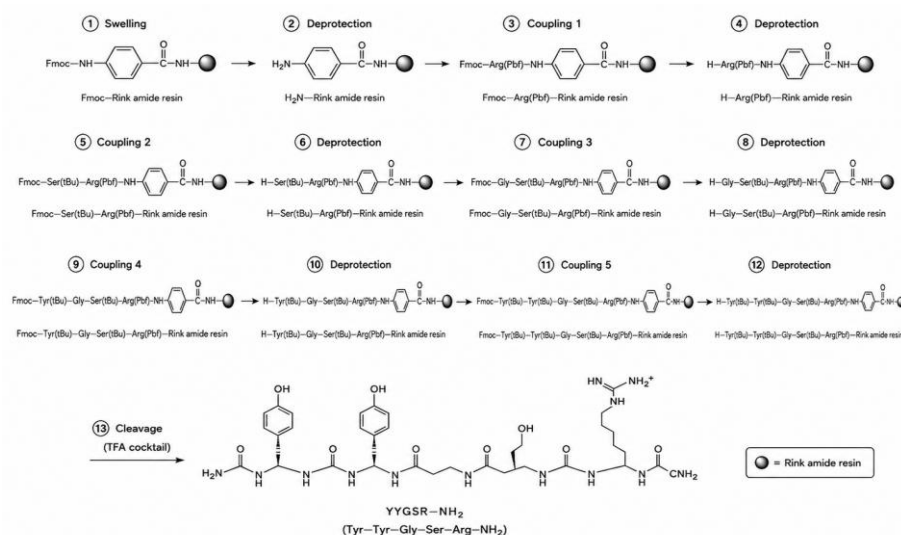
Massa molekul produk hasil sintesis ditentukan menggunakan Waters Xevo Q-TOF *mass spectrometer* dengan sumber ionisasi electrospray ionization (ESI). Analisis dilakukan dalam mode ion positif. Identitas YYGSR-NH₂ ditetapkan dengan membandingkan nilai mass-to-charge ratio (m/z) ion molekul hasil pengukuran dengan nilai

teoritis ion $[M+H]^+$. Formula molekul YYGSR-NH₂ adalah C₂₉H₄₁N₉O₈ dengan massa monoisotopik sekitar 643,31 Da dan nilai teoritis $[M+H]^+$ sekitar m/z 644,31.

3. HASIL

Sintesis Peptida YYGSR-NH₂

Peptida YYGSR-NH₂ berhasil disintesis menggunakan strategi Fmoc-SPPS pada Fmoc-Rink amide resin melalui tahapan deproteksi, kopling, capping, elongasi rantai, serta cleavage dan deproteksi global. Tahapan sintesis YYGSR-NH₂ ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar. 1. Tahapan Sintesis YYGSR-NH₂ menggunakan strategi Fmoc-SPPS

Penentuan Loading Resin

Penentuan loading resin setelah kopling residu pertama menghasilkan absorbansi terkoreksi sebesar 0,6339 dan kapasitas loading resin sebesar 0,546 mmol/g (Tabel 1)

Tabel 1. Hasil penentuan loading resin Fmoc-Rink amide

Parameter	Hasil
Absorbansi blanko (piperidin 20% dalam DMF)	0,394
Absorbansi sampel + piperidin 20% dalam DMF	1,0279
Absorbansi terkoreksi	0,6339
Loading resin	0,546 mmol/g

Perhitungan Loading resin

$$\begin{aligned}
 \text{Loading resin} &= \frac{\text{Absorbansi sampel} \times \text{volume piperidin}}{5800 \times \text{massa resin}} \\
 &= \frac{0,6339 \times 2,5}{5800 \times 0,00005} \\
 &= \frac{1,58475}{2,9} \\
 &= \mathbf{0,546 \text{ mmol/g}}
 \end{aligned} \tag{1}$$

Rumus. (1). Perhitungan Loading Resin

Setelah seluruh siklus elongasi selesai, peptida dilepaskan dari resin melalui tahap cleavage dan deproteksi global. Produk kasar yang diperoleh setelah penguapan pelarut memiliki massa rata-rata sebesar **0,4739 gram**.

Pemurnian YYGSR-NH₂ menggunakan RP-HPLC semi-preparatif

Produk kasar YYGSR-NH₂ dimurnikan menggunakan RP-HPLC semi-preparatif dengan pemantauan pada panjang gelombang 210, 254, dan 365 nm. Kromatogram menunjukkan adanya beberapa komponen pada produk kasar. Pada 365 nm, respons terbesar terdeteksi pada waktu retensi 14,234 menit dengan area relatif 53,49% (Tabel 2).

Tabel 2. Puncak utama kromatogram RP-HPLC semi preparatif krud YYGSR-NH₂

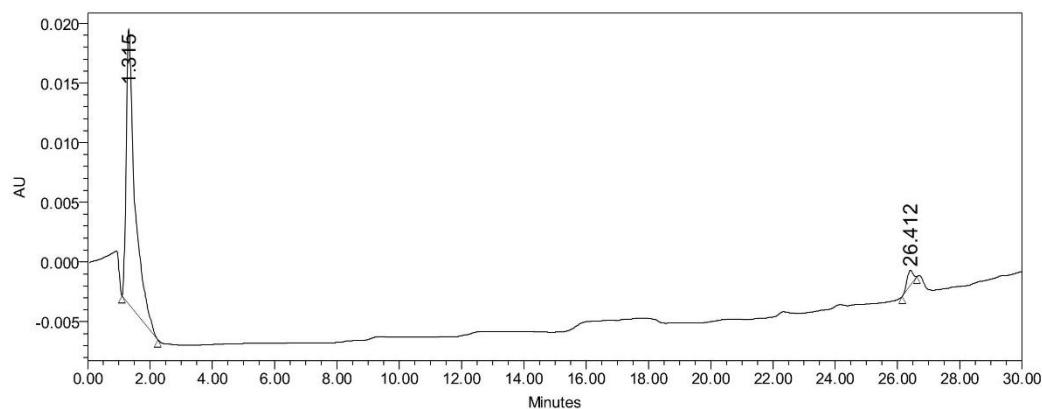
Panjang Gelombang (nm)	RT (menit)	Area Relatif (%)
254	12,622	23,32
	13,416	9,73
	13,904	15,66
	18,446	10,97
365	13,440	23,94
	14,234	53,49

Karakterisasi YYGSR-NH₂ menggunakan RP-HPLC semi-preparatif

Fraksi hasil pemurnian selanjutnya dianalisis menggunakan RP-HPLC analitik. Kromatogram menunjukkan dua puncak terintegrasi pada waktu retensi 1,315 menit dan 26,412 menit, dengan puncak dominan pada RT 1,315 menit yang memiliki area relatif 96,31% (Tabel 3 dan Gambar 3).

Tabel 3. Hasil RP-HPLC analitik fraksi hasil pemurnian

Peak	RT (menit)	Area	Area relatif (%)
1	1,315	441,210	96,31
2	26,412	16,902	3,69



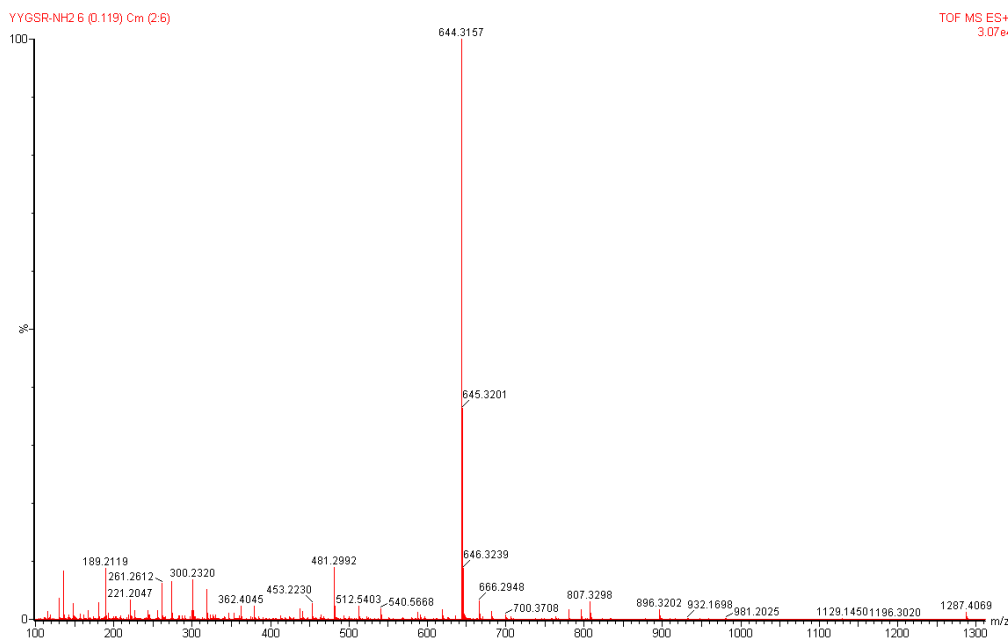
Gambar 3. Kromatogram RP-HPLC analitik fraksi hasil pemurnian pada panjang gelombang 254 nm

Karakterisasi menggunakan ESI-QTOF-MS

Analisis ESI-QTOF-MS menunjukkan ion dominan pada m/z 644,3157, yang sesuai dengan nilai teoritis ion terprotonasi $[M+H]^+$ YYGSR-NH₂ sekitar m/z 644,31. Puncak isotop juga terdeteksi pada m/z 645,3201 dan 646,3239 (Tabel 4 dan Gambar 4).

Tabel 4. Hasil Karakterisasi masa YYGSR-NH₂

Parameter	Hasil
Formula molekul	C ₂₉ H ₄₁ N ₉ O ₈
Massa monoisotopic teoritis	±643,31 Da
[M+H] ⁺ teoritis	±644,31
[M+H] ⁺ teramati	644,3157
Isotop 1	645,3201
Isotop 2	646,3239

Gambar 4. Spektrum ESI-QTOF-MS produk hasil sintesis YYGSR-NH₂

4. PEMBAHASAN

Sintesis YYGSR-NH₂ menggunakan Fmoc-SPPS

Sintesis YYGSR-NH₂ dilakukan menggunakan strategi *Fmoc-solid phase peptide synthesis* (Fmoc-SPPS) pada Fmoc-Rink amide resin. Metode Fmoc-SPPS memungkinkan perakitan rantai peptida secara bertahap pada fase padat melalui siklus deproteksi, pencucian, dan kopling yang dilakukan berulang sampai seluruh residu tersusun [11]. Pendekatan tersebut sesuai untuk sintesis YYGSR-NH₂ karena target yang diinginkan memiliki gugus amida pada C-terminal, yang dapat diperoleh melalui penggunaan Rink amide resin setelah proses cleavage [11].

Perakitan rantai dilakukan dari arah C-terminal menuju N-terminal dengan urutan Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, dan Fmoc-Tyr(tBu)-OH. HATU dan HOAt digunakan sebagai reagen kopling, sedangkan DIPEA digunakan sebagai basa. Strategi yang sangat sebanding dilaporkan Maharani et al. (2022) pada sintesis analog linear bacicyclin menggunakan Fmoc-SPPS, yaitu penggunaan Fmoc-amino acid, HATU, dan HOAt masing-masing sebanyak 3 ekuivalen dengan DIPEA 6 ekuivalen [13]. Penelitian Maharani et al. (2022) tersebut dikembangkan dari pendekatan sintesis reversed-bacicyclin yang sebelumnya juga menggunakan kombinasi metode fase padat dan fase larutan [14].

Penggunaan HATU/HOAt dalam sintesis peptida perlu dikombinasikan dengan pengendalian kondisi reaksi karena tahap aktivasi asam amino dapat disertai pembentukan produk samping. Salah satu reaksi yang perlu diperhatikan adalah epimerisasi. Duengo et al. (2023) menjelaskan bahwa epimerisasi selama sintesis peptida

dapat dipengaruhi oleh jenis residu asam amino, reagen aktivasi, basa, temperatur, dan lama reaksi [17]. Oleh sebab itu, pengendalian setiap siklus kopling penting untuk mempertahankan struktur peptida yang diharapkan.

Deproteksi, monitoring, dan elongasi rantai peptida

Deproteksi gugus Fmoc dilakukan menggunakan piperidina 20% dalam DMF selama 15 menit dan diulangi dua kali. Piperidina dalam DMF merupakan sistem yang umum digunakan untuk menghilangkan gugus Fmoc sehingga menghasilkan gugus amina bebas yang siap mengalami kopling berikutnya [11]. Mthembu et al. (2024) juga menggunakan sistem piperidina 20% dalam DMF sebagai kondisi pembanding dalam evaluasi reagen alternatif untuk pelepasan gugus Fmoc [18]. Keberhasilan deproteksi dan kopling pada penelitian ini dipantau menggunakan uji kloranil. Pemantauan setiap tahap penting karena kegagalan deproteksi atau kopling dapat menyebabkan terbentuknya rantai yang lebih pendek atau deletion sequence. Perkembangan metode monitoring SPPS juga menunjukkan bahwa pengawasan kemajuan reaksi merupakan bagian penting dalam meningkatkan konsistensi proses sintesis [19].

Strategi Fmoc-SPPS tidak hanya sesuai untuk peptida pendek, tetapi juga telah digunakan untuk menghasilkan molekul peptida dengan jumlah residu yang lebih banyak dan struktur yang lebih kompleks. Aluri et al. (2025), misalnya, menerapkan strategi Fmoc-SPPS dalam sintesis cetorelix acetate [15]. Hal tersebut memperlihatkan fleksibilitas sintesis fase padat dalam mengatur urutan residu, gugus pelindung, serta kondisi kopling sesuai karakter peptida yang ditargetkan. Secara lebih luas, pemilihan resin, gugus pelindung, reagen kopling, dan kondisi cleavage merupakan parameter yang saling berkaitan dalam keberhasilan sintesis fase padat [20].

Loading resin dan proses capping

Setelah pemasangan residu pertama, diperoleh nilai loading resin sebesar 0,546 mmol/g. Nilai loading menunjukkan jumlah residu asam amino yang berhasil terikat pada resin dan menjadi dasar penting dalam menentukan kebutuhan asam amino serta reagen kopling pada tahap elongasi berikutnya. Nilai yang diperoleh dalam penelitian ini sebanding dengan penelitian Maharani et al. (2025), yang melaporkan loading resin sebesar 0,40–0,61 mmol/g pada sintesis analog linear bacicyclin [13]. Pada penelitian tersebut, nilai loading berada dalam kisaran yang digunakan untuk melanjutkan sintesis peptida. Hal tersebut mendukung bahwa nilai 0,546 mmol/g yang diperoleh pada sintesis YYGSR-NH₂ memberikan kapasitas resin yang memadai untuk elongasi rantai.

Nilai loading perlu dikendalikan karena kepadatan rantai peptida pada fase padat dapat memengaruhi aksesibilitas reagen terhadap gugus reaktif. Kepadatan yang terlalu tinggi dapat meningkatkan hambatan sterik dan interaksi antarrantai, sedangkan nilai yang terlalu rendah dapat mengurangi efisiensi penggunaan resin [11,20]. Proses capping pada penelitian ini dilakukan menggunakan campuran asam asetat:DIPEA:DMF (5:5:90) sebanyak 5 mL selama 5 menit dan diulangi dua kali. Capping dilakukan untuk menonaktifkan gugus reaktif yang tidak mengalami reaksi sehingga situs tersebut tidak melanjutkan elongasi pada tahap berikutnya. Dengan demikian, tahap tersebut berperan dalam membatasi terbentuknya produk dengan urutan residu yang tidak lengkap. Maharani et al. (2025) juga memasukkan capping dalam tahapan sintesis peptida, tetapi menggunakan metanol:DCM:DIPEA karena resin dan protokol sintesisnya berbeda [13]. Oleh karena itu, perbedaan komposisi larutan capping tidak menunjukkan perbedaan tujuan, melainkan penyesuaian terhadap sistem sintesis yang digunakan.

Cleavage dan perolehan senyawa kerd peptida YYGSR-NH₂

Setelah seluruh residu asam amino tersusun, peptida dilepaskan dari resin melalui proses cleavage sekaligus deproteksi global menggunakan campuran TFA/TIS/H₂O. Pada tahap ini, TFA berperan dalam pelepasan peptida dari Rink amide resin sekaligus penghilangan gugus pelindung yang bersifat *acid-labile*, sedangkan TIS dan air berfungsi sebagai scavenger terhadap spesies reaktif yang terbentuk selama proses tersebut [11,20]. Pendekatan cleavage berbasis TFA/TIS/H₂O juga digunakan pada sintesis analog peptida oleh Maharani et al. (2025) setelah seluruh siklus deproteksi dan kopling selesai [17]. Setelah cleavage, produk kasar YYGSR-NH₂ yang diperoleh pada penelitian ini mempunyai massa rata-rata 0,4739 g. Massa tersebut menggambarkan jumlah produk kasar setelah pelepasan dari resin dan penguapan pelarut, tetapi belum dapat digunakan sebagai rendemen produk murni

karena sampel belum melalui proses pemurnian dan masih dapat mengandung produk target bersama komponen lainnya.

Pemurnian menggunakan RP-HPLC semi-preparatif

Produk kasar YYGSR-NH₂ selanjutnya dimurnikan menggunakan RP-HPLC semi-preparatif. Hasil kromatografi menunjukkan beberapa puncak pada panjang gelombang 210, 254, dan 365 nm. Pada 254 nm, puncak dengan respons relatif besar terdeteksi pada RT 12,622; 13,416; 13,904; dan 18,446 menit dengan area relatif masing-masing 23,32%; 9,73%; 15,66%; dan 10,97%. Pada 365 nm, respons dominan terdeteksi pada RT 13,440 dan 14,234 menit dengan area relatif 23,94% dan 53,49%. Keberadaan beberapa puncak menunjukkan bahwa produk hasil cleavage masih merupakan campuran beberapa komponen. Hal tersebut dapat terjadi pada sintesis peptida karena selain produk target dapat terbentuk deletion sequence, produk akibat deproteksi atau kopling yang tidak sempurna, epimer, maupun produk samping yang terbentuk selama proses cleavage [11,12,15].

RP-HPLC merupakan teknik yang banyak digunakan untuk pemurnian peptida karena mampu memisahkan komponen berdasarkan perbedaan interaksi hidrofobik dengan fase diam. Namun, pemisahan peptida dapat menjadi kompleks karena target dan impuritasnya sering mempunyai struktur dan sifat fisikokimia yang sangat mirip [11]. Cheung et al. (2022) menunjukkan bahwa selektivitas pemisahan peptida sangat dipengaruhi oleh kombinasi fase diam dan fase gerak sehingga pengembangan metode perlu dilakukan secara spesifik untuk masing-masing peptida [21]. Respons yang lebih kompleks pada 210 nm dapat berkaitan dengan absorpsi ikatan peptida pada daerah UV rendah. Sementara itu, keberadaan dua residu tirosin dalam YYGSR-NH₂ memungkinkan molekul memberikan respons pada panjang gelombang yang lebih tinggi akibat keberadaan gugus aromatik. Namun, waktu retensi maupun intensitas puncak tidak dapat digunakan sendiri untuk menentukan identitas molekul. Oleh sebab itu, fraksi yang dikoleksi dari HPLC semi-preparatif dalam penelitian ini diperlakukan sebagai fraksi kandidat yang selanjutnya dikarakterisasi menggunakan HPLC analitik dan spektrometri massa.

Evaluasi profil HPLC analitik

Analisis HPLC terhadap fraksi hasil pemurnian menunjukkan dua puncak terintegrasi pada RT 1,315 menit dan 26,412 menit, dengan area relatif masing-masing sebesar 96,31% dan 3,69%. Secara numerik, puncak pertama terlihat sangat dominan. Namun, area 96,31% tersebut belum dapat dinyatakan sebagai kemurnian YYGSR-NH₂. Puncak dominan muncul pada waktu retensi yang sangat awal, sehingga komponen tersebut diduga memiliki retensi yang sangat rendah pada sistem kromatografi yang digunakan dan dapat berkaitan dengan komponen yang tidak tertahan secara optimal atau *solvent front*. Oleh karena itu, luas area relatif tidak dapat langsung diperlakukan sebagai kemurnian target sebelum identitas puncak dan kualitas pemisahannya dipastikan.

Tantangan tersebut sesuai dengan karakter analisis peptida. Petersson et al. (2023) menunjukkan bahwa impuritas yang memiliki karakter struktural sangat mirip dengan peptida utama dapat mengalami ko-elusi sehingga peak purity tidak selalu dapat dinilai hanya berdasarkan profil satu puncak [22]. Stoll et al. (2023) selanjutnya menunjukkan bahwa penyesuaian kondisi gradien dapat meningkatkan kemampuan kromatografi untuk membedakan komponen peptida yang memiliki selektivitas serupa [23]. Dengan demikian, optimasi HPLC analitik YYGSR-NH₂ masih diperlukan. Parameter yang dapat dievaluasi lebih lanjut meliputi komposisi awal fase gerak, kemiringan gradien, jenis dan proporsi pelarut organik, volume injeksi, serta konsentrasi sampel [11,21–23].

Konfirmasi identitas menggunakan ESI-QTOF-MS

Berbeda dengan HPLC analitik yang masih memerlukan optimasi, ESI-QTOF-MS memberikan bukti yang lebih spesifik mengenai identitas molekul hasil sintesis. YYGSR-NH₂ mempunyai formula molekul C₂₉H₄₁N₉O₈ dengan massa monoisotopik teoritis sekitar 643,31 Da. Oleh karena itu, ion terprotonasi [M+H]⁺ diperkirakan muncul pada sekitar m/z 644,31. Hasil eksperimen menunjukkan ion dominan pada m/z 644,3157, disertai puncak isotop pada m/z 645,3201 dan 646,3239. Kesesuaian tersebut mendukung keberadaan senyawa dengan massa molekul yang sesuai dengan YYGSR-NH₂.

Lian et al. (2021) menjelaskan bahwa spektrometri massa merupakan teknik penting dalam karakterisasi peptida sintetik karena dapat digunakan untuk mengonfirmasi massa molekuler dan membantu mengidentifikasi impuritas terkait sintesis [10]. Chrono et al. (2024) juga menekankan penggunaan spektrometri massa untuk verifikasi identitas peptida berdasarkan massa molekuler yang diperoleh [24]. Pendekatan yang sebanding diterapkan Maharani et al. (2025), di mana seluruh analog peptida yang disintesis dikarakterisasi menggunakan HR-TOF-ESI-MS dan menghasilkan ion $[M+H]^+$ yang sesuai dengan nilai teoritis masing-masing peptida [13]. Dengan demikian, data ESI-QTOF-MS penelitian ini memberikan bukti yang lebih kuat untuk mendukung identitas YYGSR-NH₂ dibandingkan penetapan berdasarkan waktu retensi HPLC semata. HPLC dan spektrometri massa pada penelitian ini karena itu harus dipandang sebagai metode yang saling melengkapi. HPLC menggambarkan profil kromatografi dan kompleksitas campuran, sedangkan ESI-QTOF-MS mendukung identifikasi berdasarkan massa molekuler [11,13,23].

Relevansi YYGSR-NH₂ sebagai *chemical starting point*

Keberhasilan sintesis dan konfirmasi identitas YYGSR-NH₂ merupakan tahap awal dalam penyediaan chemical starting point untuk pengembangan struktur pada penelitian selanjutnya. Dalam pengembangan radiofarmaka, karakterisasi kimia bahan awal merupakan tahapan penting sebelum senyawa memasuki proses derivatisasi atau radiolabeling. Identitas, kemurnian, stabilitas, dan konsistensi bahan awal akan memengaruhi proses radiokimia serta pengendalian mutu produk selanjutnya [4]. Gillings et al. (2022) menekankan pentingnya pendekatan berbasis risiko terhadap kualitas dalam produksi dan evaluasi radiofarmaka [25]. Hooijman et al. (2022) juga menunjukkan bahwa metode analitik, termasuk HPLC, mempunyai peran penting dalam evaluasi radiolabeling dan pengendalian mutu radiofarmaka terapeutik [26]. Tahapan pengembangan radiofarmaka preklinik sendiri berlangsung secara bertingkat, mulai dari desain molekuler, pemilihan radionuklida dan metode radiolabeling, karakterisasi radiokimia, sampai evaluasi biologis [27].

Peptida merupakan salah satu platform molekuler yang menarik untuk pengembangan radioligand karena dapat disintesis secara terarah dan relatif mudah dimodifikasi secara kimia [5,6,10,11]. Dalam YYGSR-NH₂, dua residu tirosin menyediakan gugus fenolik aromatik yang berpotensi menjadi titik modifikasi pada penelitian lebih lanjut. Meskipun demikian, potensi kimia tersebut tidak dapat langsung diartikan sebagai kemampuan penargetan tiroid. Penelitian ini belum melakukan radiolabeling, pengujian afinitas terhadap target biologis, internalisasi seluler, selektivitas terhadap jaringan tiroid, stabilitas radiokimia, maupun biodistribusi. Oleh karena itu, YYGSR-NH₂ pada tahap ini belum dapat dinyatakan sebagai peptida penarget tiroid ataupun radiofarmaka theranostik, melainkan sebagai bahan kimia awal yang disiapkan untuk tahapan pengembangan berikutnya. Konteks ini relevan dengan perkembangan theranostik kanker tiroid. Radioiodine tetap merupakan komponen penting dalam diagnosis dan terapi DTC, tetapi sebagian tumor dapat kehilangan kemampuan mengakumulasi radioiodine dan berkembang menjadi radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer [28]. Kondisi tersebut telah mendorong eksplorasi pendekatan pencitraan molekuler dan theranostik alternatif [29], meskipun radioiodine tetap memiliki posisi fundamental dalam tata laksana pasien yang masih memenuhi indikasi terapi [30].

Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan bahwa strategi Fmoc-SPPS menggunakan Fmoc-Rink amide resin menghasilkan produk dengan massa molekuler yang sesuai dengan YYGSR-NH₂. Nilai loading resin sebesar 0,546 mmol/g mendukung keberhasilan tahap awal perakitan rantai, sedangkan profil HPLC semi-preparatif menunjukkan bahwa produk kasar masih mengandung beberapa komponen. HPLC analitik belum dapat digunakan untuk menetapkan kemurnian produk secara definitif karena puncak dominan muncul pada waktu retensi yang sangat awal. Sebaliknya, ESI-QTOF-MS menunjukkan ion m/z 644,3157 yang sesuai dengan $[M+H]^+$ teoritis YYGSR-NH₂. Temuan tersebut mendukung keberhasilan sintesis dan konfirmasi identitas molekul YYGSR-NH₂ sebagai chemical starting point, sementara optimasi pemurnian dan metode HPLC merupakan tahapan lanjutan sebelum dilakukan modifikasi struktur dan pengembangan radiokimia.

5. KESIMPULAN

YYGSR-NH₂ yang diperoleh dapat digunakan sebagai chemical starting point untuk pengembangan struktur peptida pada tahap penelitian selanjutnya YYGSR-NH₂ berhasil disintesis menggunakan metode Fmoc-SPPS dan

dimurnikan dengan RP-HPLC semi-preparatif. Karakterisasi menggunakan RP-HPLC analitik menunjukkan dua puncak pada waktu retensi 1,315 dan 26,412 menit, sedangkan ESI-QTOF-MS menunjukkan ion dominan pada m/z 644,3157 yang sesuai dengan $[M+H]^+$ teoritis YYGSR-NH₂. Hasil tersebut mendukung keberhasilan sintesis dan konfirmasi identitas YYGSR-NH₂ sebagai chemical starting point untuk pengembangan radiofarmaka theranostik tiroid pada tahap penelitian selanjutnya..

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi Republik Indonesia melalui Program Penelitian Dosen Pemula (PDP) BIMA Tahun 2026 berdasarkan kontrak penelitian Nomor 238/C3/DT.05.00/PL-BARU/2026. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman dan Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran atas dukungan fasilitas dalam pelaksanaan sintesis, pemurnian, dan karakterisasi sampel pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Thyroid Cancer Fact Sheet, GLOBOCAN 2022. Lyon: IARC; 2024.
- [2] Roseland ME, Dewaraja YK, Wong KK. Advanced imaging and theranostics in thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2022;29(5):456–465. doi:10.1097/MED.0000000000000740.
- [3] Eilsberger F, Pfestroff A. Theranostics in Thyroid Cancer. *PET Clin.* 2021 Jul;16(3):375–382. doi: 10.1016/j.cpet.2021.03.007. PMID: 34053581.
- [4] Holik HA, Ibrahim FM, Elaine AA, Putra BD, Achmad A, Kartamihardja AHS. The chemical scaffold of theranostic radiopharmaceuticals: radionuclide, bifunctional chelator, and pharmacokinetics modifying linker. *Molecules.* 2022;27(10):3062. doi:10.3390/molecules27103062.
- [5] Nock BA, Kanellopoulos P, Joosten L, Mansi R, Maina T. Peptide radioligands in cancer theranostics: agonists and antagonists. *Pharmaceuticals.* 2023;16(5):674. doi:10.3390/ph16050674.
- [6] Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7:48. doi:10.1038/s41392-022-00904-4.
- [7] Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, Sasaki M, Kleinman HK, Yamada Y, Martin GR. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science.* 1987;238(4830):1132–1134. doi:10.1126/science.2961059.
- [8] Koliakos G, Trontzos C, Kouzi-Koliakos K, Kanellaki M, Grammaticos P. Lung carcinoma imaging using a synthetic laminin derivative radioiodinated peptide YIGSR. *J Nucl Med.* 1997;38(12):1940–1944.
- [9] Mendonça FF, Sobral DV, Durante ACR, Miranda ACC, Mejia J, Faria DP, et al. Assessment of bioactive peptides derived from laminin-111 as prospective breast cancer-targeting agents. *Amino Acids.* 2024;56(1):1. doi:10.1007/s00726-023-03379-x.
- [10] Sharma K, Sharma KK, Sharma A, Jain R. Peptide-based drug discovery: current status and recent advances. *Drug Discov Today.* 2023;28(2):103464. doi:10.1016/j.drudis.2022.103464.
- [11] Hansen PR, Oddo A. Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Methods Mol Biol.* 2024;2821:33–55. doi:10.1007/978-1-0716-3914-6_3.
- [12] Sharma N, Kukreja D, Giri T, Kumar S, Shah RP. Synthetic pharmaceutical peptides characterization by chromatography principles and method development. *J Sep Sci.* 2022;45(13):2200–2216. doi:10.1002/jssc.202101034.
- [13] Maharani R, Muhajir MI, Dirgantara JM, Rasyid H, Kusumawati Y, Kartikowati CW, Umaningrum D. Synthesis, antimicrobial activity, and in silico mechanistic study of linear bacicylin analogs. *Arabian J Chem.* 2025;18(8):3282024. doi:10.25259/AJC_328_2024.
- [14] Maharani R, Firdausi A, Mayanti T, Harneti D, Nurlelasari, Ishmayana S, et al. Total synthesis of a reversed-bacicyclin using a combination of solid- and solution-phase methods. *Indones J Chem.* 2022;22(4):1061–1069. doi:10.22146/ijc.72956.
- [15] Aluri K, Basavoju S, Rangisetty J, Pullagurla MR, Pitta BR. Synthesis of diastereomerically pure cetorelix acetate by using Fmoc solid-phase peptide synthesis strategy: a commercially viable approach. *J Pept Sci.* 2025;31:e70030. doi:10.1002/psc.70030.
- [16] Lian Z, Wang N, Tian Y, Huang L. Characterization of synthetic peptide therapeutics using liquid chromatography-mass spectrometry: challenges, solutions, pitfalls, and future perspectives. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2021;32(8):1852–1860. doi:10.1021/jasms.0c00479.
- [17] Duengo S, Muhajir MI, Hidayat AT, Musa WJA, Maharani R. Epimerisation in peptide synthesis. *Molecules.* 2023;28(24):8017. doi:10.3390/molecules28248017.
- [18] Mthembu SN, Chakraborty A, Schönleber R, Albericio F, de la Torre BG. Morpholine, a strong contender for Fmoc removal in solid-phase peptide synthesis. *J Pept Sci.* 2024;30(2):e3538. doi:10.1002/psc.3538.

- [19] Yan C, Fyfe C, Minty L, Barrington H, Jamieson C, Reid M. Computer vision as a new paradigm for monitoring of solution and solid phase peptide synthesis. *Chem Sci.* 2023;14:11872–11880. doi:10.1039/D3SC01383A.
- [20] Abdildinova A, Kurth MJ, Gong YD. Heterocycles as a peptidomimetic scaffold: solid-phase synthesis strategies. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(5):449. doi:10.3390/ph14050449.
- [21] Cheung MY, Bruce J, Euerby MR, Field JK, Petersson P. Investigation into reversed-phase chromatography peptide separation systems part V: establishment of a screening strategy for development of methods for assessment of pharmaceutical peptides' purity. *J Chromatogr A.* 2022;1668:462888. doi:10.1016/j.chroma.2022.462888.
- [22] Petersson P, Buckenmaier S, Euerby MR, Stoll DR. A strategy for assessing peak purity of pharmaceutical peptides in reversed-phase chromatography methods using two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Part I: Selection of columns and mobile phases. *J Chromatogr A.* 2023;1693:463874. doi:10.1016/j.chroma.2023.463874.
- [23] Stoll DR, Sylvester M, Euerby MR, Buckenmaier SMC, Petersson P. A strategy for assessing peak purity of pharmaceutical peptides in reversed-phase chromatography methods using two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Part II: Development of second-dimension gradient conditions. *J Chromatogr A.* 2023;1693:463873. doi:10.1016/j.chroma.2023.463873.
- [24] Chrone VG, Lorentzen A, Højrup P. Characterization of synthetic peptides by mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2024;2821:83–89. doi:10.1007/978-1-0716-3914-6_7
- [25] Gillings N, Hjelstuen O, Behe M, Decristoforo C, Elsinga PH, Ferrari V, et al. EANM guideline on quality risk management for radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2022;49(10):3353–3364. doi:10.1007/s00259-022-05738-4.
- [26] Hooijman EL, Ntiabose CM, Reuvers TGA, Nonnekens J, Aalbersberg EA, van de Merbel JRJP, et al. Radiolabeling and quality control of therapeutic radiopharmaceuticals: optimization, clinical implementation and comparison of radio-TLC/HPLC analysis, demonstrated by [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2022;7:29. doi:10.1186/s41181-022-00181-0.
- [27] Nelson BJB, Krol V, Bansal A, Andersson JD, Wuest F, Pandey MK. Aspects and prospects of preclinical theranostic radiopharmaceutical development. *Theranostics.* 2024;14(17):6446–6470. doi:10.7150/thno.100339.
- [28] Satapathy S, Bal C. Theranostic options for radioiodine-refractory differentiated thyroid carcinoma: recent advances, challenges, and road ahead. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:924841. doi:10.3389/fendo.2022.924841
- [29] Giovanella L, Deandreis D, Vrachimis A, Campenni A, Petranović Ovčariček P. Molecular imaging and theragnostics of thyroid cancers. *Cancers (Basel).* 2022;14(5):1272. doi:10.3390/cancers14051272.
- [30] Campenni A, Siracusa M, Ruggeri RM. Oldie but goldie: the fundamental role of radioiodine in the management of thyroid cancer. *J Clin Med.* 2024;13(21):6400. doi:10.3390/jcm13216400.
- [31] Umeno T, Fujihara M, Matsumoto S, Iizuka N, Usui K, Karasawa S. Quantitative and nondestructive colorimetric amine detection method for the solid-phase peptide synthesis as an alternative to the Kaiser test. *Anal Chem.* 2023;95(42):15803–15809. doi:10.1021/acs.analchem.3c03350.
- [32] Terzani F, Wang C, Rostami S, Desmet R, Snella B, Sénéchal M, et al. Protocol for protein modification using oxalyl thioester-mediated chemoselective ligation. *STAR Protoc.* 2024;5(4):103390. doi:10.1016/j.xpro.2024.103390.
- [33] Eissler S, Kley M, Bächle D, Loidl G, Meier T, Samson D. Substitution determination of Fmoc-substituted resins at different wavelengths. *J Pept Sci.* 2017;23:757–762. doi:10.1002/psc.3021.
- [34] Noki S, Lastella L, Serban S, Basso A, Orosz G, de la Torre BG, Albericio F. Triethyl phosphate (TEP)–dimethylsulfoxide (DMSO), as a green solvent mixture for solid-phase peptide synthesis (SPPS). *Green Chem Lett Rev.* 2025;18(1):2438068. doi:10.1080/17518253.2024.2438068.