Herstellung monolithischer Säulen zur LC/MS/MS Analyse von Proteinen und Arzneistoffen

Jens Sproß

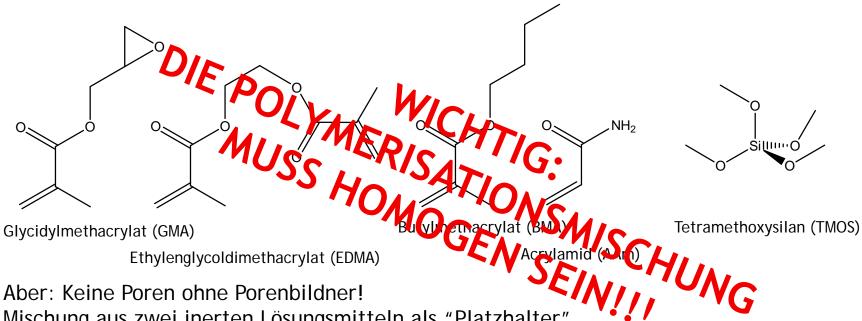
Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg





- und wie stellt man einen Monolithen her?

Ein Monolith ist ein Polymer, hergestellt aus (an)organischen Monomeren. [1,2]



Aber: Keine Poren ohne Porenbildner!

Mischung aus zwei inerten Lösungsmitteln als "Platzhalter"

Änderungen des Mischungsverhältnisses beeinflussen die bimodale Porenverteilung^[3]

Beispiele für gebräuchliche Porenbildner:

Wasser, 1,4-Butandiol, 1-Propanol, Cyclohexanol, 1-Dodecanol, PEG

Polymerisationsinitiator (z.B. AIBN)

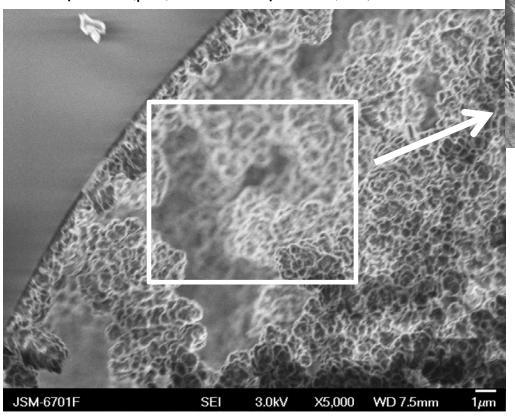
^[1] Svec, F., Frechet, J., Analytical Chemistry, 1992, 64, 820-822

^[2] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., Analytical Chemistry, 1996, 68, 3498-3501

^[3] C. Viklund, Chem. Mater., 1997, 9, 463-471

Das Ergebnis:

Bimodale Verteilung der Porengrößen: Makroporen (µm) und Mesoporen (nm)



→ Anbindung des Monolithen an die Oberfläche der Kapillare!^[4]

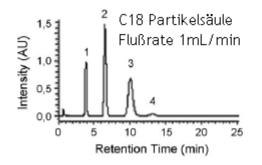
3-(TrimethoxysilyI)propylmethacrylat (γ-MAPS)

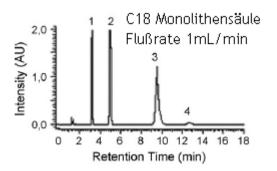
Anwendungen von Monolithen - Eine Auswahl

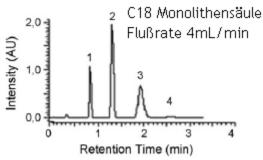
Monolithische C18-Kieselgel Säule vs. 4 µm C18-Partikelsäule [5] Vergleichbarkeit und Methodenübertragung (Partikel auf Monolith)

Methodenübertragung für Pilocarpin, Propranolol, Glibenclamid und Glimepirid ohne Änderung möglich, im Falle von Insulin minimale Änderung nötig.

Schnellere Trennung durch höhere Flußrate bei Monolithen Bessere Wiederholbarkeit der Analysen bei Verwendung der Monolithen (intra- und inter-day) Detektionslimit und Quantifizierungslimit bei Monolithen niedriger.







Phenol (1), m-Cresol (2), Insulin (3) und 21-Desamido-Insulin (4)

Anwendungen von Monolithen - Eine Auswahl

β-Secretase Reaktor^[6, 7] und Acetylcholinesterase Reaktor (AChE-IMER)^[8]

Immobilisierung auf Methacrylat-Monolith

Vorteile:

- → On-Line Untersuchung von (potentiellen) Inhibitoren
- → Bestimmung von IC₅₀-Werten
- → Automatisiertes Screening
- → pseudo-irreversible Inhibitoren können schneller untersucht werden
- → Erhöhte Lebensdauer des Enzyms (Monate)

Nachteile:

- → Vor allem bei definierten Wirkstoffen anwendbar
- → Keine komplexen Mischungen

Durch Kopplung mit massenspektrometrischen Analysemethoden können diese Probleme umgangen werden.

[8] M. Bartolini et al., Journal of Chromatography A, 2007, 1144, 102-110

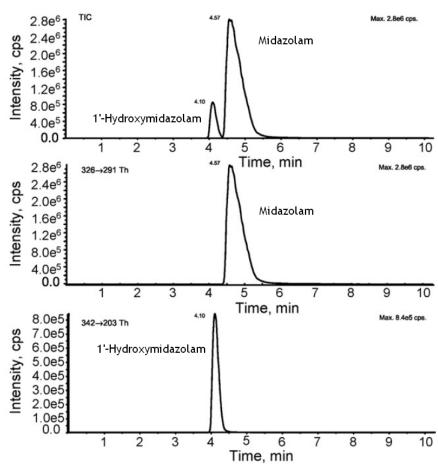
Anwendungen von Monolithen - Eine Auswahl

Immobilisierung von Cytochrom P450-Enzymen auf einem Methacrylat-Monolithen für Phase I-Metabolismusuntersuchungen^[9]

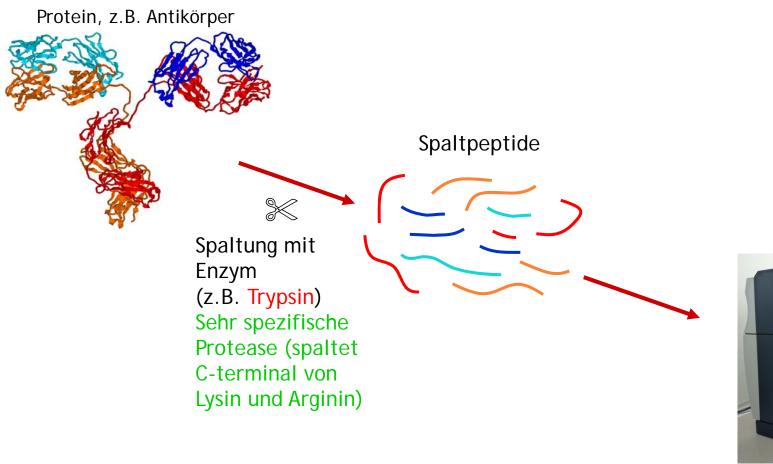
- CYP3A4 RECO (Rekonstituiertes System)
- CYP2D6 RECO

On-Line-Metabolisierung von Wirkstoffen und Analyse mit ESI-MS/MS

- → Immobilisierung kleinster Mengen möglich (pmol)
- → u. a. Midazolam metabolisiert
- → längere Lebensdauer der Enzyme (in Lösung wenige Minuten / Monolith mehrere Stunden)



Wieso ein monolithischer Trypsin-Reaktor?





Massenspektrometrie

Herstellung des monolithischen Trypsin-Reaktors

Zusammensetzung der Monolith-Mischung (wt%)[10]:

Glycidylmethacrylat (GMA) 9
Acrylamid (AAm) 6
Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA) 15

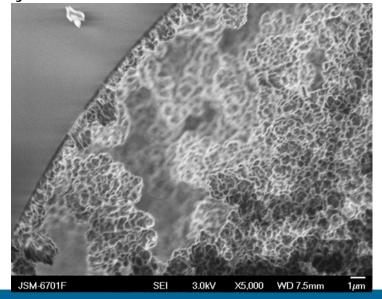
Cyclohexanol 59.5

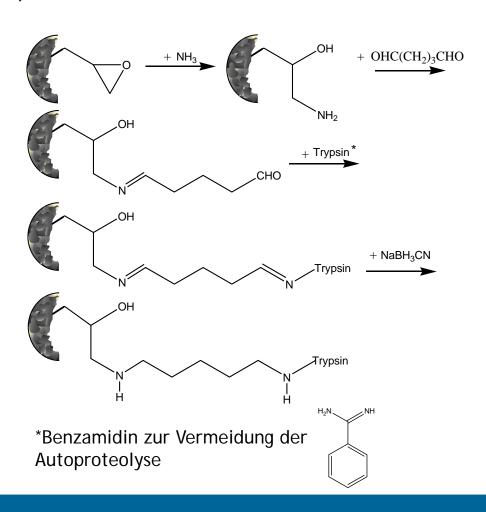
1-Dodecanol 10.5

Initiator: AIBN (0.3 wt%)

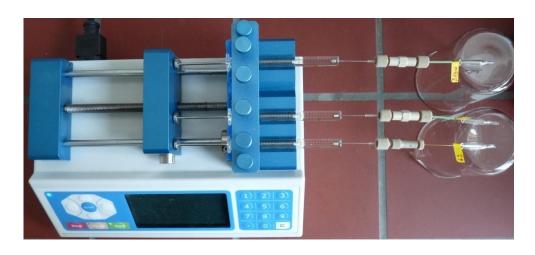
In 100 µm ID Kapillaren bei 55°C für 16h

polymerisieren





Testen des monolithischen Trypsin-Reaktors



Spritzenpumpe Fusion400 mit drei Trypsin-Reaktoren (Länge 7 cm).

Flußraten [nL/min]: 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 600.

Modelsubstrat: $N\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin-Ethylester (BAEE)

NH NH

Trennung von BAEE und des Spaltprodukts durch

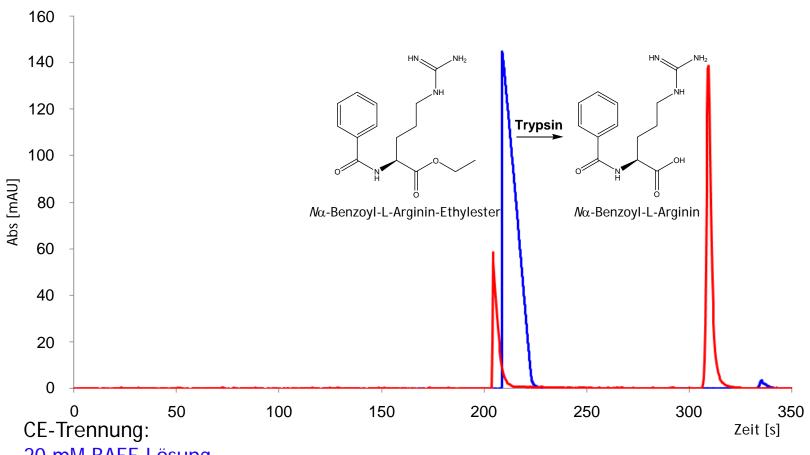
Kapillarelektrophorese (CE). Kapillare: 75 cm, 75 µm ID

Spannung: 21 kV

Puffer: 50 mM TRIS (pH 7,5)

Detektor: UV (253 nm)

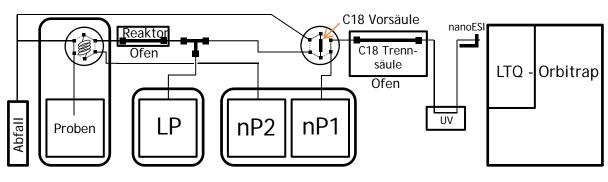
Testen des monolithischen Trypsin-Reaktors



20 mM BAEE Lösung

20 mM BAEE Lösung nach der Spaltung (Flußrate: 300 nL/min, Reaktionszeit 77 s). Aktivtät des immobilisierten Trypsins entspricht 480 µg Trypsin *in Lösung*.

On-line-Spaltung von Proteinen



LP - Ladepumpe

nP - Nanopumpe

UV - UV-Detektor

Ultimate Dual Gradient nano-HPLC und LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer mit nano-ESI Quelle Parameter^[11]:

Flußrate 300 nL/min (5% ACN, pH 8)

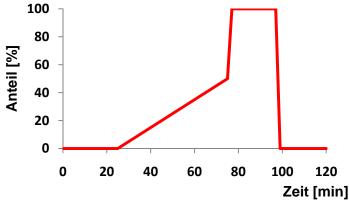
Länge Trypsin-Reaktor: 21 cm Flußrate Ladepumpe: 15 µL/min

Trennung (C18-Partikelsäule, 3 µm):

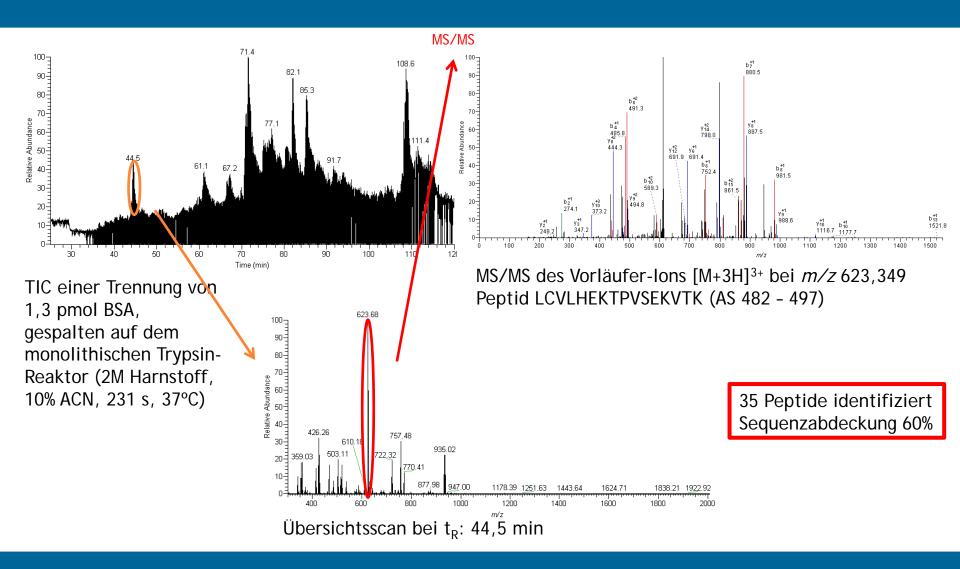
Flußrate 300 nL/min

Laufmittel A: 5% ACN; 0.1% FA Laufmittel B: 80% ACN; 0.1% FA.

Ofen-Temperatur: 37°C



On-line-Spaltung von BSA

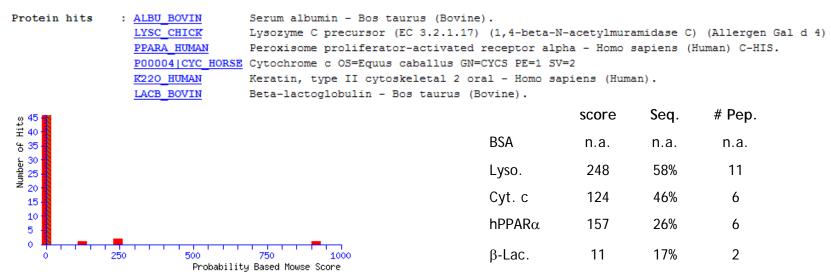


Spaltung einer 'komplexen' Proteinmischung

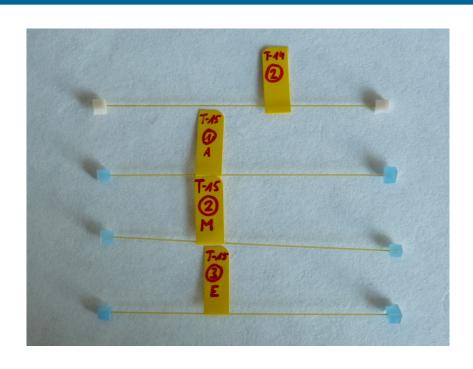
Lysozym, Cytochrom C, hPPAR $\alpha^{[4]}$ und β -Lactoglobulin (je 5 nM) wurden in Gegenwart eines 1000-fachen molaren Überschußes von BSA (5 μ M) mit dem monolithischen Trypsin-Reaktor gespalten (2 M Harnstoff, 10% ACN und 0.1 M BIC, 300 nL/min, 37°C, 21 cm) und anschließend mit *off-line* nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS analysiert.

Alle im Unterschuß vorliegenden Proteine wurden identifiziert.

(MATRIX) Mascot Search Results



Und was kostet ein monolithischer Trypsin-Reaktor?



Produktionskosten für einen monolithischen Trypsin-Reaktor (Länge 7 cm): 1,67 €

Zum Vergleich:

2 µg Trypsin (sequencing grade, Roche): 1,43 €

Substanz	Menge	Kosten [€]
Vorbehandlung		
Kapillare	30 cm	3,66
1M KOH	10 mL	0,05
γ-MAPS	10 μL	0,02
Monolith		
GMA	84 µL	0,02
EDMA	143 µL	0,03
AAm	60 mg	0,01
Cyclohexanol	595 mg	<0,01
1-Dodecanol	105 mg	0,02
AIBN	3 mg	<0,01
Spritze + Nadel	1x	0,56
Immobilisierung		
ACN	3 mL	0,22
konz. NH ₃	1 mL	0,02
Wasser	10 mL	0,20
Glutardialdehyd	1 mL	0,04
Salze + Benzamidin	x mg	0,10
Trypsin	625 µg	0,03
NaBH ₃ CN	5 mg	0,02
	Summe:	5,00€

Zusammenfassung

- Aufgrund der bimodalen Porenstruktur weisen Monolithe einen hohen Massentransfer auf
- Auch bei hohen Flußraten ist die Effizienz der Monolithen hoch
- Hohe Stabilität der Monolithen auch bei extremen pH-Werten
- Vielzahl an Anwendung durch vielfältige Derivatisierung der Monolithen
- Immobilisierte Enzyme haben eine h\u00f6here Lebensdauer als in L\u00f6sung → Stabilisierung
- Monolithische Säulen mit immobilisierten Proteinen können über mehrere Wochen oder sogar Monate verwendet werden
- Auch aus Proteinmischungen können alle Proteine identifiziert werden (Trypsin-Reaktor)
- Die Herstellung ist preisgünstig

Dank an...

Prof. Andrea Sinz

Dr. C. Ihling für Unterstützung mit LC und MS

B. Brandt und S. Kniesa für Unterstützung bei den Experimenten

Dr. H. Rüttinger für Unterstützung bei der CE Den Mitgliedern der AG Sinz für stetige Diskussion SEM-Bilder: A. Wolfsteller vom MPI für Mikrostrukturphysik, Halle Den Geldgebern







© http://www.golden-eyes.de