

## Bildgebende MALDI-MS und Nanodispensing als Werkzeuge für die wirkungsbezogene HPTLC-Analytik - Ein Zwischenbericht

Zhe Pan, Da Xu, Leonard Dreyer, Mike Dohmen, Andreas Heinrich, Wolfgang Schulz,  
Hans-Dieter Junker ([hans-dieter.junker@hs-aalen.de](mailto:hans-dieter.junker@hs-aalen.de))

Hochschule Aalen

### Zusammenfassung

Die Wirkungsbezogene Analytik (WBA) ist eine immer wichtigere Methode zur Beurteilung und Bewertung organischer Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt. Gerade in der Kombination mit der HPTLC zur Fraktionierung der Wasserproben ergeben sich neue Möglichkeiten der Detektion und Verbesserung der Effektivität der WBA. Hierzu gehört eine präzisere und flexiblere Auftragung von Probe und Reagenzien. Durch den Einsatz des hier vorgestellten Nano-Dispensers ist es möglich, ortsspezifisch Analyte und Reagenzien zu dosieren. Dadurch wird es ermöglicht, gezielt an einer Bande unterschiedliche Biotests durchzuführen. Als exemplarisches Beispiel wurde zur orts aufgelösten Detektion auf der Dünnschichtplatte bildgebende MALDI-Massenspektrometrie als Detektionsverfahren eingesetzt. Die Entwicklung eines MALDI-MS gestützten Acetylcholinesterase (AChE)-Tests für Neurotoxizität auf der HPTLC-Platte in Kombination mit der PipeJet nL Dispensingtechnologie erlaubt den Nachweis von Enzyminhibitoren und die Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten von schwachen AChE-Inhibitoren wie z.B. Koffein.

### Einleitung und Zielsetzung

Die heute in der instrumentellen Analytik zur Verfügung stehenden Target- und Non-Target-Methoden ermöglichen die Routinebestimmung von Spurenstoffen in der aquatischen Umwelt in Konzentrationen bis in den ng/L-Bereich. Die mit Flüssigkeitschromatographie und mit hochauflösender Massenspektrometrie gekoppelte Non-Target Analytik liefert einen Einblick in die Substanzvielfalt an Spurenstoffen in einer Wasserprobe [1]. Ein Problem ist, dass nur ein geringer Anteil dieser Stoffe derzeit identifiziert werden kann. Für die Beurteilung bzw. Bewertung der Kontamination ist die Kenntnis über deren Wirkung entscheidend.

Direkte biologische Testverfahren (Bioassays) von Wasserproben können beispielsweise Informationen zu neurotoxischen oder endokrinen Wirkungen liefern. Die Wirkung kann aber nicht bestimmten Substanzen oder Substanzgruppen zugeordnet werden. Durch die Anwendung der Wirkungsbezogenen Analytik (WBA), eine Kombination von Fraktionierung mit einem Bioassay und chemischer Analytik, ist eine differenzierte Beurteilung der Wirkung möglich [2, 3]. Je selektiver die Fraktionierung durchgeführt wurde, umso wahrscheinlicher wird es, einen Bezug zwischen Substanz/-gruppe und Wirkung herzustellen. Eine erprobte Fraktionierungsmethode ist die Anwendung der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC, High-performance thin-layer chromatography).

Die offene Trennschicht ermöglicht, im Gegensatz zur Trennsäule, nicht nur die Anwendung von unterschiedlichen Detektionstechniken wie beispielsweise UV-VIS Absorption, Fluoreszenz, Farbreaktionen durch Derivatisierung und in den letzten Jahren verstärkt die Massenspektrometrie, sondern auch die direkte Durchführung von unterschiedlichen Bioassays auf der Dünnschichtplatte. Dadurch ist es möglich, beim Auftreten einer Wirkung in einer Bande diese gezielt auf die Wirksubstanzen zu untersuchen. Eine Substanzidentifizierung erfolgt in der Regel durch eine Extraktion aus den Substanzbanden mit einem speziellen Interface, welches entweder direkt mit einem Massenspektrometer gekoppelt ist oder das Extrakt in ein LC-MS System zur zusätzlichen Trennung überführt [4]. Interferenzen der Assay-Detektionssysteme mit der Eigenabsorption der unbekanntesten Substanzen sowie eine unvollständige und örtlich unpräzise Extraktion der Substanzen aus der Dünnschicht für die LC-MS Identifizierung sind limitierende Faktoren. Wünschenswert wäre zudem eine Automatisierung, die eine genauere Quantifizierung der Stärke und Art der biologischen Wirkung der Schadstoffe ermöglicht. In dem hier vorgestellten Lösungsansatz wird die Kopplung eines nL-Dispensing Systems mit bildgebender MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie) für die wirkungsbezogene HPTLC-Analytik vorgestellt. In der bildgebenden MALDI-MS wird die zu untersuchende Dünnschicht zunächst mit einer Matrix, einem kleinen organischen Molekül, beschichtet. Danach kann diese Oberfläche orts aufgelöst mit einem Laserstrahl punktförmig abgerastert werden. Hierbei wird die Energie des Laserlichts auf die Matrix übertragen, es kommt zu einer sanften Ionisierung der in der Schicht vorhandenen Substanzen. Durch diese Ionisierung ist es möglich, für jede Position ein Massenspektrum zu erzeugen. Aus den Massenspektren der einzelnen Positionen wird ein Bild berechnet, bei dem die Signale der verschiedenen ausgewählten m/z-Verhältnisse farbkodiert sind. In der computererzeugten Darstellung dient die Farbtintensität als Skala für die gewählte Messgröße (z.B. Intensität).

Zur Evaluierung dieses Systems wird der Acetylcholinesterase-Bioassay auf der HPTLC-Platte zur Detektion neurotoxischer Substanzen eingesetzt. Die Neurotoxizität von Spurenstoffen hat einen Einfluss auf die Festlegung des gesundheitlichen Orientierungswertes (GOW-Konzept) für Trinkwasser [5].

## Material und Methoden

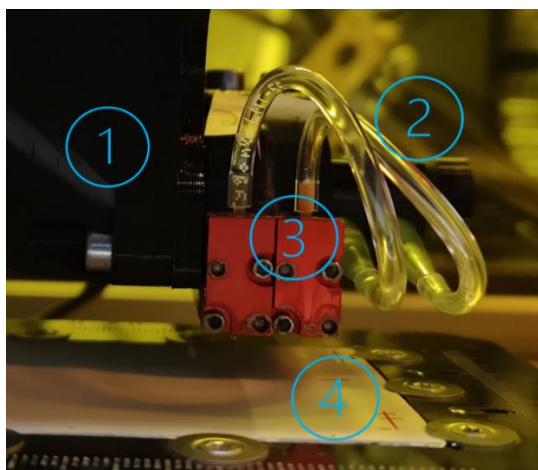
### Massenspektrometrische Methoden

Als Massenspektrometer wurde ein MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics), ausgestattet mit einem Nd:Yag Laser (355 nm) mit einer Wiederholungsfrequenz von 2 kHz, eingesetzt. Die Messungen wurden mit super-Dihydroxybenzoesäure (sDHB, eine 9:1 (w/w) Mischung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure) als MALDI-Matrix (Fisher Scientific, GmbH, UK, 99 % Reinheit) im positiven Ionenmodus mit einem Massenbereich von 0 - 1000 Da durchgeführt. Die Laserleistung wurde manuell auf ein Optimum zwischen Ionisationseffizienz und Auflösung angepasst.

Als Trägermaterial für die bildgebende MALDI-Massenspektrometrie wurden HPTLC-Fertigplatten mit einer Schichtdicke von 0,20 mm (NANO-SIL-20 / UV254, Macherey & Nagel GmbH & Co.KG, Düren, DE) eingesetzt. Diese basieren auf einer mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolie, da die HPTLC Platte für die Funktionsweise der MALDI-Ionenquelle leitfähig sein muss.

### Dispenser System

Als Grundlage für den entwickelten Dispenser für die Dosierung auf die HPTLC-Platte dient der Nano-Dispenser PipeJet P9 Druckkopf (BioFluidix GmbH, Freiburg, DE). Dieser wurde in einen Universal Robot 3 (Universal Robots GmbH, München, DE) eingebaut. Die Ansteuerung des Systems erfolgt mit einem selbstentwickelten Programm, geschrieben in Python (Version 3.8.) Dieses steuert die Tröpfchen-Abgabe des Druckkopfes während des Dispensingvorgangs im Nanoliterbereich und die Position der orts aufgelösten Abgabe ( $\pm 0,3$  mm). Die Abbildung 1 zeigt den Aufbau des Dispensers.



**Abb. 1:** Aufbau des Dispensers. (1) Roboterarm, (2) Lösungsmittelreservoir, (3) PipeJet-Druckköpfe mit integrierter Kapillare, (4) MALDI-Target mit eingespannter HPTLC-Platte.

### Acetylcholinesterase-Hemmtest

Für den Acetylcholinesterase-Hemmtest wurde ein auf der MALDI-MS Detektion der Hydrolyse des natürlichen Substrates Acetylcholin basierender HTS-Assay aus der Literatur [6] etabliert und auf die HPTLC-Platte übertragen. Als Substratlösungen für den Hemmtest in Lösung wurden 10 mM Acetylcholin- und Acetylthiocholin- (Sigma Aldrich, > 99%) Lösungen (TRIS-HCl, pH 7,8) und als Enzym die Acetylcholin-Esterase aus *Electrophorus electricus* (Zitteraal, lyophilisiertes Pulver, Enzymaktivität  $\geq 1,000$  units/mg Protein, Merck KGaA, Darmstadt, DE) eingesetzt. Als EnzymstammLösung (0,8 M Tris-Puffer, pH 7,8) wurde eine Aktivität von 2,5 U/ml eingestellt. Die Enzymreaktion wurde nach 5 Minuten mit Acetonitril beendet (finale Konzentration 20%). Für die MALDI-MS Messung wurden 0,5  $\mu$ L Assaylösung und 0,5  $\mu$ L (5 g/L sDHB Lösung in 75% [v/v] Ethanol) auf einem Anchor-Chip Target (Bruker Daltonics) zusammengegeben und an der Luft getrocknet. Für das AChE-Bioassay auf der HPTLC-Platte wurde eine Lösung mit einer Aktivität von 10 U/ml eingesetzt. Für das Dispensingprotokoll wurde eine 500  $\mu$ m Kapillare mit einem Tröpfchenabstand von 0,7 mm verwendet. Nach 1 - 5 Minuten wurde die Reaktion durch Trocknung mit einem Heißluftfön beendet. Für die bildgebende MALDI-MS wurde sDHB (50 g/l in 75% [v/v] Ethanol) als Matrix aufgegeben und an der Luft getrocknet. Für die bildgebenden MALDI-MS Messungen wurde ein Raster von 400  $\mu$ m und 1000 Laserschüsse pro Position eingestellt.

### AChE-Inhibitoren

In Tabelle 1 sind die verwendeten Inhibitoren mit der Summen- und Strukturformel, sowie der monoisotopischen Masse zusammengestellt.

## Ergebnisse und Diskussion

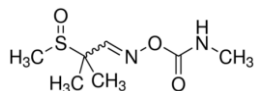
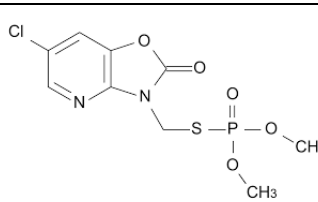
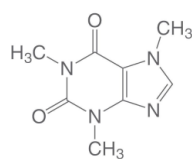
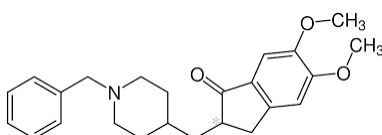
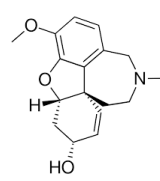
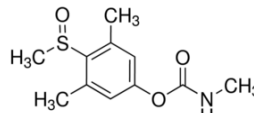
### Evaluierung des Dispensingvorgangs

Die Qualität des entwickelten Dispensingvorgangs ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Fläche der Auftragung und das aufgetragene Volumen kann durch die Variation der Kapillare beeinflusst werden, welche in dem Druckkopf austauschbar integriert ist. Abb. 2 zeigt den Zusammenhang zwischen Kapillargröße und Auftragungsfläche, wobei das Auftragungsvolumen der 500  $\mu$ m Kapillare bei 70 nL/Spot und bei der 200  $\mu$ m Kapillare bei 25 nL/Spot lag. Die Auftragsgeschwindigkeit konnte auf 13 Tropfen pro Sekunde optimiert werden.



**Abb. 2:** Reproduzierbarkeit der Auftragung der Matrix sDHB 3 mm Spotabstand mit 500  $\mu$ m Kapillare (oben), 2 mm Abstand mit 200  $\mu$ m Kapillare (unten) – UV-Detektion bei 254 nm.

**Tabelle 1:** Zusammenstellung der verwendeten AChE-Inhibitoren

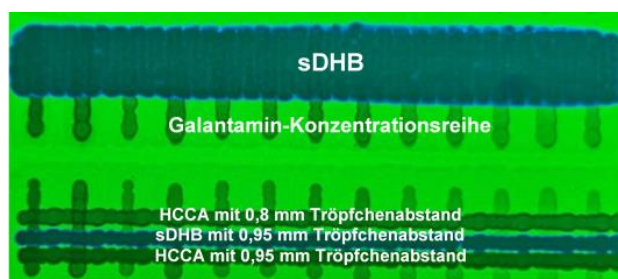
Nr.	Strukturformel	Name Summenformel	monoisotopische Masse [Da]
1		Aldicarb-Sulfoxid C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	206,072510
2		Azamethiphos C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS	323,973663
3		Koffein C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	194,080383
4		Donepezil C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	379,214752
5		Galanthamin C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	287,152130
6		Methiocarb-sulfoxid C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S	241,077271

### Nachweis von AChE-Inhibitoren durch MALDI-MS

Zunächst wurde der Effekt des Dispensing-Systems auf die MALDI-MS-Nachweisstärke des AChE-Inhibitors Galantamin (ein Alzheimer-Medikament) auf einem Edelmetalltarget untersucht, da dieses für Routinemessungen eingesetzt wird. Hierzu wurde der Biofluidix-Druckkopf mit einer 200 µm Kapillare als Dispensing-Einheit ausgestattet und für die Abgabe der Matrix und der anderen Reagenzien verwendet. Die Nachweisgrenze von Galantamin (25 nL Aufgabevolumen, 50 µm Spotdurchmesser, sDHB als MALDI-Matrix) wurde mit 0,0003 ng/Spot (1,1 fmol/Spot, S/N = 6) abgeschätzt. Eine manuelle Aufgabe (1 µL) erzielte hierbei eine wesentlich schlechtere Nachweisgrenze von 300 fmol/Spot.

In einem Folgeschritt wurde die Nachweisstärke der AChE Inhibitoren auf der HPLC-Platte bestimmt. Abbildung 3 zeigt beispielhaft eine mit der Dispensingeinheit aufgetragene

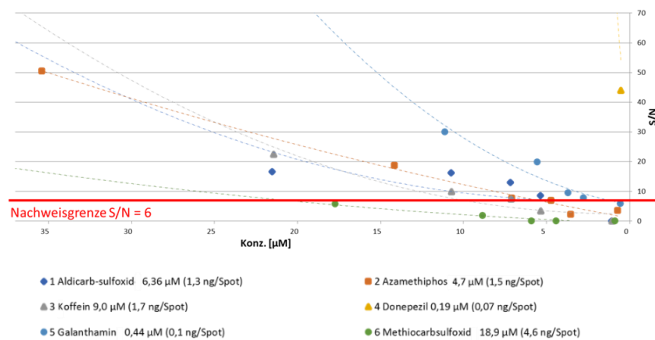
Verdünnungsreihe von 13 Galantaminkonzentrationen (senkrechte Banden) auf der HPLC-Platte



**Abb. 3:** Beispiel für die Auftragung (500 µm Kapillare) einer Galantamin-Konzentrationsreihe im Abstand von 5 mm und einer Bandenlänge von 10 mm (3 Wiederholungen) auf die HPLC-Platte. Detektion durch UV-Licht (254 nm).

Danach erfolgte die Auftragung der MALDI-MS Matrix sDHB als Vorbereitung für die bildgebende MALDI-MS. Es ist zudem

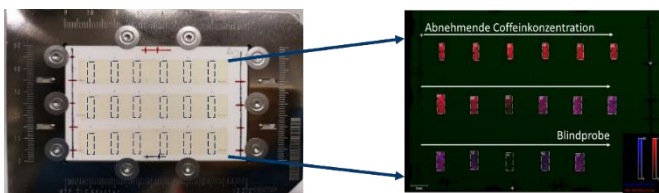
möglich auch andere Matrices, wie z.B.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA), aufzutragen. Nach Auftragen der MALDI-Matrix sDHB wurde durch bildgebende MALDI-MS die Nachweisgrenzen der sechs Inhibitoren bestimmt (Abb. 4). Die Ergebnisse zeigen, dass die Kieselgelschicht zu einer wesentlichen Verschlechterung der Nachweisstärke führt. Im Vergleich zu Messungen auf Edelmetalltargets, müssen die Bedingungen für eine ausreichend hohe Nachweisstärke von AChE-Inhibitoren auf der Kieselgelschicht weiter optimiert werden, um reale Proben analysieren zu können.



**Abb. 4:** Bestimmung der Nachweisgrenze ( $S/N = 6$ ) von 6 verschiedenen Acetylcholinesteraseinhibitoren auf der HPLTC-Platte

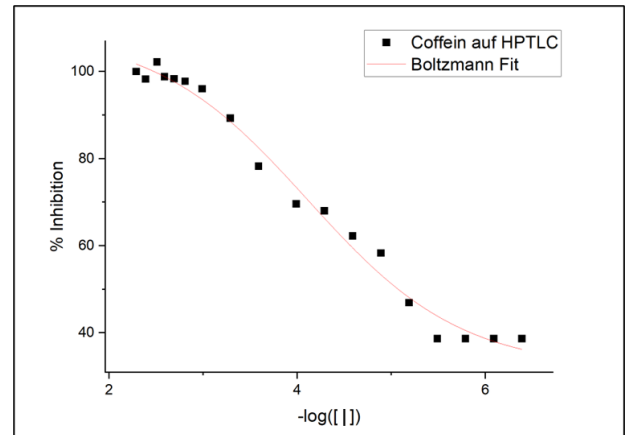
### Bestimmung von $IC_{50}$ -Werten durch bildgebende MALDI-MS

Die Durchführung von enzymatischen Reaktionen, wie dem AChE-Bioassay, ist auf einer HPTLC-Platte möglich und erlaubt die Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten. Die Vorgehensweise wird beispielhaft in Abbildung 5 für den AChE-Inhibitor Koffein dargestellt. Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wird der Acetylcholinesterasebioassay bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen auf der HPTLC-Platte durchgeführt. Bildgebende MALDI-MS dient hierbei als Detektionsverfahren für das Enzymsubstrat und das Hydrolyseprodukt.



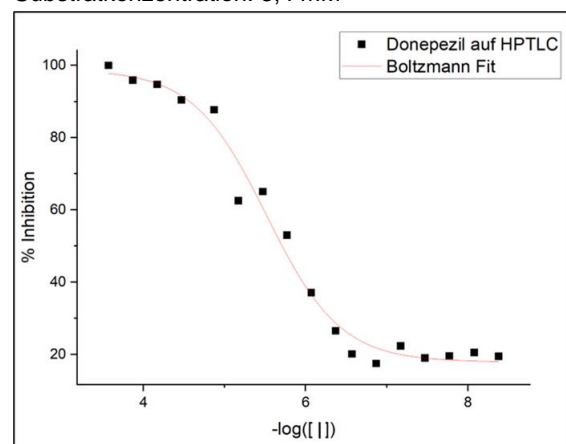
**Abb. 5:** MALDI-MS Imaging

**links:** Bild der im MALDI-Taget eingespannten HPTLC-Platte mit 15 verschiedenen Koffeinkonzentrationen ( $0,8 \mu\text{M}$  bis  $5,2 \text{ mM}$  und Blindproben) und einem Auftragsvolumen von  $10 \mu\text{L}$  (blaue Kästen: Messbereiche der bildgebenden MALDI-MS). **rechts:** Farbcodierung der massenspektrometrischen MALDI-MS Signale. Rot: Intensität des Acetylcholin(Edukt)-Signals. Blau: Intensität des Cholin(Produkt)-Signals.



$IC_{50}$  Koffein  $77 \pm 6 \mu\text{M}$

Substratkonzentration:  $3,4 \text{ mM}$



$IC_{50}$  Donepezil  $3 \pm 1 \mu\text{M}$

Substratkonzentration:  $3,4 \text{ mM}$

**Abb. 6:** Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren Koffein und Donepezil durch bildgebende MALDI-MS auf der HPTLC-Platte.

Die Auftragung der Messwerte zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte ist in Abbildung 6 dargestellt. Als Vergleichsmessungen wurden  $IC_{50}$ -Werte in Lösung ermittelt, wobei Aliquote für die Bestimmung des Substratumsatzes durch MALDI-MS entnommen wurden. Für den schwachen Inhibitor Koffein zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Literaturwerten ( $87 \mu\text{M}$  (mit Acetylthiocholin als Substrat [7]), dem in Lösungs-Bioassay mit MALDI-MS Detektion bestimmten Wert ( $66 \mu\text{M} \pm 6 \mu\text{M}$ ) und dem Ergebnis der bildgebenden MALDI-MS auf der HPTLC-Platte ( $77 \mu\text{M} \pm 6 \mu\text{M}$ ). Auf der HPTLC-Platte musste aufgrund der limitierten Substratnachweisstärke eine im Vergleich zu dem Bioassay in Lösung höhere Substratkonzentration von  $3,4 \text{ mM}$  eingesetzt werden. Dies führte bei dem starken AChE-Inhibitor Donepezil zu einem im Vergleich zur Literatur höheren  $IC_{50}$ -Wert ( $3 \pm 1 \mu\text{M}$ ), da dieser von der Substratkonzentration abhängig ist. Das Ergebnis des auf MALDI-MS basierenden Bioassays mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $18 \pm 2 \text{ nM}$  ist vergleichbar mit dem Literaturwert ( $35 \pm 3 \text{ nM}$  (Acetylthiocholiniodid als Substrat)) [8].



## Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die prinzipielle Machbarkeit von bildgebender MALDI-MS als Detektionsverfahren für die Substanzidentifikation und für die Bestimmung der Inhibitionswirkung von neurotoxischen Substanzen durch einen Acetylcholin-Bioassay. Bildgebende MALDI-MS kann eine Substanzextraktion aus der Dünnschicht und eine aufwendige Assayentwicklung mit Substratanaloga vermeidbar machen. Die vorgestellte Miniaturisierung der Auftragechnik durch einen PipeJet-Nanoliterdispenser ermöglicht vielfältige Anwendungen. Die Auftragung verschiedener Konzentrationen der zu untersuchenden Umweltproben auf die HPLTC-Platte erlaubt die Bestimmung von Dosis-Wirkungsbeziehungen. Die Auftragung von verschiedenen Substratkonzentration kann zudem die Bestimmung des Inhibitionsmechanismus von Enzyminhibitoren erlauben. Nicht zuletzt scheint es möglich, verschiedene Assays der wirkungsbezogenen Analytik auf einer HPTLC-Platte durchzuführen. Die Hauptlimitation ist derzeit die Einschränkung der Nachweisstärke der Substanzen und der Enzymsubstrate. Ein Lösungsansatz wäre hier die Herstellung von HPTLC-Platten mit geringerer Schichtdicke und anderen Trägermaterialien.

## Danksagung

Das Projekt wurde durch das Land Baden-Württemberg (Innovatives Projekt Trinkmass), die Landeswasserversorgung Stuttgart, Bruker Daltonics, Biofluidix und von Macherey & Nagel finanziell und durch geldwerte Leistungen unterstützt. Für Ihre fachliche Unterstützung bedanken wir uns bei L. Betz und W. Seitz (Landeswasserversorgung Stuttgart), J. Fuchser (Bruker Daltonics), S. Schork (Biofluidix) und C. Falk (Macherey & Nagel).

## Literatur

- [1] J. Hollender, E.L. Schymanski, H.P. Singer, et al., "Nontarget screening with high resolution mass spectrometry in the environment: Ready to go?" *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 11505-11512.
- [2] W. Brack, S. Aït-Aïssa, R.M. Burgess, et al., "Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments - An in-depth overview". *Sci. Total Environ.* 544 (2016) 1073-1118.
- [3] S. C. Weiss, N. Egetenmeyer, W. Schulz, "Coupling of in vitro bioassays with planar chromatography in effect-directed analysis". In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 157, p. 187-224, DOI: 10.1007/10\_2016\_16.
- [4] L. Stütz, S. C. Weiss, W. Schulz, W. Schwack, R. Winzenbacher, "Selective two-dimensional effect-directed analysis with thin-layer chromatography". *J. Chromatogr. A* 1524 (2017) 273–282.
- [5] Umweltbundesamt (2003) „Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser aus gesundheitlicher Sicht“ *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 46:249-251 doi:10.1007/s00103-003-05
- [6] C. Haslam, J. Hellicar, A. Dunn, et al., "The evolution of MALDI-TOF mass spectrometry toward ultra-high-throughput screening: 1536-well format and beyond". *J. Biomol. Screen.* 21 (2016) 176–186.
- [7] N. Karadsheh, P. Kussie, D. S. Linthicum, "Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives". *Toxicol. Lett.* 55 (1991) 335-342.
- [8] F. Li, Z.-M. Wang, J.-J. Wu, J. Wang, S.-S. Xie, J.-S. Lan, W. Xu, L.-Y. Kong, X.-B. Wang, „Synthesis and pharmacological evaluation of donepezil-based agents as new cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential application against Alzheimer's disease". *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31 (2016) 41–53.

## Kontaktadresse

Prof. Dr. Hans-Dieter Junker  
Fakultät Chemie  
Hochschule Aalen  
Beethovenstraße 1 / 73430 Aalen  
T +49 7361 576-2306  
E-Mail: [hans-dieter.junker@hs-aalen.de](mailto:hans-dieter.junker@hs-aalen.de)