

secrets of science

magazine

01 / 2023



Schnellerer Durchsatz. Gemeinsam.

Neue optimierte Lösung für die Analyse von Immunsuppressiva mittels LC-MS/MS

Niemals im Dunkeln

Shimadzu automatisiert präzise Prüfungen von Aluminium-Stahl-Seilen für Freileitungen

Kosmetika – wie rein ist rein?

TOC-gestützte Reinigungsvalidierung



Schnellerer Durchsatz. Gemeinsam.
 Neue optimierte Lösung für die Analyse von Immunsuppressiva mittels LC-MS/MS **Seite 22**



Kosmetika – wie rein ist rein?
 TOC-gestützte Reinigungsvalidierung



Newsletter
 Aktuelle Nachrichten von Shimadzu direkt in Ihr Postfach mit den Shimadzu Europa Updates.



Jetzt registrieren!

Seite 14

Die fünf Kategorien in der „Secrets of Science“

SWITCH ON
 Erfahren Sie mehr über unsere Produkte und Applikationen sowie aktuelle Themen.

MOVE ON
 Wir begeben uns auf Neuland: neue Anwendungen und Einsatzgebiete unserer Systeme und neue Konfigurationen für Applikationen.

ON SHOW
 Shimadzu vor Ort: Berichte zu Events, Ausstellungen und Seminaren.

VOICES
 Hier kommen unsere Kunden zu Wort in Interviews, Gastbeiträgen und Kommentaren.

HANDS-ON
 Servicethemen sowie Tipps und Tricks zu unseren Geräten (Funktionen, Wartung etc.).



Niemals im Dunkeln
 Shimadzu automatisiert präzise Prüfungen von Aluminium-Stahl-Seilen für Freileitungen

04



Kundenspezifische Messgeräte ebnen den Weg für bahnbrechende Erkenntnisse
 Wissenschaftler am UCL erforschen mit einem maßgeschneiderten GC-System neue Grenzen in der chemischen Technik

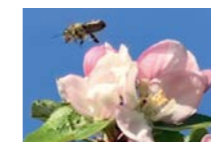
08



Hochwertige Analyse auch bei geringer Konzentration

Bewertung eines MRM-Verfahrens zur Bestimmung von PAK in Palmöl mittels GC-MS/MS

18



Schnellere Bestimmung von Chloramphenicol in Honig

Neues Verfahren kombiniert DPiMS-8060 mit dem LCMS-8060NX für schnellere Messungen

28



Rostschutz mit Röntgenstrahlung

Das EDX-7200 als Schweizer Taschenmesser in der Galvanik-Qualitätskontrolle

32



Verbesserungen in der Entwicklung von Biopharmazeutika

Hochwertige, metallfreie LC-MS-Analyse von therapeutischen Oligonukleotiden

38



Veranstaltungen

44

Shimadzu automatisiert präzise Prüfungen von Aluminium-Stahl-Seilen für Freileitungen

Niemals im Dunkeln

Dipl.-Ing. Piotr Szade, Central Mining Institute

Ein Stromnetz ist eine gesellschaftlich und wirtschaftlich kritische Anlage, deren Komponenten strenge Leistungs- und Sicherheitsanforderungen erfüllen müssen. Das polnische Central Mining Institute (GIG) prüft die mechanischen Eigenschaften von Freileitungen auf die Konformität mit aktuellen Normen. Mithilfe von Shimadzu Geräten kann das GIG den Prüfprozess automatisieren und menschliche Fehler minimieren. Das Ergebnis ist ein einfaches und zuverlässiges Verfahren.



Stromübertragung

Elektrische Energie ist für unsere heutige Lebensweise unverzichtbar. Dies setzt voraus, dass der Strom von den Stromerzeugungsanlagen bis zu den Verteilernetzen über große Distanzen übertragen wird. Dafür kommen seit mehr als einem Jahrhundert Hochspannungsleitungen zum Einsatz. Für die Stromübertragung mit Spannungen von über 100 kV werden blanken Freileitungen verwendet. Die Leiterseile bestehen in der Regel aus Aluminium.

Zwei sehr unterschiedliche Materialien

Um eine ausreichende Biegefestigkeit zu gewährleisten, werden die Leiter in Form eines spiralförmigen Strangs hergestellt, der aus Drähten mit einem Durchmesser von 1,2 bis 5 mm besteht. Doch am gebräuchlichsten sind Aluminium-Stahl-Seile, bei denen die Aluminiumleiter auf einen tragfähigen Stahlkern aufgebracht werden. Das Querschnittsverhältnis von Aluminium zu Stahl variiert und kann standardmäßig von 1,25 bis 20 reichen. →

Aluminium-Stahl-Leitungen bestehen also aus gezogenen Aluminium- und Stahldrähten, die kombiniert werden, um die mechanischen Eigenschaften der Leitungen zu verbessern. Dies ist deshalb so wichtig, weil die Leitungen während des Betriebs einer Reihe mechanischer Faktoren ausgesetzt sind: konstanten Faktoren wie Spannung und Eigengewicht sowie variablen Faktoren wie Vereisung, Temperatureinflüssen und Winddruck sowie den daraus resultierenden Schwingungen.

Diese Materialien müssen gut zusammenarbeiten, obwohl ihre mechanischen Parameter sehr unterschiedlich sind: Aluminiumdraht hat eine Zugfestigkeit von 160 bis 325 MPa, während Stahl eine Zugfestigkeit von mehr als 1.800 MPa aufweisen kann. Berücksichtigt man außerdem die Unterschiede beim Elastizitätsmodul und bei der Bruchdehnung, lassen sich die mechanischen Eigenschaften einer kompletten Leitung nur schwer vorher-sagen. Die maximale Belastung, die auf die Stahldrähte in einem verseilten Leiter einwirkt, entspricht der Dehnung, bei der die Aluminiumdrähte brechen. In der Praxis und in Normen wird diese Dehnung mit 1 % angenommen und als Grundlage für die Berechnung der nominellen Bruchfestigkeit von Aluminium-Stahl-Leitern herangezogen.

Die Prüfung von Leitern für Freileitungen

Leitungen sind kritische Komponenten von Stromnetzen und müssen deshalb eine Reihe standardisierter Anforderungen erfüllen. Innerhalb der EU gilt für Runddraht-Freileitungen die Norm DIN EN 50182. Diese legt die Anforderungen fest, die ein in Betrieb befindlicher Leiter erfüllen muss, und beschreibt die entsprechenden Prüfverfahren. Sie beinhaltet außerdem spezifische Prüfungen für die Drähte, aus denen ein Leiter besteht, darunter ein genormter Zugversuch und weitere Prüfungen der mechanischen Eigenschaften. Da die Messergebnisse herangezogen werden, um die Festigkeit der gesamten Leitung zu berechnen, müssen die Ergebnisse möglichst genau sein, um die Qualität und somit die Sicherheit von Freileitungen zu gewährleisten.

Die Bestimmung der Belastung, die auf einen Stahldraht bei einer Dehnung von 1 % einwirkt, umfasst mehrere Schritte. Im ersten Schritt wird der Draht in ein Prüfgerät eingespannt und mit einer definierten Vorlast beaufschlagt. Anschließend wird ein Extensometer direkt an der Probe angesetzt, um die Dehnung zu bestimmen. Im letzten Schritt wird die Probe so lange gedehnt, bis das Extensometer eine Gesamtdehnung von 1 % der Anfangsmesslänge anzeigt

und die Kraft an der Prüfmaschine abgelesen. Dieses Verfahren ist komplex und beinhaltet potenzielle Quellen für Messfehler. Zudem gilt es für gerade Drähte (Kerndrähte oder Drähte vor der Verseilung), die keine Formabweichung aufweisen.

Vereinfachtes Verfahren dank Automatisierung

Diese Prüfung wird regelmäßig bei Power Grid Systems – einem akkreditierten Labor des Central Mining Institute (GIG) im polnischen Katowice – durchgeführt. Dafür wird die Probe in eine Shimadzu AGX-V 300 kN Universalprüfmaschine eingebracht, die mit hydraulischen Spannwerkzeugen von DEMGEN mit automatischer Druckanpassung ausgestattet ist. Die anschließenden Prüfschritte werden automatisch nach dem in der Shimadzu Trapezium-Software eingegebenen Verfahren und der gemessenen Probengeometrie durchgeführt. Der Draht wird mit einer der Vorlast entsprechenden Kraft gezogen und das Shimadzu SIE-560A Extensometer mit einer Anfangsmesslänge von 250 mm automatisch an die Probe geklemmt.

Die Probe wird gleichmäßig gedehnt, bis eine Gesamtdehnung von 1 % erreicht ist. Die Kraft- und Dehnungs-

daten, die diesem Punkt entsprechen, werden vom System automatisch präzise bestimmt und von der Software in ein Ergebnis für die Belastung bei einer Dehnung des geprüften Stahldrahts von 1 % umgewandelt. Auf Grundlage dessen wird ermittelt, ob die Probe den Anforderungen der geltenden Norm entspricht. Durch diese Art der Prüfung werden Fehler vermieden, die sich aus dem manuellen Einsatz und Ablesen des Extensometers ergeben. Die große Messbasis führt zudem zu einer hervorragenden Messgenauigkeit.

Mit dem weltweit steigenden Stromverbrauch nimmt auch der Bedarf an entsprechender Infrastruktur einschließlich der Übertragungsnetze zu. Daher ist es entscheidend, dass die effiziente Überprüfung der Sicherheit und Leistung von Freileitungen so einfach ist wie das Betätigen eines Lichtschalters. Hochwertige Messgeräte und Software machen das möglich.

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.

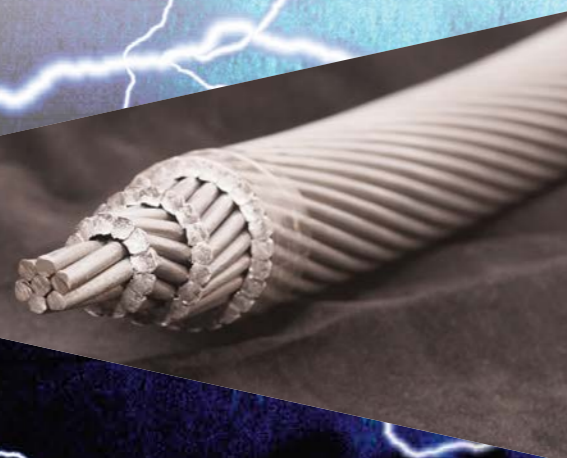


Abbildung 1: Beispiel für ein Aluminium-Stahl-Seil zur Prüfung

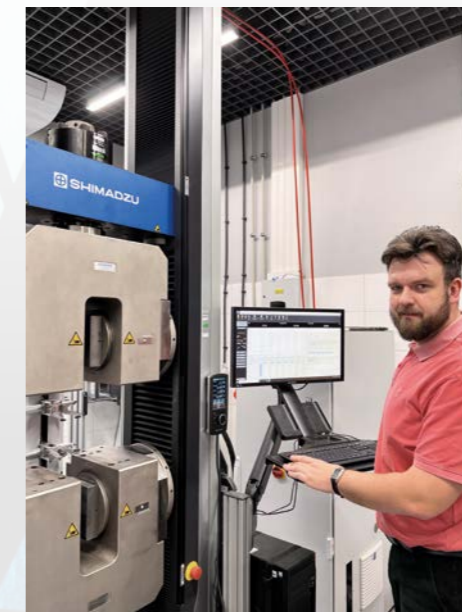


Abbildung 2: Prof. Jerzy Korol, Leiter des Labors für Materialtechnologien und Recycling am GIG-Institut

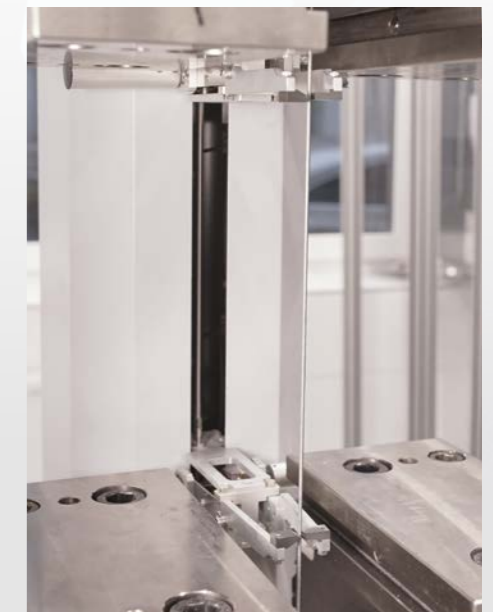


Abbildung 3: Ein runder Stahldraht eines zu prüfenden ACSR-Leiters



Kundenspezifische Messgeräte ebnen den Weg für bahnbrechende Erkenntnisse

Wissenschaftler am UCL erforschen mit einem maßgeschneiderten GC-System neue Grenzen in der chemischen Technik



Dr. Han Wu, Dr. Nidhi Kapil, UCL Centre for Nature Inspired Engineering, London

Der Bedarf an umweltfreundlicheren Prozessen für die Herstellung von Grundchemikalien und Brennstoffen sowie der Wunsch, Industrieabgase wie CO₂ zu recyceln, bilden die Grundlage für ein vollkommen neues Forschungsgebiet im Bereich innovativer chemischer Prozesse. Ein Wegbereiter auf diesem Gebiet ist das Centre for Nature Inspired Engineering (CNIE) am University College London (UCL). Wir sprachen mit zwei Wissenschaftlerinnen des CNIE über die Wichtigkeit der Messgeräte für diese Forschung und über die besondere Rolle der kundenspezifischen Gaschromatographie-Systeme (GC) von Shimadzu.

Eine Leidenschaft für Messgeräte

Der wissenschaftliche Fortschritt, so sagt man, hänge von der Leistungsfähigkeit der Messgeräte ab. Dass das zutrifft, weiß kaum jemand besser als Dr. Han Wu vom Centre for Nature Inspired Engineering (CNIE) der Fakultät für Chemietechnik am University College London (UCL).

Seit 2018 leitet Dr. Wu das Labor für das CNIE und die gesamte Fakultät für Chemietechnik. In dieser Position verantwortet sie den Einkauf und die Wartung zahlreicher Messgeräte, die für viele Forschungsprojekte unverzichtbar sind. Daher weiß sie genau, wie entscheidend die Leistungsfähigkeit der Geräte für den Forschungserfolg ist.

Schon früh interessierte sich Dr. Wu für Messgeräte. Als Doktorandin an der Universität Sheffield beschäftigte sie sich mit Polymorphismus in pharmazeutischen Materialien und nutzte verschiedene Analyseverfahren wie Synchrotron-Röntgenbeugung, HPLC, thermogravimetrische Analyse, dyna-

mische Differenzkalorimetrie, Raman-Spektroskopie und viele mehr. „Durch erkannte ich nicht nur, wie effektiv analytische Verfahren sind“, sagt sie heute. „Mir wurde auch bewusst, wie groß der Unterschied zwischen der Erfassung verlässlicher Daten in der Praxis und den idealisierten Szenarien in den Lehrbüchern ist!“ Bei ihrer Forschungsarbeit wurde sie vom technischen Personal der Universität Sheffield und der Synchrotronanlage unterstützt: „Wir sprachen häufig über meine Arbeit und ich ließ mich zum bestmöglichen Einsatz der Messgeräte beraten. Dadurch lernte ich das Fachwissen der technischen Mitarbeiter sehr zu schätzen.“

Diese Erfahrung erwies sich als Wendepunkt in ihrer Karriere. „Die Forschung war zwar meine Leidenschaft und ich setzte diesen Weg am UCL fort. Ich stellte aber auch fest, wie viel Spaß es mir macht, andere Wissenschaftler bei ihrer Forschungsarbeit zu unterstützen. Als eine Stelle als Research Technician am CNIE ausgeschrieben wurde, bewarb ich mich deshalb sofort!“ →

Die Rolle chromatographischer Systeme am CNIE

Die erste Anschaffung von Dr. Wu in ihrer neuen Position war die erste Anlage für Röntgenstreuung mit kleinem Einfallswinkel am UCL. Seitdem haben sich ihr Aufgabenbereich und ihre Expertise erheblich erweitert. Heute wird sie von einem Team aus drei Technikern unterstützt, die unter anderem sieben Chromatographie-Systeme von Shimadzu betreuen. Diese Geräte sind zwar in den Forschungslabors untergebracht, wo sie am häufigsten genutzt werden, aber Dr. Wu betont, dass die meisten davon auch anderen Forschern zur Verfügung gestellt werden: „Um die Geräte bestmöglich auszunutzen, lohnt es sich, sie bei Bedarf zugänglich zu machen, denn selbstverständlich werden LC und GC für die Analyse aller möglichen chemischen Reaktionen benötigt.“

Zu den Shimadzu Systemen gehören zwei GC-MS/FID, ein GC-System mit reiner Flüssiginjektion und einem Autosampler für 150 Proben, ein neu installiertes GC-System mit BID-Detektor und zwei GC-FID/TCD-Online-Systeme. Am CNIE werden diese GC-Systeme und andere Geräte für Projekte genutzt, die sich bei der Entwicklung von Lösungen für große chemietechnische Herausforderungen von der Natur inspirieren lassen – zum Beispiel Brennstoffzellen nach dem Vorbild der menschlichen Lunge, hierarchisch strukturierte Katalysatoren, selbst heilende

Materialien und nanoporöse Katalysatoren, die die Confinement-Effekte biologischer Systeme nachahmen.

Ein nachhaltigerer Weg zu Propylenoxid

Gerade zum zuletzt genannten Projekt ist in jüngster Zeit sehr viel publiziert worden – dank der Arbeit von Dr. Nidhi Kapil, die vor Kurzem zu diesem Thema promoviert hat. Mit Fördermitteln des saudischen Chemiekonzerns SABIC hat sie mittels des angepassten GC-FID/TCD-Online-Systems die katalytische Oxidation von Propylen zur Grundchemikalie Propylenoxid untersucht. Ziel ist es, nachhaltigere Alternativen zu den klassischen Chlorhydrin- und Hydroperoxid-Verfahren zu finden, bei denen viele Chemikalienabfälle anfallen.

Dr. Kapil erklärt: „An unserer Reaktion sind lediglich Propylen, Wasserstoff und Sauerstoff sowie ein Inertgas beteiligt. Mithilfe eines Katalysators aus Gold entsteht in einem Festbettreaktor bei 200 °C Propylenoxid und Wasser. Das Potenzial für eine umweltschonende Herstellung ist also gegeben. Allerdings müssen Katalysatorstabilität und Produktionsertrag noch verbessert werden und das war der Schwerpunkt meiner Untersuchungen.“

Ich bin von Anfang an in das Projekt involviert und habe nicht nur die Reaktion verfeinert und den Katalysator

optimiert, sondern auch den Reaktor entwickelt. Am Anfang nutzte ich Nano-Katalysatoren und ging anschließend zu Katalysatoren im Meso- und Makromaßstab über, indem ich mir die Eigenschaften von Zeolithen zunutze machte.“

Feinabstimmung des angepassten GC-Online-Systems

Bei einem Online-System mussten Aufbau der Messgeräte und Design des Reaktors Hand in Hand gehen. Dr. Kapil erklärt, wie das System aufgebaut ist: „Grundsätzlich haben wir Wasserstoff, Sauerstoff und Propylenoxidgase, die in etwa gleichen Anteilen in Stickstoff gemischt sind, das als Inertgas wichtige Sicherheitsanforderungen erfüllt. Diese strömen durch das Quarz-Reaktionsrohr im Reaktor und das System läuft ununterbrochen, wobei die ausströmenden Gase von einem angepassten GC-Online-System überwacht werden.“

Nach Gesprächen mit Dr. Wu stand fest, dass Shimadzu die perfekte Wahl für die Bereitstellung des GC-Systems war. „Wir mussten nicht nur die Reaktanten und Produkte trennen können, sondern auch mehrere Nebenprodukte. Da es sich um ein Online-System handelt, mussten die Säulen zudem effizient arbeiten, um die Messzeit möglichst kurz zu halten. Dr. Wu pflegte bereits ausgezeichnete Beziehungen zu Shimadzu, sodass die Gespräche sofort beginnen konnten.“

Obwohl die Herausforderung enorm war, ließ sich das Team von Shimadzu nicht entmutigen, sagt Dr. Wu: „Nach der Feinabstimmung der Anforderungen und der Auswahl der Hardware-Komponenten entschieden wir uns für den optimalen Aufbau und Shimadzu machte sich an die Arbeit. Letztlich dauerte der gesamte Prozess von Anfang bis Ende nur sechs Monate – alles verlief schnell und reibungslos.“ →

► Dieses kundenspezifische GC-System mit Reaktor nutzte Dr. Kapil für ihre Arbeit zur Propylenoxidation. Das System ist in einem begehbaren Abluftraum untergebracht. Es besteht aus einem GC-2014 und verwendet zwei Säulen. Eine Porapak T-Säule und ein FID werden zur Trennung und Detektion von Propylenoxid, Kohlendioxid, Wasser, Propylen und den sauerstoffhaltigen Nebenprodukten Ethanal, Propanal, Aceton und Acrolein verwendet. Für die Permanentgase Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenmonoxid kommen eine Molsieve 5A-Säule und ein TCD zum Einsatz. Das Foto zeigt die Bedienelemente für die Reaktorgase (und Stickstoff) oben links, den Reaktor selbst rechts und den GC in der Mitte.

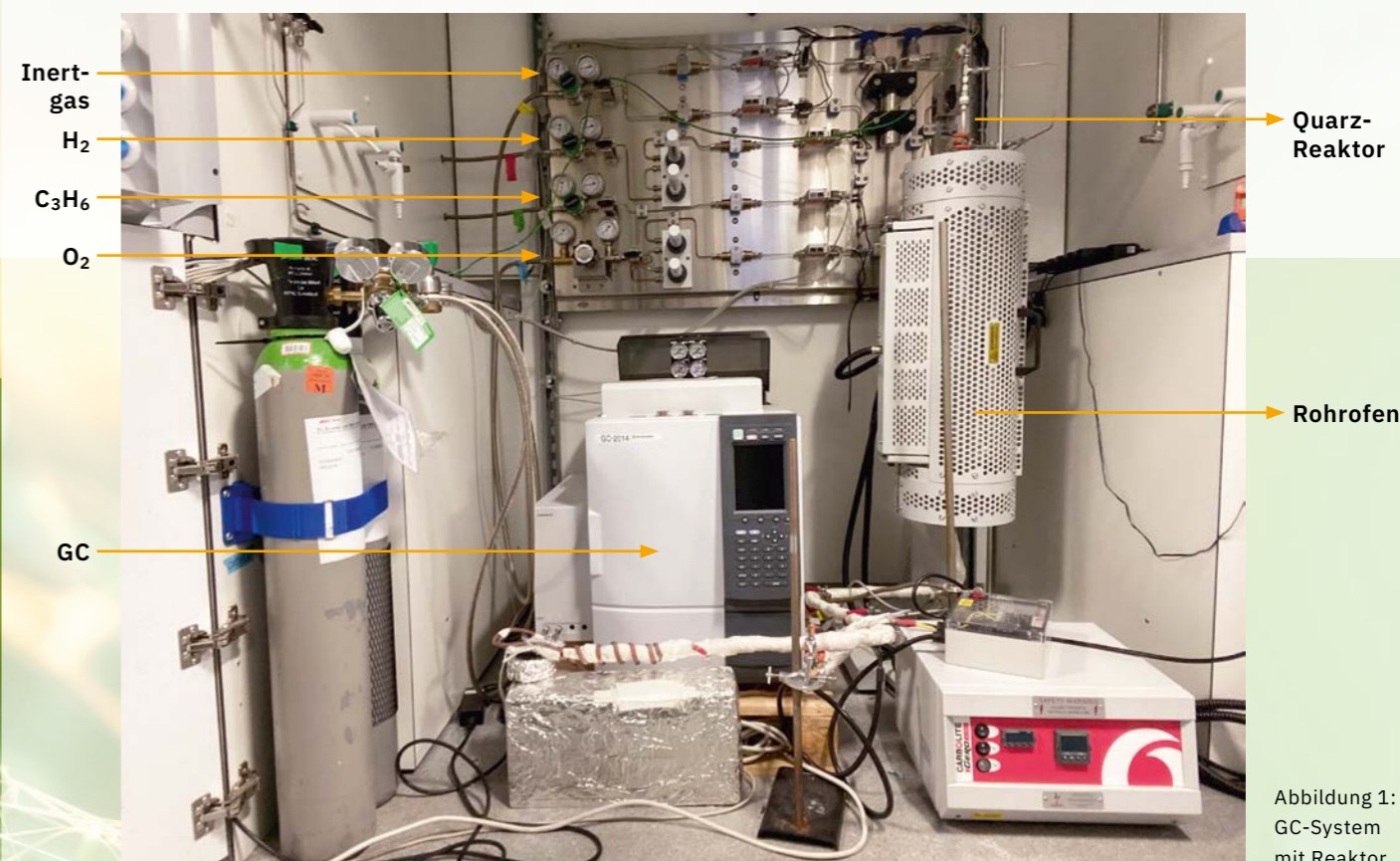


Abbildung 1:
GC-System
mit Reaktor

Effiziente Analyse, eindrucksvolle Ergebnisse

Laut Dr. Kapil erfüllte das Messgerät während ihres gesamten Promotionsstudiums alle Anforderungen: „Alles lief perfekt“, erzählt sie. So konnte sie sich dem Hauptziel ihres Ph.D. widmen: der Erforschung eines effizienten Wegs zu einem optimierten Katalysator. Die Ergebnisse der eigentlichen Reaktion wurden in der Fachzeitschrift *Angewandte Chemie* veröffentlicht und sind beeindruckend: Die Lebensdauer des Katalysators konnte auf über 20 Tage verzehnfacht und die Selektivität für Propylenoxid auf knapp 90 % gesteigert werden.

Besonders beeindruckt war sie von der Robustheit des Systems. „Zunächst ließen wir das System etwa vier Stunden lang laufen. Schließlich konnten wir Durchläufe von bis zu 30 Tagen mit Messungen im Abstand von etwa 40 Minuten durchführen. Dank der hohen

Wiederholbarkeit konnten wir die Performance des Katalysators über längere Zeiträume überwachen und dank der Vernetzung hatte ich das System immer im Blick – selbst als ich vier Tage zu einer Konferenz in den USA war.“

Nachweisgrenzen verschieben, Produktivität steigern

Neben dem maßgeschneiderten GC-FID/TCD, den Dr. Kapil nutzte, half Dr. Wu bei der Auswahl und Beschaffung eines GC-Systems mit dem Barrier Ionization Detector (BID) von Shimadzu für die Arbeitsgruppe von Dr. Yang Lan am CNIE. Dieses ermöglicht die Detektion von praktisch jedem Analyten mit deutlich niedrigeren Nachweisgrenzen als herkömmliche Detektoren. Dadurch reicht laut Dr. Wu die Verwendung eines einzigen Detektors für die sehr komplexen Reaktionssysteme anstatt eines Multi-Detektor-Systems aus einem

TCD und zwei FID. Geplant ist der Einsatz dieses Systems für zwei Projekte unter der Leitung von Dr. Lan: Eins befasst sich mit der photokatalytischen Reduktion von CO₂ und das andere mit der Umwandlung von Methan und Ethan in die entsprechenden Alkohole.

Die hohe Empfindlichkeit bei den ersten Testdurchläufen war beeindruckend: „Im Rahmen des Systemaufbaus injizierten die Forscher das Gas manuell, anstatt es als Online-System laufen zu lassen. Dadurch gerieten gelegentlich winzige Mengen von Luft ins System – und mit dem BID konnten wir Peaks des CO₂ in der Luft sehen, die der Konzentration in der Atmosphäre entsprachen. Das führte uns die Leistungsfähigkeit des BID-Detektors vor Augen!“

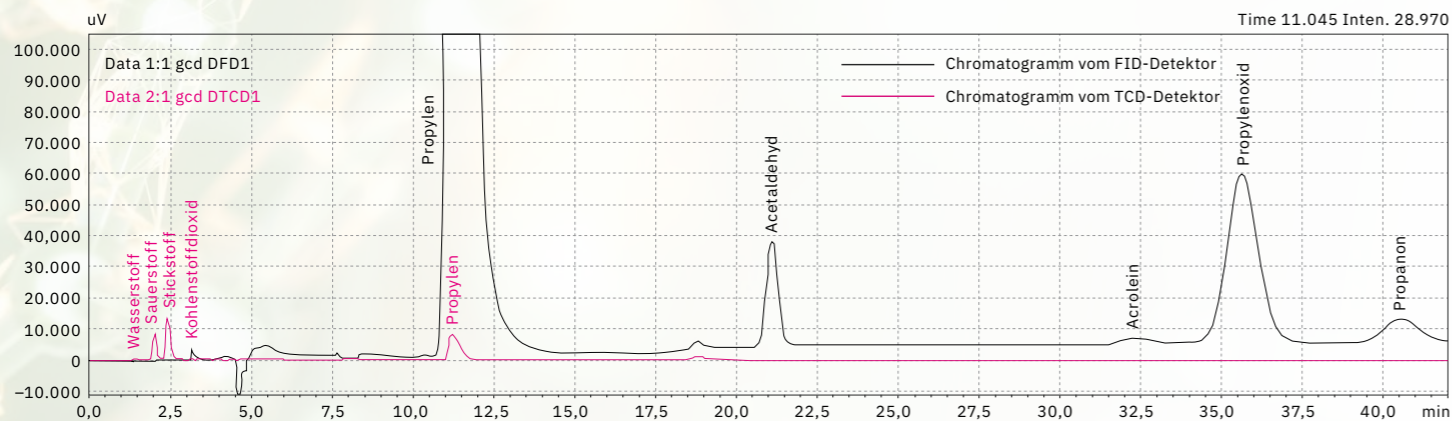


Abbildung 2: Beispielchromatogramm, das Dr. Kapil im Rahmen ihrer Arbeit über die katalytische Epoxidierung von Propylen mit dem kundenspezifischen GC-FID/TCD-System von Shimadzu ermittelte; zu sehen sind die zahlreichen Analyten, die während eines einzigen Durchlaufs nachgewiesen wurden

Persönlicher Service, bahnbrechende Forschung

Auch den persönlichen Service von Shimadzu wissen Dr. Wu und Dr. Kapil zu schätzen. „Als ich 2013 als technische Mitarbeiterin am UCL anfang, war man sich in der Wissenschaft weitgehend einig, dass es keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen GC-Anbietern gibt“, sagt Dr. Wu. „Doch nachdem ich die ersten persönlichen Gespräche mit den Herstellern geführt hatte, war mir klar, dass es gerade beim Kundenservice sehr wohl erhebliche Unterschiede gibt – und für mich ist das ein großes Highlight in der Zusammenarbeit mit Shimadzu.“

Dr. Wu verweist auch auf das Training für Studierende am UCL: „Shimadzu bietet spezielle Workshops für unsere Studierenden an, die extrem hilfreich für den Einstieg in die Arbeit mit dem GC sind, da sie sowohl das theoretische Wissen als auch den praktischen

Umgang mit verschiedenen Geräten vermitteln. Diese Kurse sind bei unseren Studierenden sehr beliebt, weil sie sehr praxisnah und relevant für ihre Arbeit sind. Tatsächlich fällt mir kein anderer Hersteller ein, der ein solches Engagement an den Tag legt und seinen Kunden solche Angebote kostenlos bereitstellt.“

Diese persönlichen Beziehungen zu den Experten im Unternehmen ist allen am CNIE wichtig, wie Dr. Wu sagt: „Anders als bei vielen anderen Herstellern werde ich nie an einen allgemeinen Kundenservice verwiesen, bei dem ich mein Anliegen jedes Mal einem anderen Servicemitarbeiter erklären muss. Bei Shimadzu habe ich verschiedene Ansprechpartner, die immer gerne ans Telefon gehen, um technische Fragen zu beantworten oder zu besprechen, wie ein bestehendes System angepasst werden kann, um neue Herausforderungen zu lösen.“

„Angesichts des hohen Tempos in der Forschung am UCL werden zukünftig garantiert noch sehr viele neue Ideen entwickelt werden. Die Zusammenarbeit mit Shimadzu wird zweifelsohne viele weitere bahnbrechende Erkenntnisse im Bereich der Chemietechnik in den kommenden Jahren unterstützen!“

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.



Kosmetika – wie rein ist rein?

TOC-gestützte
Reinigungsvalidierung



Anika Brett, Tilman Stellfeld, Mann & Schröder GmbH



In der kosmetischen Industrie ist der TOC ein aussagekräftiger Summenparameter, um die Reinigungseffizienz von Herstellenanlagen und Ausrüstungsgegenständen zu bewerten. Was gilt es zu beachten?

Wenn Kosmetik – neben Schönheit – eines verspricht, dann ist es Sauberkeit. Die Branche steht für Pflege, Reinheit, Wohlbefinden und vieles Angenehme mehr. Doch wie wird eigentlich gewährleistet, dass sich die Verbraucher nicht nur sauber und gut fühlen, sondern auch wirklich sicher sein können, dass die Produkte qualitativ hochwertig und letztlich gesetzeskonform produziert sind? Dazu müssen die Kosmetika selbst insbesondere eines sein: sauber. Doch was heißt „sauber“ bzw. „rein“ in diesem Zusammenhang genau?

Wer kosmetische Produkte, wie z. B. Seife, Creme oder dekorative Kosmetik herstellt, muss die Reinheit der verwendeten Fertigungsanlagen und Ausrüstungsgegenstände sicherstellen. Doch wie dies im Einzelnen durchzuführen und zu validieren ist, findet sich in den ent-

sprechenden Regelwerken [1] nur vage formuliert. Wichtig ist, dass ein standardisiertes Reinigungsverfahren besteht und die Wirksamkeit der Reinigung belegt werden kann. Der Summenparameter TOC gibt einen Überblick über die Reinigungseffizienz.

Geltende Vorgaben für Kosmetikerhersteller

Gemäß der DIN EN ISO 22716:2016 für Kosmetik-GMP (GMP, engl. Good Manufacturing Practice) gilt für alle Ausrüstungsgegenstände ein geeignetes Reinigungs- und ggf. Desinfektionsprogramm. Dies umfasst auch festgelegte wirksame Reinigungs- und Desinfektionsmittel. Im IFS HPC (International Featured Standard – Household/Personal/Care), einem internationalen Standard zur Beurteilung von Produkten und Prozessen von Herstellern und Zulieferern von Haushalts- und Körperpflegeprodukten, werden die geltenden Vorgaben noch weiter konkretisiert: Hiernach müssen die Reinigungsmaßnahmen auch entsprechend validiert und mittels definiertem Stichprobenplan durch ein geeignetes Verfahren dokumentiert werden. Die Art der Validierung ist hingegen nicht vorgeschrieben.

→



Abbildung 1:
TOC-L mit
Autosampler

Der Summenparameter TOC

In kosmetischen Produkten besteht ein Großteil der Inhaltsstoffe aus organischen Verbindungen, ebenso wie in den meisten Reinigungsmitteln. Daher ist der TOC (engl. Total Organic Carbon; gesamter organischer Kohlenstoff) ein geeigneter Parameter um die Reinheit verwendeter Fertigungsanlagen zu prüfen. Um ein passendes Reinigungs- und Validierungsverfahren festzulegen, werden verschiedene Reinigungsschritte durchgeführt und anschließend das „letzte Spülwasser“ (Final Rinse) analysiert. Zudem können auf diese Weise die Spülvorgänge so weit optimiert werden, bis sie den Anforderungen entsprechen und Kosten gespart werden.

Um den TOC zu bestimmen, gibt es unterschiedliche Techniken. Die meistverbreitete ist die katalytische Verbrennungsoxidation. Sie oxidiert die Kohlenstoffkomponenten bei hohen Temperaturen mit einem Platinkatalysator. Anschließend wird das entstehende CO₂ mit einem NDIR-Detektor erfasst.

Da neben den organischen Verbindungen auch anorganische Kohlenstoffverbindungen wie Carbonate oder Hydrogencarbonate erfasst werden, haben sich hierfür zwei verschiedene TOC-Bestimmungsmethoden etabliert, welche die anorganischen Verbindungen aus der Probe entfernen. Bei der am häufigsten verwendeten, der so genannten NPOC- (engl. Non Purgeable Organic Carbon; nicht ausblasbarer organischer Kohlenstoff) oder Direkt-Methode, wird die Probe zunächst mit einer Mineralsäure angesäuert. Sie setzt die anorganischen Kohlenstoffverbindungen zu Kohlenstoffdioxid um; ein Spülgas entfernt sie aus der Probe. Anschließend wird ein Aliquot der vorbereiteten Probe oxidiert und das entstehende CO₂ gemessen.

Kommen jedoch für die Reinigung von Anlagen Reinigungsmittel zum Einsatz, die zum Schäumen neigen, ist die sogenannte Differenzmethode ideal. Dabei wird zunächst durch Oxidation die Konzentration der gesamten Kohlenstoffverbindungen (TC, engl. Total Carbon) ermittelt. In einem zweiten Schritt gilt es, die anorganischen Kohlenstoffverbindungen (IC, engl. Inorganic Carbon) zu messen. Durch Differenzbildung (TC – IC = TOC) lässt sich die TOC-Konzentration berechnen.

Moderne Analysatoren wie die der TOC-L Serie von Shimadzu übernehmen die Probenvorbereitung (Ansäuern und Ausgasen) vollautomatisch. Die Systeme arbeiten mit einem hocheffektiven Platinkatalysator bei einer Verbrennungstemperatur von 680 °C. Neben der Direktmethode (NPOC) können die Systeme aber auch den TOC mittels Differenzmethode bestimmen. Die Geräte verfügen über eine spezielle Spritzeinheit, die automatische Verdünnungen von Proben bei Überschreitung des Kalibrier-

bereichs ermöglichen sowie die automatische Verdünnung von Standards, um Kalibrierkurven auch in äquidistanten Konzentrationsabständen zu erstellen.

„Ohne Alkohol“ – wirklich?

Die erforderliche Reinheit des letzten Spülschrittes wird mittels einer Risikobewertung festgelegt. Ihr Ziel ist es, gesetzeskonforme Produkte zu gewährleisten. Ein geeignetes Szenario zur Risikobewertung bei der Herstellung von Kosmetika ist die Verschleppung eines Inhaltsstoffs von einem inhaltsstoffhaltigen in ein inhaltsstofffreies Produkt. Konservierungsmittel sind ein klassisches Beispiel dafür. Oft sind solche Produkte mit expliziten Auslobungen, sogenannten Claims, versehen, etwa „frei von Konservierungsmitteln“, „0 % Alkohol“ oder „ohne Parfüm“. Dies muss bei der Herstellung der Produkte sichergestellt werden. Das bedeutet: Der Inhaltsstoff darf im kosmetischen Produkt nicht nachweisbar sein.

Zur Berechnung des TOC-Akzeptanzkriteriums wird im ersten Schritt eine risikoorientierte Leitsubstanz definiert, in diesem Fall die verschleppte Substanz. Über eine Risikobewertung der Herstellenanlagen wird im Anschluss festgelegt, welche Spülwassermenge des Final Rinse in einem sogenannten Worst Case im Herstellkessel zurückbleibt und so zu einer Kontamination des nachfolgenden Produktionsansatzes führt. Im Rahmen dieser Betrachtung wird angenommen, dass diese TOC-Konzentration ausschließlich durch die Leitsubstanz entsteht.

Ist das Akzeptanzkriterium festgelegt, kann die Validierung beginnen. Zu den unterschiedlichsten Spülzyklen werden Proben entnommen und auf den TOC-Gehalt analysiert. Hierbei zeigt sich wie erwartet ein Abfall des TOC-Gehalts mit jedem Spülschritt (Abbildung 3). Das Reinigungsverfahren muss für jede Herstellenanlage und jede Produktgruppe separat betrachtet werden. In Tabelle 1 sind die TOC-Messwerte verschiedener Produkte in der gleichen Herstellenanlage nach Durchführung des gleichen Reinigungsprogramms aufgeführt. Bestätigt sich die Einhaltung des festgelegten Akzeptanzkriteriums auch nach mehrmaliger Durchführung, gilt die Reinigungsmethode für das jeweilige Produkt als validiert.

In der kosmetischen Industrie ist der TOC ein aussagekräftiger Parameter, um die Reinigungseffizienz von Herstellenanlagen und Ausrüstungsgegenständen zu bewerten. Er ist einfach und schnell zu analysieren. Moderne Analysatoren, wie der TOC-L von Shimadzu, erledigen die notwendigen Probenvorbereitungen automatisch. Zudem können die Messungen dazu beitragen, die Reinigungsschritte zu optimieren und dadurch Kosten und Ressourcen einzusparen.



$$C_{Sub} = \frac{\text{Ansatzgröße [kg]} \cdot \text{Nachweisgrenze [ppm]}}{\text{verbleibende Spülwassermenge [kg]}}$$

$$TOC \text{ [ppm]} = \frac{C_{Sub} \cdot 12,0107 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-2} \cdot K_{Sub}}{M_{Sub}}$$

C_{Sub} : maximal erlaubte Konzentration der Leitsubstanz [ppm]
 K_{Sub} : Anzahl der Kohlenstoffe der Leitsubstanz
 M_{Sub} : Molare Masse Substanz [g·mol⁻¹]
 TOC : Total Organic Carbon [ppm]

Abbildung 2: Berechnung des TOC-Akzeptanzkriteriums

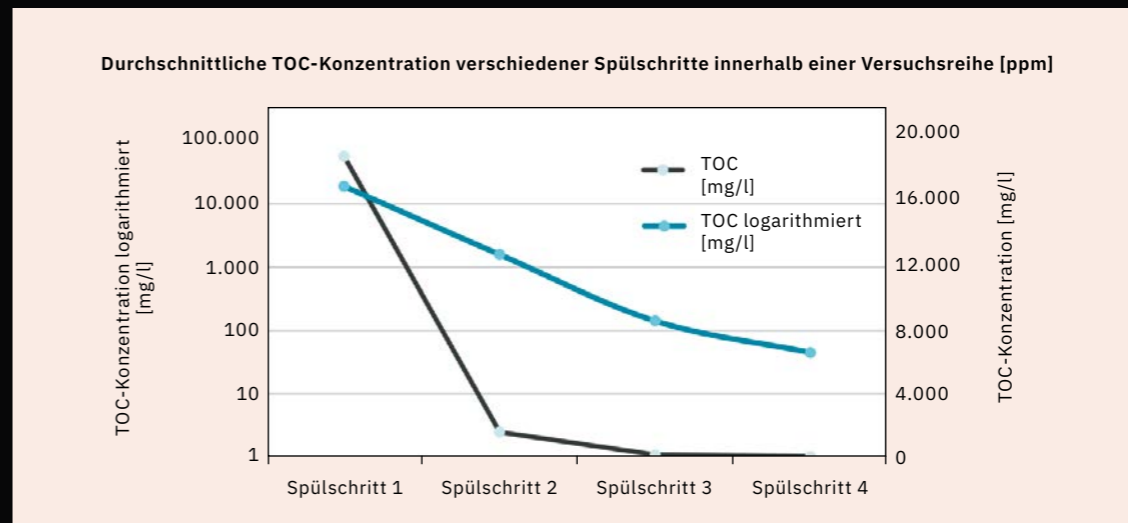


Abbildung 3: Grafische Darstellung der TOC-Konzentration des Spülwassers über vier Spülschritte hinweg

MS-Parameter	Haarparfum	Sonnenspray	Haarspray	Gesichtswasser
TOC in Spülschritt 1 [ppm]	7.187	14.350	5.521	4.928
TOC in Spülschritt 2 [ppm]	189	5.785	1.102	156
TOC in Spülschritt 3 [ppm]	19	2.148	50	36
TOC in Spülschritt 4 [ppm]		44		

Tabelle 1: Höhe des TOC im Spülwasser bei der Reinigung verschiedener Produkte in der gleichen Herstellenanlage und unter identischen Reinigungsbedingungen

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.



Hochwertige Analyse auch bei geringer Konzentration



Bewertung eines MRM-Verfahrens zur Bestimmung von PAK in Palmöl mittels GC-MS/MS

Waldemar Weber, Shimadzu Europa GmbH, Elvi Horiyanto, Cynthia Lahey, Shimadzu Asia Pacific

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind eine Gruppe von organischen Verbindungen, die hauptsächlich durch die unvollständige Verbrennung organischer Stoffe entstehen. PAK sind karzinogene, teratogene und mutagene Kontaminanten und für den Menschen giftig. Eine Hauptquelle für die Exposition gegenüber PAK sind Lebensmittel und besonders Speiseöle und -fette aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften und des hohen Konsums dieser Erzeugnisse. Mit einem neuen Multiple-Reaction-Monitoring-Verfahren (MRM) können PAK in Palmöl selbst in geringer Konzentration nachgewiesen werden.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) können auf natürliche Weise oder durch den Trocknungsprozess während der Produktion in Lebensmittel gelangen. 2002 identifizierte das „Scientific Committee on Food“ 15 PAK, die als genotoxisch und karzinogen gelten. 2005 ergänzte das „Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives“ diese Liste um einen weiteren PAK zur sogenannten „15+1 EU Priority PAH“.

Auf Grundlage dieser Liste legt die Verordnung (EU) Nr. 835/2011 den Höchstgehalt an Benzo[*a*]pyren und die Summe der PAK Benzo[*a*]pyren, Benz[*a*]anthracen, Benzo[*b*]fluoranthen und Chrysen in Speiseöl auf 2,0 µg/kg bzw. 10,0 µg/kg fest. Dieser Artikel beschreibt die Etablierung und Bewertung eines neuen Multiple-Reaction-Monitoring-Verfahrens (MRM) zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der 15+1 PAK in Palmöl.

Versuchsbedingungen

Für diesen Versuch wurde ein Triple-Quadrupol GCMS-TQ8050 NX eingesetzt. Die Einzelheiten zum verwendeten GC-MS/MS-System und zu den analytischen Bedingungen des Verfahrens sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle 15+1 PAK wurden mit quantitativen und qualitativen MRM-Übergängen gemessen. Genaue Angaben zu den MRM-Übergängen, den Kollisionsenergie-Werten (CE) und den internen Standards (IS) finden sich in Tabelle 2.

Standards und Probenvorbereitung

Matrixnahe IS-Kalibrierlösungen wurden im Matrix-Blank vorbereitet. Die 15+1 PAK-Proben wurden in einer Konzentration von 0,2, 0,5, 1, 2, 5 und 10 µg/l vorbereitet (das entspricht 0,44 bis 22,34 µg/kg). Alle Kalibrierlösungen enthielten einen IS in der Konzentration von 5 µg/l Chrysen-*d*12 und 5 µg/l Perylen-*d*12. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde der Matrix-Blank vor der Extraktion mit der PAK-Standardmischung und internen Standards zugegeben und anschließend analysiert.

Detektion und Trennung

Die 15+1 PAK wurden im GC-MS/MS mit einer SH-I-PAH Säule getrennt. Die Massenchromatogramme aller Verbindungen sind in Abbildung 1 dargestellt.

Kalibrierbereich, Linearität und Quantifizierung

Für die 15+1 PAK wurden IS-Kalibrierkurven mithilfe entsprechender matrixnaher Kalibrierlösungen erstellt. Der Kalibrierbereich für die einzelnen PAK ist in Tabelle 3 angegeben. Die Kalibrierkurven aller PAK zeugten von einer ausgezeichneten Linearität mit einem R²-Wert von mindestens 0,9979 (Tabelle 3). Die Quantifizierung der Palmölprobe erfolgte durch Analyse der mit internen Standards dotierten Palmöl-Matrix-Blank. In dieser Palmölprobe wurde keiner der 15+1 PAK festgestellt. →

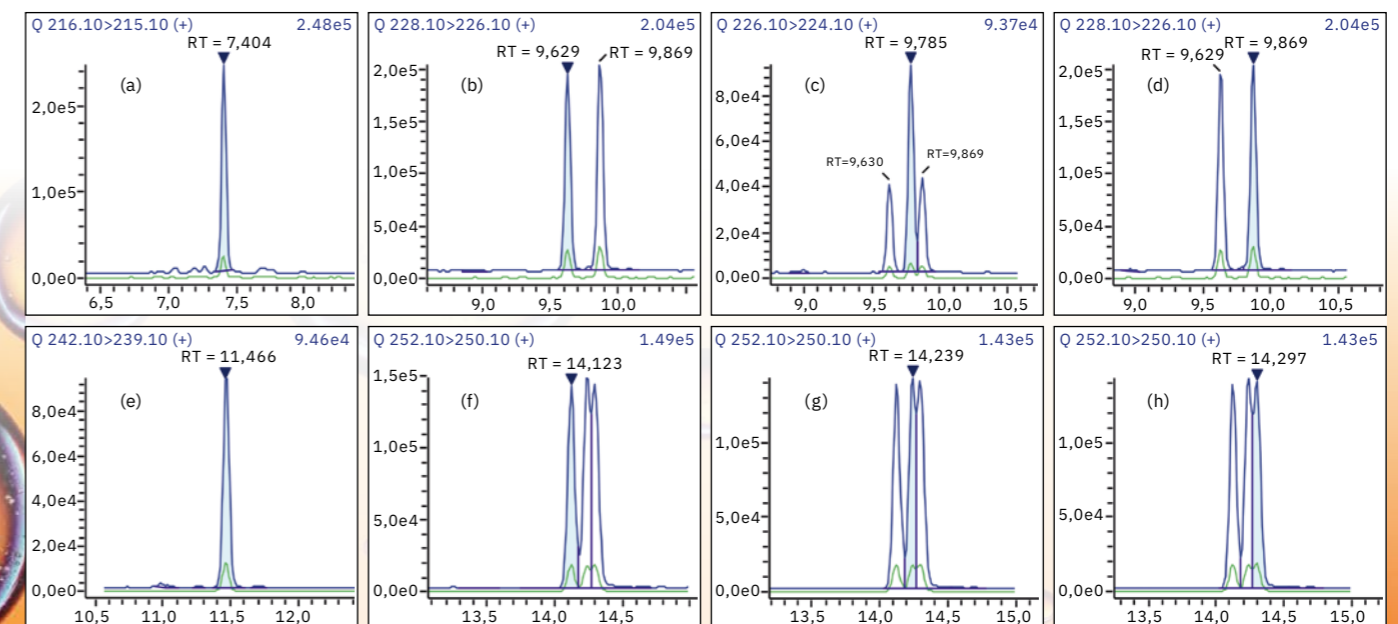


Abbildung 1: Massenchromatogramme von: (a) Benzo[*c*]fluoren, (b) Benzo[*a*]anthracen, (c) Cyclopenta[*cd*]pyren, (d) Chrysen, (e) 5-Methylchrysen, (f) Benzo[*b*]fluoranthen, (g) Benzo[*j*]fluoranthen, (h) Benzo[*k*]fluoranthen

Zur Berechnung der Wiederfindungsrate wurde der Matrix-Blank mit 5 µg/l (entspricht 11,173 µg/kg in Palmöl) internen Standards und PAK gespickt. Die Konzentrationen wurden anschließend mithilfe der IS-Kalibrierkurven bestimmt. Die Wiederfindungsrate bei den sogenannten PAK4 (Benzo[a]pyren, Benzo[a]anthracen, Benzo[b]fluoranthren und Chrysen) lag zwischen 76,15 % und 88,11 %; dies entspricht den Kriterien der Verordnung (EU) Nr. 836/2011 (50–120 %). Die Ergebnisse zur Quantifizierung und Wiederfindungsrate zu der mit den 15+1 PAK dotierten Palmölprobe sind in Tabelle 3 aufgeführt.

LOD, LOQ und Wiederholbarkeit

Die Nachweisgrenze (LOD) bei allen 15+1 PAK in der Palmölprobe wurde im Bereich von 0,038–0,327 µg/kg bzw. bei den PAK4 im Bereich von 0,071–0,157 µg/kg ermittelt. Die berechnete Bestimmungsgrenze (LOQ) lag bei den 15+1 PAK zwischen 0,127 und 1,090 µg/kg und bei den PAK4 zwischen 0,236 und 0,522 µg/kg. Laut der Verordnung (EU) Nr. 836/2011 sollte die LOD für PAK weniger als 0,30 µg/kg bei einer LOQ von unter 0,9 µg/kg betragen. Dementsprechend zeigt die hier angewendete GC-MS/MS-Methode, dass sich per MRM-Detektion selbst geringe Konzentrationen von PAK in Palmöl nachweisen lassen.

Die Genauigkeit der Analyse wurde durch acht aufeinanderfolgende Messungen der Kalibrierlösungen mit geringer Konzentration (0,5 µg/l) und mittlerer Konzentration (5 µg/l) in der Matrix durchgeführt. Die relative Standardabweichung (%RSD) des Peakflächenverhältnisses aller PAK gegenüber dem jeweiligen IS betrug < 8 % und < 5 % bei geringer bzw. mittlerer Konzentration. Für weitere Erkenntnisse wurde die 5 µg/l Kalibrierlösung in der Matrix innerhalb von 48 Stunden noch 72-mal analysiert.

Systemkonfiguration	
GC-MS-System	GCMS-TQ8050 NX
Flüssigsampller	AOC-20i and AOC-20s
Gaschromatographieparameter	
Kapillarsäule	SH-I-PAH (30 m x 0,25 mm ID x 0,10 µm df)
Injektionsmodus	Splitless, 330 °C
Flusskontrollmodus	Lineare Geschwindigkeit 50,0 cm/s
Trägergas	Helium
Temp.-Programm	110 °C für 5 min, 30 °C/min bis 240 °C, 240 °C für 2 min, 3 °C/min bis 270 °C, 240 °C für 2 min, 8 °C/min bis 340 °C, 340 °C für 8 min
MS-Parameter	
Ionisationsmodus	EI
Temp. Ionenquelle	230 °C
Temp. Interface	300 °C
Modus	MRM

Tabelle 1: Analytische Bedingungen GC-MS/MS

Analyt	MRM-1	CE (V)	MRM-2	CE (V)
Benzo[c]fluoren	216,1 > 215,1	22	216,1 > 189,1	30
Benzo[a]anthracen	228,1 > 226,1	28	228,1 > 202,1	26
Chrysen-d12 (IS)	240,2 > 236,2	28	240,2 > 238,2	26
Cyclopenta[c,d]pyren	226,1 > 224,1	38	226,1 > 200,1	30
Chrysen	228,1 > 226,1	28	228,1 > 202,1	26
5-Methylchrysen	242,1 > 239,1	32	242,1 > 215,1	22
Benzo[b]fluoranthren	252,1 > 250,1	28	252,1 > 226,1	30
Benzo[j]fluoranthren	252,1 > 250,1	30	252,1 > 226,1	30
Benzo[k]fluoranthren	252,1 > 250,1	30	252,1 > 226,1	30
Benzo[a]pyren	252,1 > 250,1	30	252,1 > 226,1	24
Perylen-d12 (IS)	264,2 > 260,2	47	264,2 > 262,2	44
Indeno[1,2,3-cd]pyren	276,1 > 274,1	34	276,1 > 250,1	30
Dibenzo[a,h]anthracen	278,1 > 276,1	30	278,1 > 252,1	30
Benzo[g,h,i]perylene	276,1 > 274,1	32	276,1 > 275,1	28
Dibenzo[a,l]pyren	302,1 > 300,1	36	302,1 > 298,1	60
Dibenzo[a,e]pyren	302,1 > 300,1	36	302,1 > 276,1	28
Dibenzo[a,i]pyren	302,1 > 300,1	36	302,1 > 276,1	28
Dibenzo[a,h]pyren	302,1 > 300,1	36	302,1 > 276,1	28

Tabelle 2: MRM-Übergänge, Kollisionsenergie für PAK und interne Standards

Analyt	Kalibrierbereich µg/l	R ²	Konz. der gespickten Probe für Wiederfindungstest µg/kg	Wiederfindung %
Benzo[c]fluoren	1,0–10	0,9994	6,53	58
Benzo[a]anthracen	0,5–10	0,9995	8,50	76
Cyclopenta[c,d]pyren	0,5–10	0,9997	10,32	92
Chrysen	0,5–10	0,9985	9,84	88
5-Methylchrysen	0,2–10	0,9993	9,12	82
Benzo[b]fluoranthren	0,2–10	0,9991	8,98	80
Benzo[j]fluoranthren	0,2–10	0,9987	8,26	74
Benzo[k]fluoranthren	0,2–10	0,9985	9,48	85
Benzo[a]pyren	0,2–10	0,9989	9,35	84
Indeno[1,2,3-cd]pyren	0,2–10	0,9988	9,44	85
Dibenzo[a,h]anthracen	0,2–10	0,9990	9,49	85
Benzo[g,h,i]perylene	0,2–10	0,9991	9,45	85
Dibenzo[a,l]pyren	0,2–10	0,9986	9,01	81
Dibenzo[a,e]pyren	0,2–10	0,9981	9,64	86
Dibenzo[a,i]pyren	0,2–10	0,9979	9,85	88
Dibenzo[a,h]pyren	0,5–10	0,9988	9,25	83

Tabelle 3: Kalibrierbereich, R² und Wiederfindungsrate für 15+1 PAK

Analyt	Berechnete LOD [µg/kg]	Berechnete LOQ [µg/kg]	Flächenverhältnis %RSD bei 0,5 µg/l Lösung (n=8)	Flächenverhältnis %RSD bei 5 µg/l Lösung (n=8)	Flächenverhältnis %RSD bei 5 µg/l Lösung (n=72)
Benzo[c]fluoren	0,327	1,090	6,2	1,5	2,2
Benzo[a]anthracen	0,176	0,588	5,3	1,6	2,4
Cyclopenta[c,d]pyren	0,157	0,522	3,1	1,5	4,2
Chrysen	0,175	0,583	5,9	2,0	3,2
5-Methylchrysen	0,112	0,373	2,8	1,6	2,4
Benzo[b]fluoranthren	0,088	0,293	3,0	1,8	2,7
Benzo[j]fluoranthren	0,077	0,256	5,2	4,1	4,3
Benzo[k]fluoranthren	0,077	0,255	5,1	3,9	4,8
Benzo[a]pyren	0,071	0,236	4,0	2,1	2,8
Indeno[1,2,3-cd]pyren	0,049	0,163	1,4	2,2	2,3
Dibenzo[a,h]anthracen	0,045	0,150	1,9	1,7	2,6
Benzo[g,h,i]perylene	0,038	0,127	2,7	2,2	2,5
Dibenzo[a,l]pyren	0,107	0,358	7,3	3,4	4,4
Dibenzo[a,e]pyren	0,127	0,423	7,2	2,4	3,7
Dibenzo[a,i]pyren	0,114	0,378	5,3	3,0	7,9
Dibenzo[a,h]pyren	0,137	0,458	5,3	3,0	4,3

Tabelle 4: LOD/LOQ und Wiederholbarkeit der analysierten PAK

Die relative Standardabweichung (%RSD) des Peakflächenverhältnisses aller PAK (72) gegenüber dem jeweiligen IS betrug < 5 % (außer bei Dibenzo[a,i]pyren, wo er bei < 8 % lag). Diese Ergebnisse zeugen von einer hohen Stabilität und Genauigkeit des optimierten MRM-Verfahrens. Eine Zusammenfassung der Werte findet sich in Tabelle 4.

Ein attraktives neues Verfahren

Mithilfe des GCMS-TQ8050 NX konnte ein MRM-Verfahren für die Analyse polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe in Palmöl entwickelt werden, das auch für die Untersuchung anderer Öle und Fette geeignet ist. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die 15+1 PAK mit dieser Methode selbst in geringer Konzentration nachweisen und quantifizieren lassen – bis zu einer Nachweis- und Bestimmungsgrenze von 0,071 µg/kg (LOD) bzw. 0,127 µg/kg (LOQ). Eine ausgezeichnete Linearität der IS-Kalibrierkurven mit R²-Werten wurde ebenfalls erzielt. Neben einer hohen Empfindlichkeit und Selektivität bietet das optimierte MRM-Verfahren schließlich auch eine gute Wiederholbarkeit und Stabilität, was die neue Methode für den analytischen Einsatz in Laboren attraktiv macht.

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.



Schnellerer Durchsatz. Gemeinsam.

Neue optimierte Lösung für die Analyse von Immunsuppressiva mittels LC-MS/MS

Mikaël Levi, Alsachim / Reagent Kit Business Unit



Um steigenden Anforderungen hinsichtlich Zeit und Ressourcen gerecht zu werden, benötigen Chemielabore anwenderfreundliche Lösungen mit kürzeren Durchlaufzeiten und geringeren Kosten pro Probe bei gleichzeitiger Einhaltung der immer strenger werdenden gesetzlichen Vorschriften. Dank jüngster Arbeiten von Alsachim mit Geräten und Software von Shimadzu gibt es jetzt eine optimierte Hochdurchsatz-Analyselösung, die noch am selben Tag Ergebnisse für die therapeutische Arzneimittelüberwachung von Immunsuppressiva liefert. Die Lösung vereint Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) mit automatisierter Probenvorbereitung und einem speziellen Reagenzienkit.

Das therapeutische Drug Monitoring (TDM) ist eine interdisziplinäre Wissenschaft mit dem Ziel, die Einflussfaktoren der Dosis-Wirkungs-Beziehung zu verstehen und dieses Wissen zu nutzen, um die Arzneimittelbehandlung zu optimieren.[1–3]

In den meisten Laboren kommen bei der therapeutischen Arzneimittelüberwachung überwiegend automatisierte Immunoassays zum Einsatz. Diese können jedoch aufgrund von Kreuzreaktivität der aktiven Metaboliten zu verzerrten Ergebnissen führen. Diese Komplikation kann durch die chargenspezifische Heterogenität der Antikörper oder der Reagenzienqualität, durch Hochdosisseffekte und durch hohe Kosten pro Analyse noch verstärkt werden.[4]

Da sich die Präzisionsmedizin mehr und mehr zu einem Ansatz für die individuelle Behandlung von Patienten entwickelt, d. h. für die Behandlung einer bestimmten Krankheit und unter Berücksichtigung der individuellen Variabilität von Genen, Umwelt und Lebensstil, dürfte die therapeutische Arzneimittelüberwachung künftig einen noch größeren Einfluss auf die Dosisanpassung haben. Schon jetzt steigen durch diesen neuen Anwendungsbereich für die therapeutische Arzneimittelüberwachung die Anzahl der zu untersuchenden Proben und der Druck, die Durchlaufzeiten zu verkürzen. Erschwerend kommt hinzu, dass die im Mai 2022 in Kraft getretenen europäischen Vorschriften für die In-vitro-Diagnostik eingehalten werden müssen, was den Bedarf an zertifizierten Analyselösungen drastisch erhöht hat.

In diesem Artikel wird eine zeitsparende und vollständig richtlinienkonforme Komplettlösung für die Analyse von Immunsuppressiva mit hohem Durchsatz vorgestellt, die sich durch eine Kombination aus Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) mit automatisierter Probenvorbereitung und einem speziellen Reagenzienkit auszeichnet.

LC-MS/MS zur therapeutischen Arzneimittelüberwachung Immunsuppressiva

Flüssigchromatographie (LC) unter Verwendung von Ultraviolett- (UV), Photodiodenarray- (PDA) und Fluoreszenzdetektionssystemen (FLD) wird seit mehreren Jahrzehnten in der therapeutischen Arzneimittelüberwachung eingesetzt. Trotz der Leistungsfähigkeit der Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie [5–7] sind solche Nachweismethoden jedoch in Bezug auf ihre Spezifität begrenzt, was oft zu langen Probenzyklen und geringer Empfindlichkeit führt.[1]

Die Massenspektrometrie (MS) gilt heute als eine der wichtigsten Techniken für Labore zur Bereitstellung robuster Plattformen mit hoch selektiver und empfindlicher Detektion.[8] Die Fähigkeit der MS zur Entwicklung von Assays für einzelne Arzneimittel und zur Multiplexierung von Analytpanels schafft neue Möglichkeiten und erweitert gleichzeitig die Zahl der Arzneimittelassays.

Automatisierte Handhabung und Vorbereitung von Proben

Biologische Flüssigkeiten besitzen eine hoch komplexe Matrix, die eine Herausforderung für die Analytik darstellen, da endogene und exogene Komponenten in der MS zu verbindungs- und systemspezifischen Effekten führen. Bei allen Protokollen zur Probenvorbereitung und -verarbeitung muss sorgfältig darauf geachtet werden, die Effekte der Matrix zu neutralisieren. Matrixeffekte können zu isobarer Interferenz, Verstopfung durch Partikel und Suppression oder Verstärkung von Ionen führen, wodurch ein Unterschied in der Signalintensität im Vergleich zur sauberen Standardlösung beobachtet wird.

Um die Auswirkungen der Matrixeffekte auf bioanalytische Assays zu reduzieren, stehen dem Analytiker mehrere Strategien zur Verfügung. Eine der wichtigsten Techniken ist die Verwendung geeigneter und validierter interner Standards (IS), vor allem von mit stabilen Isotopen markierten Analoga (SIL-ISTD), zur Korrektur von Ionensignaländerungen und Handhabungsfehlern in Probenvorbereitungsprotokollen. Bei vielen Analysen müssen jedoch aufgrund der hohen Variabilität der Konzentrationen endogener Moleküle zwischen verschiedenen Patienten und auch bei einzelnen Patienten die Proben mithilfe von Extraktions- oder Aufreinigungstechniken gereinigt werden.

Bei Analysen mit hohem Durchsatz können automatisierte Systeme bei der Konzeption der Probenvorbereitungsmethode von großem Nutzen sein. Liquid-Handling-Robotersysteme mit mehreren Pipetten, beispielsweise Hamilton Microlab Star, können einfache oder komplexe Probenvorbereitungsprotokolle mit einer großen Anzahl von Proben verarbeiten.

Immunsuppressiva dienen dazu, die Aktivität des Immunsystems zu reduzieren, um die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern. Die zirkulierenden Konzentrationen dieser Substanzen sollten innerhalb eines engen therapeutischen Fensters gehalten werden, da eine Überdosierung zu schwerwiegenden Toxizitäten und langfristiger Morbidität führen kann, während eine Unterdosierung eine Abstoßung des Transplantats zur Folge haben kann.[3] Da Immunsuppressiva zu einer hohen pharmakokinetischen Variabilität zwischen einzelnen Patienten führen, ist die therapeutische Arzneimittelüberwachung inzwischen ein etablierter Ansatz zur Minderung der mit einer Organtransplantation verbundenen Risiken.

Für die TDM von Immunsuppressiva stehen mehrere handelsübliche Immunassays zur Verfügung. Alle Immunassays weisen jedoch im Vergleich zu LC-MS/MS-Methoden einen systematischen positiven Fehler auf.[18] Trotz der Verfügbarkeit automatisierter Immunassays ist jeder Test auf einen Analyten pro Test beschränkt, obwohl in vielen klinischen Umgebungen bei einzelnen Patienten mehrere Immunsuppressiva angewendet werden.[1,19] Nachfolgend wird eine neue rationalisierte und automatisierte LC-MS/MS-Methode für die routinemäßige Analyse zur therapeutischen Arzneimittelüberwachung von Immunsuppressiva beschrieben. →





Abbildung 1: Positionierung von Kalibratoren und Kontrollen in Roboter-Probenträgern

Kombination einzelner Lösungen

Um den Anforderungen der Hochdurchsatzanalyse gerecht zu werden, wurde ein DOSIMMUNE™-Kit (Alsachim) an die robotergestützte Flüssigkeitsverarbeitung angepasst. Dieses validierte und CE-IVD-zertifizierte Kit mit manueller Probenvorbereitung enthält alle erforderlichen Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Überwachung von Immunsuppressiva in Vollblut mittels LC-MS/MS. Die Kalibrator- und Kontrollgefäße können direkt in ein Roboter-Rack positioniert werden (Abbildung 1). Im Vergleich zur manuellen Pipettierung haben Liquid-Handling-Systeme jedoch ein größeres Totvolumen, das nicht genutzt werden kann. Daher wurde der Inhalt von je zwei Gefäßen jedes Kalibrators und jeder Kontrolle vor dem Einsetzen in die Racks vereinigt. Durch diese Vorgehensweise können die Kalibratoren und Kontrollen eine ganze Woche lang verwendet werden, bevor sie ausgetauscht werden müssen.

Um die Anzahl der Verbrauchsmaterialien und Protokollschritte zu reduzieren, wurde eine IS-Lösung direkt mit dem Extraktionspuffer gemischt. Das Gemisch kann dann in einem Reservoir oder über eine Lösungsmittelabgabereinheit dispensiert werden.

Die Arbeitsabläufe des Liquid-Handling-Systems wurden optimiert, um eine möglichst kurze Vorbereitungszeit zu erreichen und gleichzeitig die mit dem manuellen Protokoll erzielte Leistung beizubehalten. Die meisten Maßnahmen konzentrierten sich dabei auf den Schritt der Resuspension des Blutes. Um präzise Ergebnisse zu erzielen, sollten die Proben beim Testen homogen sein. Daher wurde jede Probe kurz vor dem Testen resuspendiert. Es wurde ein spezielles Protokoll mit mehreren Sequenzen der Probenaufnahme/-abgabe unter Verwendung der Funktion des

Roboters zur Nachverfolgung der Probenhöhe entwickelt. Mithilfe dieses Protokolls konnten Proben mit Volumina von 0,5 bis 5 ml und Hämatokritwerten von 30 bis 70 % erfolgreich homogenisiert werden, und zwar mit einer Zeitersparnis von 60 % im Vergleich zu ähnlichen Protokollen, die in den Laboren eingesetzt wurden. Die Zeit-/Geschwindigkeitsparameter für das Vortexen und Zentrifugieren wurden ebenfalls optimiert und die Vorgänge so weit wie möglich parallelisiert. Schlussendlich erfolgt die Probenvorbereitung einer kompletten 96-Well-Platte (Leerwert + 6 Kalibratoren, 4 Kontrollen und 85 Proben) innerhalb von 45 Minuten. Im Vergleich zu herkömmlichen Roboterlösungen für die Analyse von Immunsuppressiva entspricht dies einer Reduzierung der Vorbereitungszeit um 50 %.

Immunsuppressiva sind komplexe hydrophobe Verbindungen, die bekanntermaßen in der LC zu Carry-over-Effekten führen. Das neue Nexera X3 LC-System (Shimadzu) bietet verbesserte Spülfunktionen, die den Zeitaufwand für die Reinigung des Nadelinneren drastisch reduzieren. Dadurch konnte die LC-MS/MS-Zykluszeit von 2,1 auf 1,5 Minuten (von Injektion zu Injektion) reduziert werden. In Anbetracht der Anzahl der zu analysierenden Proben bedeutet diese Reduzierung um 30 % eine erhebliche Verbesserung der Durchlaufzeit.

Auswertung und Validierung

Zur Beurteilung der Präzision und Stabilität der Lösung wurden nacheinander drei Platten vorbereitet, die nur die-

selbe Kontrolle in niedrigen bis mittleren Konzentrationen (Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus mit etwa 8 µg/l, Cyclosporin A mit etwa 145 µg/l) als unbekannte Probe enthielten. Die erste Platte enthielt Kalibratoren und Kontrollen; die anderen Platten enthielten Kontrollen. Die Platten wurden in der gleichen Reihenfolge analysiert. Schließlich wurden 272 Datenpunkte für die drei Platten ermittelt. In Abbildung 2 sind die gemessenen Konzentrationen für alle Verbindungen und die gemessene IS-Peakfläche dargestellt. Die relative Standardabweichung der Konzentrationen oder der Peakflächen lag deutlich unter dem üblicher-

weise akzeptierten Wert von 15 %. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die Kalibrierung stabil war, dass die Präzision der Probenvorbereitung ausgezeichnet war und dass die Reagenzien im Roboter-Rack stabil waren. Ein charakteristisches Chromatogramm einer solchen niedrig bis mittel konzentrierten Kontrollprobe ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Methode einschließlich der Probenvorbereitung wurde gemäß den internationalen Richtlinien für bioanalytische Methoden (ICH M10[20], CLSI C62-A[21]) validiert. Darüber hinaus wurde die klinische Leistung bewertet, indem die

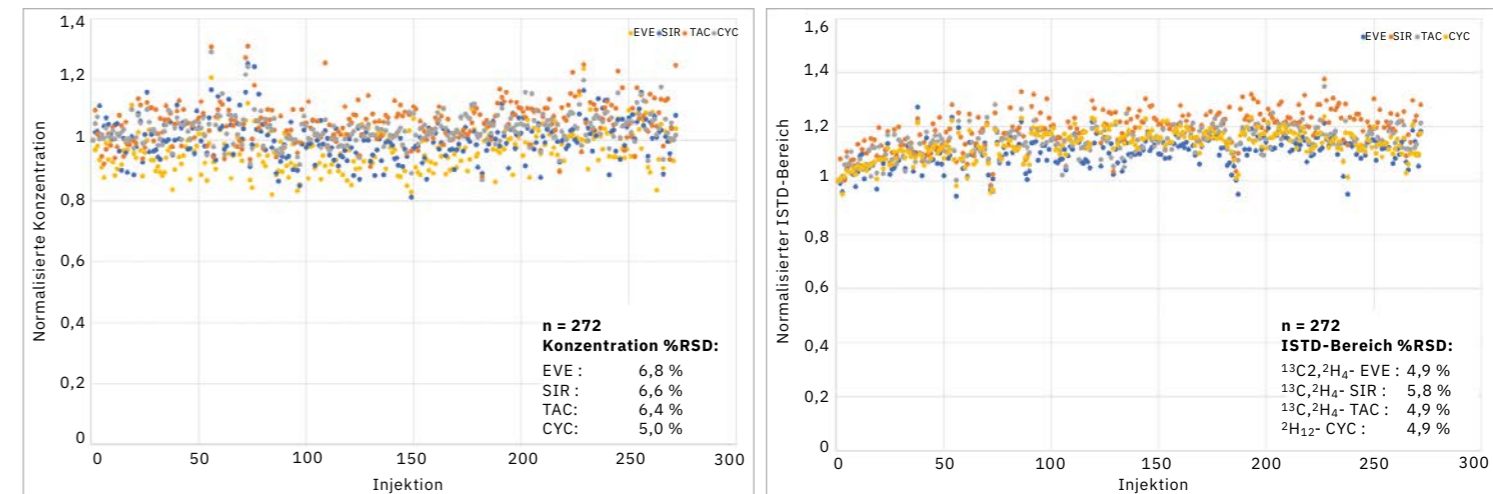


Abbildung 2: Präzision und Stabilität der Lösung für gemessene Konzentrationen (links) und den Bereich des internen Standards (rechts)

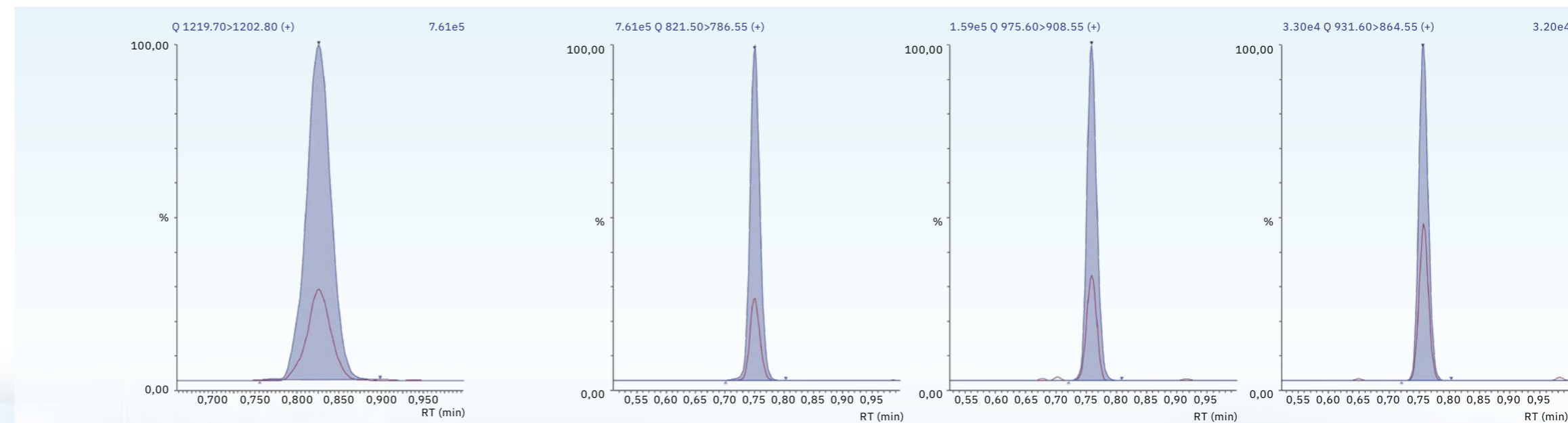
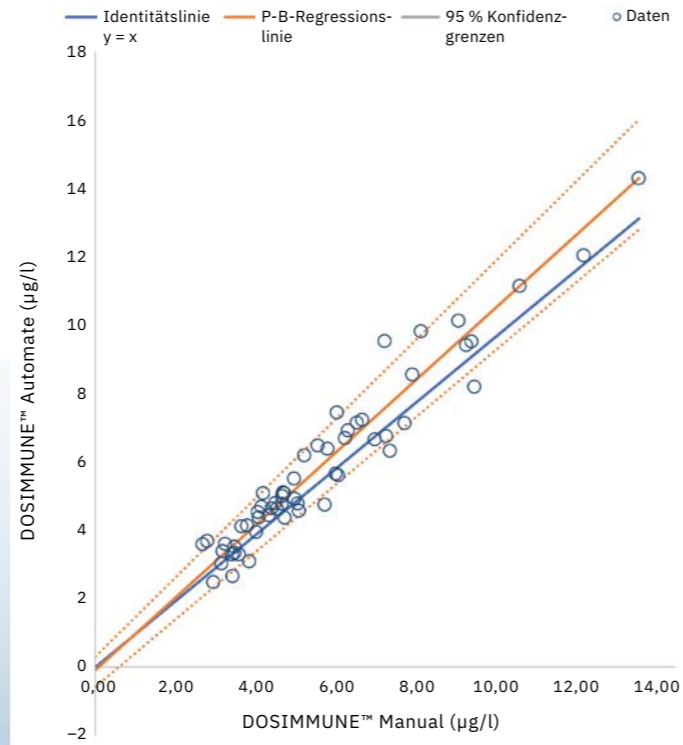
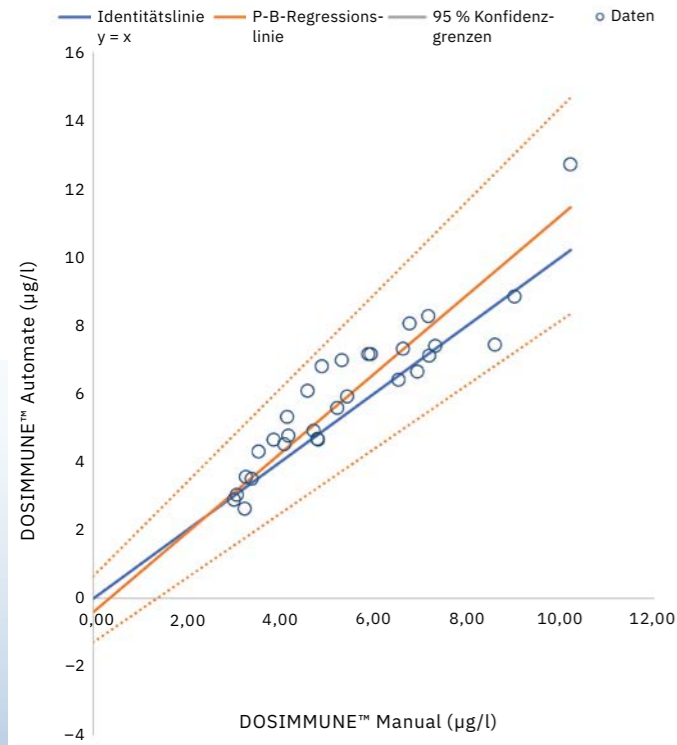


Abbildung 3: Charakteristisches Kontrollchromatogramm mit Cyclosporin A, Tacrolimus, Everolimus und Sirolimus (von links nach rechts)

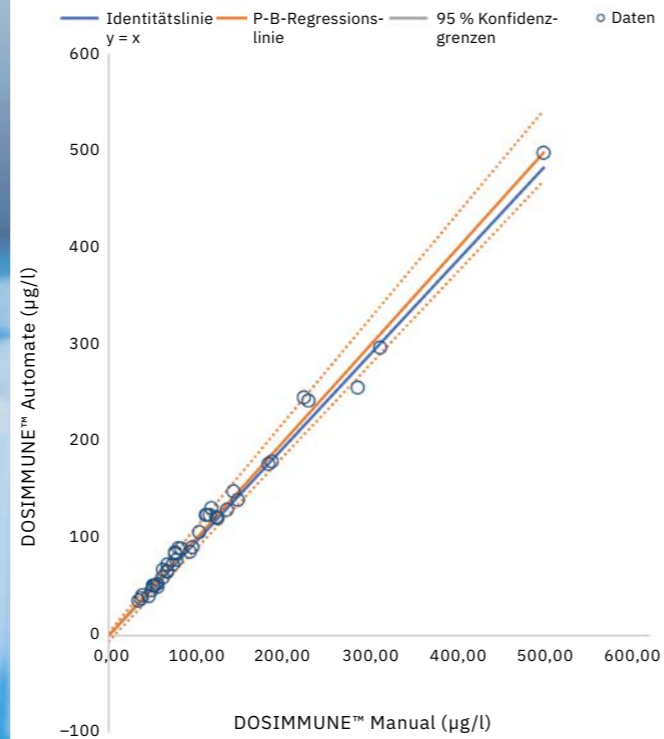
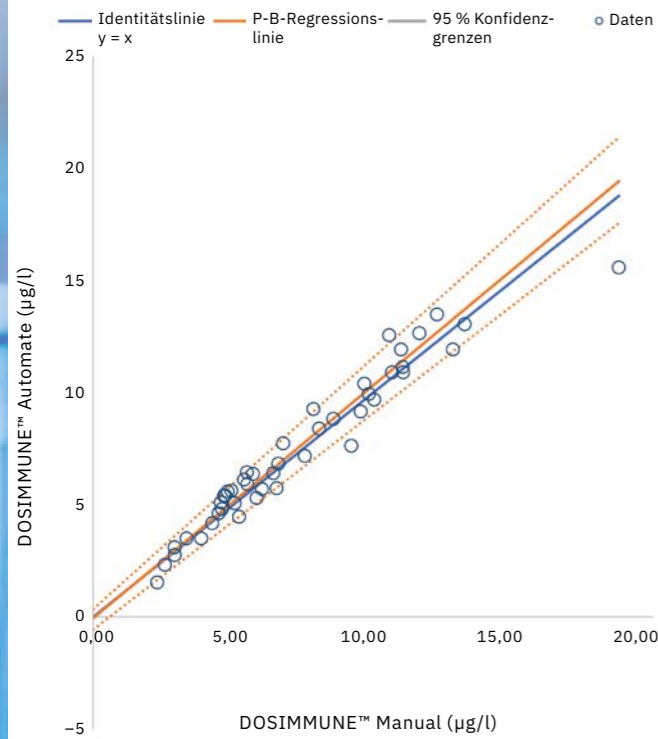
Streudiagramm der Passing-Bablok-Regression von DOSIMMUNE™ Manual ggü. DOSIMMUNE™ Automate für SIROLIMUS in Vollblut

Streudiagramm der Passing-Bablok-Regression von DOSIMMUNE™ Manual ggü. DOSIMMUNE™ Automate für EVEROLIMUS in Vollblut



Streudiagramm der Passing-Bablok-Regression von DOSIMMUNE™ Manual ggü. DOSIMMUNE™ Automate für TACROLIMUS in Vollblut

Streudiagramm der Passing-Bablok-Regression von DOSIMMUNE™ Manual ggü. DOSIMMUNE™ Automate für CYCLOSPORIN in Vollblut



Ergebnisse, die bei echten Patientenproben mit manueller Vorbereitung erzielt wurden, mit denen des automatisierten Protokolls verglichen wurden. Die statistische Analyse ergab, dass die Methoden sehr gut übereinstimmen und vergleichbar sind. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Passing-Bablok-Reggressionsanalyse dargestellt.

Durchsatz und Konformität

Durch die Anpassung der Anzahl der Liquid-Handling- und LC-MS/MS-Systeme lassen sich 300 bis fast 900 Patientenproben in weniger als 10 Arbeitsstunden analysieren. In Abbildung 5 ist ein Beispiel für eine vorgeschlagene Konfiguration zur Erreichung eines sehr hohen Durchsatzes dargestellt.

Neben der analytischen Optimierung wurde auch der Informationsfluss untersucht, um diesen an die Systemgeschwindigkeit anzupassen. Das Liquid-Handling-System generiert automatisch die Arbeitsliste durch das Scannen der Patientenröhrchen. Diese Liste wird direkt im richtigen Format in die Shimadzu LabSolutions Software für LC-MS exportiert. Mit nur wenigen Klicks lässt sich die Sequenz für die Probenanalyse erstellen. Unter Verwendung adapti-

ver Markierungsregeln schlägt die Software einen Review-by-Exception vor, bei dem die Daten hervorgehoben werden, die vom Analytiker geprüft werden müssen. Eine doppelte Datenvalidierung ist möglich, bevor die Ergebnisse über CSV-Dateien oder eine bidirektionale HL7-Verbindung an das Laborinformationssystem gesendet werden.

Alle Geräte und Software, die mit dieser zeitsparenden Lösung in Zusammenhang stehen, sind CE-IVD-zertifiziert. Das DOSIMMUNE™-Kit wurde ebenfalls CE-IVD-zertifiziert mit manueller oder automatischer Probenvorbereitung.

Abschließend lässt sich sagen, dass es nun eine effiziente und zeitsparende neue Methode für die Hochdurchsatzanalyse von Immunsuppressiva gibt, bei der eine optimierte und vollständig richtlinienkonforme Kombination von Instrumenten, Reagenzien und Software zum Einsatz kommt.

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.

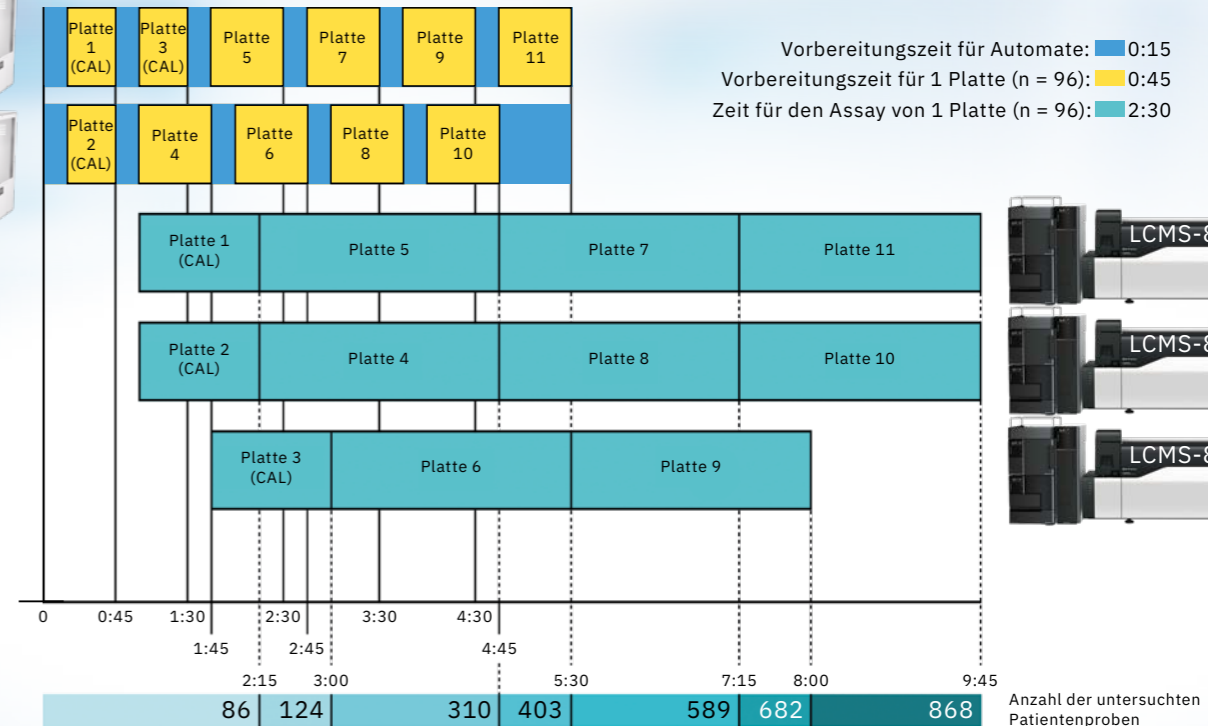


Abbildung 4: Analyse der Passing-Bablok-Regression zum Vergleich von manueller Vorbereitung und automatisierter Methode

Abbildung 5: Beispiel einer Konfiguration mit hohem Durchsatz



Schnellere Bestimmung von Chloramphenicol in Honig

Neues Verfahren kombiniert DPiMS-8060 mit dem LCMS-8060NX für schnellere Messungen

Dr. Gerasimos Liapatas, Dr. Manos Barmounis, N. Asteriadis SA, Athen, Griechenland

Dr. Konstantinos M. Kasiotis, Dr. Kyriaki Machera, Laboratory of Pesticides' Toxicology, Benaki Phytopathological Institute, Kifissia, Griechenland



Für die Untersuchung von Honig auf Rückstände von Chloramphenicol wurde eine neuartige, von Shimadzu entwickelte APCI-Quelle eingesetzt. Das innovative Verfahren basiert auf dem Prinzip der Probe-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (PESI-MS) und markiert einen bedeutenden Fortschritt in der LC-MS-Analyse, da sie den Einsatz einer Analysensäule überflüssig macht. Mit dieser Methode lassen sich eine Bestimmungsgrenze von 1,0 ng/g und eine erheblich kürzere Messzeit von zwei Minuten pro Probe erzielen – das ist zehnmal schneller als herkömmliche Verfahren.



Bei der Honigproduktion kommen üblicherweise Xenobiotika zum Einsatz, um die Bienenvölker vor Infektionen zu schützen. So wird zur Behandlung von Bienenlarven beispielsweise das Breitbandantibiotikum Chloramphenicol eingesetzt. Chloramphenicol hat jedoch toxische und dosisunabhängige Nebenwirkungen auf empfindliche Personen und der Einsatz bei Nutztieren für die Lebensmittelproduktion, einschließlich Honigbienen, ist gesetzlich reguliert.[1]

Herkömmliche Methoden zur Untersuchung von Honig auf Chloramphenicol-Rückstände nutzen die Elektrospray-Ionisation (ESI). Bedauerlicherweise sind ESI-Methoden mitunter sehr zeitaufwendig, sodass Forscher nun eine Ionenquelle entwickelt haben, um das Verfahren zu beschleunigen. Die neue Quelle kombiniert die hohe Selektivität des LCMS-8060NX im MRM-Modus mit der hohen Messgeschwindigkeit des neuen DPiMS-8060 von Shimadzu und macht den Einsatz einer Analysensäule überflüssig.

Nachweis von Chloramphenicol-Rückständen in Honig

Die Probe-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (PESI-MS) wendet ähnliche Prinzipien wie die ESI an. Die mobile Phase wird durch eine kleine Menge Lösungsmittel ersetzt, in dem die Probe enthalten ist: Diese wird anschließend auf eine Kunststoffplatte übertragen. Die ESI-Kapillare wird durch eine Metallnadel ersetzt, die in die Lösung eintaucht; die Ionisierung findet also an der Nadel statt.

Im Rahmen der Entwicklung dieser PESI-MS-Methode wurden drei Lösungsmittel getestet: 100 % Methanol; 50 % Wasser – 50 % Methanol mit 10 mM Ammoniumformiat; und 50 % Wasser – 50 % Isopropanol mit 10 mM Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure. Bei Verwendung von Methanol als Lösungsmittel wurde kein Signal für Chloramphenicol und den internen Standard (IS) festgestellt. Im Vergleich zum Wasser-Methanol-Gemisch wurde mithilfe von Wasser-Isopropanol ein viermal stärkeres Signal erzielt. Mit dieser neuartigen Methode lassen sich eine Bestimmungsgrenze von 1,0 ng/g und erheblich kürzere Messzeiten von zwei Minuten pro Probe erzielen. →



Abbildung 1:
DPiMS-8060 mit LCMS-8060

Wiederholbarkeit, Extraktionseffizienz und Matrixeffekt

Die Wiederholbarkeit der Messungen wurde durch dreifache Analyse einer mit Chloramphenicol und Chloramphenicol-d5 dotierten Probe untersucht. Zunächst war die prozentuale relative Standardabweichung (%RSD) bei Chloramphenicol (9,5 %) und dem IS (11,1 %) sehr hoch. Nach Zugabe eines deuterierten internen Standards reduzierte sich der %RSD-Wert um den Faktor 5, was zeigt, dass sich die Wiederholbarkeit der PESI-MS-Messungen mit einem deuterierten internen Standard erheblich verbessern lässt.

Da bei der PESI-MS keine chromatographische Trennung erfolgt, können potenzielle Quellen der Ionenunterdrückung im Extrakt nicht mehr vom Analyten und vom internen Standard getrennt werden. Daher war es wichtig, den Matrixeffekt des vorgeschlagenen Vorbehandlungsprotokolls zu bestimmen. Dazu wurden eine an die Matrixzusammensetzung der Realprobe angepasste „Blank“-Probe (mit dem Analyten und dem internen Standard in Lösungsmittel rekonstituiert) und eine dotierte Probe mit einer Konzentration von 3 ng/g Honig hergestellt. Um den Matrixeffekt zu bewerten, wurden die Ergebnisse für beide Proben mit denen für die Standardlösung verglichen. Daraus ergab sich eine Extraktionseffizienz von 74 % für Chloramphenicol und 73 % für den internen Standard. Ein Vergleich der Ergebnisse für die „Blank“-Probe und die Standardlösung weist auf eine Wiederfindungsrate von 54 % für Chloramphenicol und 46 % für den internen Standard hin.

MS-Parameter und Datenverarbeitung

Für die Detektion von Chloramphenicol und des internen Standards wurde die negative Ionisierung angewendet. Zur Quantifizierung von Chloramphenicol wurde ein etablierter MRM-Übergang verwendet (321 > 257).[4] Die Kollisionsenergie (CE) für die Quantifizierung war auf 11 V optimiert.

Zur Bestätigung wurde der MRM-Übergang 321 > 194 bei CE 18 V verwendet. Die entsprechenden Parameter für den internen Standard waren 326 > 262, CE 12 V für die Quantifizierung und 326 > 157, CE 18 V für die Bestätigung. Für die Analyse wurden 10 µl des Probenextrakts genommen, die Analysezeit betrug 0,3 min pro Probe und die Gesamtmesszeit weniger als zwei Minuten.

Die Massenspektrometrie-Parameter werden in Tabelle 1 beschrieben. Der größte Unterschied bei den MS-Parametern im Vergleich zu herkömmlichen LC-MS-Methoden ist die deutlich geringere Heizblocktemperatur (30 °C anstatt typischer Werte von ca. 250 °C) bei PESI-MS-Methoden.[6,7] Ein weiterer Unterschied zu herkömmlichen LC-MS-Methoden ist, dass vor der Messung des Analyten und des IS (Abbildung 2) jeweils ein Q3-Scan (m/z 10–2.000) im positiven und im negativen Modus stattfindet.

Es gibt zwei wichtige PESI-MS-Parameter, die in der „PESI MS Solution“-Software konfiguriert werden können: Die „Ionization outage time“ und die „Take sample outage time“ (Tabelle 2). Die Anwendung der PESI-MS-Methode führt zu einem vollkommen unterschiedlichen Rohdatenformat. Statt eines chromatographischen Peaks müssen jetzt mehrere Dutzend Peaks integriert werden. Jeder Peak entspricht einer spontanen Ionisierung durch die PESI-Nadel (Abbildung 3).

Schnellere Analysen

Über die mögliche toxische Wirkung von Chloramphenicol-Rückständen in Honig hinaus ist die Kontrolle von Antibiotika generell ein Teil der weltweit wachsenden Bedenken über den unnötigen Einsatz antimikrobieller Substanzen in der Landwirtschaft. Schnellere und einfachere Analysen können Hochdurchsatzlaboren weltweit dabei helfen, ihre kritische Arbeit für die Sicherheit und das Wohlergehen aller Menschen noch besser zu erfüllen.

Typ	Ereignis#	+/-	Verbindungsname m/z	Zeit (0,000 min – 0,300 min)
Q3-Scan	1	+	10,0000:2000,0000	
Q3-Scan	2	-	10,0000:2000,0000	
MRM	3	-	CAP 320,9000 > 257,0000, 320.	
MRM	4	-	CAP d5 325,9000 > 262,0000, 3	

Abbildung 2: Typische MS-Messparameter bei Verwendung einer PESI-Quelle

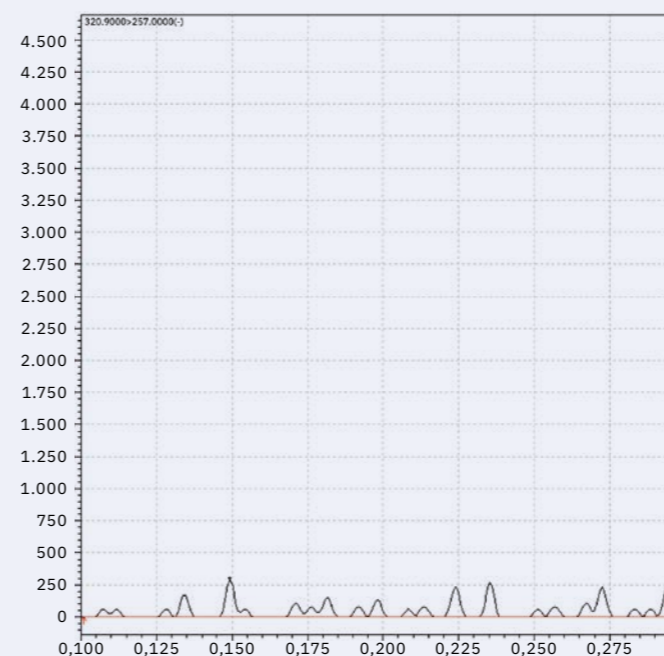


Abbildung 3: Daten für eine Blank-Probe (oben) und eine gespickte Honigprobe von 1,0 ng/g (unten)

MS-Parameter	Wert
Desolvatisierungstemperatur	250 °C
Heizblocktemperatur	30 °C
Verweilzeit	10 ms
Ionisationsspannung	2 kV
Q1-Auflösung	Einheit
Q3-Auflösung	Einheit
MRM Chloramphenicol (Quantifizierung)	321 > 257
MRM Chloramphenicol (Bestätigung)	321 > 152
MRM Chloramphenicol d5 (Quantifizierung)	326 > 262
MRM Chloramphenicol (Bestätigung)	326 > 157

Tabelle 1: MS-Parameter für die Feststellung von Chloramphenicol in Honig

PESI-Parameter	Wert
Ionization outage time	160 ms
Take sample outage time	50 ms

Tabelle 2: PESI-Parameter für die Feststellung von Chloramphenicol in Honig

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.





Dr. Benjamin Thomas, Shimadzu Europa GmbH

Galvanisch beschichtete Produkte sind aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken, vom rhodinierten Ehering bis zum verchromten Motorradauspuff. Viele analytische Fragestellungen rund um Galvanik – von der Zusammensetzung des Galvanikbades bis zur Dicke der aufgetragenen Beschichtung – lassen sich zerstörungsfrei mit energiedispersiver Röntgenfluoreszenzspektroskopie beantworten. Somit vereint ein Gerät viele verschiedene Applikationen.

Die energiedispersive Röntgenfluoreszenz (ED-XRF für Englisch „energy-dispersive x-ray fluorescence“) ist ein zerstörungsfreies Analyseverfahren, mit dem die Elementzusammensetzung einer Probe analysiert werden kann. Dabei wird die Probe mit Röntgenstrahlung belichtet. Die Energieverteilung und Flussdichte dieser Röntgenphotonen kann durch Spannung und Stromstärke an der Röntgenröhre und das Zwischenschalten von Absorptionsfiltern für die jeweilige Analyse optimiert werden.

Das Prinzip lässt sich am besten anhand des Bohrschen Atommodells (Abbildung 1) beschreiben: Durch die Bestrahlung werden Elektronen aus den Atomorbitalen („Schalen“) der in der Probe enthaltenen Elemente herausgeschlagen (1). Es entsteht ein sogenanntes „Loch“ (2). Die für diese Anregung benötigte Energie hängt von der Ordnungszahl des jeweiligen Elements ab. Das angeregte Atom kehrt nun in den energetischen Grundzustand zurück, indem das entstandene „Loch“ durch ein Elektron aus einer höheren Schale gefüllt wird (3).

Gemäß dem Energieerhaltungssatz muss dabei die überschüssige Energie in Form von Licht abgegeben werden. →

Die Energiedifferenz zwischen zwei Schalen – und somit die Energie des abgegebenen Photons in Kiloelektronenvolt (keV) – kann quantenmechanisch berechnet werden und ist charakteristisch für jedes Element. Aus dem Spektrum kann daher die Elementzusammensetzung der Probe berechnet werden, bei bekannter Zusammensetzung jeder Schicht aber auch die Schichtdicken. Die Röntgenstrahlung dringt dabei je nach Zusammensetzung und Dichte bis zu 100 µm in die Probe ein.

Korrosion

Viele Alltagsgegenstände und auch Baumaterialien werden aus metallischen Werkstoffen gefertigt. Die Metalle sind anfällig für Reaktionen mit Sauerstoff oder Säuren und kehren bei ungeschütztem Kontakt mit Luft und Feuchtigkeit auf lange Sicht in ihren Ursprungszustand zurück – sie korrodieren.

Korrosion ist ein elektrochemischer Prozess, bei dem Wasser als Elektrolyt wirkt. Dabei gibt das Metall Elektronen an im Wasser gelösten Sauerstoff ab (Abbildung 2).

Rostschutz mit Röntgenstrahlung

Das EDX-7200 als Schweizer Taschenmesser in der Galvanik-Qualitätskontrolle

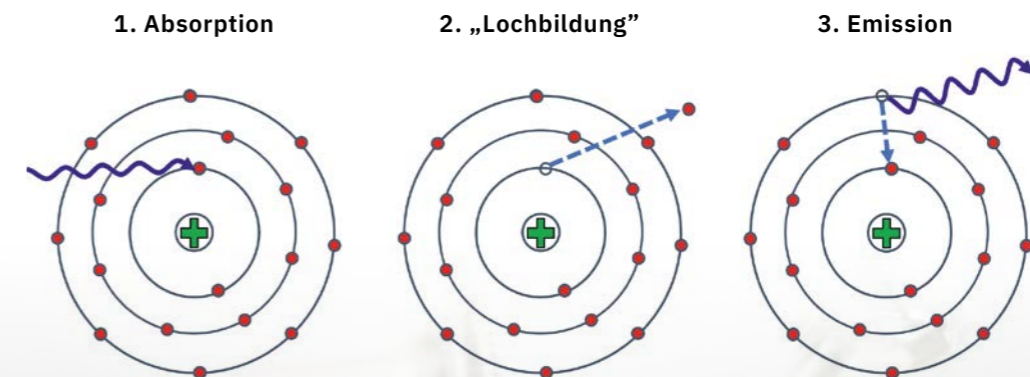


Abbildung 1: Röntgenfluoreszenz am Bohrschen Atommodell erklärt

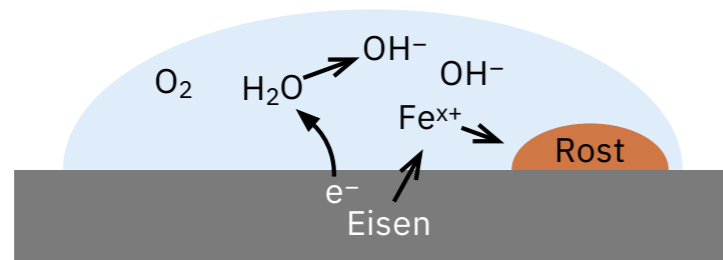


Abbildung 2: Elektrochemische Reaktionen bei der Rostbildung

Während einige Metalle, wie z. B. Aluminium, bei Luftkontakt eine durchgängige, stabile und so vor weiterer Korrosion schützende Oxidschicht ausbilden, lagern sich die Oxide anderer Metalle, wie etwa Eisen, locker und wasserdurchlässig ab. Somit „frisst“ sich die Korrosion regelrecht durch den Metallkörper, bis die Struktur des entsprechenden Bauteils nachgibt. Säuren sowie Kontakt mit anderen Metallen („Bimetallkorrosion“) begünstigen diesen Vorgang.

Korrosionsschutz

Beim Korrosionsschutz gibt es verschiedene Ansätze (Tabelle 1). In den meisten Fällen wird der Korrosionsschutz durch Beschichtung mit anderen Metallen, Harz oder einer Kombination aus beidem („Duplex-System“) erreicht. So begegnen uns im Baumarkt beispielsweise „feuerverzinkte“, also in einer Zinkschmelze beschichtete, Schrauben; in der Küche finden wir galvanisch vergoldetes Besteck und auch der Ehering aus Weißgold ist in der Regel galvanisch rhodiniert, d. h. durch eine dünne Rhodiumbeschichtung vor Korrosion geschützt.

Galvanikverfahren

Bei galvanischen Verfahren wird ein elektrisch leitfähiges Werkstück durch elektrochemische Abscheidung von Metall aus einer Elektrolytlösung beschichtet. Die im Galvanikbad gelösten Ionen werden in beiden Fällen durch den am Werkstück anliegenden Strom wieder zum Metall reduziert, das sich in Schichten auf dem Werkstück ablagert.

Die großtechnische Anwendung der Verfahren ist sehr komplex. Die chemische Zusammensetzung des Bades muss genau überwacht werden, ebenso die Stromstärke und Beschichtungszeit. In der Praxis sind oft mehrere verschiedene Schichten nötig, um einen mechanisch und chemisch stabilen und langlebigen Korrosionsschutz zu erreichen. Die folgenden drei Beispiele zeigen, wie die EDX-Spektroskopie zur Kontrolle der Ausgangsmaterialien, Zwischen- und Endprodukte eingesetzt werden kann.

Beispiel 1: Zusammensetzung der Grundlegierung

Die möglichen Beschichtungen, benötigten Parameter und Vorbehandlung hängen vom Material des zu beschichtenden Werkstücks ab. So kann Edelstahl zum Beispiel auf Hochglanz poliert und direkt verchromt werden, während andere Stahlsorten zunächst verkupfert und vernickelt werden müssen, um eine Grundlage für die finale Chromschicht zu schaffen.

Mittels EDX-Spektroskopie lässt sich die Zusammensetzung einer Legierung einfach bestimmen. Je nach Anzahl der erwarteten Elemente reicht eine Messzeit von 30 Sekunden oft aus. Ein qualitativ-quantitatives Ergebnis kann dabei auch ohne Kalibration ermittelt werden. Da die Position der elementspezifischen Linien bekannt ist, können alle gemessenen Linien automatisch zugeordnet werden. Anhand der Intensitätsverhältnisse wird dann eine Verteilung ausgegeben.

Auf Basis der gefundenen Elemente wird die Probe dann mit einer quantitativen Methode erneut gemessen, um die genaue Zusammensetzung zu ermitteln (Tabelle 2). →

Prinzip	Wirkweise	Vorteil	Nachteil	Beispiel
Beschichtung mit Edelmetall	Schutzschicht nicht anfällig für Korrosion	Langlebigkeit	Beschleunigte Korrosion bei Beschädigung	Vergoldung, Verchromung
Beschichtung mit unedlem Metall	Schutzschicht fungiert als Opferanode	Schutz auch bei Beschädigung	Schutzschicht löst sich langsam auf	Verzinkung, Opferanoden am Schiffsrumpf
Beschichtung mit Kunststoff	Schutzschicht nicht anfällig für Korrosion	Keine Bimetall-Korrosion	Geringe mechanische Stabilität	Teflon-Beschichtung, Schutzlack
Anlegen von Fremdstrom	Verlorene Elektronen kontinuierlich „nachliefern“	Verschleißfrei	Nur im Großmaßstab praktikabel	Brücken, Pipelines, Schiffsaufbauten

Tabelle 1: Verschiedene Korrosionsschutztechniken im Vergleich

Element	Al	Si	Cu	Fe	Zn	Mn	Mg	Ti	Cr
Zertifikat	85,02	6,90	3,90	1,01	0,99	0,83	0,42	0,29	0,26
EDX	85,31	7,99	2,72	0,94	0,87	0,81	0,00	0,32	0,29

Tabelle 2: Ohne Kalibration ermitteltes Ergebnis in % gegenüber den zertifizierten Werten



Beispiel 2: Zusammensetzung des Bads und Abwassers

Die korrekte Zusammensetzung des Galvanikbads ist wichtig für ein gutes Beschichtungsergebnis. Bei Verwendung einer unlöslichen Anode muss das Grundmaterial der Beschichtung in der richtigen Konzentration in Form von löslichen Salzen beigemischt werden. Daneben wird das Bad im Prozess auch verunreinigt, zum Beispiel durch anhaftende Flüssigkeit aus anderen Produktionsschritten. Daher müssen regelmäßig Proben entnommen und auf ihre chemische Zusammensetzung untersucht werden.

Das Bad enthält dabei neben konzentrierten Säuren in der Regel eine Vielzahl giftiger und umweltschädlicher Substanzen. Daher ist auch eine Kontrolle des Abwassers erforderlich. Im Gegensatz zum Galvanikbad selbst müssen hier kleinste Konzentrationen im ppm-Bereich zuverlässig bestimmt werden.

Flüssige Proben können mittels EDX ohne weitere Aufbereitung in einer Zelle aus Kunststoff gemessen werden. Verschiedene Materialien sind erhältlich, je nach geforderter chemischer Beständigkeit. Der Boden besteht aus einer

dünnen Polymerfolie, um die Röntgenstrahlung so wenig wie möglich abzuschwächen. Die Detektionsgrenzen liegen je nach Messparametern und Qualität der Kalibration typischerweise zwischen 0,1 und 5 ppm.

Beispiel 3: Schichtdicke

EDX ist eine Methode der Oberflächenanalytik. Die Eindringtiefe der Röntgenstrahlung liegt je nach Material unterhalb von 100 µm. Ist die Probendicke unterhalb der Eindringtiefe, so hängt die Stärke einer Linie neben der Konzentration des entsprechenden Elements auch von der Schichtdicke ab. Daher kann bei bekannter Zusammensetzung einer Beschichtung aus dem Spektrum auf die Schichtdicke zurückgerechnet werden – auch ohne Kalibration.

Auch die Analyse von Mehrschichtsystemen ist möglich, sofern alle Schichten durchstrahlt werden können. Durch eine spezielle Methode („Background Fundamental Parameters“-Methode) ist sogar die präzise Bestimmung von Schichtdicken auf unregelmäßig geformten Bauteilen, wie z. B. Schrauben, möglich.

PCEDX-Navi-Software

Die Möglichkeiten und Applikationen zur EDX-Analyse erscheinen zunächst vielfältig und komplex und tatsächlich gibt es bei der Erstellung einer neuen EDX-Analysemethode viel zu bedenken. In der Praxis ermöglicht die PCEDX-Navi-Software eine einfache Bedienung (Abbildung 3). Hier können die vorgefertigten Methoden aufgerufen werden und die Handgriffe sind intuitiv. Der Messfleck kann über ein Kamerabild kontrolliert und optimiert werden.

In jeder Methode können auch Qualitätskriterien (pass/fail) für die jeweilige Probenart hinterlegt werden. So erhält der Anwender eine unmittelbare Rückmeldung, ob die Probe in Ordnung ist (Abbildung 4). Die Resultate können anschließend als Bericht mit einer zuvor in Microsoft Excel erstellten Vorlage exportiert werden.

Viele analytische Fragestellungen der Galvanikindustrie lassen sich mit EDX-Spektroskopie beantworten. Mit einem Gerät können so flüssige oder feste Proben zerstörungsfrei und mit einfachen Handgriffen gemessen werden. Dies spart Platz im Labor, schont das Budget und

verkürzt Einarbeitungszeiten. Im Gegensatz zu Methoden wie der Atomabsorptionsspektroskopie können flüssige Proben dabei unverdünnt gemessen und auch Halogene bestimmt werden. Bei festen Proben können sowohl die Zusammensetzung als auch die Schichtdicken bestimmt werden, sodass hier keine zusätzlichen Geräte beschafft werden müssen.

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.



Abbildung 3: Benutzeroberfläche der PCEDX-Navi-Software

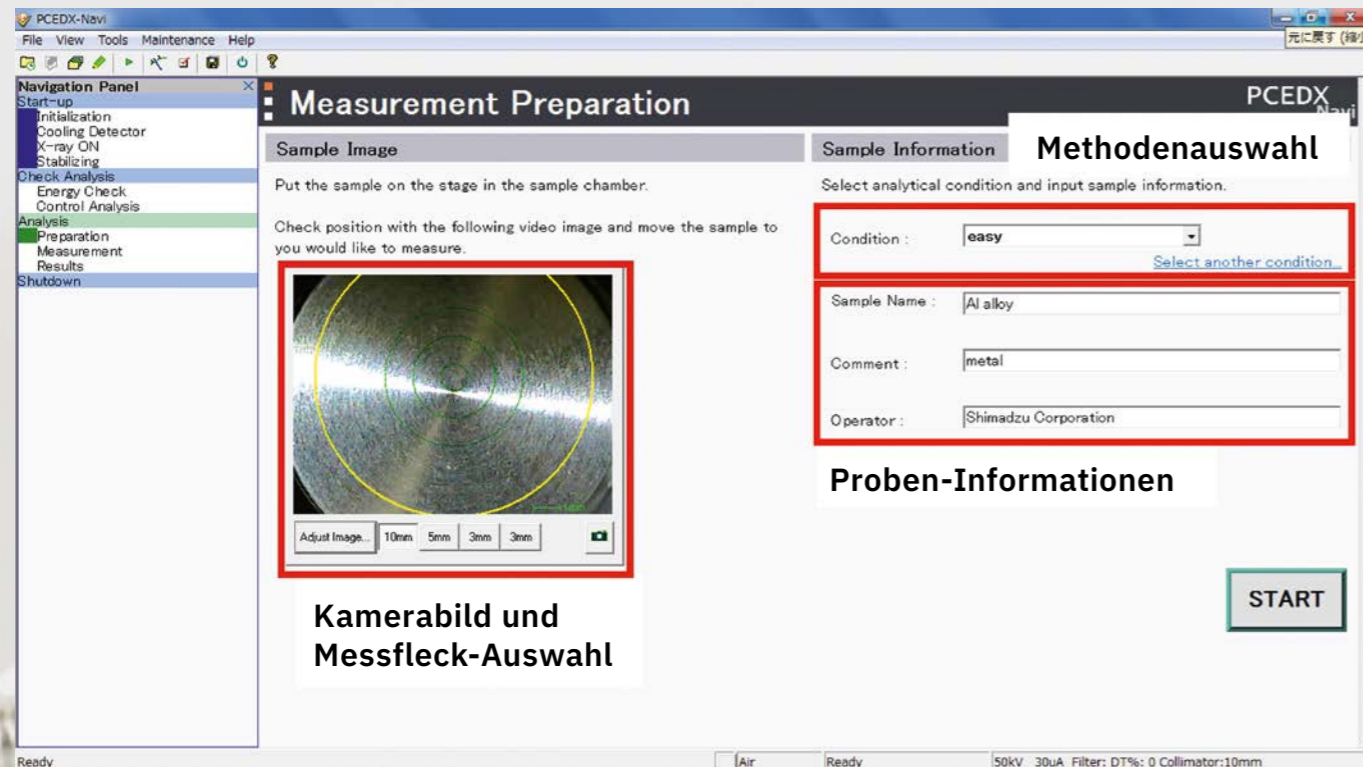


Abbildung 4: Beurteilung einer Probe mit hinterlegten Qualitätskriterien (hier RoHS-Grenzwerte)



Verbesserungen in der Entwicklung von Biopharmazeutika



Hochwertige metallfreie LC-MS-Analyse von therapeu- tischen Oligonukleotiden

Dr. Gesa Schad, Dr. Björn T. Erxleben,
Shimadzu Europa GmbH

In den vergangenen Jahren wurde das Potenzial von therapeutischen Oligonukleotiden zur Behandlung seltener und chronischer Erkrankungen erkannt und bereits mehrere solcher Arzneimittel wurden zugelassen. Die Analyse dieser Nucleinsäuren zur Bestätigung der Identität und Reinheit mittels LC-MS stellt eine Herausforderung dar, da Oligonukleotide mehrere reaktive Gruppen besitzen, was bei einem edelstahlbasierten UHPLC-System zur Adsorption an metallischen Oberflächen führen kann. Der vorliegende Artikel befasst sich mit der Verbesserung der Quantifizierungsleistung in der LC-MS-Analyse von Oligonukleotiden mit dem Nexera XS inert, einem bioinerten UHPLC-System.

Einführung

Therapeutische Oligonukleotide zeichnen sich durch die zielgerichtete Behandlung spezifischer Erkrankungen aus und sind Teil einer neuen Welle von Biopharmazeutika, zu denen auch die mRNA-Impfstoffe gegen COVID-19 gehören. Wie in Abbildung 1 dargestellt, binden die DNA-Oligomere an ein Targetprotein oder eine RNA und werden erfolgreich zur Hemmung der Transkription und Genexpression eingesetzt. Auch bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort haben sie sich als wirksam erwiesen. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist, dass die Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten im Vergleich zu herkömmlichen Methoden weniger Zeit in Anspruch nimmt, da Oligonukleotide einfach zu entwerfen und zu synthetisieren sind. →

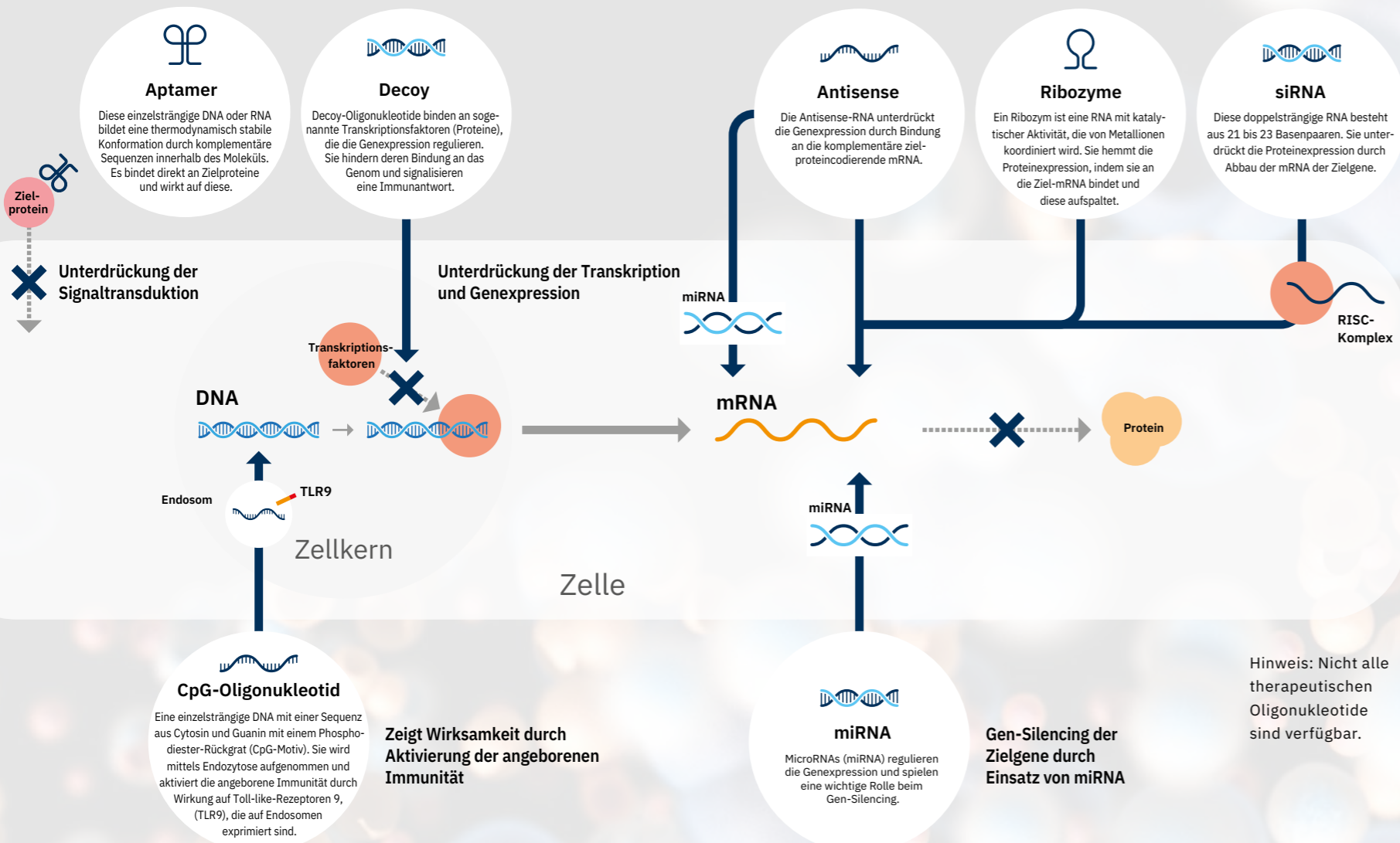


Abbildung 1: Wirkmechanismen von therapeutischen Oligonucleotiden[1]

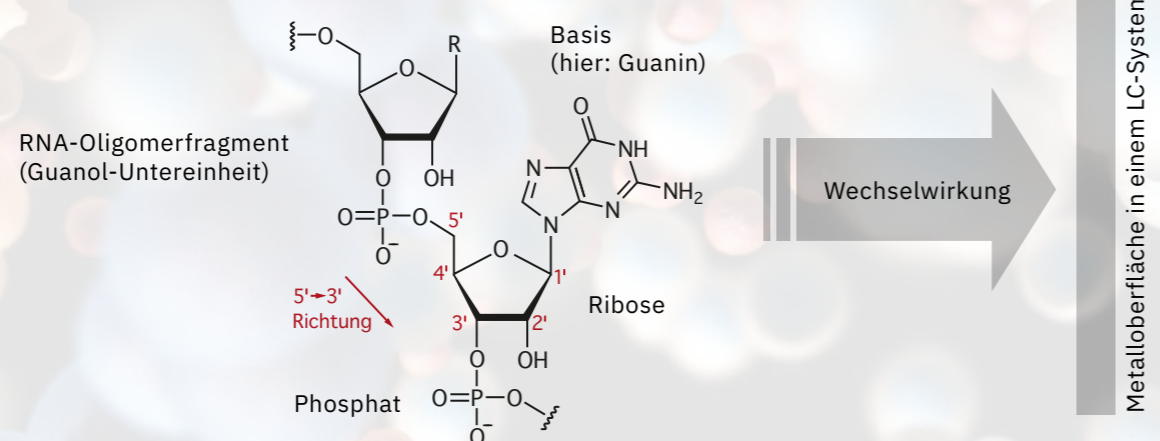


Abbildung 2: Therapeutische Nucleinsäuren besitzen aktive Gruppen, die eine Wechselwirkung mit metallischen Oberflächen eingehen

Um die Identität von synthetisch hergestellten Arzneimitteln wie therapeutischen Oligonucleotiden zu bestätigen und diese auf ungewollte Unreinheiten zu untersuchen, hat sich das Verfahren der LC-MS-Analyse bewährt. Die Analyse dieser Nucleinsäuren ist jedoch mit einigen wesentlichen Herausforderungen verbunden, da sie mehrere reaktive Gruppen besitzen, die zu einer Adsorption an Metalloberflächen eines edelstahlbasierten UHPLC-Instruments führen können (Abbildung 2). Diese Wechselwirkung führt zu mangelhaften Peak-Formen, einer verringerten Empfindlichkeit und mangelnder Reproduzierbarkeit. Die wiederholte Injektion einer hochkonzentrierten Probe ist eine Möglichkeit, um ein System vor der eigentlichen Datenerfassung zu passivieren und so die Adsorptionsstellen auf der Metalloberfläche zu „sättigen“ und den Probeverlust zu verringern. Bei diesem Ansatz wird jedoch nicht nur Zeit und wertvolles Probenmaterial verschwendet – auch die Erfassung verlässlicher Daten kann aufgrund des laufend veränderten Zustands der Passivierung während der Analyse deutlich erschwert werden. Der vorliegende Artikel beschreibt die Verbesserung der Quantifizierungsleistung bei der LC-MS-Analyse von Oligonucleotiden mit dem Nexera XS inert, einem bioinerten UHPLC-System.

Experiment

Die für die Analyse verwendete Probe war ein Oligonucleotid mit der Sequenz 5'-dG-dC*-dC*-dT-dC*-dA-dG-dT-dC*-dT-dG-dC*-dT-dT-dC*-dG-dC*-dC*-3', wobei (*) für eine 5-C- oder 5-U-Methylierung und (d) für 2'-Desoxy-Nucleosid steht. Die Molekülmasse betrug 6.431,72.

Um den Effekt eines bioinerten Systems mit metallfreier Flusslinie zu bewerten, wurde die Analyse sowohl mit einem edelstahl (SUS-)basierten UHPLC-System (Nexera XR) mit SUS-Trennsäule als auch mit dem bioinerten Nexera XS inert mit metallfreier Säule durchgeführt. Die analytischen Bedingungen sind in Tabelle 1 ausführlich dargestellt. Als Ionenpaarreagenzien wurden HFIP (1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol) und DIPEA (N,N-Diisopropylethylamin) verwendet, wie es bei der Reversed-Phase-Analyse von Oligonucleotiden üblich ist. →

HPLC-Bedingungen (Nexera XR, Nexera XS inert)	
Säule:	Shim-pack Scepter C18-120 (100 x 2,1 mm, 3 µm) Shim-pack Scepter C18-120 (100 x 2,1 mm, 3 µm), metallfrei
Mobile Phase A:	50 mmol/l HFIP + 10 mmol/l DIPEA in Wasser
Mobile Phase B:	Acetonitril
Volumenstrom:	0,3 ml/min
Gradient:	5 % B (0–1 min), 5–30 % B (1–6 min), 95 % B (6,1–7 min), 5 % B (7,1–12 min)
MS-Bedingungen (LCMS-8060)	
Ionisierung:	ESI (negativer Modus)
Sondenspannung:	-4 kV
Modus:	MRM (m/z 803,5 > 95,0)
CID-Gas:	330 kPa
Vernebelungsgasstrom:	3,0 l/min
Trocknungsgasstrom:	8,0 l/min
Heizgasstrom:	12,0 l/min
DL-Temperatur:	300 °C
Heizblocktemperatur:	450 °C
Interface-Temperatur:	250 °C

Tabelle 1: Analytische Bedingungen der LC-MS-Analyse eines Oligonucleotids

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 3 zeigt Chromatogramme aus der Analyse einer 10 ng/ml Oligonukleotid-Standardlösung mit einem herkömmlichen Nexera XR UHPLC-System mit SUS-Säule und dem neuen Shimadzu Nexera XS inert mit metallfreier Säule. Die Ergebnisse zeigen, dass die Empfindlichkeit etwa um das 1,7-Fache zunimmt, wenn Metall aus der Flusslinie entfernt wird.

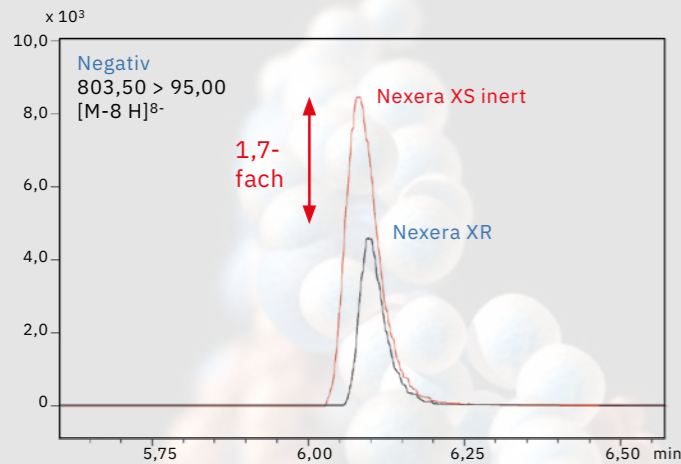


Abbildung 3: MRM-Chromatogramme einer Oligonukleotid-Standardlösung

Zum Vergleich der Leistung beider Systeme bei der quantitativen Analyse von Oligonukleotiden wurden Kalibrierungskurven im Bereich von 0,5–1.000 ng/ml erstellt. Das Diagramm, das sich aus den Daten des SUS-basierten Nexera XR Systems ergibt, zeigt einen niedrigeren Wert für die lineare Regression ($R^2 = 0,9721$) gegenüber der ausgezeichneten Linearität des bioinerten Systems ($R^2 = 0,9996$), was den Effekt der Metalladsorption auf die Genauigkeit der Quantifizierung bei der hochempfindlichen LC-MS-Analyse von Oligonukleotiden hervorhebt. Die Daten zur Linearität und Genauigkeit an den einzelnen Kalibrierungspunkten sind in Tabelle 2 und Abbildung 4 dargestellt. Diese Werte zeugen davon, dass sich die Zuverlässigkeit durch Verwendung des Nexera XS inert mit metallfreier Trennsäule insbesondere bei Proben mit sehr geringer Konzentration verbessern lässt.

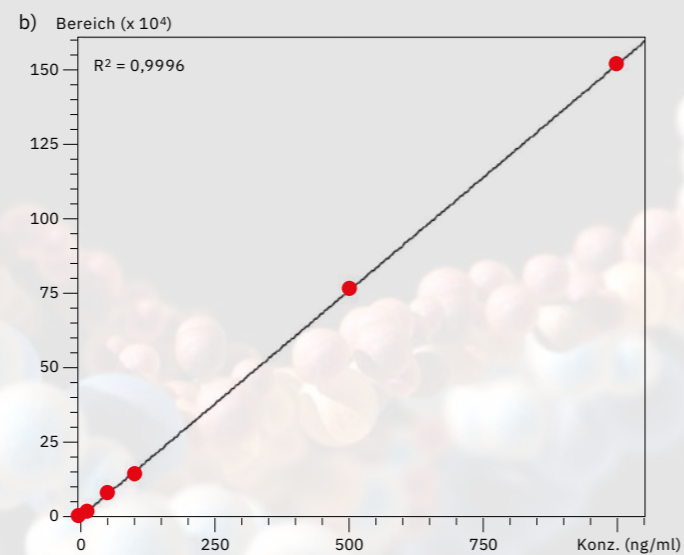
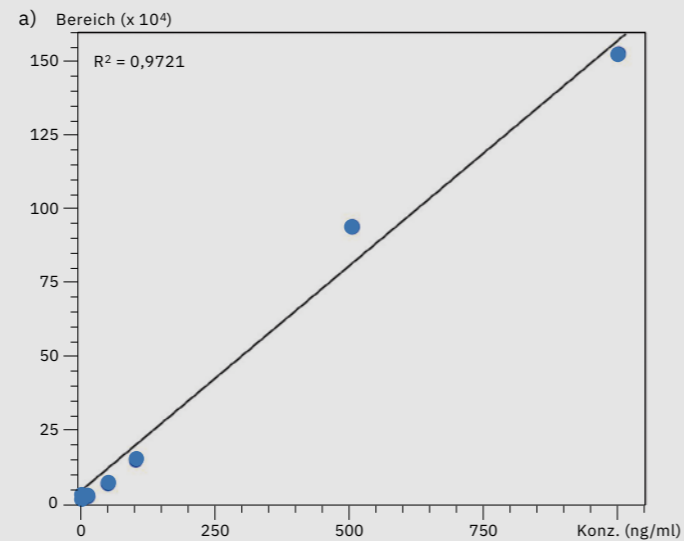


Abbildung 4: Kalibrierungskurve der LC-MS-Analyse eines Oligonukleotid-Standards mit a) einem SUS-basierten Nexera XR UHPLC-System und b) dem bioinerten UHPLC-System Nexera XS inert

Um die Systemleistung in Bezug auf den Carry-over-Effekt zu messen, wurde unmittelbar nach einer Messung von 1.000 ng/ml Oligonukleotidlösung reines Wasser injiziert. Abbildung 5 zeigt den Vergleich der Chromatogramme, die durch Injektion dieser Blindprobe in das SUS-basierte Nexera XR System (a) und das bioinerte Nexera XS inert System (b) erzielt wurden. Die Ergebnisse und die Carry-over-Werte von 0,079 % bzw. 0,003 % zeugen davon, dass die Metalladsorption beim Nexera XS inert ausbleibt, wodurch auch der Carry-over beim nächsten Probenlauf minimiert wird.

Konzentration (ng/ml)	Nexera XR		Nexera XS inert	
	ng/ml	Genauigkeit %	ng/ml	Genauigkeit %
0,5	2,28	455,7	0,57	113,5
1	-1,04	-104,4	0,93	93,0
5	2,43	48,5	5,42	108,5
10	5,62	56,2	9,13	91,3
50	26,63	53,3	50,24	100,6
100	76,39	76,4	92,77	92,8
500	588,74	117,7	497,04	99,4
1.000	965,46	96,5	1.010,36	101,0

Tabelle 2: Vergleich der Genauigkeit der LC-MS-Analyse eines Oligonukleotids mit einem SUS-basierten UHPLC-System und einem bioinerten UHPLC-System

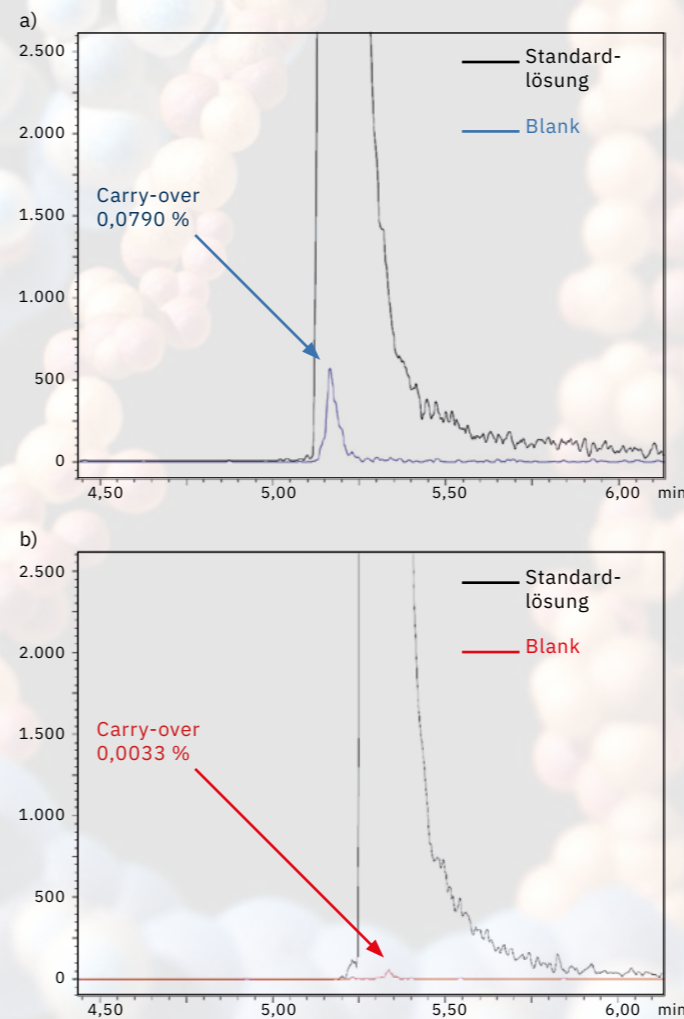


Abbildung 5: Carry-over-Performance eines a) SUS-basierten Nexera XR UHPLC-Systems und des b) bioinerten UHPLC-Systems Nexera XS inert

Im Rahmen einer Studie wurden die Empfindlichkeit, die Quantifizierungsleistung und der Carry-over-Effekt eines edelstahlbasierten UHPLC-Systems im Vergleich zu einem bioinerten UHPLC-System bei der hochempfindlichen LC-MS-Analyse von Oligonukleotiden untersucht. Bei Verwendung des bioinerten Systems ließen sich in allen Aspekten Verbesserungen erzielen, sodass die Vorteile einer metallfreien Flusslinie bei der Analyse von Verbindungen mit metallaffinen Gruppen eindeutig nachgewiesen werden konnten. Diese Studie zeigt den Nutzen einer Nexera XS inert in Kombination mit einer metallfreien Trennsäule für eine genaue Charakterisierung und Qualitätskontrolle von therapeutischen Oligonukleotiden.

Hinweis

Weitere Informationen und Literaturhinweise entnehmen Sie bitte der digitalen Version dieser Ausgabe.





JEC WORLD

Paris, Frankreich
25.–27.04.2023



SETAC

Dublin, Irland
30.04.–04.05.2023



SFC

Basel, Schweiz
14.–16.05.2023



WORLDFLAB – EUROMEDLAB

Rom, Italien
21.–25.05.2023



Food Integrity Europe

Amsterdam, Niederlande
23.05.2023



HPLC

Düsseldorf, Deutschland
18.–22.06.2023

secrets of science magazine

Herausgeber

Redaktion

Gestaltung

Auflage

©Copyright

Kundenzeitschrift der Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

Shimadzu Europa GmbH
Albert-Hahn-Str. 6–10
D-47269 Duisburg
Tel.: +49(0)203 7687-0
shimadzu@shimadzu.eu
www.shimadzu.eu

Uta Steeger,
Sonja Wischnewsky,
Andrea Wagner-Neumann,
Christopher Brünn

Bartenbach AG
Kaufmannshof 1
D-55120 Mainz

Deutsch: 4.500
Englisch: 4.300

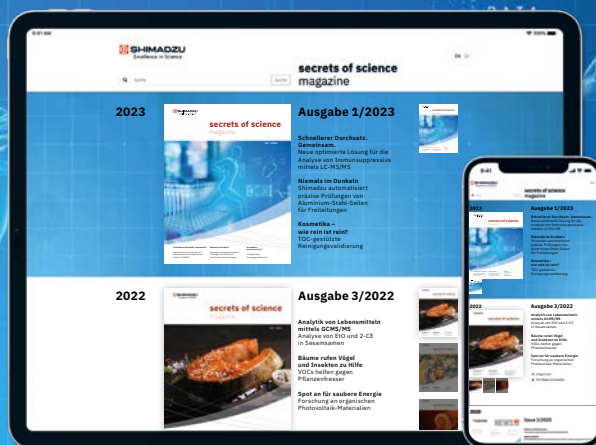
Shimadzu Europa GmbH,
Duisburg, März 2023.
Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit Genehmigung der Redaktion.

Noch mehr Einblicke

Sie wollen noch tiefer in die Themen des „Secrets of Science“ Magazins abtauchen? Die digitale Version bietet zu jedem Artikel noch mehr Insights, wie zusätzliche Chromatogramme, Tabellen und inhaltliche Details. Gehen Sie also den Geheimnissen der Wissenschaft auf den Grund.



Digitale Version
shimadzu-webapp.eu



05 4 3 6 7

GENERATE DATA

PULSE

NORMAL

116

0453268