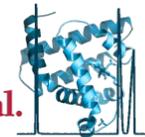




Technische
Universität
Braunschweig



Wätzig et al.
Institut für Medizinische und
Pharmazeutische Chemie



Continuous Improvement in Pharmazeutischer Analytik: schneller, präziser, selektiver

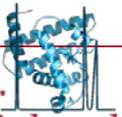
Sabine Redweik¹, Claudia Cianciulli¹, Thomas Hahne¹, Hassan Al Hazmi¹, Xi Deng¹, Yuanhong Xu^{1,2},
Hermann Wätzig^{1,*}

¹Institute of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, University of Braunschweig

²Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 5625 Renmin Street, Changchun, Jilin 130022, China

Correspondence: h.waetzig@tu-braunschweig.de

Continuous Improvement



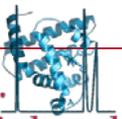
Schneller, präziser, selektiver



Geschwindigkeit: (Brutto-)Analysenzeit

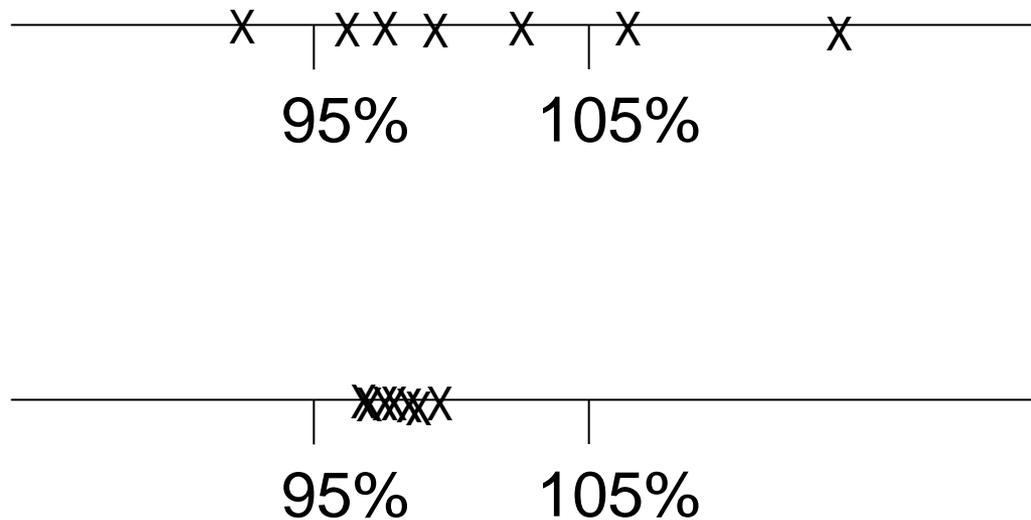
Präzision: RSD%

Selektivität: Peakzahl, Bandenzahl o.ä.



Warum ist Präzision so wichtig?

Product Quality Control (QC)



Schneller, präziser, selektiver



Geschwindigkeit: (Brutto-)Analysenzeit

Präzision: RSD%

Selektivität: Peakzahl, Bandenzahl o.ä.

NIR, MS: schnell und selektiv!

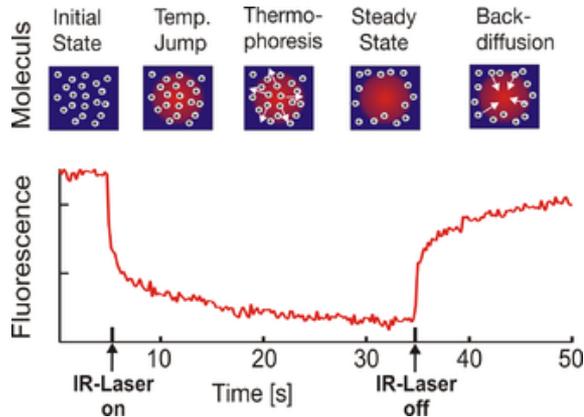
NMR: schnell, selektiv und präzise!

CE, LC

CE: CGE, ACE: recht schnell, präzise, recht selektiv

u.v.a.: ESR, MMM, Raman, Thermophorese+, ...

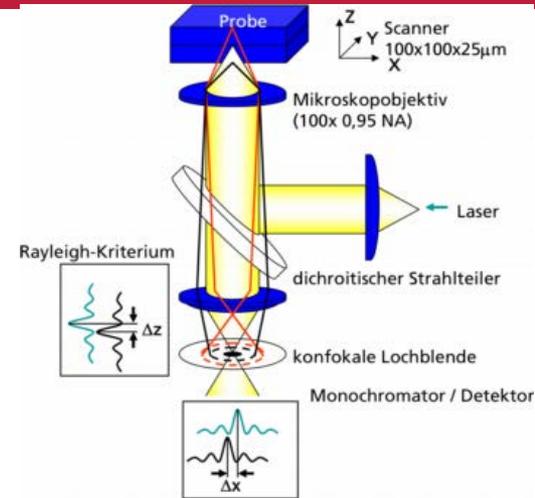
Continuous Improvement



<http://de.wikipedia.org/wiki/Thermophorese>

„Use of thermophoresis for protein characterization and formulation“

A. Besheer

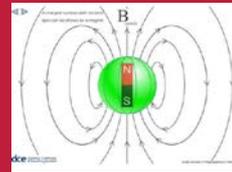


<http://www-alt.igb.fraunhofer.de/www/gf/grenzflmem/oa/analytik-anlagen/dt/AFM-Raman.html>

"Control strategy for an active coating process based on systematic process development (DoE) and in-line Raman spectroscopy (PAT)"

Adrian Funke

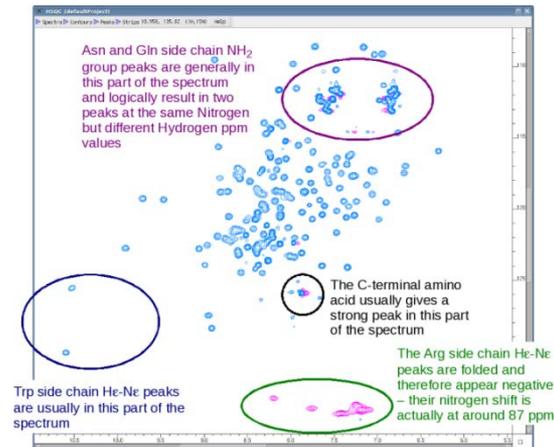
NMR



Torbjörn Arvidsson, Läkemedelsverket, Swedish Medical Products Agency, Uppsala
“Strategy and experience in testing of suspected counterfeit medicines at the Swedish OMCL using NMR and LC-MS-TOF”

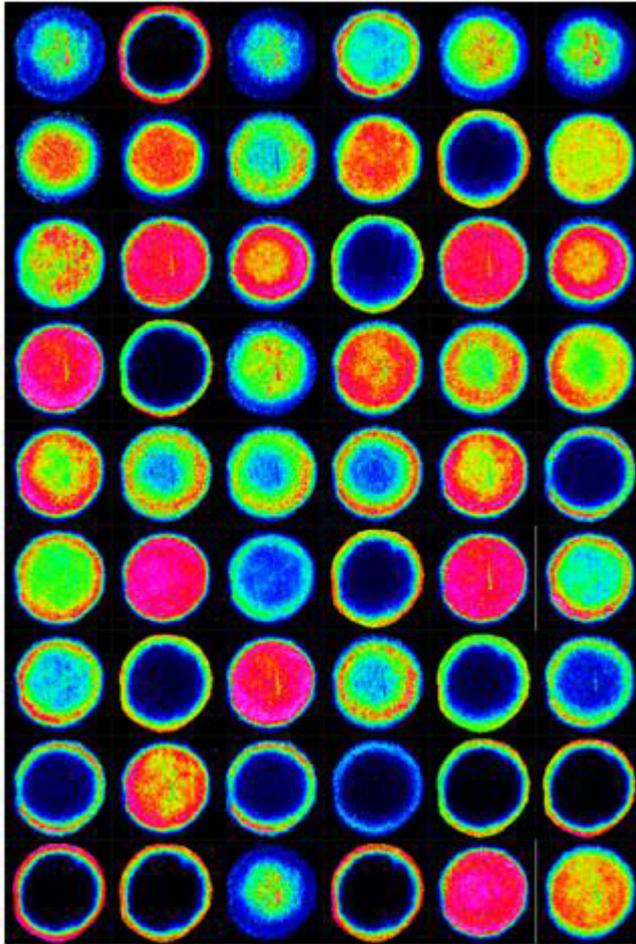
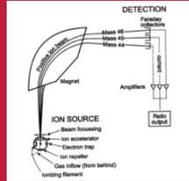


„Selektive Markierungsstrategien in der NMR-Spektroskopie von Proteinen: Neue Impulse für die Wirkstoffforschung“
„NMR Spektroskopie von hochmolekularen Proteinkomplexen“
Christiane Ritter



<http://www.bruker-biospin.com/td-nmr.html>

<http://www.protein-nmr.org.uk/spectra.html>

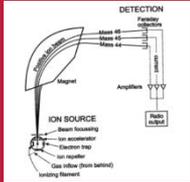


Cover from Investigative Ophthalmology and Visual Science, September 2009, showing an array of human lens crystallin images acquired by MALDI imaging mass spectrometry.

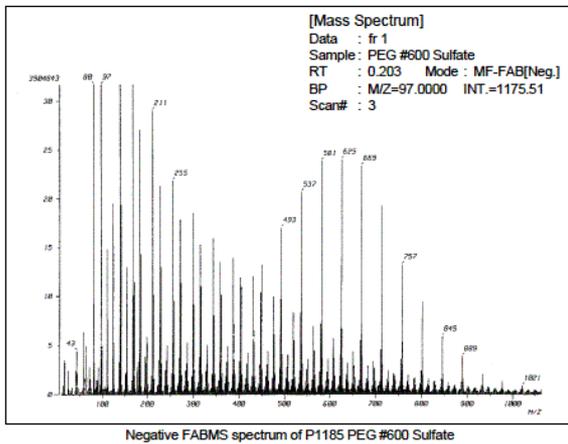
<http://www.mc.vanderbilt.edu/root/vumc.php?site=msrcscheylab&doc=31160>

Vortrag Dr. M. Liebeke

MS



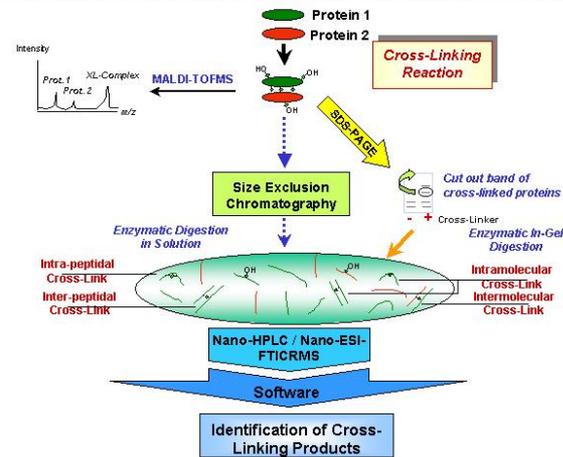
Andrea Heinz, MLU Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie
 „Charakterisierung von Quervernetzungen des Matrixproteins Elastin mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie und bioinformatischen Methoden“



http://www.tcichemicals.com/eshop/en/us/category_in dex/02781/

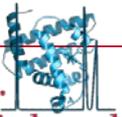
„Untersuchung von Proteinen und Metaboliten - Was können moderne Massenspektrometer leisten?“
Andrea Sinz

Analytical Strategy: Intermolecular Cross-Linking

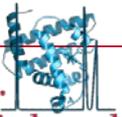


<http://agsinz.pharmazie.uni-halle.de/research.html>

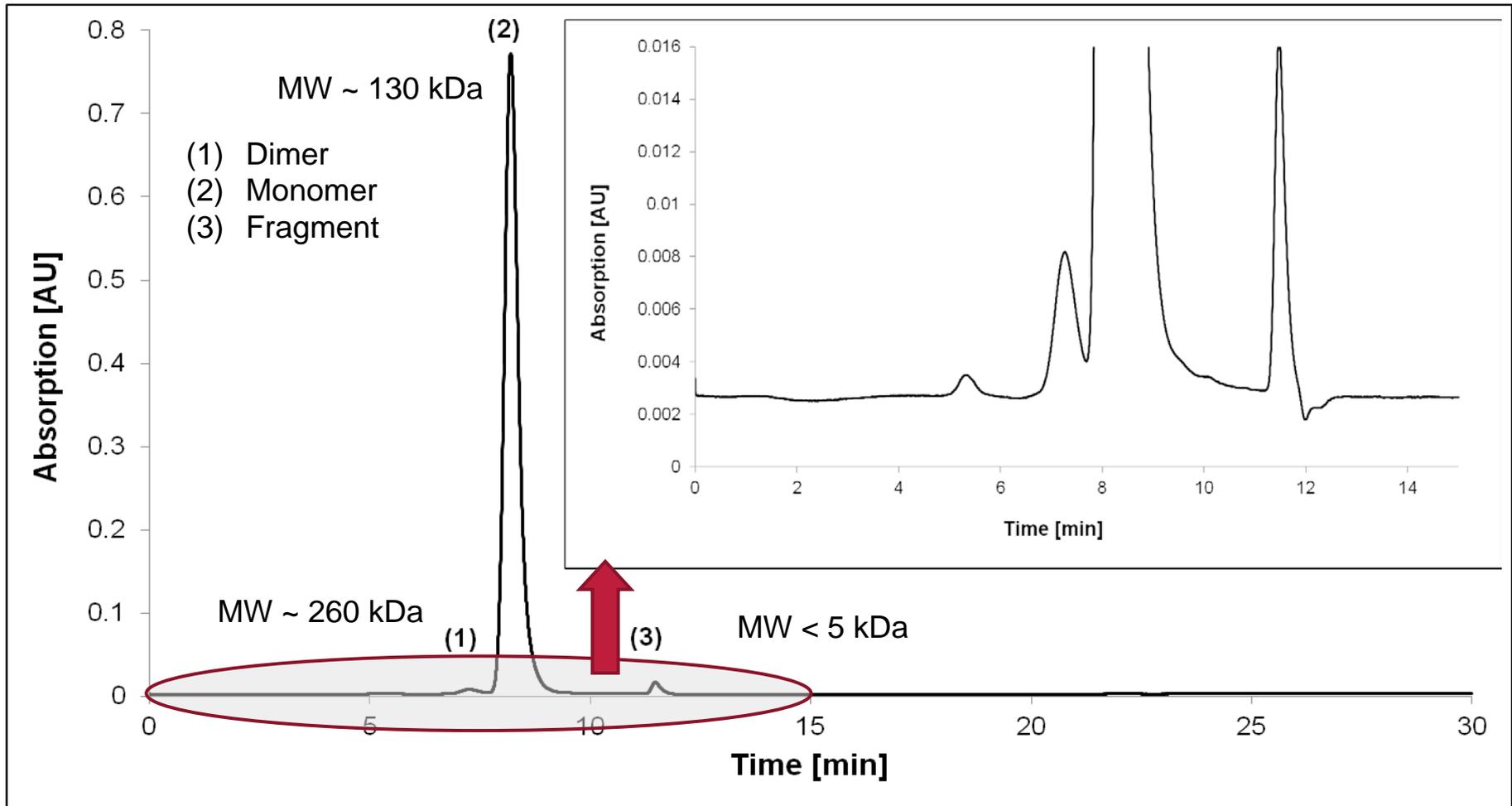
Präzision in der Bioanalytik?



Präzision in der Bioanalytik! LC!



Größenausschlusschromatographie (SEC) eines IgG Antikörpers



Methode nach Phenomenex BioSep Product manual, application: IgG aggregates

Größenausschlusschromatographie (SEC) eines monoklonalen Antikörpers

Peak	Day-to-day precision t_R (RSD % n=60)	Repeatability area _{pooled} (RSD % n=20)	Day-to-day precision area (RSD % n=60)
(1) Dimer	0.201	1.77	2.49
(2) Monomer	0.061	0.663	2.54
(3) Fragment	0.147	3.02	22.7
all area		0.644	1.95



Sandra Grotefend



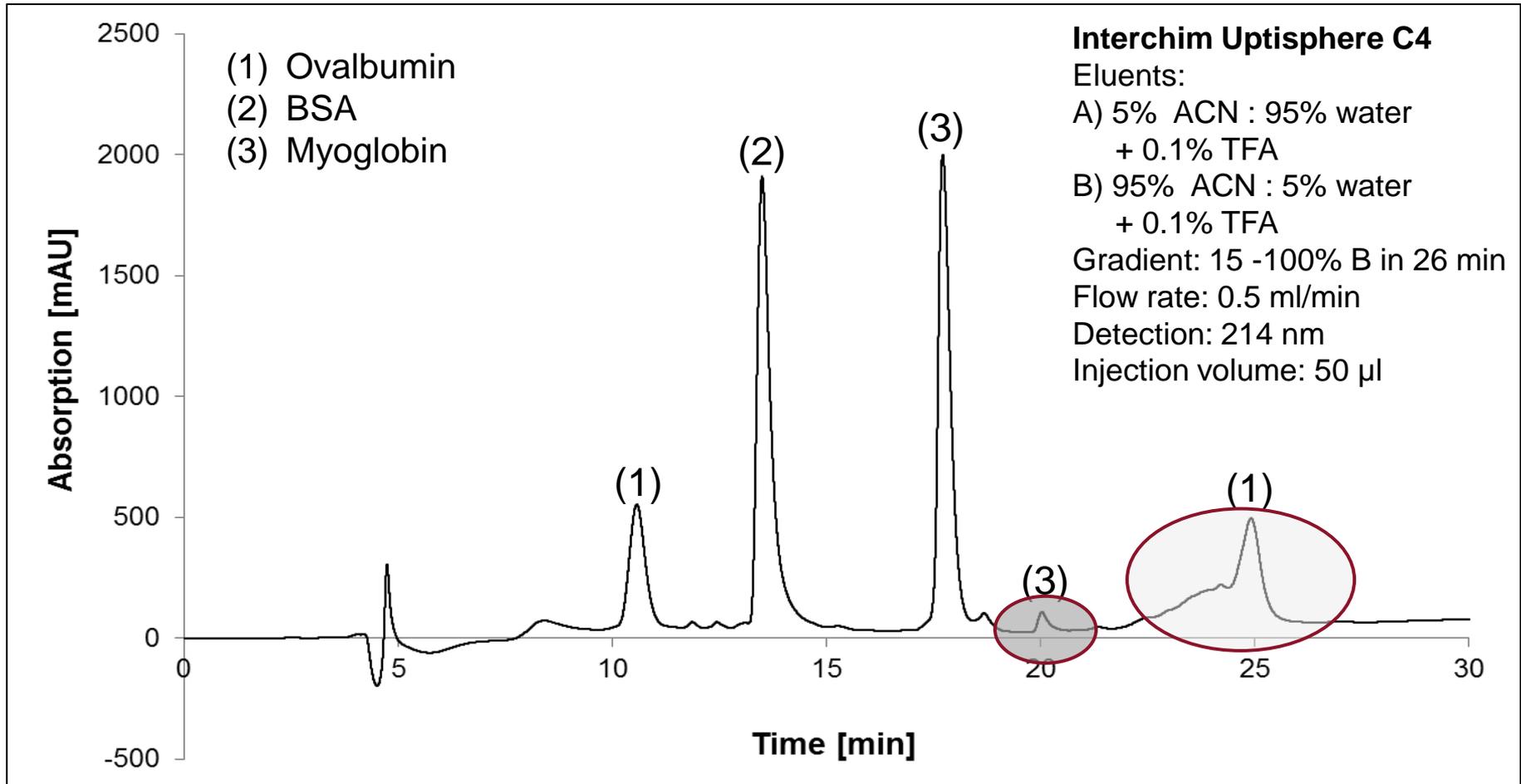
Stefanie Wroblewitz



Dr. Lukas Kaminski

S. Grotefend et al.,
 J. Pharm. Biomed.
 Anal.
 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.024>

RP-HPLC



Modified according to: Bradshaw, T.P., Phenomenex; Introduction to Protein and Peptide HPLC (1998) 31-32

Präzision in der LC! Besonders in der Bioanalytik!

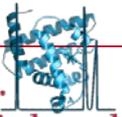
Dr. Agata Blazewicz, National Medicines Institute of
Poland, Warschau

Dr. Christian Langfermann, AMI Nord GmbH

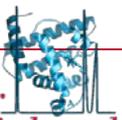
Prof. Dr. M. Lämmerhofer, Uni Tübingen



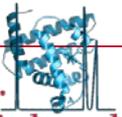
Präzision in der Bioanalytik! CE!



Kapillarelektrophorese (CE)!



Kapillarelektrophorese (CE)!



Kapillarelektrophorese (CE)!

“Chromatographic Application on Calixarene columns Part I: A stability indicating HPLC-method for Determination of Celecoxib in Tablet formulation”, Hashem, H., Tründelberg, C., Jira, Th., *Chromatographia* **71**, 91 – 94 (2010)

“Characterization of calixarene-bonded stationary phases”, Schneider, C., Menyes, U., Jira, Th., *J.Sep.Sci.* **33**, 2930 – 2942 (2010)

“Selectivity of calixarene-bonded silica phases in HPLC: Description of special characteristics with a multiple term linear equation at different methanol concentrations”, Schneider, C., Jira, Th., *J.Sep.Sci.* **33**, 2943 – 55 (2010)

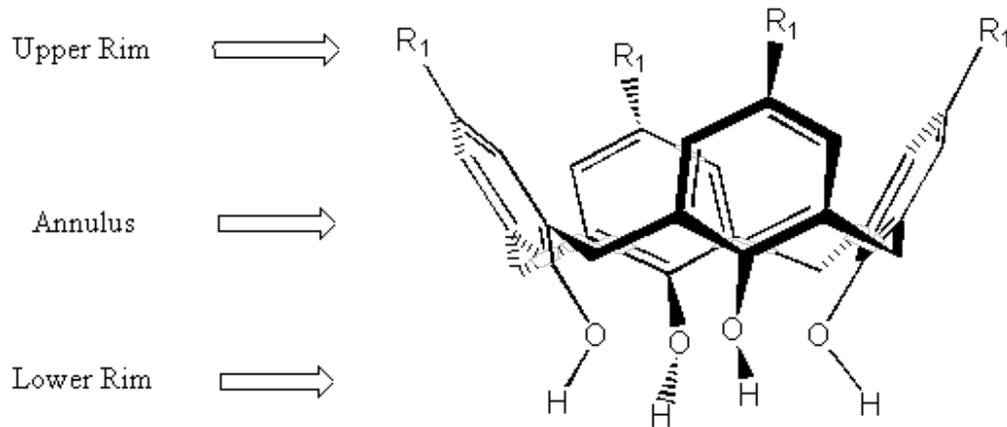
“Description of retention characteristics of calixarene-bonded stationary phases in dependence the methanol content in the mobile phase”, Schneider, C., Jira, Th., *J. Chromatogr.*, **A 1216**, 6285 – 6294, (2009)

“ “Selectivity of calixarene-bonded silica-phases in HPLC: Description of special characteristics with a multiple term linear equation at two different pH-values”, Schneider, C., Meyer, R. Jira, Th., *Anal. Sci.*, **24**, 1157 - 1164, (2008)

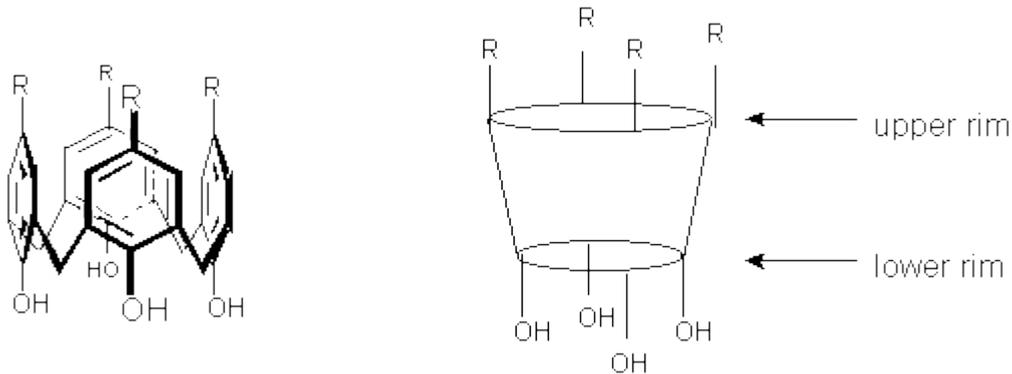
“The effect of achiral calixarenes on chiral separations using cyclodextrin as chiral selector and applying combination of partial and complete filling techniques in capillary electrophoresis”, Hashem, H., Kinzig, M., Jira, Th., *Pharmazie*, **63**, 256 - 262, (2008)

“Considerations of the behaviour of C18-chains and calixarenes and their application for determination of stationary phase volume in RP-chromatography”, Meyer, R., Schneider, C., Jira, Th., *Pharmazie*, **63**, 619 – 627, (2008)

Kapillarelektrophorese (CE)!

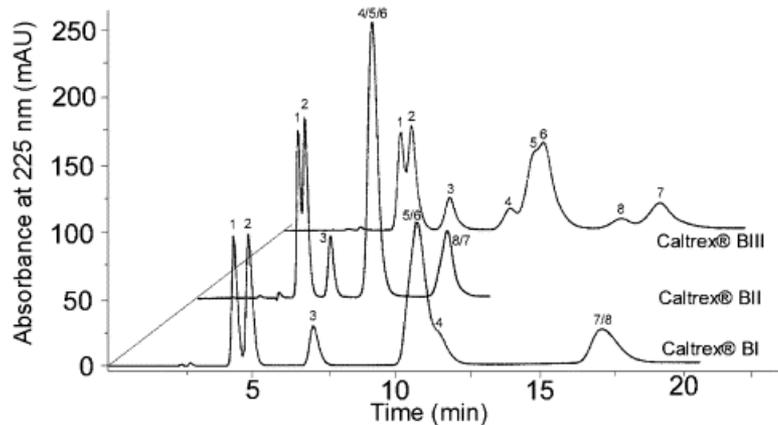
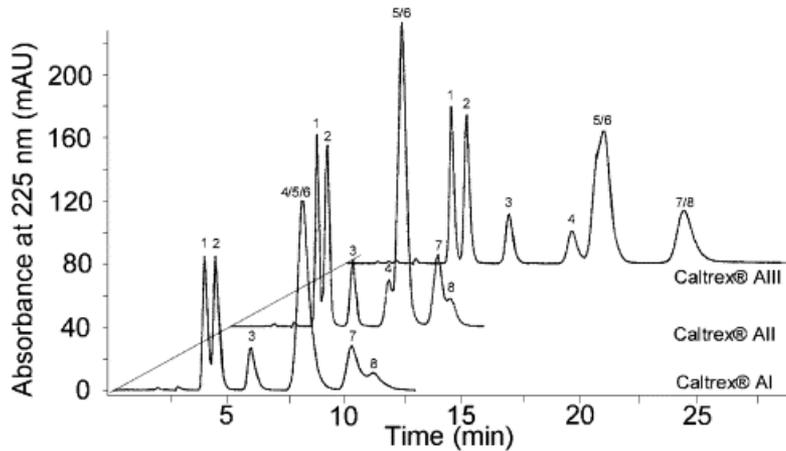


www.dcu.ie/chemistry/biographies/kieran_nolan.shtml



<http://www.dcu.ie/~best/analch.htm>

CE => LC (!)

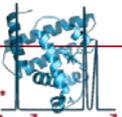


Torsten Sokoließ, Ulf Menyes, Ulrich Roth, Thomas Jira, Journal of Chromatography A, 898, 2000, 35–52.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730000875X>

Fig. 1: Separation of Phenols

Kapillargelelektrophorese (CGE)



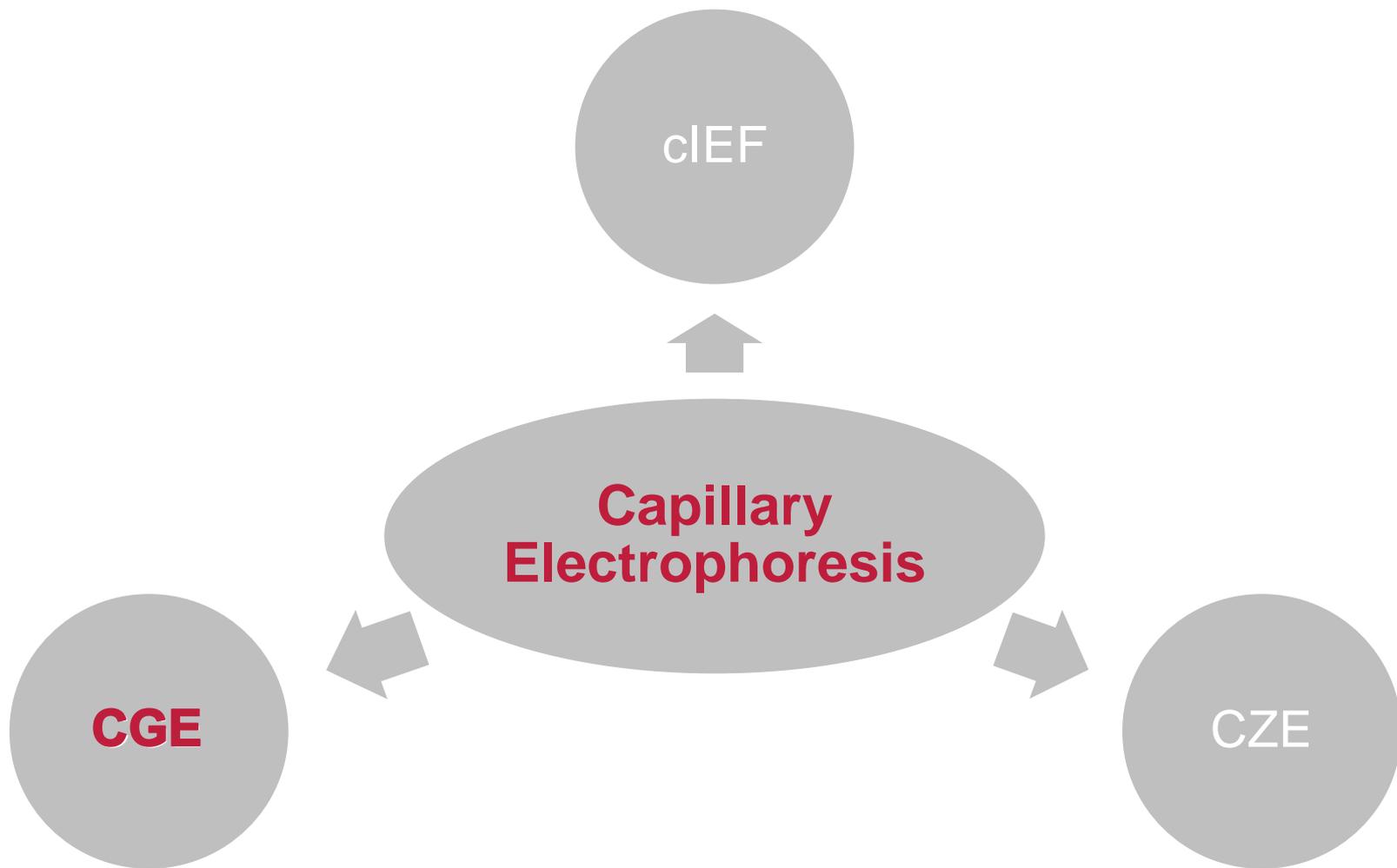
Quantitative Proteinanalytik

Capillary
Electrophoresis

Protein
Quantitation



Quantitative Proteinanalytik

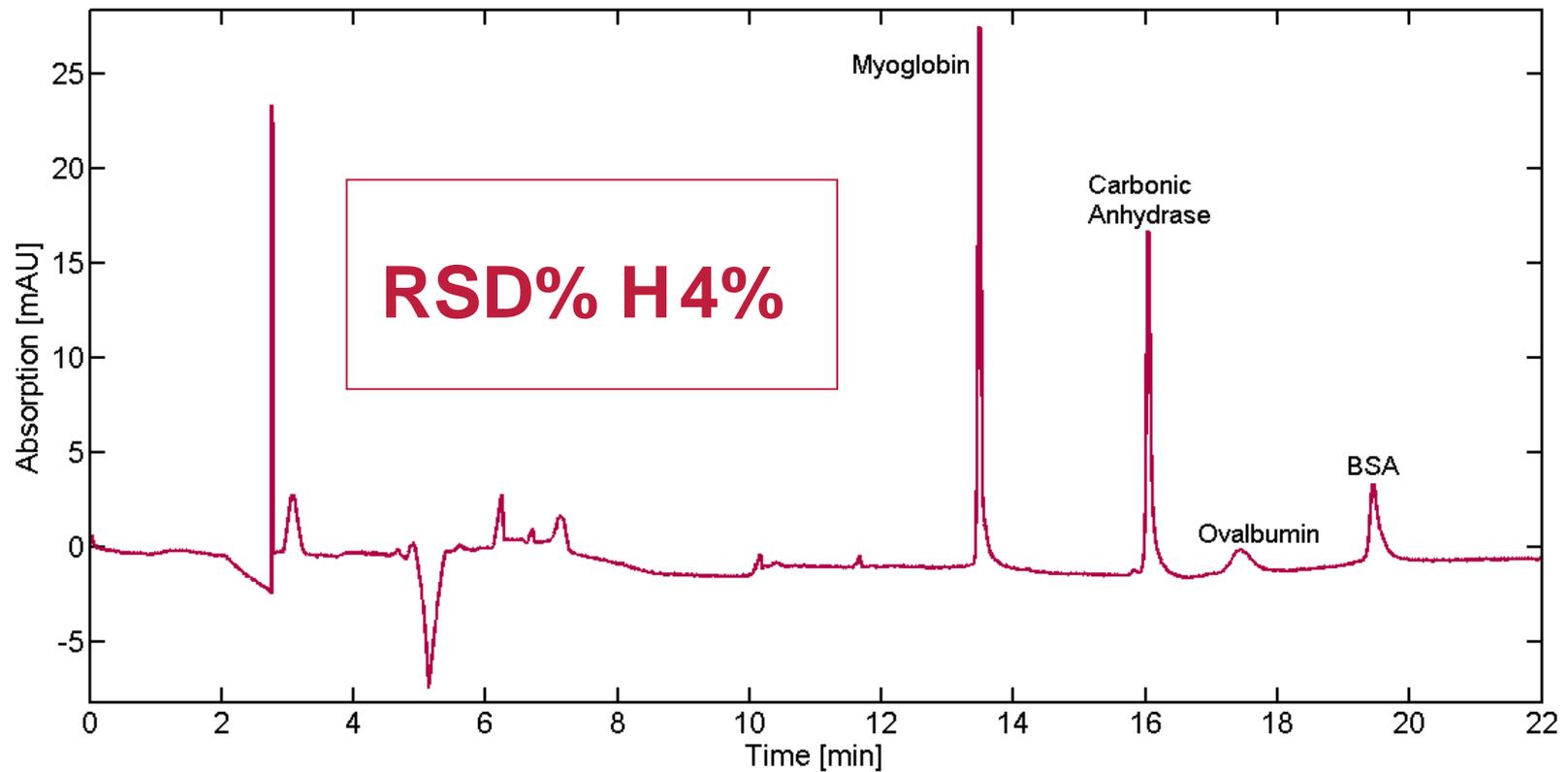


Application note

CE system	Agilent HP ^{3D} CE	
Capillary	Fused-silica, 50 µm ID, 375 µm OD; 33 cm L _{eff} , 24,5 cm L _{tot}	
Sample buffer	100 mM Tris-HCl, 1% SDS, pH 8.0	
Separation buffer	SDS Gel Buffer (Beckman Coulter)	
Injection	-5 kV for 20 sec	
Temperature	25°C	
Detection	Peak area: RSD_≈4% (n=6)	
Rinsing	0.1M NaOH, 0.1M HCl, H ₂ O, SDS Gel Buffer 4 bar external pressure	
Voltage / current	-16.5 kV / -30 µA	
Separation time	30-60 min	
Sample	Myoglobin Carbonic anhydrase Ovalbumin BSA	1mg/ml 0.5mg/ml 1mg/ml 1mg/ml

Application note

Electropherogram of standard proteins



Optimierung der Präzision

- Ursachen für die ungünstige RSD%:
 - Signal/Rausch-Verhältnis $<100^1$
 - Injektionsvolumen vergrößern
 - Proteinkonzentration vergrößern
 - Injektionsfehler
 - Hydrodynamische Injektion
 - Integration mit CISS²
 - Auswertung mit der 100%-Methode

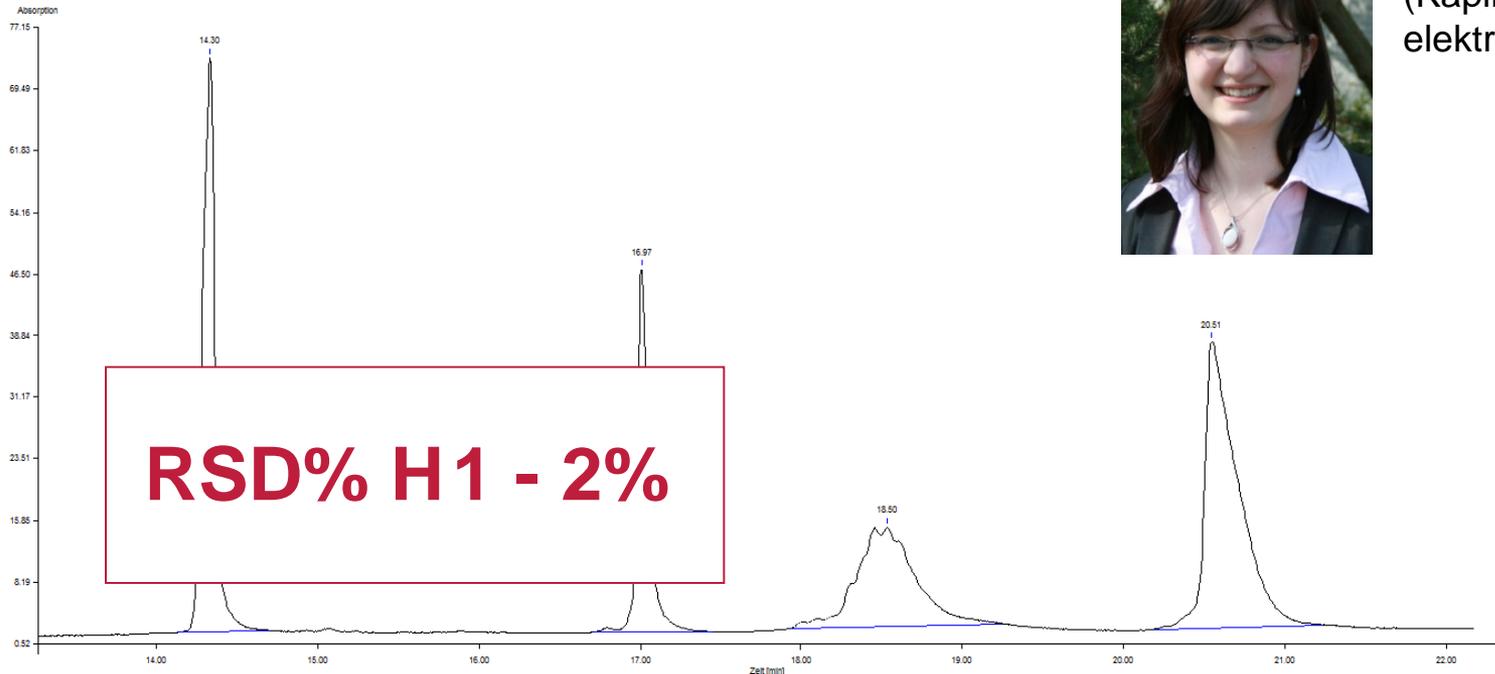
¹ Meyer, C., et al., *Electrophoresis* 2012, 33, 1509–1516

² Schirm, B., Wätzig, H., *Chromatographia* 1998, 48, 331-346

Optimierung



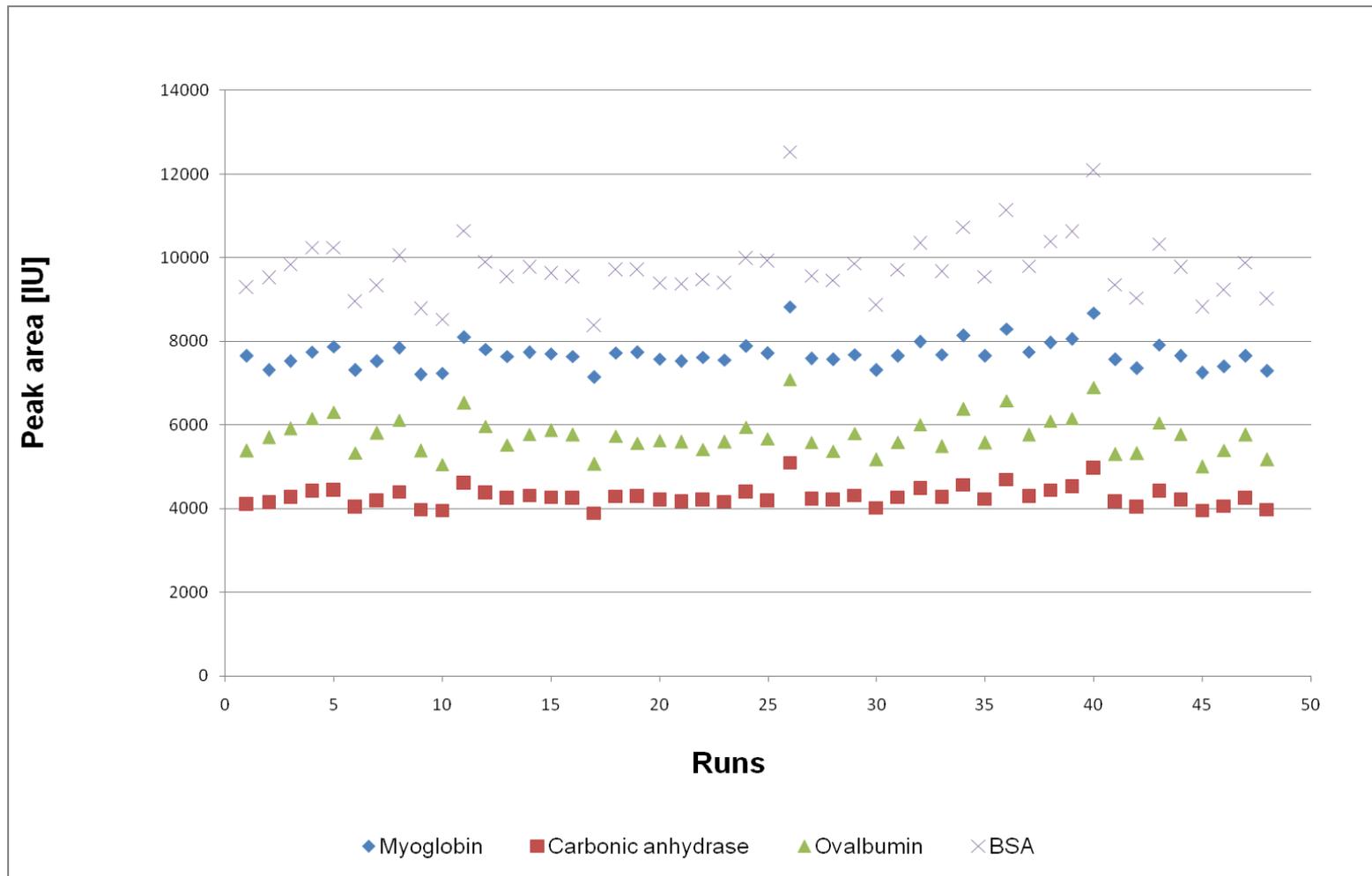
Claudia Cianciulli
(Kapillar-
elektrophorese)



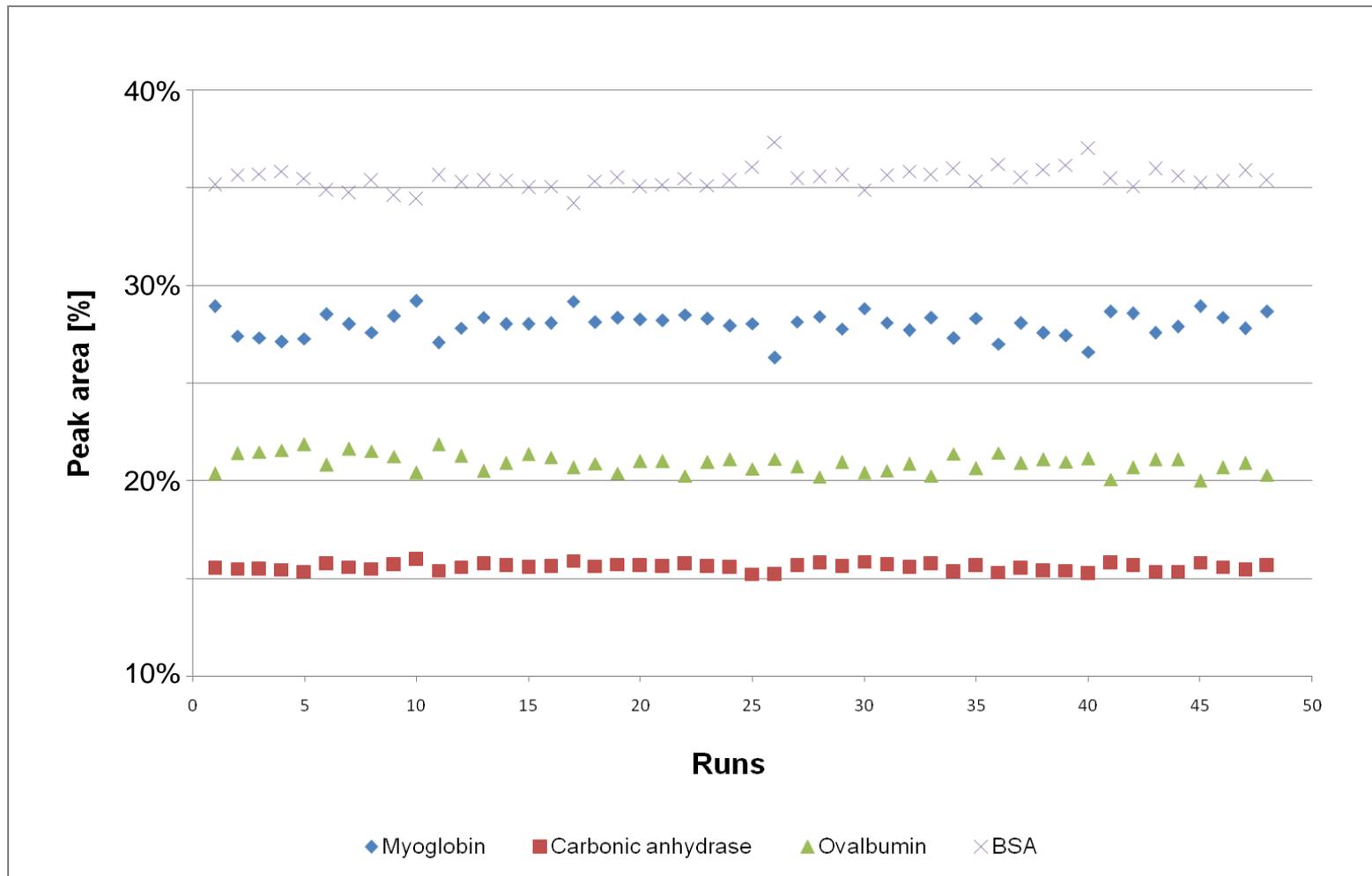
C. Meyer, et al., *Electrophoresis* 2012, 33, 1509–1516

C. Cianciulli, T. Hahne, Hermann Wätzig, *Electrophoresis* 2012, accepted paper,
DOI 10.1002/elps.201200177

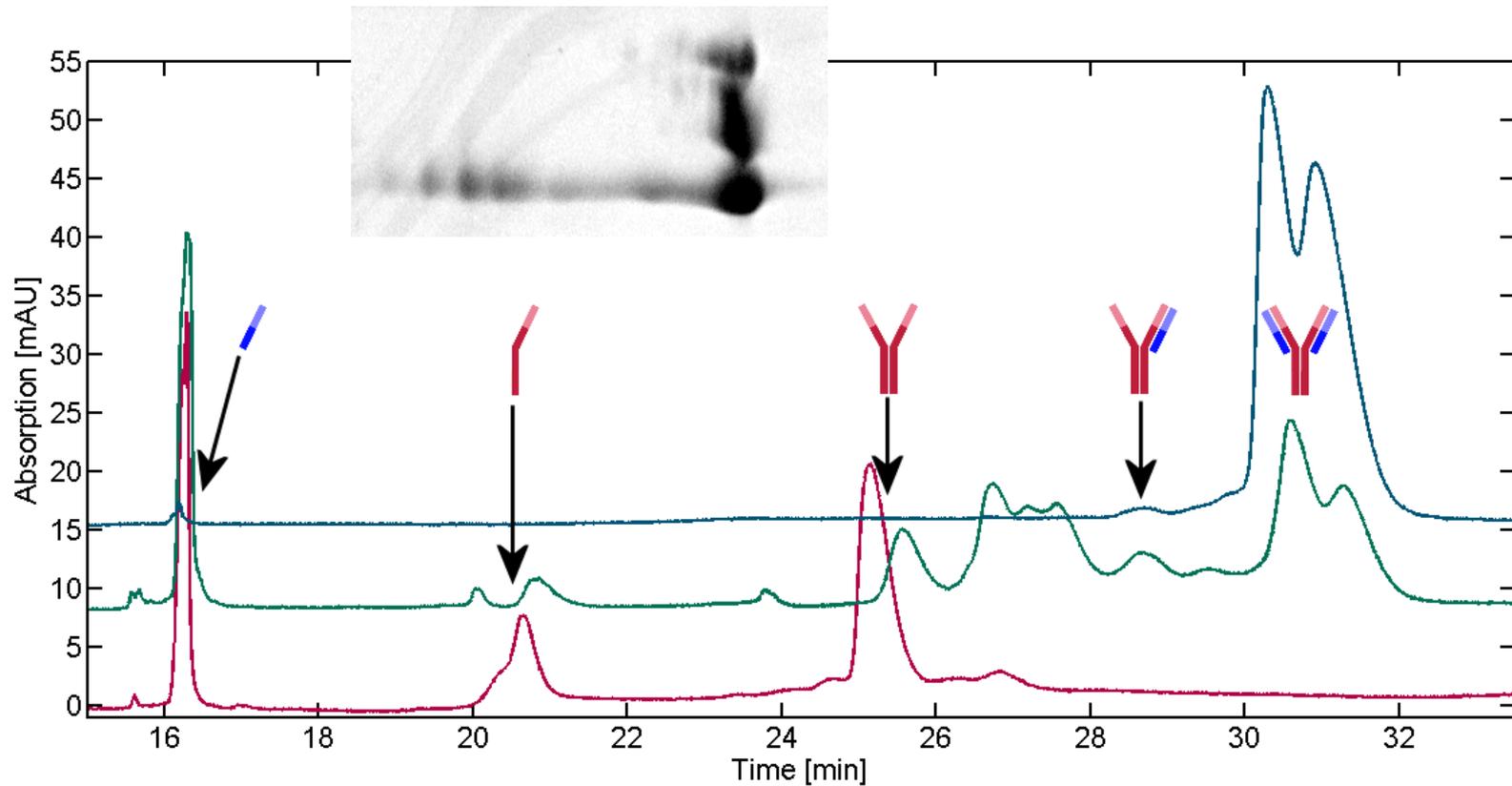
Optimierung – lange Serie



Optimierung – lange Serie



Anwendung

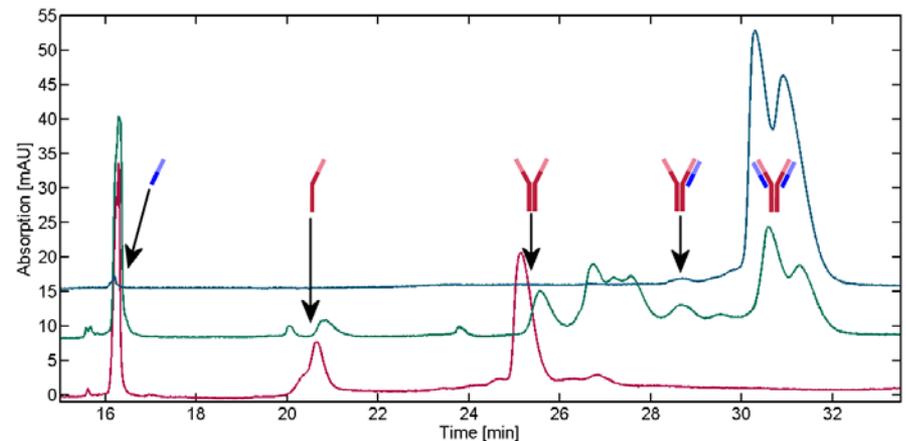


Zusammenfassung Capillary Gel Electrophoresis (CGE)

- Fabulous precision
 - if the signal-to-noise ratio is greater than 100
 - if the sample is injected hydrodynamically
 - if CISS is used as integration software
 - if the results are evaluated with the 100% method

	Hydrodynamic injection	
	Mean [min]	RSD%
CE, CGE: RSD% H1 - 2%		
Ovalbumin	20.9	2.20
BSA	35.5	1.57

- High selectivity
- Precise tool for quality control of proteins and antibodies instead of Gel Electrophoresis and Chromatographic Techniques



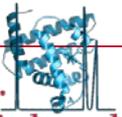
P.S.: CE Instrumenten-Qualifizierung

Parameter		AC
Temperature	Precision	$\pm 0,1^\circ\text{C}$
	Accuracy	$\pm 2^\circ\text{C}$
	Cooling system	< 90 μA (see above)
Spannung	Precision	$\pm 0,5\%$
	Accuracy	$\pm 4\%$
Detektor	Noise and Drift	$5 \cdot 10^{-5}$ AU
	Wavelength Accuracy	± 3 nm
	Linearity	$R^2 > 0,99$
Injektion	Linearity	$R^2 > 0,99$
	Accuracy	$\pm 25\%$
	Precision	RSD < 2%

C. Cianciulli, H. Wätzig, Electrophoresis 2012, 33, 1499–1508

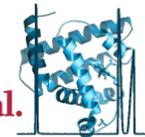
Summary Capillary Gel Electrophoresis (CGE)

Ready for Pharmaceutical Quality Control!





Technische
Universität
Braunschweig



Wätzig et al.
Institut für Medizinische und
Pharmazeutische Chemie



Continuous Improvement in Pharmazeutischer Analytik: schneller, präziser, selektiver

Sabine Redweik¹, Claudia Cianciulli¹, Thomas Hahne¹, Hassan Al Hazmi¹, Xi Deng¹, Yuanhong Xu^{1,2},
Hermann Wätzig^{1,*}

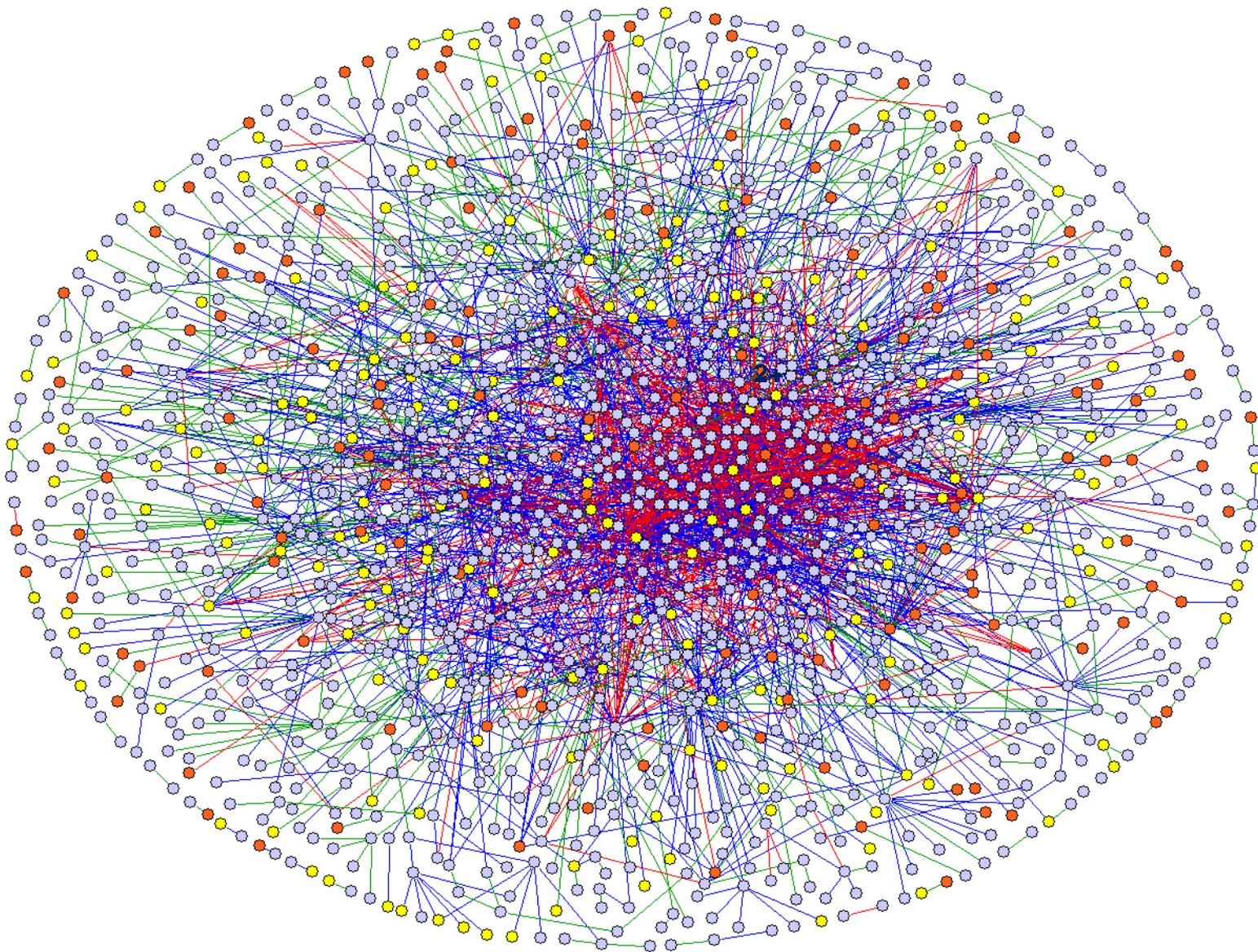
¹Institute of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, University of Braunschweig

²Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 5625 Renmin Street, Changchun, Jilin 130022, China

Correspondence: h.waetzig@tu-braunschweig.de

Interactomics

http://www.mdc-berlin.de/en/news/archive/2008/20080910-erwin_schr_dinger_prize_2008_goes_to_resea/P__PRESS2008_WA NKER_SCHROEDINGER_PRIZE_PROTEIN_NETWORK.jpg



Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

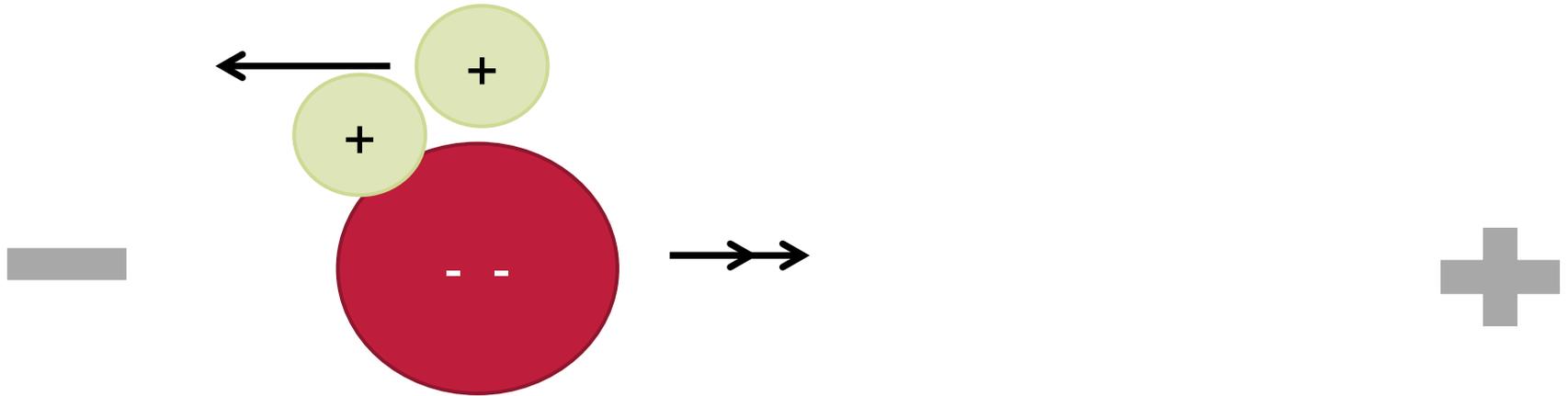
- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

Warum Affinitätskapillarelektrophorese (ACE)?

- Protein-Wechselwirkungen in der gewünschten Umgebung untersuchbar!
- Interaktionen oder Bindung zu Protein verändert dessen Mobilität μ



- Die effektive Mobilität (μ_{eff}) des Proteins unterscheidet sich von der des ungebundenen Proteins (μ_p)
 - Durch Wechselwirkung verändert sich Ladung (und Masse)

$$\mu = \frac{z \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

z = Ladungszahl

e_0 = Elementarladung

η = Viskosität

r = Partikelradius

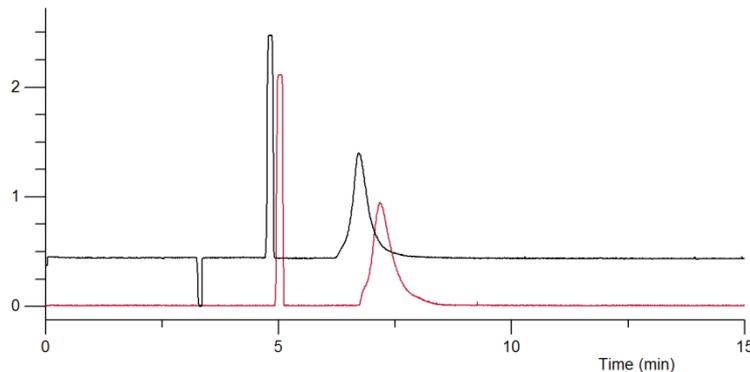
Grundlagen der ACE

1. Mobilitätsbestimmung des Proteins (ohne Ligand):

- Elektrophoresepuffer
- Injektion des Proteins

2. Mobilitätsbestimmung des Proteins in Gegenwart des Liganden

- Elektrophoresepuffer mit Ligand
- Injektion des Proteins



Schwarze Linie β -Lactoglobulin (β -LG) mit
500 μ M Ephedrinhydrochlorid
Rote Linie: β -Lactoglobulin (β -LG) ohne
Ephedrinhydrochlorid

ACE: Eigenschaften

- indirekte Messung:
 - Mobilitätsdifferenzen zwischen gebundener und ungebundener Form (Veränderung im Ladungs-Masse-Verhältnis)
- spezifische, aber auch unspezifische Interaktionen können untersucht werden⁴
- breites Anwendungsgebiet
- ganz unterschiedliche wäßrige Lösungen kompatibel
- native and denaturierende Bedingungen möglich
- keine teuren Reagentien oder Kits
- keine Derivatisierung notwendig
- simultane Trennung und Affinitätsmessung in Mischungen möglich
- bei 1:1 Stöchiometrie kann die Bindungskonstante berechnet werden

⁴ Chen, Z., Weber, S. G., Trends Analyt Chem. 2008 Oct;27(9):738-748

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

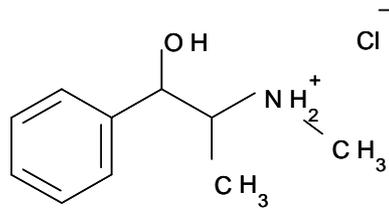
- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

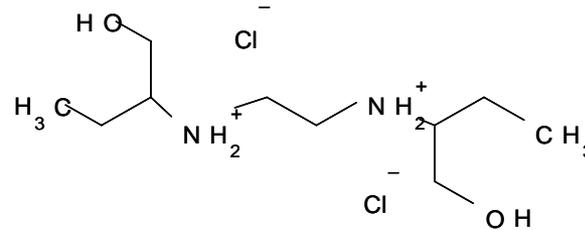
- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

Kationische Arzneistoffe

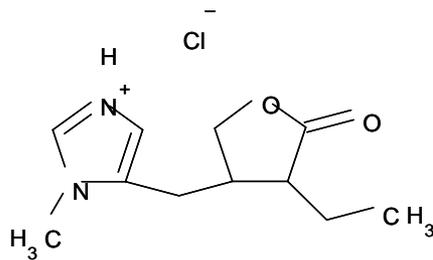
→ Migrationszeit der Proteine nimmt meist ab, Proteine werden schneller



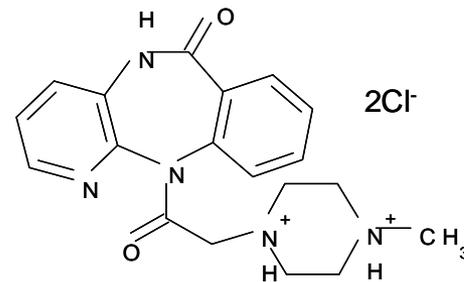
ephedrine hydrochloride



ethambutol dihydrochloride



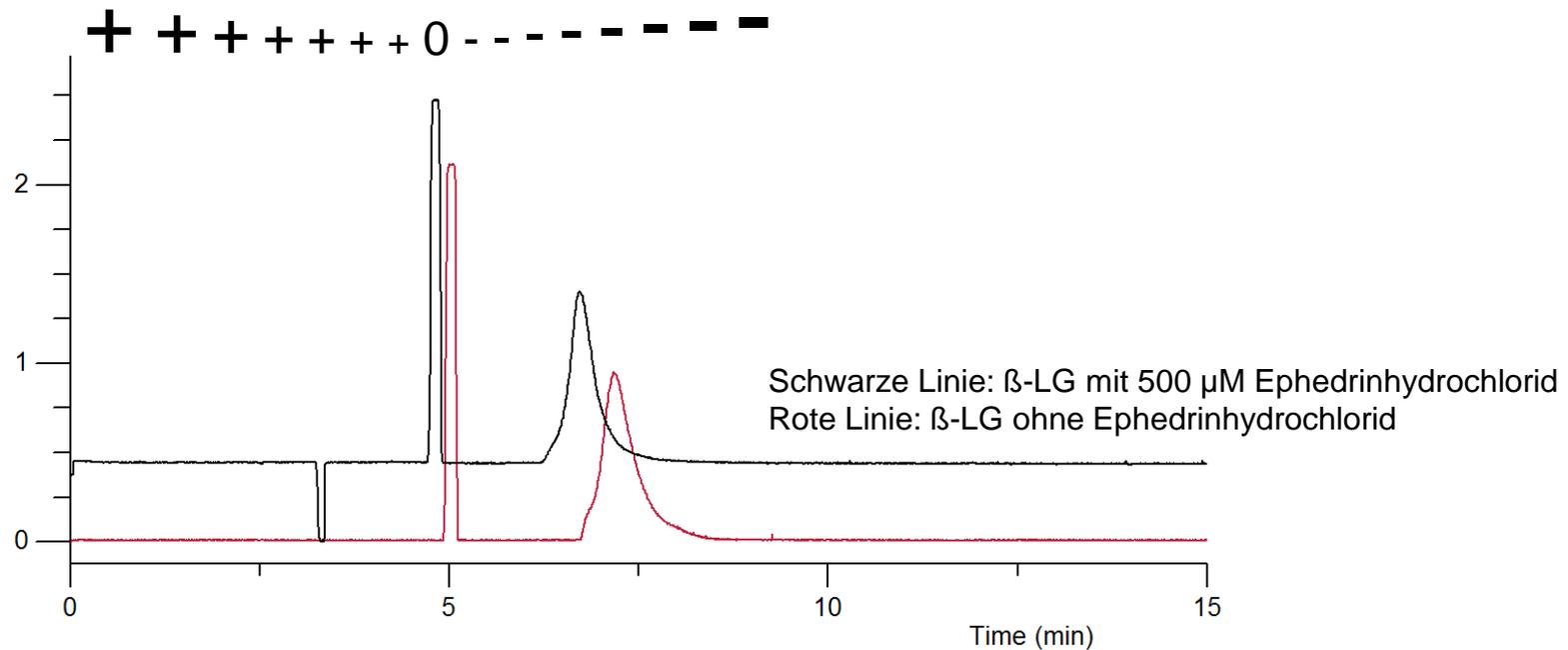
pilocarpine hydrochloride



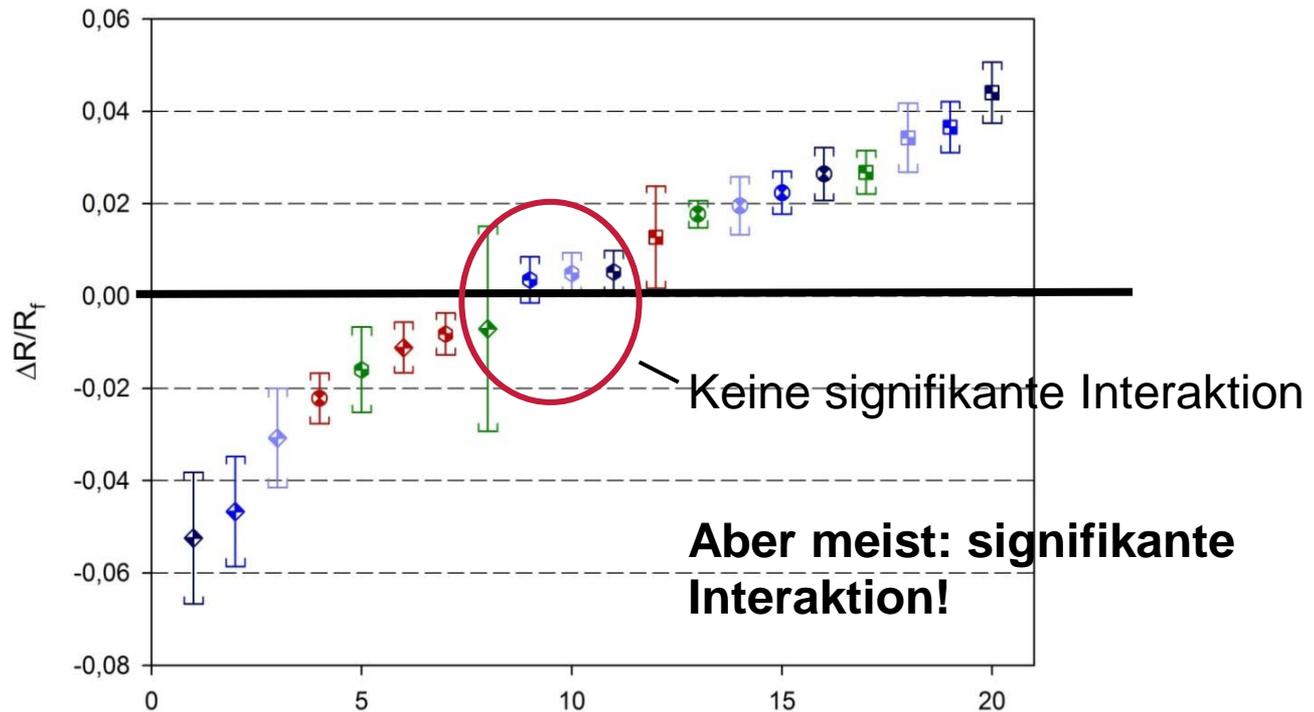
pirenzepine dihydrochloride

Proteine und kationische Arzneistoffe

→ Migrationszeit der Proteine nimmt meist ab, Proteine werden schneller



Proteine und kationische Arzneistoffe



- ◆ ethambutol dihydrochloride
- ◆ pilocarpine hydrochloride
- ◆ pirenzepine dihydrochloride
- ◆ ephedrine hydrochloride

Konzentration jeweils 500 μmol/L,
Proteine BSA, β-Lactoglobulin
und Ovalbumin

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

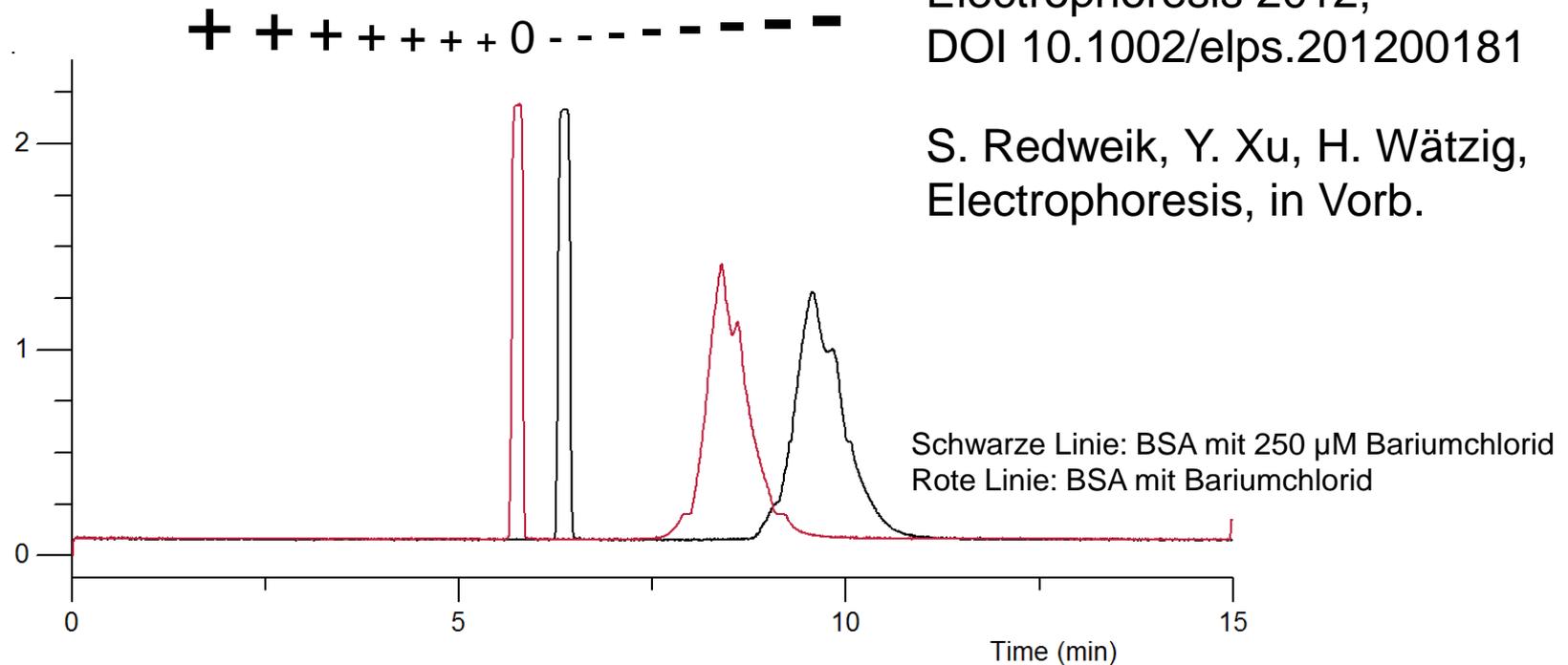
Proteine und Metallionen

- Zunahme der Migrationszeit, Proteine werden langsamer
- Proteine werden negativer (!)

- starke Effekte

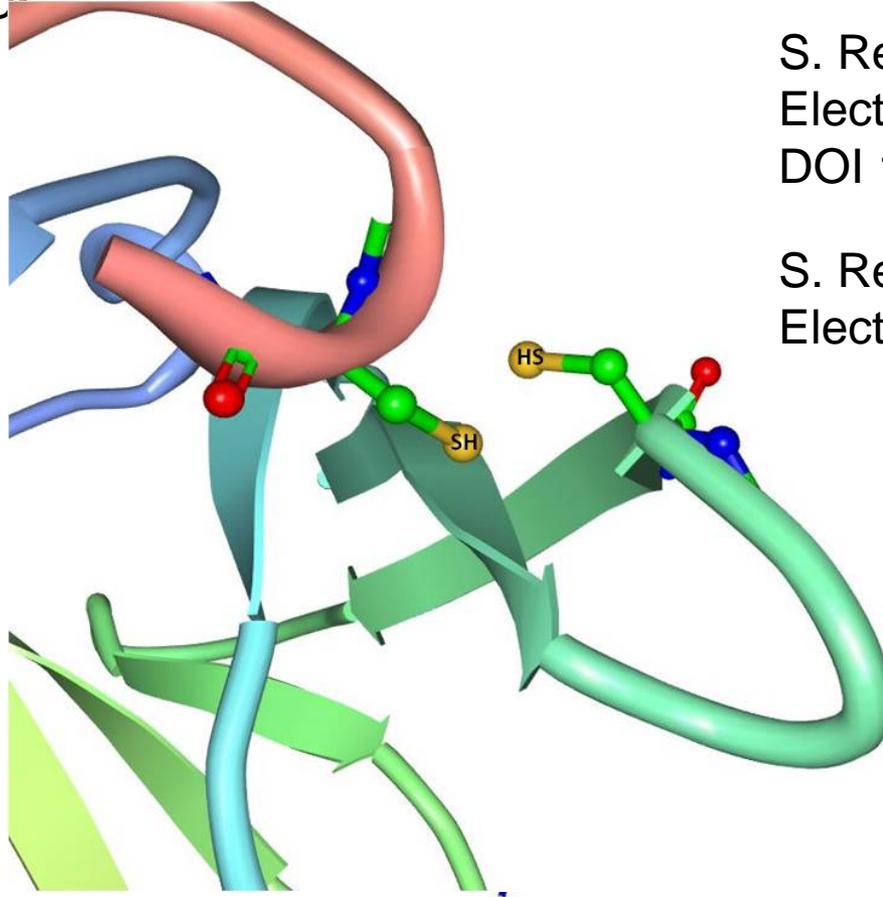
S. Redweik, Y. Xu, H. Wätzig,
Electrophoresis 2012,
DOI 10.1002/elps.201200181

S. Redweik, Y. Xu, H. Wätzig,
Electrophoresis, in Vorb.



Zunahme von Migrationszeiten

Schematische Darstellung einer Bindung von Metallionen zu β -Lactoglobulin (β -LG; 3NPO from PDB)

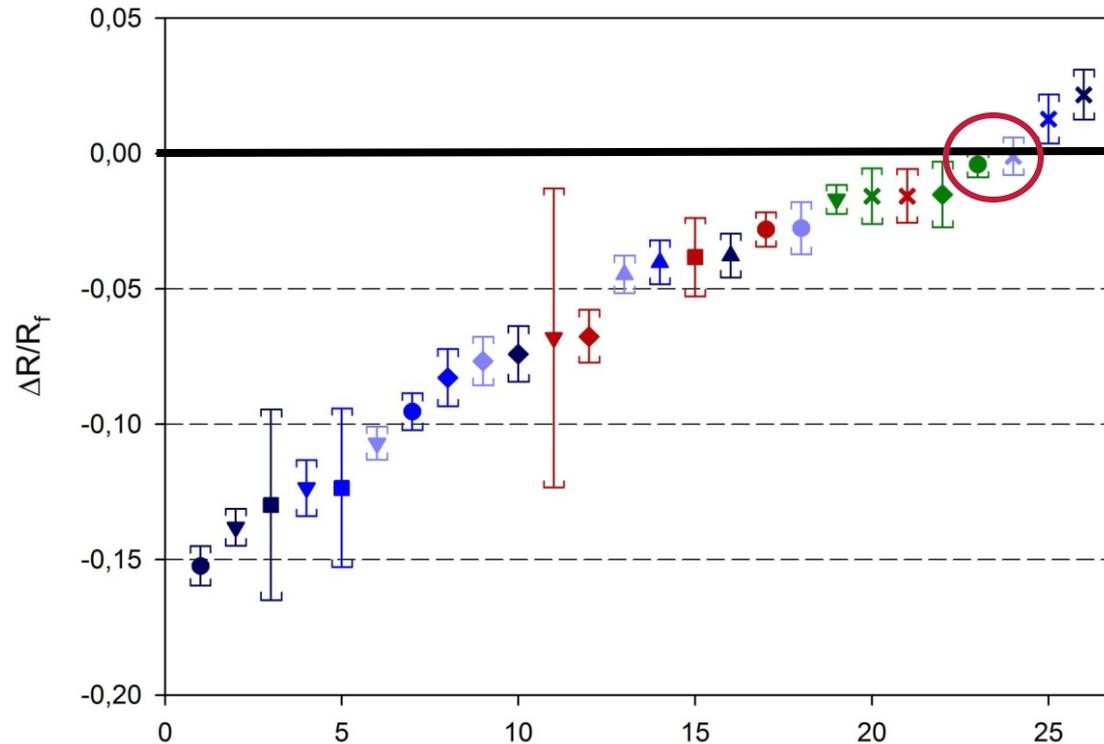


S. Redweik, Y. Xu, H. Wätzig,
Electrophoresis 2012,
DOI 10.1002/elps.201200181

S. Redweik, Y. Xu, H. Wätzig,
Electrophoresis, in Vorb.



Proteine und Metallionen



- barium
- ▼ copper
- nickel
- ◆ manganese
- ▲ magnesia
- × calcium

Metallion-Konzentrationen:

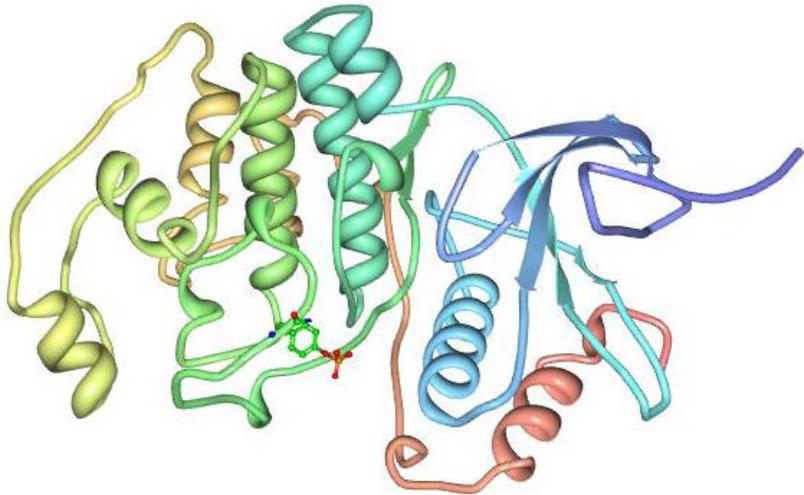
- bei **BSA** and **ovalbumin** 250 μmol/L
- bei **β-lactoglobulin** 100 μmol/L

ERK

- MAP kinase pathway
 - Phosphorylierungskaskade in mehreren Schritten
- MAP-3K
 - Phosphorylierung anderer Proteine an speziellen Serinen or Threoninen
- Aktiviert durch Phosphorylierung an Tyrosin und Threonin (ERK 1: Thr202 und Tyr204)

ERK1 (Homo sapiens)

- 379 Aminosäuren
- pI 6.28
- Mr 43135.5



Kristallstruktur von humanen ERK1
mit Mono-Phosphorylierung an Tyr204
(aus PDB; PDB-ID: 2ZOQ)

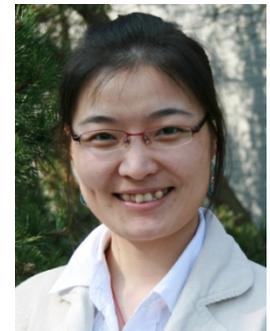
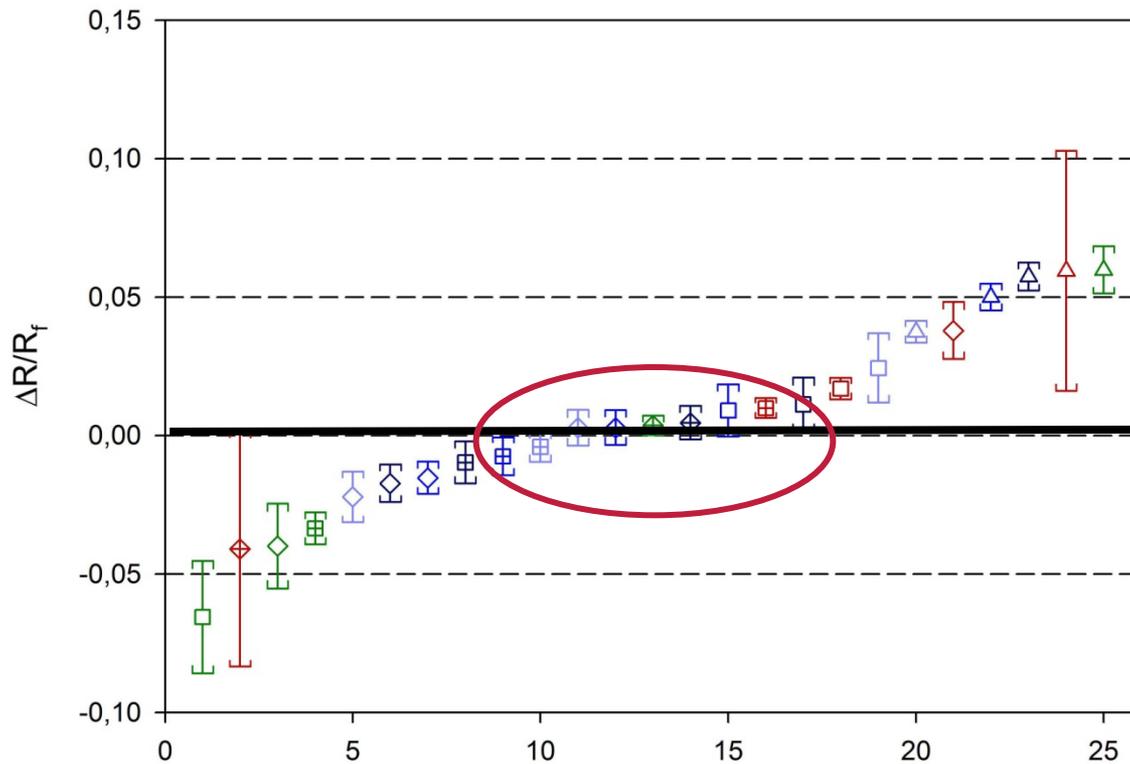
Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

Proteine und Anionen



Dr. Yuanhong Xu

- ◇ glutamic acid in TRIS
- ▣ succinic acid in PBS
- ◊ glutamic acid in PBS
- succinic acid in TRIS
- △ phosphate in TRIS

Anion-Konzentrationen:

- bei **BSA** and **ovalbumin** 500 μmol/L
- bei **β-lactoglobulin** 250 μmol/L

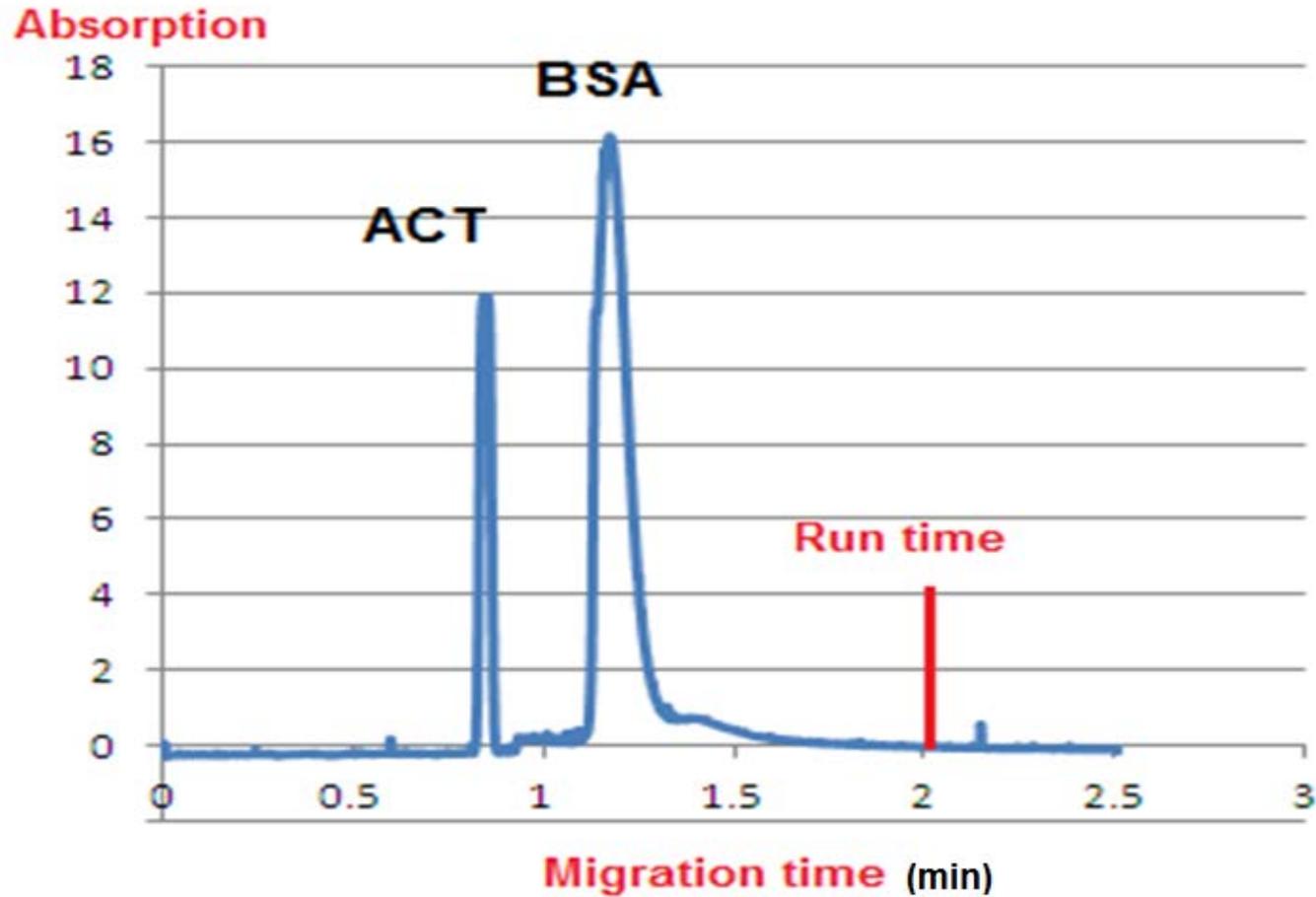
Übersicht Teil 2: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

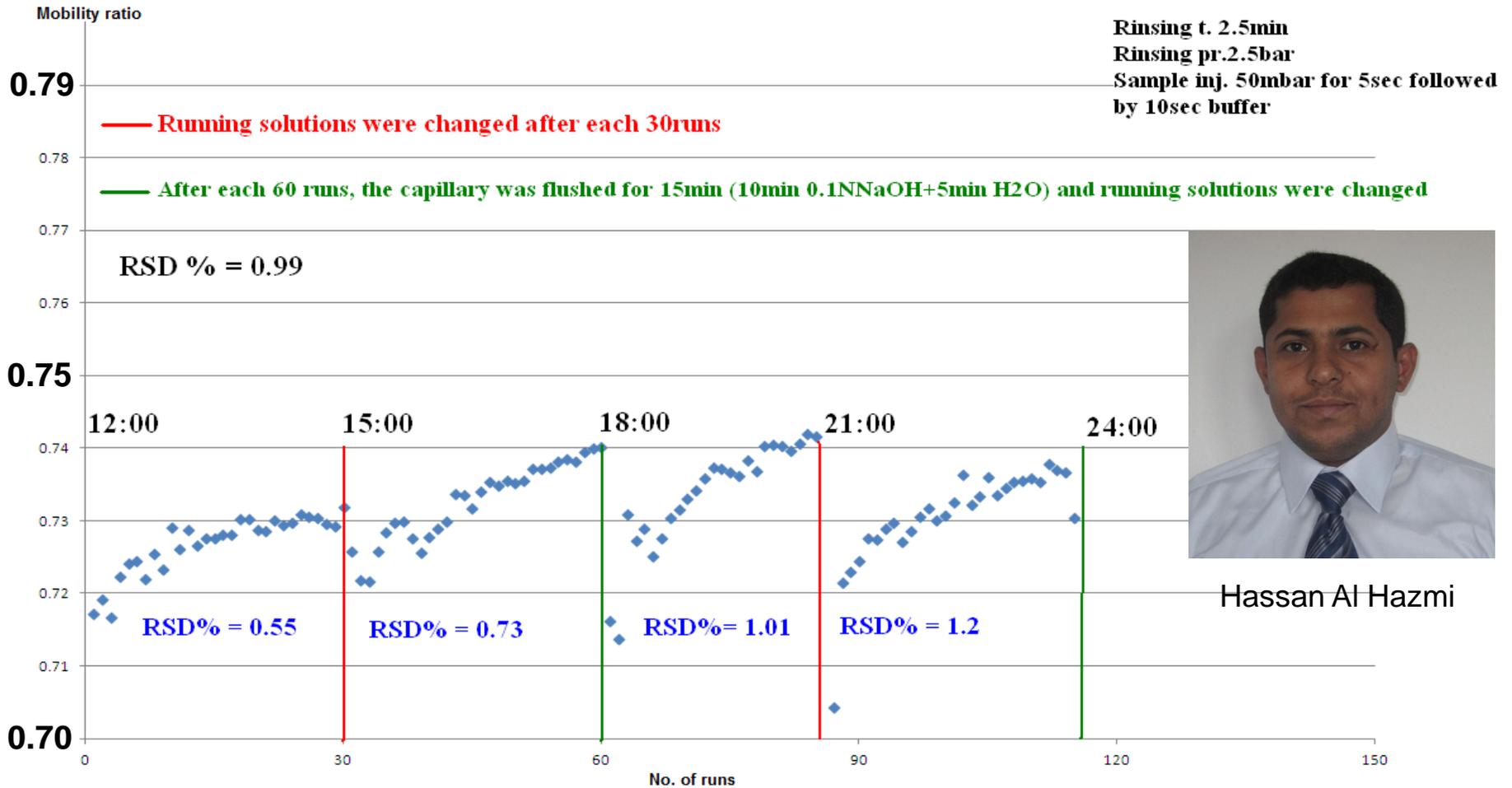
Übersicht Teil 2: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- **Geschwindigkeit: schneller!**
- Zusammenfassung und Ausblick

Kürzere Kapillare



Kürzere Kapillare: schnell!



Hassan Al Hazmi

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

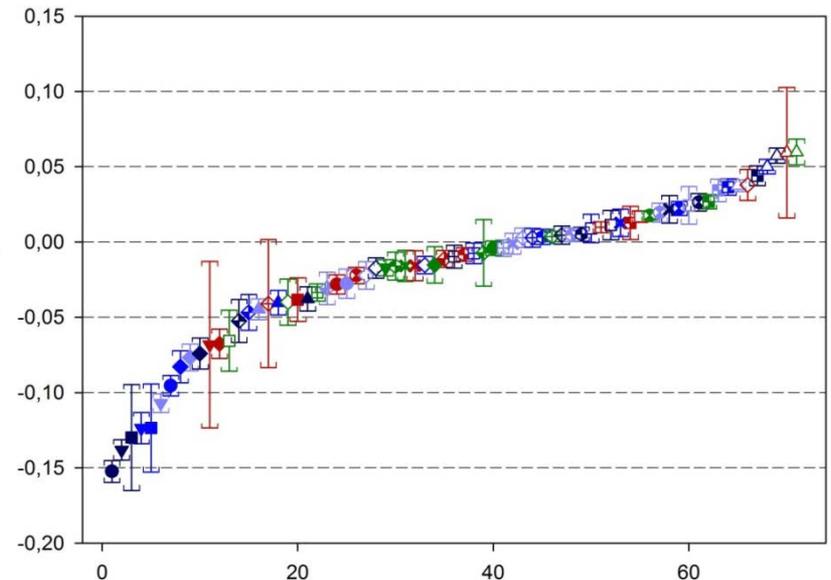
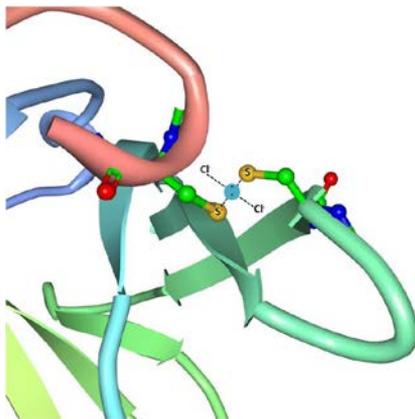
- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- **Geschwindigkeit: schneller!**
- Zusammenfassung und Ausblick

Übersicht: AffinitätsCapillarElektrophorese (ACE)

- Einführung
- Protein-Kation-Wechselwirkungen
 - Wechselwirkungen mit Metallionen
- Protein-Anion-Wechselwirkungen
- Geschwindigkeit: schneller!
- Zusammenfassung und Ausblick

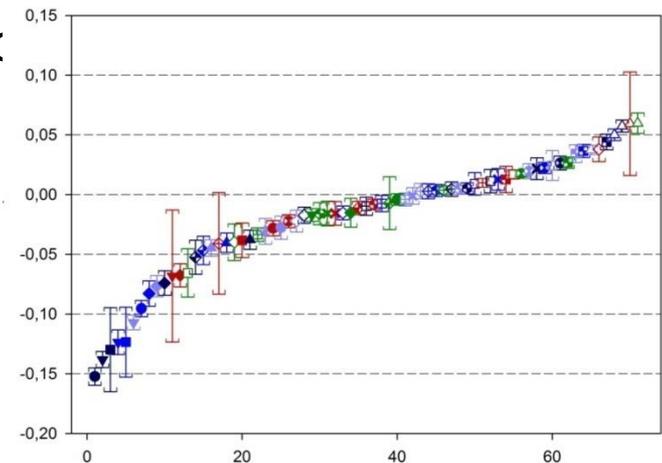
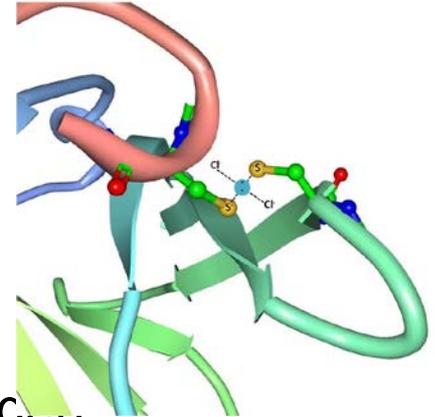
Zusammenfassung

- ACE ist ein leistungsfähiges Werkzeug zur Untersuchung von Ladungswechselwirkungen
- Metallionen binden stärker als organische Kationen
- Proteine werden typischerweise negativer durch Bindung von Metallionen, durch anschließende koordinative Bindungen



Ausblick

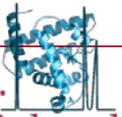
- Weitere Untersuchungen an ERK und ähnlichen Signalproteinen
- Metall-Wechselwirkungen (e.g. Ni^{2+})
- Dehydrins als metallionenbindende Proteine
- Calcium-bindende Proteine
- etc.
- auch Untersuchung von Protein-Peptid-Wechselwirkungen,
- wahrscheinlich sogar von Protein-Protein-Wechselwirkungen



Allgemeine Zusammenfassung

Bildbeiträge vom Beginn
aufgreifen

h.waetzig@tu-bs.de

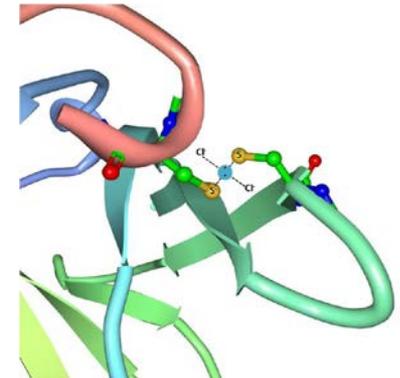
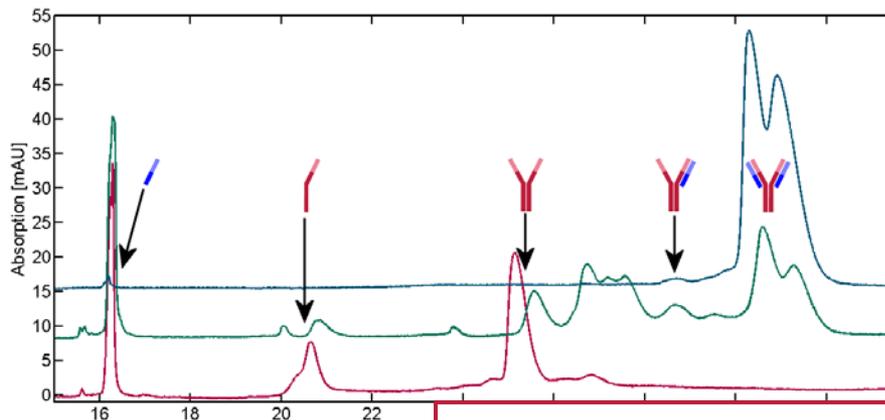
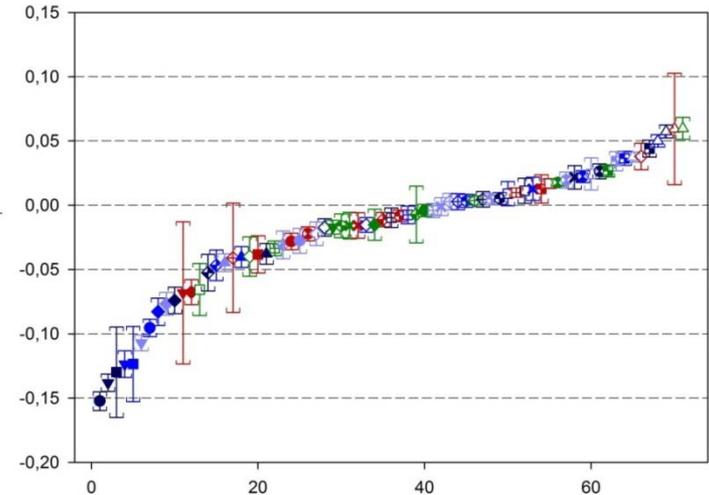


Allgemeine Zusammenfassung

RSD% H1 - 2%

Hydrodynamic injection

	Mean [%]	RSD%
Myoglobin	28.0	2.24
Carbonic anhydrase	15.6	1.15
Ovalbumin	20.9	2.20
BSA	35.5	1.57

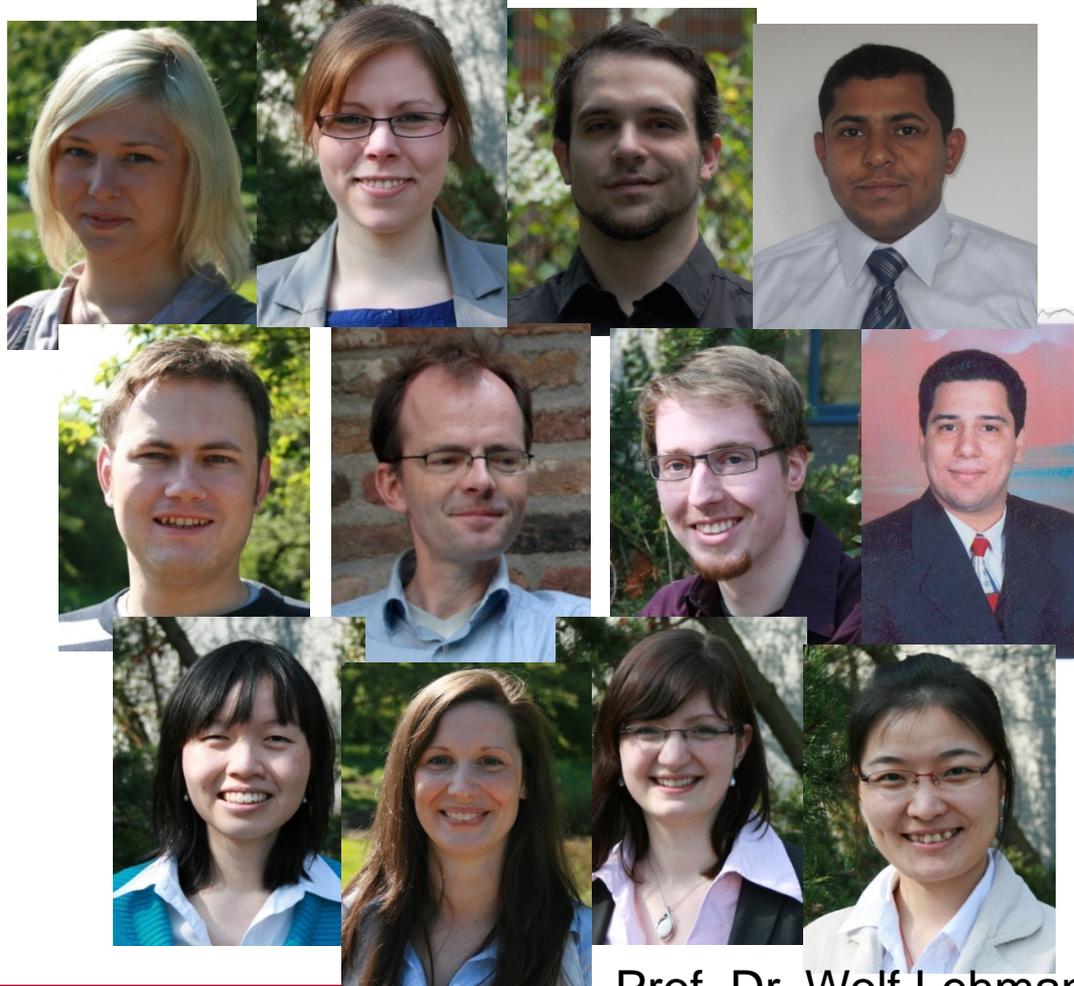


h.waetzig@tu-bs.de



Technische
Universität
Braunschweig

Herzlichen Dank!



Prof. Dr. Wolf Lehmann



A Subsidiary of **molex**



Alexander von Humboldt
Stiftung/Foundation



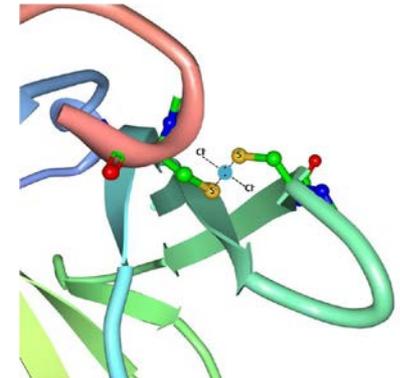
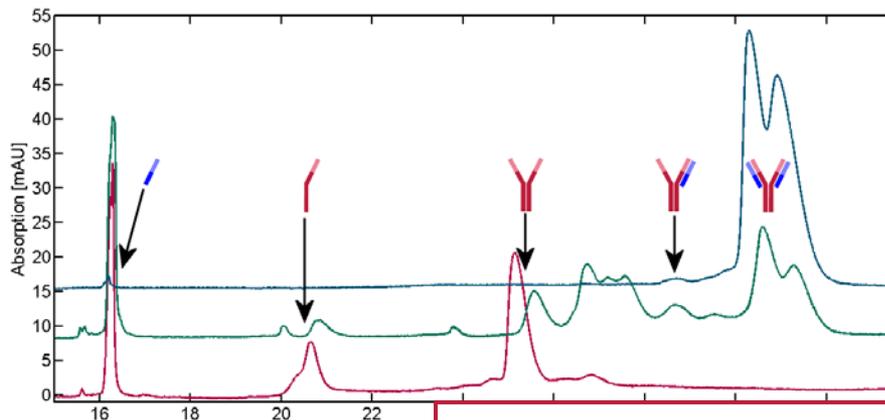
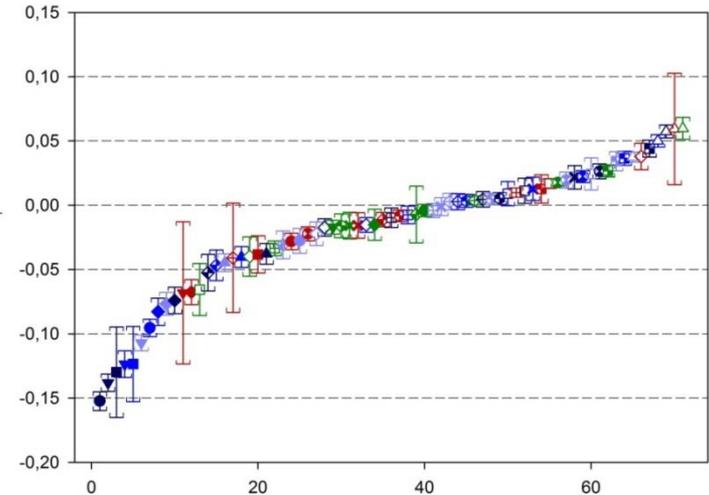
Technische
Universität
Braunschweig

Allgemeine Zusammenfassung

RSD% H1 - 2%

Hydrodynamic injection

	Mean [%]	RSD%
Myoglobin	28.0	2.24
Carbonic anhydrase	15.6	1.15
Ovalbumin	20.9	2.20
BSA	35.5	1.57



h.waetzig@tu-bs.de



Technische
Universität
Braunschweig

