

Hochdurchsatz Qualitätskontrolle mittels kombinierter UV/ELSD/CLND LC-MS

Ens, Waldemar

Bachelorarbeit 2011
MLS Chemie

KURZZUSAMMENFASSUNG

Die Qualität einer Verbindung ist beim High Throughput Screening ein entscheidender Erfolgsfaktor. Aus diesem Grund werden im Compound Management der Novartis Basel, Qualitätskontrollen per LC/MS mit Multidetektoren (UV, ELSD & CLND) durchgeführt. Dabei werden die Identität, die Reinheit und eventuell die Konzentration überprüft. Jedoch gibt es gewisse Verbindungen, für die sich die „one fits all“ Standardmethode weniger eignet, z.B. bioaktive Lipide oder stark polare Verbindungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Probleme bei der Lipidanalyse erforscht und eine LC/MS Methode für Lipide und allgemein stark hydrophobe Verbindungen erstellt. Der ELSD wurde mit dem CLND verglichen und einige Vor- und Nachteile der Detektoren aufgedeckt. Ebenfalls wurden Methodenoptimierungsversuche für sehr polare Verbindungen, welche mit DMSO (Lösungsmittel) coeluierten, durchgeführt.

ZIELE

Als Hauptziel sollten die Probleme bei der Lipidanalyse geklärt und die Analysenmethode für stark hydrophobe Stoffe wie z.B. bioaktive Lipide optimiert werden. Weiterhin sollte der ELSD mit dem CLND hinsichtlich der Konzentrationsbestimmung verglichen und Vor- und Nachteile aufgedeckt werden. Ebenfalls sollte eine Methodenoptimierung für sehr polare Verbindungen, die bei der LC/MS Analyse mit DMSO coeluierten, durchgeführt werden. Schliesslich sollten Verbesserungsvorschläge für die verwendeten Geräte gemacht und alternative Analysenmethoden erkundet werden.



Abb. 1: LC/MS Multidetektor System (Waters Acquity UPLC)

RESULTATE

Es stellte sich heraus, dass das grösste Problem bei der Lipidanalyse die schlechte Löslichkeit in DMSO ist (s. Abb. 2).

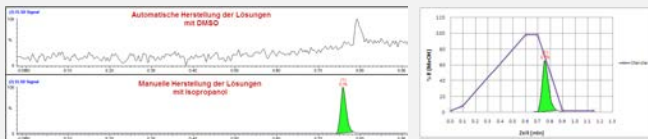


Abb. 2: Vergleich Lipidanalyse mit DMSO und Isopropanol

Da sich die Standardmethode für stark hydrophobe Verbindungen nicht eignet, wurde eine Methodenoptimierung durchgeführt und von einer C18 auf eine C8 Säule gewechselt. Mit der neuen Methode eluieren hydrophobe Verbindungen zu optimaleren Retentionszeiten (s. Abb. 3). Dadurch wird eine bessere Trennung erreicht und ein „Hängenbleiben“ auf der Säule verhindert, wodurch mehr Verbindungen detektiert und identifiziert werden können (s. Abb. 4/5).

Abb. 3: Gradienten

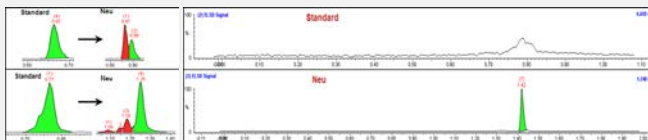


Abb. 4: Trennung

Abb. 5: „Hängenbleiben“ auf der Säule

Beim Vergleich ELSD versus CLND stellte sich heraus, dass sich der ELSD sehr gut für die Konzentrationsbestimmung eignet und gegenüber dem CLND gewisse Vorteile aufweist.

Der CLND ist weniger stabil und bereitet dem Anwender mehr Schwierigkeiten. Sein Signal hängt stark von der Sprayqualität ab, die sich täglich ändern kann. In Abb. 6 ist zu erkennen, dass die CLND Konzentrationen mit steigenden Retentionszeiten bei einem Gerät relativ zu den ELSD Konzentrationen abnehmen. Möglicherweise ändert sich das Spray bei verschiedenen Eluentenzusammensetzungen, was zu kleineren Signalen und folglich zu geringeren Konzentrationen führt.

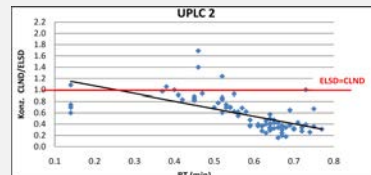


Abb. 6: Konzentration CLND/ELSD vs. Retentionszeit

Umgekehrt sieht die Statistik schon anders aus. Verbindungen, die keinen Stickstoff enthalten wie z.B. die meisten Lipide, werden vom CLND nicht detektiert. Des Weiteren sind die Peaks im CLND doppelt bis dreifach so breit wie die im ELSD, was schnell zu Überlagerungen mit Nebenprodukten führen kann. Ausserdem ist die Auswertung mit dem ELSD einfacher.

Ferner wurden Methodenoptimierungsversuche für Verbindungen, die mit DMSO coeluierten, durchgeführt. Mit einer C18-, einer Phenyl- und einer Amidsäule (Normalphase) konnten unter den gegebenen Bedingungen (Methanol/Wasser als Eluenten mit pH-Wert $pH7$) keine Erfolge erzielt werden. Aufgrund dieser Limitierungen, die vom CLND herrühren, konnte keine optimale Trennung der polaren Verbindungen vom DMSO Peak erzielt werden.

SCHLUSSFOLGERUNG

Es wäre denkbar, in Zukunft eine Lipid-Library einzuführen, bei der die Lipide mit geeigneteren Lösemitteln als mit DMSO gelöst werden.

Mit der neuen Methode für sehr hydrophobe Verbindungen werden bei der Lipidanalyse bessere Ergebnisse erzielt, die sich mit dem erworbenen Wissen nun auch eindeutiger interpretieren lassen.

Wägt man die Vor- und Nachteile des CLNDs ab, so sind die Vorteile gegenüber den Limitierungen eher gering und es stellt sich die Frage, ob der Gebrauch des CLNDs noch zwingend erforderlich ist. Mit Acetonitril als Eluenten und Ammoniumpuffer als Modifizier könnten bei der Trennung der stark polaren Verbindungen sehr wahrscheinlich bessere Ergebnisse erzielt werden.