

Massenspektrometrische Charakterisierung von Enzym-Lactose-Derivaten

Julia Biller^{*a}, Marten Klukkert^b, Lena Morschheuser^{*a}, Claudia S. Leopold^b, Maria Trusch^c, Sascha Rohn^a

^a HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

^b Institut für Pharmazeutische Technologie, Universität Hamburg,

^c Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

Ansprechpartnerin: biller@chemie.uni-hamburg.de

Enzymatische Arzneistoffe werden im Rahmen der Pharmakotherapie häufig zur Substitution körpereigener Proteine eingesetzt. So wird ein Mangel an körpereigenen Verdauungsenzymen im Rahmen der Pankreasinsuffizienz durch Verabreichung von pankreatischen Enzymen (wie z.B. α -Amylase und Lipase) therapiert [1,2]. Pharmazeutische Hilfsstoffe, wie z.B. Lactose, einem häufig eingesetzten Füllstoff in der Tablettierung, können zur Denaturierung der Proteinstruktur des Arzneistoffs und somit zu sinkender biologischer Aktivität und immunologischen Reaktionen führen. Die Charakterisierung und Identifizierung der dabei entstehenden Produkte bilden die Grundlage zum Verständnis des resultierenden Einflusses auf die Eigenschaften des Präparats bzw. seiner Risiko-Nutzen-Bewertung. Eine geeignete Methode hierfür bildet die HPTLC-Analyse in Kopplung mit der MALDI-TOF-MS.

Material und Methoden

Probenmaterial

α -Amylase (extrakt-chemie), Lactose, tablettierte Proben

Probenvorbereitung

Tablettierung mit der FETTE 102i Rundläuferpresse und anschließende Variation der Lagerungstemperatur (25 °C und 40 °C) sowie Luftfeuchtigkeit (RH) (0 % und 75 %); Lagerungszeitraum: 8 Wochen
Tryptischer Verdau von α -Amylase & tablettierte α -Amylase-Lactose-Präparaten (jeweils mit einer Konzentration von 3 mg/mL)

HPTLC-Material

HPTLC-Cellulose (Trägermaterial: Alufolie, Merck KGaA)

HPTLC-MS-Analyse



* Derivatisierungsreagenzien: Fluorescamin/Triethylamin zur empfindlichen Peptid-Detektion
Diphenylamin-*p*-Anisidin zur spezifischen Detektion von Zuckern

Messvorbereitung/Messbedingungen [3]:

MALDI-TOF-MS: Beschichten mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (200 mg/mL in Acetonitril/Wasser mit 0,1 % TFA, 90/10) als Matrix und Vortrocknen bei 60 °C und 0 mbar. ultrafleXtreme (Bruker Daltonik), RP-Modus, m/z 700-3500.

Ergebnis (A) – HPTLC-Analyse

Tabletтиerte Proben, die bei 40 °C und 75 % RH gelagert wurden, weisen nach 8 Wochen bereits äußerliche Veränderungen in Form intensiver Braunfärbung auf. Ein umfassender Vergleich der unterschiedlichen Herstellungs- und Lagerungsbedingungen mittels HPTLC zeigt deutlicher die Abweichung gegenüber der unbehandelten α -Amylase (vgl. Abb. 1, Position 1). Während die bei 40 °C und 75 % RH gelagerte Probe stellenweise Veränderungen aufweist (vgl. Abb. 1, Position 3), sind im Fall einer bei 25 °C und 0 % RH gelagerten Probe (vgl. Abb. 1, Position 2) solche Unterschiede nicht erkennbar.

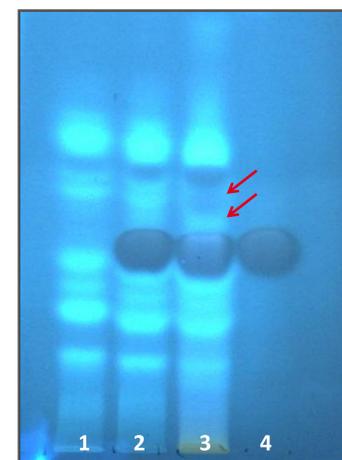


Abbildung 1: HPTLC-Cellulose-Platte [UV 366 nm nach Fluorescamin/Triethylamin-Derivatisierung] mit (1) trypt. Peptide der Amylase-Referenz, (2) trypt. Peptide der tablettierte Amylase (25 °C & 0 % RH); (3) trypt. Peptide der tablettierte Amylase (40 °C & 75 % RH), (4) Lactose-Lösung (1 %ig)

Ergebnis (B) – TLC-MALDI-Messung

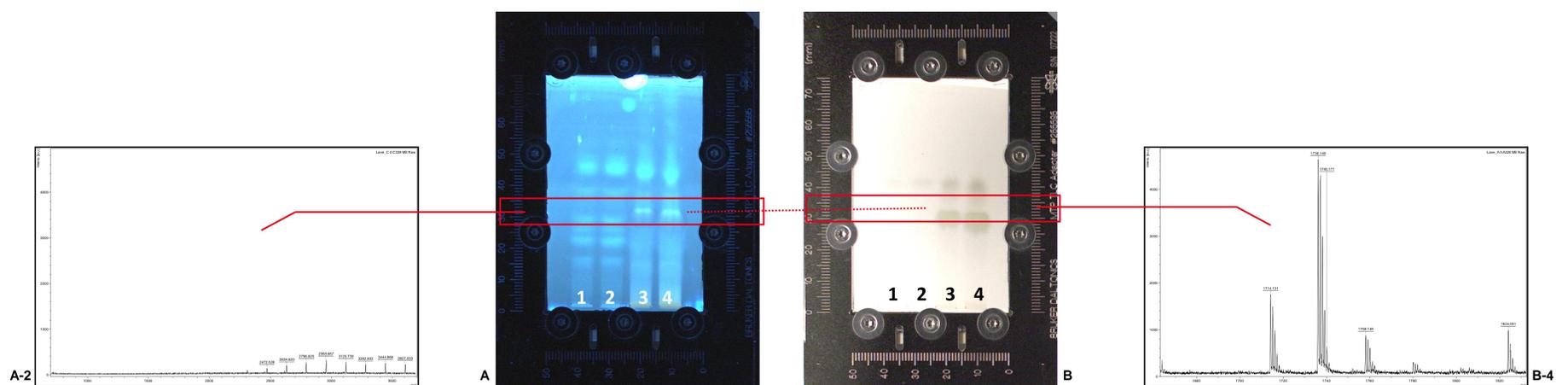


Abbildung 2: HPTLC-Cellulose-Detektionsplatte im TLC-MALDI-Adapter nach Derivatisierung mit (A) Fluorescamin/Triethylamin (UV 366 nm) und (B) mit Diphenylamin-*p*-Anisidin-Reagenz (Weißlicht); (1) trypt. Peptide der unbehandelten Amylase 7 μ L, (2) trypt. Peptide der unbehandelten Amylase 10 μ L, (3) trypt. Peptide der tablettierte Amylase (40 °C & 75 % RH) 7 μ L, (4) trypt. Peptide der tablettierte Amylase (40 °C & 75 % RH) 10 μ L;
A-2 und B-4 Spektren für die Messposition 328 der Bahn 2 und 4

Zusammenfassung

Die MALDI-TOF-MS ist dazu geeignet lagerungsbedingte Veränderungen tablettierte α -Amylase-Lactose-Präparate auf Basis tryptischer Peptide aufzuzeigen. In Verbindung mit der HPTLC-Analyse können durch spezifische Derivatisierungs-Reagenzien (Fluorescamin-, Ninhydrin- oder Diphenylamin-*p*-Anisidin-Reagenz) ergänzende Informationen erhalten werden. Die vorangehende HPTLC-Trennung bietet weiterhin die Möglichkeit der gezielten MALDI-Detektion und verbesserten Zuordnung.

Durch MS/MS-Messungen kann nachfolgend eine Identifizierung der unbekannter Molekülonen vorgenommen werden. Zudem ist es möglich mit Hilfe der zweidimensionalen Chromatographie die Trennleistung und Präzision zu verbessern.

Literatur: [1] Miller W., *DMW* (1946) **2008**, 133, 9, 323-326; [2] Desser, L.; Zavadova, E.; Herbacek, I., *Int J Immunother* **2001**, 17, 2/3/4, 153-161; [3] Bruker Daltonik GmbH, TLC-MALDI dip coating protocol version 1.5