

Massenspektrometrie in komplexen Matrices: was können ESI, APCI und MALDI ?

Jahrestagung Regensburg 2004

Gemeinsame Fachgruppentagung

Fachgruppen Arzneimittelkontrolle/Pharmazeutische Analytik und Klinische Pharmazie

"Analytik aus komplexen Matrices: Proteine, Biotechnik, Pharmakokinetik"



Dr. Klaus Raith
Martin-Luther-Universität Halle
Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Wolfgang-Langenbeck-Str. 4
D-06120 Halle

Ionisationsmethoden

- Ionisation in der Gasphase: EI, CI
Verdampfung der Probe notwendig
geeignet für GC/MS-Kopplung
- Ionisation aus flüssiger Phase: ESI, APCI, APPI
Verdampfung des Lösungsmittels erforderlich
Ionisation unter Atmosphärendruck (API)
geeignet für LC/MS und CE/MS-Kopplung (Online)
- Ionisation aus fester Phase
MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)
Präparation der Probe zusammen mit spezieller Matrix
geeignet für qualitative und halbquantitative
Untersuchung von Biomolekülen, bes. Proteinen und
Kohlenhydraten
i.d.R. nur Offline-Kopplung möglich

ESI: Probleme in komplexen Matrices

- Signalunterdrückung (z.B. Tenside)
- Nichtflüchtige Salze (Phosphat, Borat, Sulfat) verstopfen Probeneinlaß, verschlechtern Empfindlichkeit (auch durch Bildung neutraler Komplexe)
- Wechselwirkung mit Ionen gleicher Ladung (Common Ion Interferences), z.B. Adduktbildung, schlechtere Evaporation
- Polarität oder Flüchtigkeit des Lösungsmittels nicht optimal
- Evtl. ungünstiger pH
- Probleme beheben oder umgehen durch Probenvorbereitung, Chromatographie (LC/MS)

MALDI: Besonderheiten

- Generell weniger anfällig als ESI
- Präparation: Dried Droplet, Thin-Layer, Lsm.-frei
- Ggf. Entsalzung notwendig
- Polymere: ggf. SEC bei zu hoher Polydispersität
- Störungen im unteren Massenbereich (<500) durch Peaks der MALDI-Matrix
- PSD: Relativ ungenaue Isolation durch Timed Ion Selector (10-20 Da)
- LC/MALDI-Kopplung über Probenroboter vorteilhaft
- Quantitative und semiquantitative Ansätze

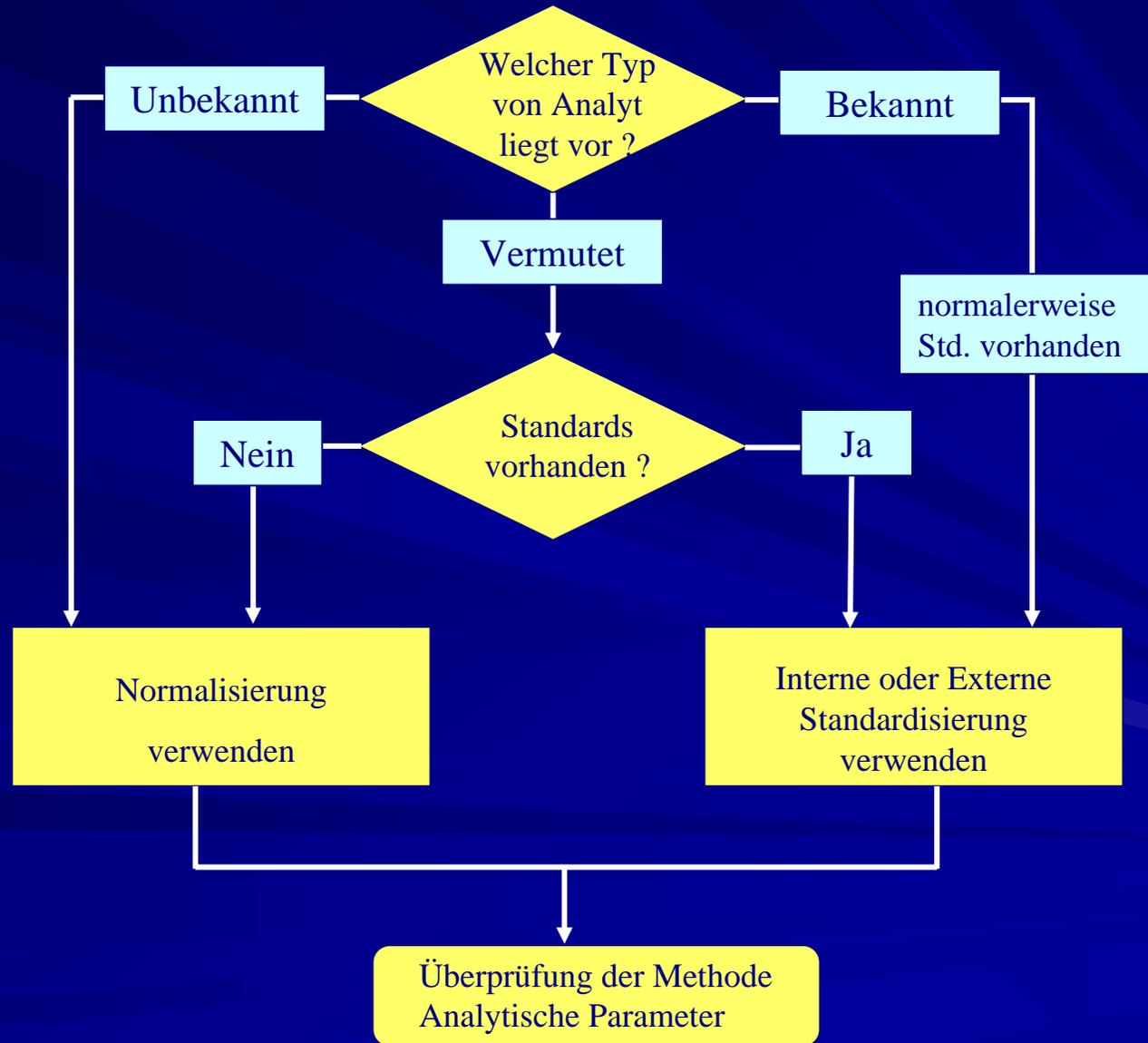
Probenvorbereitung

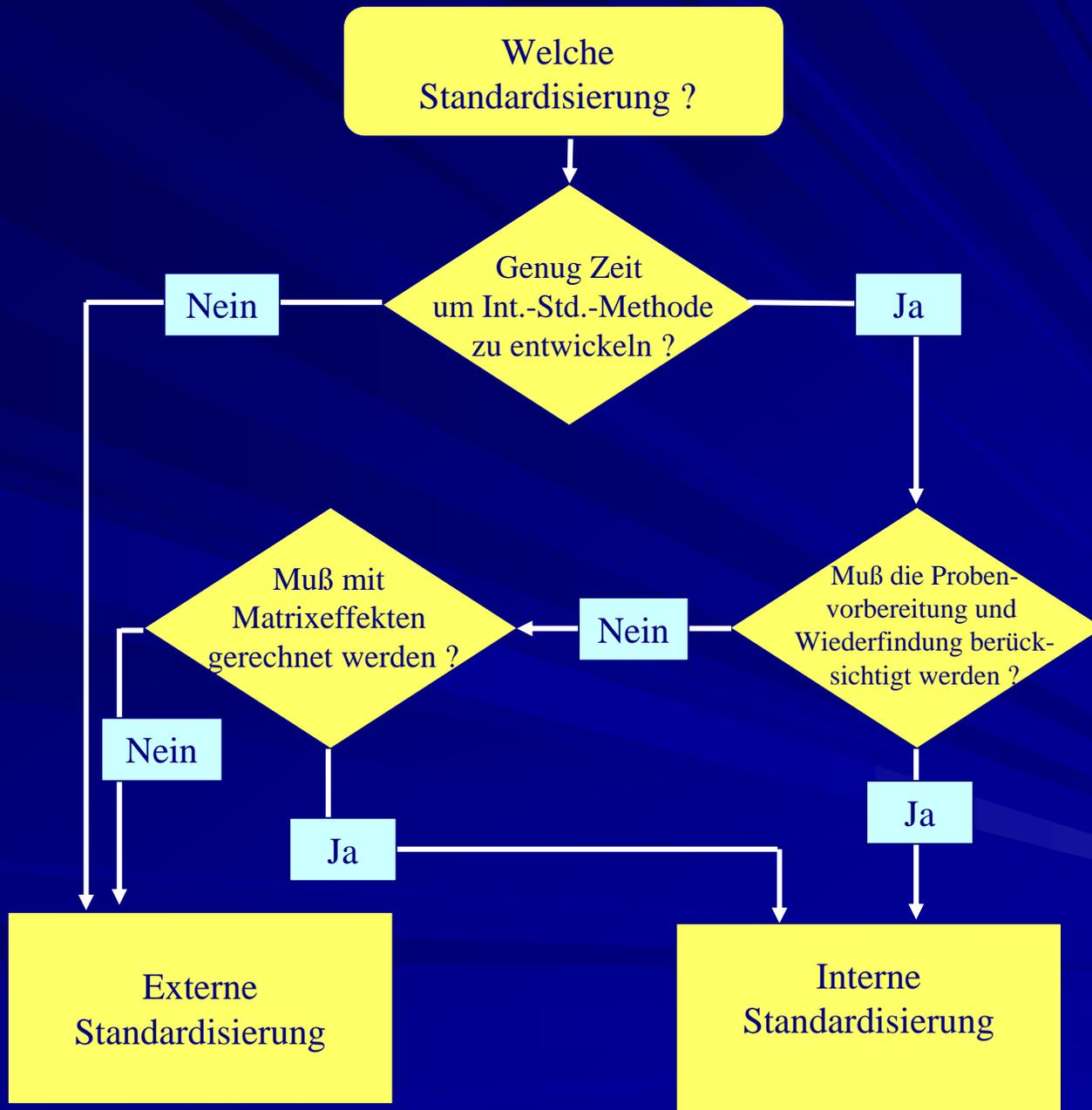
- Notwendigkeit: störende Salze, Matrixkomponenten (z.B. Plasmaproteine), zu geringe Konzentration
- API-Techniken besonders empfindlich (v.a. ESI), MALDI robuster
- Methoden:
 - Flüssig-Flüssig-Extraktion
 - Festphasenextraktion (SPE)
 - ZipTips, Nutips und Ähnliches (vereinfachte SPE)
 - Ionenaustausch
 - Affinitätsmedien
 - Entfernung von Plasmaproteinen: Ultrafiltration, ACN-Fällung
 - Säulenschaltung, LC/LC

Wie löst man Quantifizierungsprobleme mittels LC/MS ?

- Quantitative Aussagen nur durch Vergleich mit Standards möglich !
- Quantifizierung anhand der Peakflächen in einem Chromatogramm (FIA oder LC/MS), i.d.R. nicht anhand der Peakhöhe im Massenspektrum !
- Optimal: Linearer Zusammenhang
- Response: Peakfläche = RF x Konzentration
RF = Response-Faktor
- Responsefaktor muß für Standard und Probe gleich sein !
- In Praxis häufig nicht linear über gesamten Bereich → andere adäquate Fkt. verwenden, z.B. Polynom 2. Grades

Wie löst man Quantifizierungsprobleme mittels LC/MS ?





3 Arten von internen Standards:

Standardzugabe
(Analyt selbst)

- schnell und einfach
- geringe Probenanzahl
- komplexe Probe
- linearer Response
- Spurenidentifizierung (Spiking)

Chemische
Analogsubstanz

- Probenvorbereitung berücksichtigt
- hohe Genauigkeit
- genug Zeit und Geld vorhanden
- passender Standard verfügbar (!)

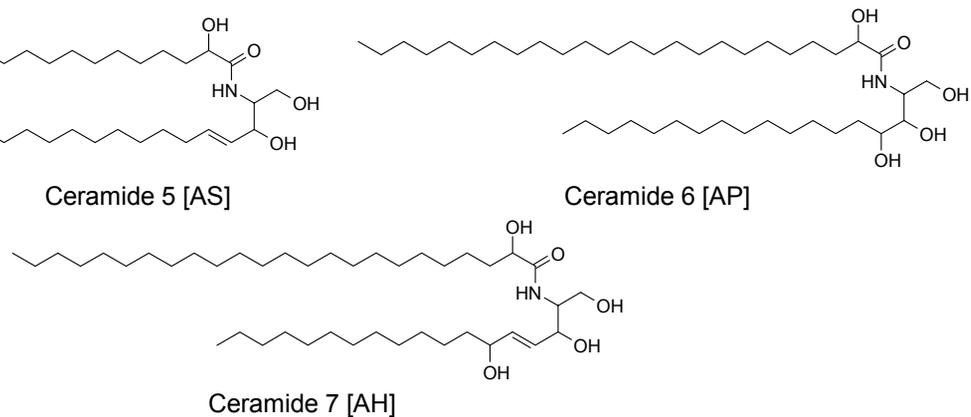
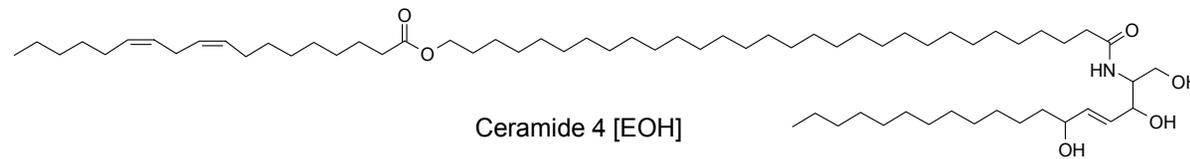
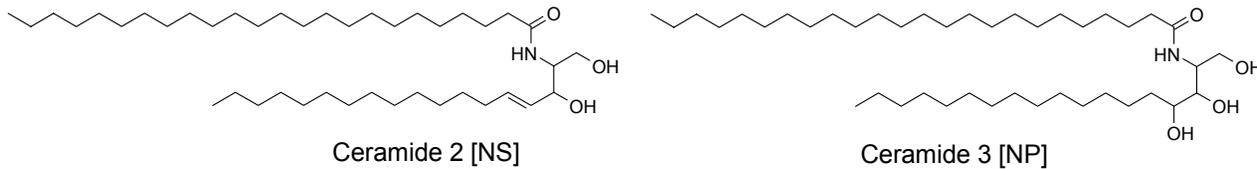
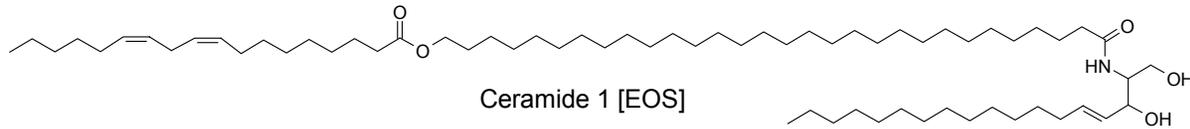
Isotopen-
markierter
Analyt

- Probenvorbereitung berücksichtigt
- hohe Genauigkeit
- hohe Meßrate erforderlich
- genug Geld vorhanden
- berücksichtigt auch Zufallsabweichungen und Nichtlinearität
- passender Standard (stabiles Isotop) verfügbar (!)

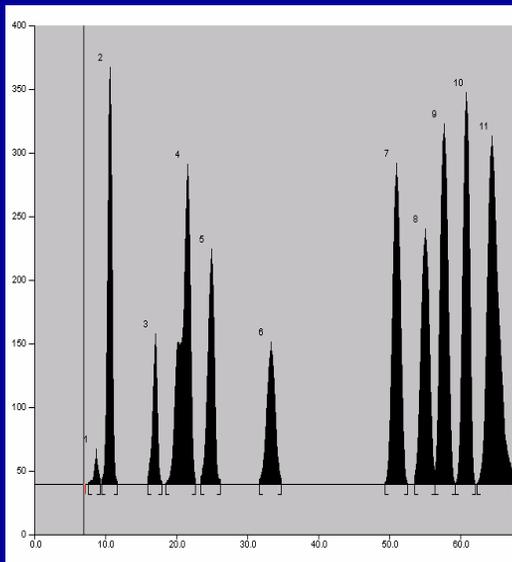
Beispiele

- Analytik von Stratum-corneum-Ceramiden
- Analytik von Cholesterooloxidationsprodukten in Nahrungsmitteln
- Analytik von Elastin
- Peptide in Nahrungsproteinhydrolysaten

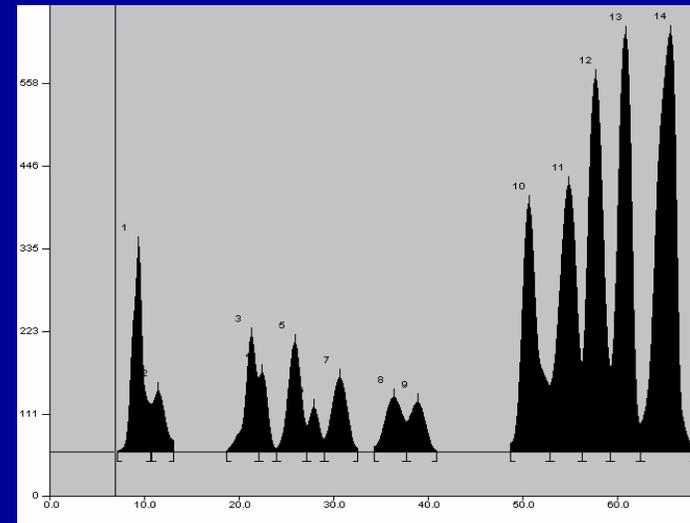
Analytik von Stratum-corneum-Ceramiden



Analytik von Stratum-corneum-Ceramiden

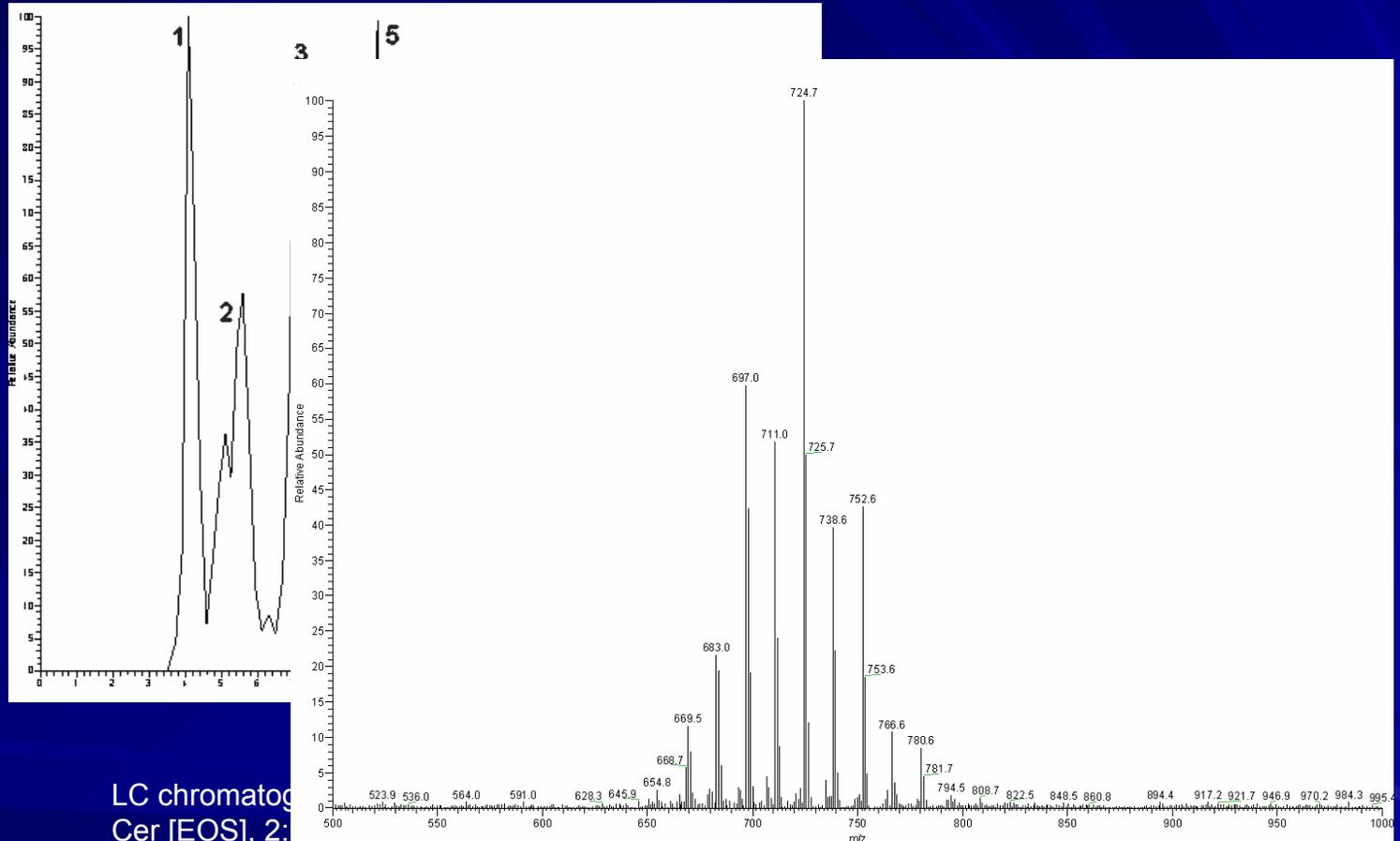


The densitometric chromatogram of the standard lipids. 1: start, 2: cholesterol-3-sulfate, 3: first peak of synthetic ceramide AP, 4: double peak of both ceramide AS and the second peak of ceramide AP, 5: ceramide NP, 6: ceramide NS, 7: cholesterol, 8: palmitic acid, 9: triolein, 10: cholesteryl oleate, 11: squalene.



The densitometric chromatogram of the standard lipids. 1: start, 2: cholesterol-3-sulfate, 3: first peak of synthetic ceramide AP, 4: double peak of both ceramide AS and the second peak of ceramide AP, 5: ceramide NP, 6: ceramide NS, 7: cholesterol, 8: palmitic acid, 9: triolein, 10: cholesteryl oleate, 11: squalene.

Analytik von Stratum-corneum-Ceramiden

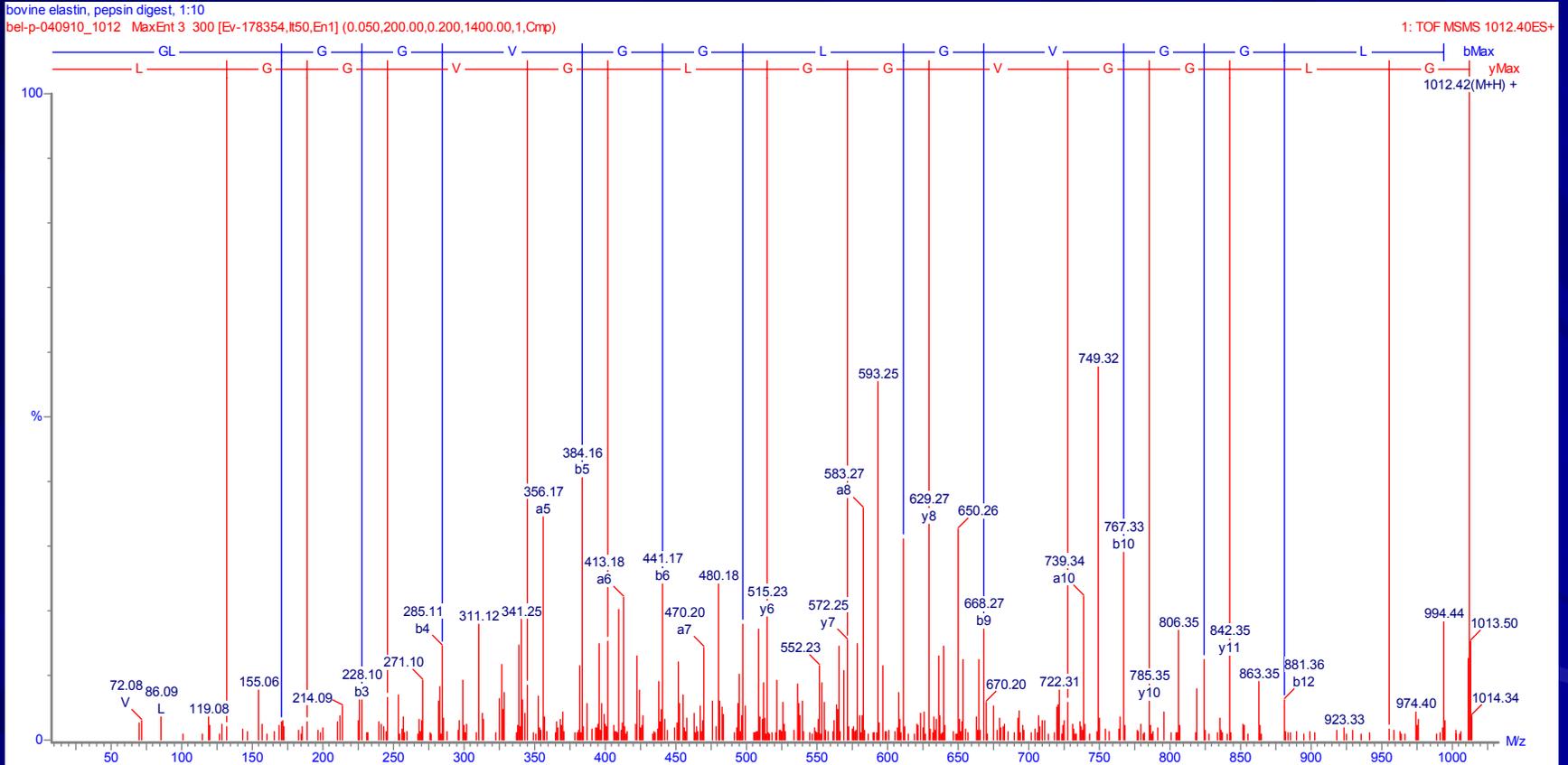


LC chromatogram of
Cer [EOS], 2:

[EOH], 5: Cer [AS], 6: Cer [AP], 7: Cer [AH].

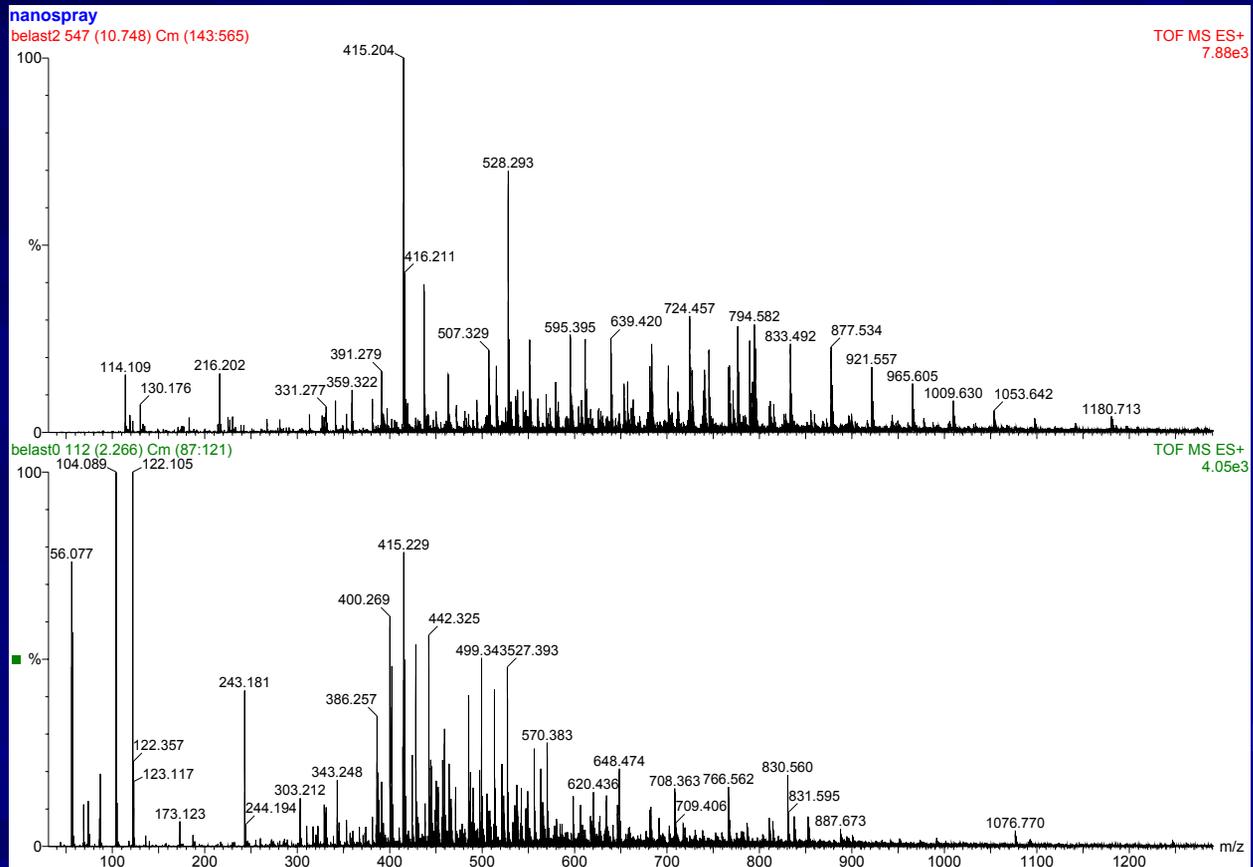
APCI-MS spectrum of ceramide [NP].

Analytik von Elastin



Peptid aus Pepsinverdau von bovinem Elastin (Q-TOF 2)

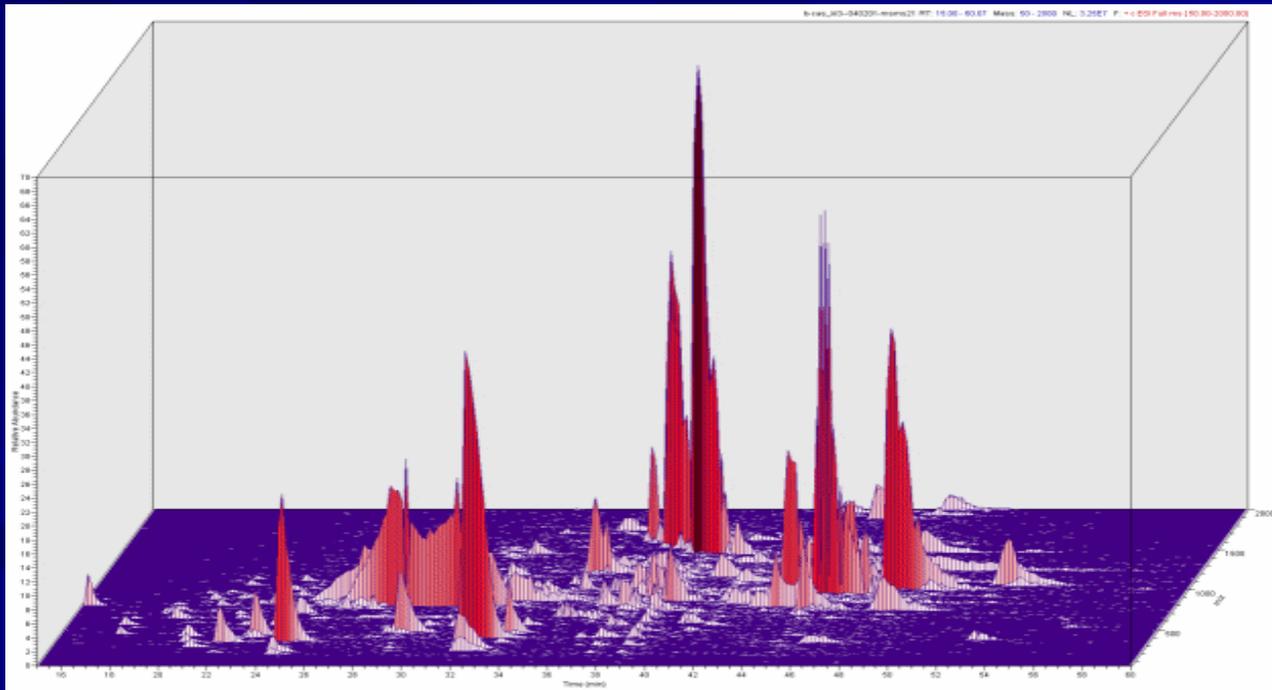
Analytik von Elastin



Verdau von bovinem Elastin mit Thermitase (oben: nach ZipTip C18)

Analytik von Peptiden in Nahrungspoteinhydrolysaten

- LC/MS: Kompromiss zwischen optimaler chromatographischer Trennung und optimaler Elektrospray-Ionisation
- binärer Gradient 5-50% ACN in 60 min, 0,1% Ameisensäure, alternativ 0,01% TFA



Chromatogramm/Spektrum einer β -Casein-Fraktion

Analytik von Peptiden in Nahrungspoteinhydrolysaten



Zuordnung einer Peptidsequenz durch Vergleich von experimentell erhaltenen Tandem-MS-Daten mit errechneten anhand einer Protein- oder Peptid-datenbank.

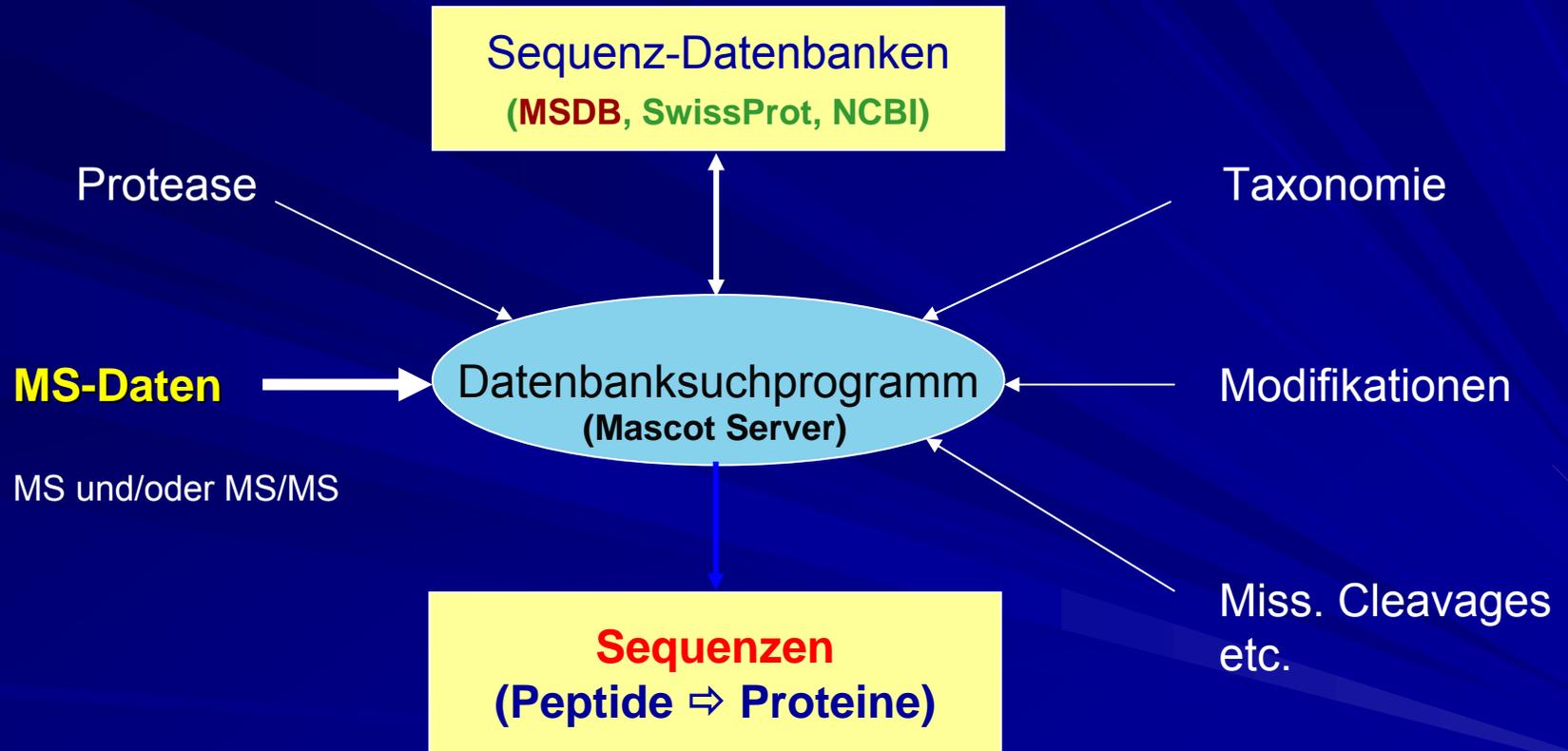
- Sequenzierung direkt aus den Tandem-MS-Spektren
- besondere technische Anforderungen an die MS (hohe Massengenauigkeit und Auflösung ...)

Analytik von Peptiden in Nahrungspoteinhydrolysaten

Peak No. ^a	Sequence identified ^b	calc. [M+H] ⁺	β -Casein residues ^c	MC ^d	MALDI-PSD	ESI-MS/MS	MSDB	Expected?
1	<SL> ^e	219.13		0		•		•
2	A<FL>L ^e	279.17	205-206	1		•		•
3	S<LTL>T	246.03	149-149					•
4	<QSL> ^e							•
5	Q<AFL>L							•
6	A<FLL>Y							•
7	L<QSW>M							•
8	S<LTLT>I							•
9	Q<AFL>Y							•
10	L<LYQE>E							•
11	A<FLLY>Q							•
12	S<QSLTL>							•
13	S<LTLTD>							•
14	F<PPQSVI							•
15	I<PPLTQT							•
16	F<LLYQE>							•
17	RELEE>							•
18	L<YQEPVI							•
19	M<FPPQSV							•
20	V<PPFLQE							•
21	G<PVRGPF							•
22	E<PFTESQ							•
23	L<GPVRGF							•
24	T<PVVVPE							•
25	E<PVLGPV							•
26	L<TDVENI							•
27	L<TDVENI							•
28	S<WMHQPH							•
29	L<YQEPVI							•
30	L<LYQEPE							•
31	F<LLYQEE							•
32	S<WMHQPH							•
33	L<QSWMHQ							•
34	L<SLSQSK							•
35	L<SLSQSK							•
36	L<SLSQSK							•
37	H<LPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQS>K	3831.01	150-183	-	•			•
38	L<VYPPGPIHNSLPPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVM>G	3863.06	74-108	10	•		•	•

Sequenzierte Peptide des peptischen Verdaus β -Caseins

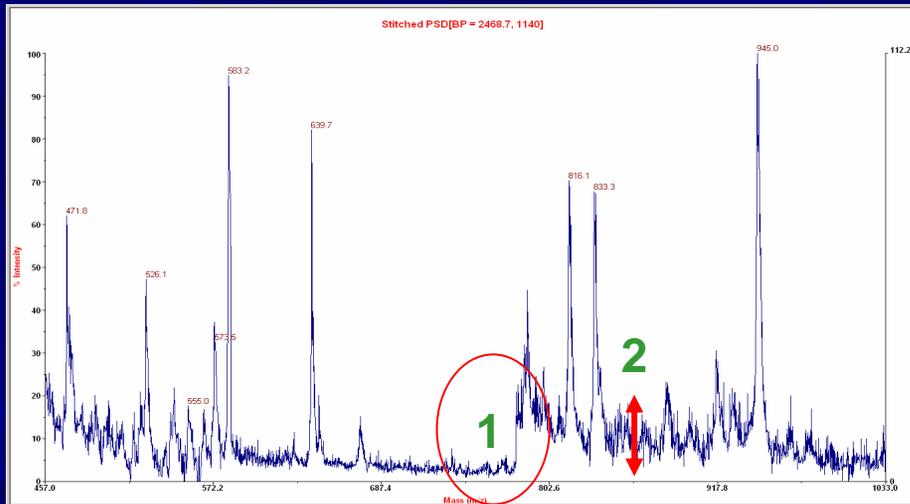
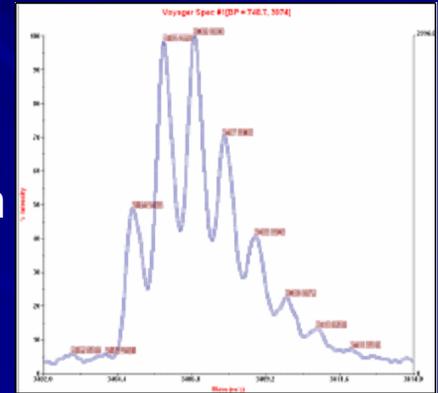
Datenbanksuche



Prozessierung

Probleme bei der Peakerkennung:

- Erkennung von Peaks geringer Intensität
- Auswahl von Peaks die dem Grundrauschen entstammen
- Auswahl der/des falschen Peaks oder aller Peaks aus einem Isotopen-Cluster



Segment aus MALDI-PSD-Spektrum

Zusätzliche Probleme in MALDI-PSD-Spektren:

- (1) Baseline-“Sprünge“
- (2) S/N klein

→ Signalpeaks schwer vom Rauschen unterscheidbar

Prozessierung

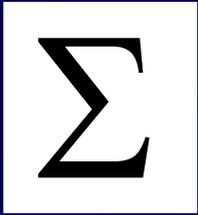


Mascot Distiller

- iterativ arbeitende Software, die bei der Detektion von Signalpeaks die durchschnittliche Isotopenverteilung von Peptiden zu Grunde legt und während der Suche einmal als Signal erkannte Peaks vom verbleibenden Spektrum subtrahiert
- auch manuell nicht zu detektierende Peaks in der Größenordnung des Signalrauschens lassen sich noch sicher erkennen
- eignet sich auch sehr gut für Peptide Mass Fingerprinting

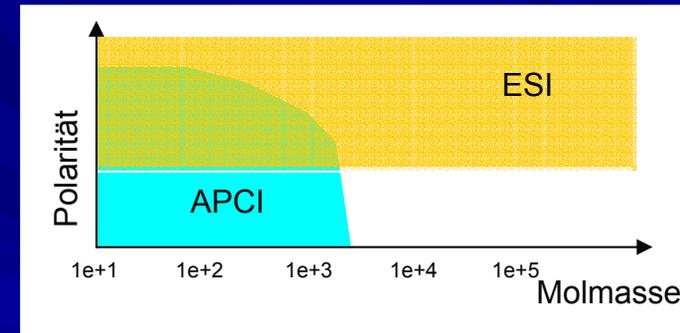
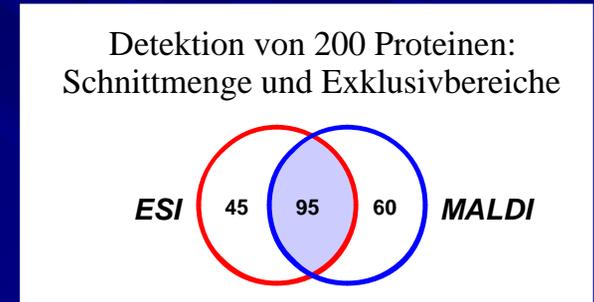


Verbesserte Identifizierungsquote



Zusammenfassung

- Verschiedene Ionisationsmethoden komplementär
- ESI (MS/MS) vs. MALDI (PSD) bei Strukturaufklärung
- ESI vs. APCI bei LC/MS
- Bei komplexen Proben Probenvorbereitung meist unerlässlich, viele Möglichkeiten
- Bei Quantifizierung interne Standardisierung wichtig



Dank

- Christian Schmelzer
- Hany Farwanah
- Christian Brenner
- Melkamu Getie
- Prof. Reinhard Neubert
- BMBF, DFG, KM Sachsen-Anhalt

<http://pharmtech.pharmazie.uni-halle.de>