

Emissionen im Fahrzeuginnenraum

Analyse von Werkstoffmaterialien
nach VDA278 mit Thermodesorption

UV-1900

UV-Vis-Spektroskopie – schnell
und einfach wie noch nie

50 Jahre Shimadzu in Europa

Meilensteine in Entwicklung und
Technologie





APPLIKATION

- In jedem Ozean, in jeder Tiefe – Mikrofasern und Mikroplastik **2**
- Restlos rein – TOC-Analytik für die Reinigungsvalidierung in der pharmazeutischen Industrie **8**
- SteBLife – neues Kurzzeitverfahren zur Lebensdauerberechnung von Werkstoffen, Proben und Bauteilen **10**
- Analyse von VOC- und SVOC-Emissionen im Fahrzeuginnenraum – Werkstoffprüfung nach VDA278 mit Thermodesorption **16**
- Öl im Wasser? – Schnelle und effiziente Analyse von Mineralölen in Umweltproben nach H53 **18**
- Die Qual der Wahl – Nicht alle C₁₈-Säulen zeigen dasselbe Trennverhalten **21**
- Derivatisierung mit Pyryliumsalzen – Höhere Empfindlichkeit bei Peptidanalysen mit LC-MS/MS **26**

PRODUKTE

- UV-1900: Perfekt für alle Analyseanforderungen – UV-Vis-Spektroskopie – schnell und einfach wie noch nie **6**

AKTUELLES

- ALSACHIM: Hochwertige Grundkomponenten für die Antibiotikaforschung **5**
- 50 Jahre Shimadzu in Europa – Meilensteine in Entwicklung und Technologie **14**
- Die Zukunft der Massenspektrometrie für das toxikologische Screening **24**

FÜR SIE GELESEN

- Mineralölrückstände in Lebensmitteln – MOSH-/MOAH-Bestimmung **12**

MÄRKTE

-  Chemical, Petrochemical, Biofuel and Energy
-  Clinical
-  Environment
-  Food, Beverages, Agriculture
-  Pharmaceutical
-  Plastics and Rubber
-  Automotive

In jedem Ozean, in jeder Tiefe – Mikrofasern und Mikroplastik

Mikro-FTIR-Analytik an kleinsten Partikeln aus der Tiefsee bis zum Polareis

Auf allen Kontinenten finden Naturwissenschaftler polymere Mikropartikel in Lebewesen – auch in der Welt der Meerestiere, etwa im Polardorsch (*Boreogadus saida*) oder in Tiefseeflöhen (*Lysianassoidea amphipods*), die ein wichtiges Glied in der Nahrungskette von Fischen, Pinguinen, Seevögeln oder Robben sind. Zwei Arbeitsgruppen (Newcastle University, Großbritannien und Wageningen Marine Research, Niederlande) untersuchten die Mageninhalte der jeweiligen Tierart. Und beide Gruppen wurden fündig. Mikropartikel um 100 µm Größe wurden isoliert.

Polardorsch vom Nordpol

Der Arktische Ozean wird oft als ungestörte und unberührte Natur erfahren. Jedoch ist die Arktis kein geschlossenes System, sondern vom Menschen beeinflusst, zum Beispiel durch Klimawandel oder Umweltverschmutzung. In den letzten Jahren wurde in der Nähe des Spitzbergen-Archipels im arktischen Ozean ein zusätzlicher Meereswirbel (Gyre) beschrieben, der aus den südlichen, stärker urbanisierten Gebieten den marinen Plastikabfall ansammelt. Auch im Meereis selbst wurden Plastikrückstände gefunden. Da das Eis schmilzt, können die im Meereis eingefangenen Kunststoffteilchen freigesetzt werden, und stehen für Organismen zur Verfügung, die unter dem Meereis leben und sich ernähren.

Einer dieser Organismen ist der Polardorsch, eine Fischart, die

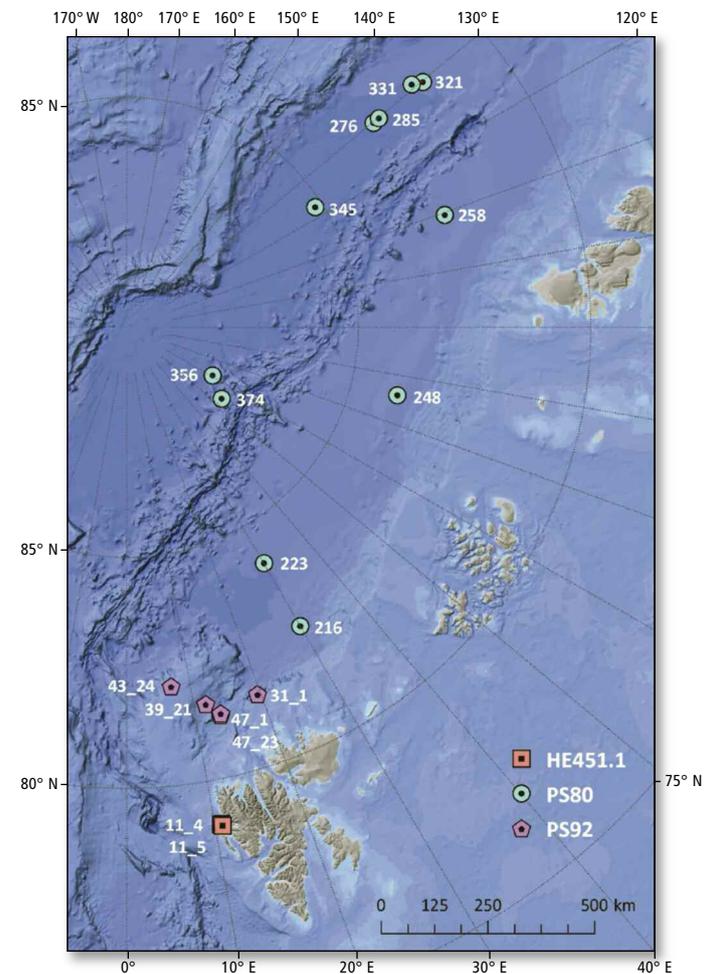


Abbildung 1: Fundorte der Polardorschproben

ihre ersten Jahre unter dem Meereis verbringt. Sie ernährt sich von kleinen Krebstieren und dient als wichtige Beute für größere Tiere wie Seevögel und Meeressäuger. Der Polardorsch wird darum als Schlüsselspezies des arktischen Ökosystems angesehen. Für diese Studie wurde der Fisch direkt unter dem Meereis des Eurasischen Beckens und in offenem Wasser rund um Spitzbergen gefangen [1].

Tiefseeshrimps – Ordnung Flohkrebse (Amphipoda)

Die Universität von Newcastle nutzte Tauchsonden, um mobile maritime Organismen in den extremen Tiefen der See einzusammeln. Proben wurden in einer Tiefe von 11.000 m im Marianen-Graben genommen, eine Tiefseerinne im westlichen Pazifik, direkt östlich der mikronesischen Inseln, sowie in ande-

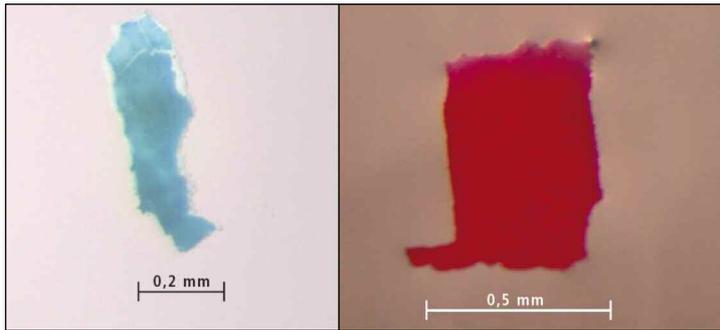


Abbildung 2: Zwei der gefundenen Partikel aus Polardorsch-Mägen

ren Gräben im Pazifik mit Tiefen bis zu 7.000 m. Die meisten Organismen waren Lysianassoidea Amphipoden, Kreaturen, die an die Bedingungen der Tiefsee angepasst sind. Es wurde herausgefunden, dass diese Lebewesen aus der Tiefsee sogar in der Lage sind, Enzyme zu entwickeln, die Holzfasern verdauen. [2]

Probenvorbereitung

Die größte Problematik der Mikropartikelanalyse ist die Kontamination der Proben durch elektrostatisch aufgeladene Partikel, die die Probe anfliegen oder Parti-

kel, die der Mensch (Schuppen und Fasern) mit sich trägt. Einige Kunststoff-Teilchen, sogenannte Mikrofasern, zum Beispiel aus Kleidung, werden nicht nur von Tieren aufgenommen, sondern sind so leicht, dass sie in der Luft schweben können. Eine Unterscheidung zwischen Fasern, die durch Tiere selbst oder durch Luftverunreinigungen in die Probe geraten, ist nicht möglich [1].

Die Reinigung der Mikropartikel ist eine weitere schwierige Fragestellung. Behandelt man die Proben chemisch, um alle proteinähnlichen Rückstände zu entfernen

oder wäscht man die Proben einfach mit Wasser? Bei der chemischen Reinigung können Informationen über anhaftende Chemikalien verloren gehen; bei der Reinigung mit Wasser bleiben diese Informationen erhalten, aber die Reinigung ist möglicherweise weniger gründlich. Die Mikropartikel aus dem Flohkrebs wurden mit einer KOH-Lösung (Kaliumhydroxid) bearbeitet, die alle organischen Anhaftungen auflöst, ohne den Kunststoff selbst anzugreifen. Die Partikel aus dem Polardorsch wurden mit Wasser gereinigt.

lichster Herkunft (Shimadzu, Sadtler, STJapan-Europe und anderen) identifiziert.

Studium der Plastikaufnahme

Zur Untersuchung der potenziellen Beziehung zwischen Kunststoff in Meereis und der Einnahme von Kunststoff durch Fische, wurde in 72 Polardorsch-Mägen nach Kunststoff gesucht. Von den 72 Fischen wurden zwei Individuen (2,8 % der gesammelten Probe) mit jeweils einem kleinen Plastikpartikel gefunden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Ein-



Abbildung 4: Hirodelleas gigas als Beispiel der Ordnung Amphipode

Analyse mit Infrarotmikrospektroskopie

Die Definition eines Mikropartikels variiert von Veröffentlichung zur Veröffentlichung. Partikel im µm-Bereich sind hier der Anlass zur Beschreibung einer Messtechnik, die dem Erscheinungsbild der Proben gerecht wird. Die Infrarotspektroskopie ist die Methode der Wahl.

Mit dem FTIR-Gerät IRTracer-100, dem Infrarotmikroskop AIM-9000 und der Diamantzelle DC3 von Specac, wurden die Untersuchungen der Mikropartikel durchgeführt. Je nach ihrem Aussehen wurden Einzelpunktmessungen oder Flächenanalysen (Mapping) ausgeführt. Mit der Diamantzelle werden kleine unebene Partikel plan und bis zur Transparenz gedrückt. Somit können Partikel im Durchlichtverfahren analysiert werden. Die gemessenen Infrarot-Spektren wurden mit Spektrenbibliotheken unterschied-

nahmeraten bei Fischen aus norwegischen und kanadischen Gewässern. Der in Abbildung 2 gezeigte blaue Partikel von 200 µm wurde infrarotmikroskopisch analysiert. Das Ergebnis der Durchlichtmessung ergab, dass der Partikel aus einer Kombination aus anorganischen (Kaolin) und polymerbasierenden Stoffen (PMMA) besteht (Abbildung 5, Seite 4). Das Infrarotspektrum (Transmission) des roten Partikels in Abbildung 2 ist das Ergebnis aus einer Mischung von Epoxidharz und Acryl basierendem Klebstoff [2].

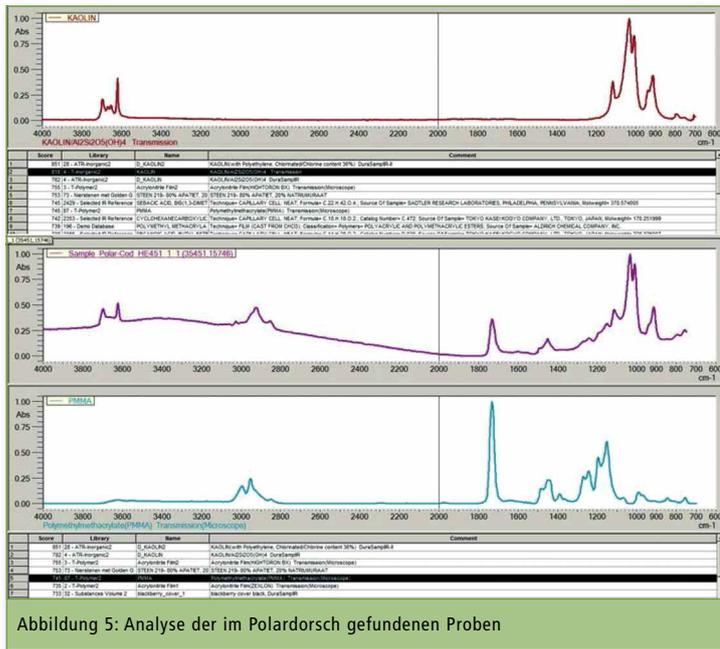
Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Analyse des blauen Partikels. Mit der Bibliotheksfunktion wurden die Hauptkomponenten PMMA (Polymethylmethacrylat) und Kaolin des Partikels identifiziert. Oben in der Abbildung ist das Kaolin dargestellt, in der Mitte das Transmissionsspektrum



Abbildung 3: Tauchsonde, die bei den Arbeiten in der Tiefsee zum Einsatz gelangte

Eigenschaft	PE-LD	PE-HD	PE-LLD	PMMA	Meerwasser (Temperatur: ~10 °C; Salzgehalt: 35 g/l)
Dichte in g/cm ³	0,915 - 0,935	0,94 - 0,97	0,87 - 0,94	1,18 - 1,19	1.027

Tabelle 1: Dichte von Meerwasser, Polyethylenen (PE) und Polymethylmetacrylat (PMMA) [Wikipedia]



dieser Kranz wiedergegeben werden.

Fazit – Kunststoff als zusätzlicher Stressfaktor

Die Ergebnisse zeigen, dass die Auswirkungen von Kunststoffverschmutzung den Arktischen Ozean sowie die Tiefsee erreicht haben und dass Fische und Amphipode Kunststoff-Teilchen begegnen können. Die Folgen der Einnahme von Plastikpartikeln bleiben unklar.

Zusammen mit anderen Faktoren wie dem Klimawandel, der zunehmenden Schifffahrt und der Ausweitung der Fischerei kann die Plastik-Verschmutzung ein zusätzlicher Stressfaktor des sensiblen Ökosystems der Arktis sein [1].

In der Tiefsee ist zu erwarten, dass Plastik, einmal am Tiefseeboden angekommen, dort auch bleibt. Daraus resultiert eine Anreicherung am Meeresboden. Dies ist ein Ergebnis, das alarmiert. Fasern aus dem Magen eines Tieres zu isolieren, das in 11 km Tiefe lebt, zeigt bereits die Folgen des Mikroplastikproblems [3].

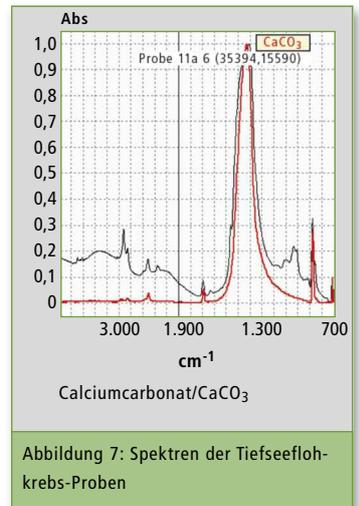


Abbildung 7: Spektren der Tiefseeflohkrebs-Proben

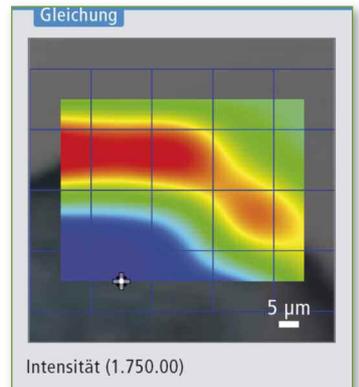


Abbildung 8: FTIR-Mapping Tiefseeflohkrebs



Abbildung 8a: Skalierung des FTIR-Mapping

des Mikropartikels und unten das Spektrum von PMMA.

Der Magen eines Tiefseeshrimps enthielt einen Partikel bestehend aus „Polyethylen“, der partiell von einer Mischung aus Organik und Anorganik umhüllt war (Abbildung 6). Polyethylen ist als Polymer von Natur aus sehr leicht mit seiner Dichte unter 1 (Tabelle 1) und schwimmt eigentlich in oberen Gewässerschichten. Vermutlich durch Anlagerung von kleinen Wassertieren und deren Skelette oder anderen äußeren Einflüssen ist dieser Partikel doch bis in die unteren Meerwasserschichten gelangt. In Abbildung 6 ist oben rechts in der Ansicht des Partikels der Messflecken von 15 x 15 μm zu erkennen. Es ist eine Transmissionsaufnahme eines Partikels von 100 μm, der durch das Glätten mit der Diamantzelle verbreitert wurde.

einen Kranz aus CaCO₃ (Calciumcarbonat) handelt (Abbildung 7). Auf Grund der klaren Darstellung wurde daher der Partikel in einer Flächenmessung (Screening, Mapping) abgetastet (Abbildung 8). In der Mapping-Sicht, eingestellt auf die carbonylische Bande vom CaCO₃, kann sehr anschaulich

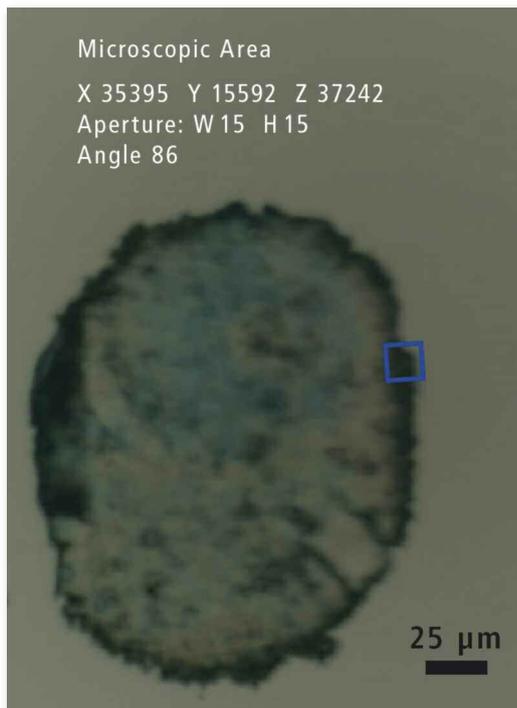


Abbildung 6: Bild des Partikels mit der CCD-Kamera des Infrarotmikroskops AIM-9000

Wie in der Abbildung deutlich zu sehen, ist der Partikel mit einer Korona versehen. Die Messung ergab, dass es sich um

Vielen Dank an:

Dr. Alan Jamieson Newcastle University, UK und Dr. Robert Keighley, Shimadzu UK für die Ergebnisse der Amphipodenanalysen. Susanne Kühn, et al. für die Ergebnisse der Polardorschanalysen.

Autoren

Susanne Kühn, Wageningen Marine Research, Niederlande
 Alan Jamieson, New Castle University, Großbritannien
 Robert Keighley, SUK, Großbritannien
 Marion Egelkraut-Holtz, Shimadzu Europa GmbH, Deutschland

Literatur

- [1] Plastic ingestion by juvenile polar cod (*Boreogadus saida*) in the Arctic Ocean, Susanne Kühn, Fokje L. Schaafsma, Bernike van Werven, Hauke Flores, Melanie Bergmann, Marion Egelkraut-Holtz, Mine B. Tekman, Jan A. van Franeker; Polar Biology, <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2283-8>, 2018
- [2] National Geographic News August 30, 2012
- [3] <https://news.sky.com/story/plastic-pollution-reaches-oceans-deepest-parts-11127144>



ALSACHIM

a Shimadzu Group Company



Hochwertige Grundkomponenten für die Antibiotikaforschung

ALSACHIM unterstützt Pharma-Unternehmen und deren F&E von Antibiotika

ALSACHIM, ein Unternehmen der Shimadzu-Gruppe, hat ein vollständiges Spektrum stabiler isotope-markierter interner Antibiotika-Standards vorgestellt, um pharmazeutische Industrie und Kliniken bei der Entwicklung einer therapeutischen Medikamentenüberwachung (Therapeutic Drug Monitoring) zu unterstützen. Hierzu gehören spezifisch markierte Verbindungen wie Tazobactam, Avibactam oder Cefotolozan und Ceftarolin.

Als ein weltweiter Marktführer für die Synthese stabiler isotope-markierter interner Standards (^{13}C , ^2H , ^{15}N), stabiler markierter Grundkomponenten, pharmazeu-

tischer Wirkstoffe, sogenannter API (Active Pharmaceutical Ingredients) und Metaboliten für bioanalytische Untersuchungen ist ALSACHIM seit 2017 Teil der Shimadzu-Gruppe.

Die ALSACHIM-Produkte ergänzen das Shimadzu-Angebot für den klinischen Markt – Komplettlösungen aus Hardware, Software und Anwendungs-Kits.

Seit 13 Jahren beliefert das in Frankreich beheimatete Unternehmen Kunden weltweit aus Gesundheitswesen, Lebensmittel und Umwelt, darunter die pharmazeutische und biotechnologische Industrie, klinische und bio-

analytische Forschungseinrichtungen (CROs) und Forschungsinstitute.

Hochwertige Grundkomponenten für Antibiotika

Durch seine Marktnähe und F&E-Stärke hat ALSACHIM wichtige isotope-markierte Grundkomponenten für Antibiotika entwickelt. Alle führenden Akteure im Gesundheitsbereich arbeiten an Themen wie Antibiotika-Resistenz, Antibiotika-Rückstände im Blut oder Antibiotika-Kombinationen.

ALSACHIM hat stabile isotope-markierte interne Standards für unterschiedliche Antibiotika-

Familien vorgestellt, etwa für Beta-Lactame, Cephalosporin, Carbapenem oder Penicillin. Der Umfang von markierten und unmarkierten Antibiotika-Molekülen hat sich nun erweitert auf hochwertige isotope-markierte Analytestandards wie Amoxicillin-d₄, Avibactam- $^{13}\text{C}_5$, Cefepim- $^{13}\text{C}_3$, Cefotaxim- $^{13}\text{C}_3$, Ceftarolin- $^{13}\text{C}_3$, Ceftazidim-d₆, Cefotolozan-d₂- $^{15}\text{N}_2$, Cloxacillin-d₅, Flucloxacillin- $^{13}\text{C}_4$ - ^{15}N (Flucloxacillin- $^{13}\text{C}_4$ - ^{15}N), Meropenem-d₆ oder Tazobactam- $^{13}\text{C}_2$ - $^{15}\text{N}_2$.



UV-1900: Perfekt für alle Analyseanforderungen

UV-Vis-Spektroskopie – schnell und einfach wie noch nie



UV-Vis-Spektrophotometer UV-1900

Das neue UV-1900-Spektrophotometer verbindet ein hochentwickeltes optisches Doppelstrahlensystem mit der patentierten Lo-Ray-Ligh®-Beugungsgitter-Technologie in einem Czerny-Turner-Monochromator. Diese Technik gewährleistet geringes Streulicht und hohe photometrische Reproduzierbarkeit, die in dieser Geräteklasse bisher nicht bekannt war. Das UV-1900 ist höchst effizient dank der schnellsten Scan-Funktion von 29.000 nm/min; es dauert nur drei Sekunden,

über alle Wellenlängenbereiche zu messen. Aufgrund der Steuerung über das nutzerfreundliche Farb-Touch-Panel und die neue LabSolutions UV-Vis-Software, ist das UV-1900 perfekt geeignet, die Laborarbeit zu optimieren.

Hightech bietet bisher nicht dagewesene Gerätefähigkeiten

Das Lo-Ray-Ligh-Beugungsgitter aus den High-End-Modellen bietet für das UV-1900 das geringste

schwindigkeit von 29.000 nm/min durchzuführen. Dies verkürzt die Analysedauer erheblich und ermöglicht es, auch chemische Reaktionen nachzuverfolgen.

Perfekt für alle Analyseanforderungen

Über das Farb-Touch-Panel lässt sich die Programmoberfläche intuitiv bedienen – über Stift oder Fingerspitze. Auch ohne PC sind alle gängigen Programme verfügbar: „Photometrie“, „Spektrum“, „Quantifizierung“, „Kinetik“, „Zeitverlauf“ und „Biomethode“ zur DNA- und Proteinquantifizierung. Die programmeigenen

Streulicht seiner Klasse (weniger als 0,5 % bei 198 nm). Die hohe photometrische Reproduzierbarkeit und Genauigkeit bieten einen der größten Linearitätsbereiche (Abbildung 2).

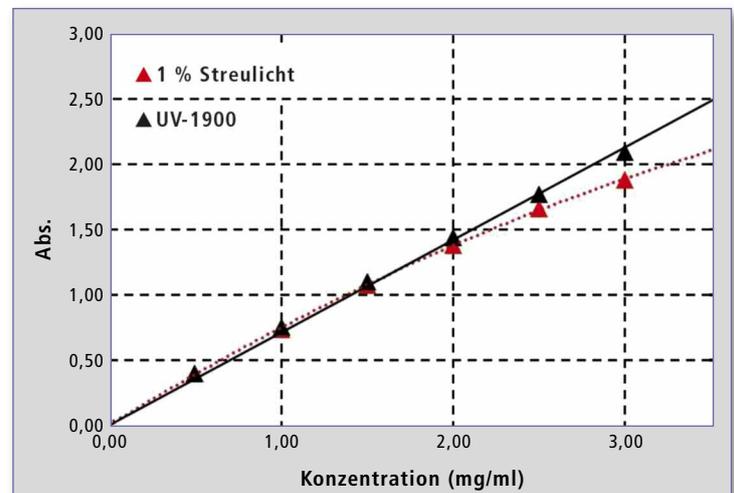


Abbildung 2: Die Eichkurve des UV-1900 (schwarze Linie) ist linearer als der Kurvenverlauf eines Geräts mit 1 % Streulicht (rote Linie)



Abbildung 1: Verbesserte Bedienung über Farb-Touch-Panel



Abbildung 3: Intuitiver Programmaufbau

Das optische System des UV-1900 hat die höchste Auflösung seiner Klasse (1 nm) und gewährleistet die maximale, von den Arzneibüchern vieler Länder verlangte Messgenauigkeit. Darüber hinaus ermöglicht die neue ultra-schnelle Scan-Funktion, eine genaue Messung mit der erstaunlichen Ge-

Prüf- und Sicherheitsfunktionen erfüllen die Anforderungen aus Arzneibüchern, GLP/GMP, FDA und andere Rechtsvorschriften. Des Weiteren nimmt die Probenkammer verschiedenstes Zubehör auf, wie Ansaugeneinheit, Temperatursteuerung oder Reflexionsmess-einsatz.

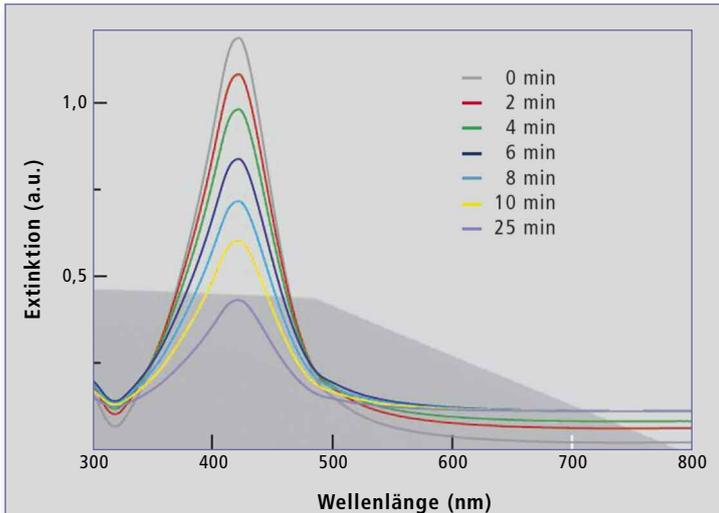


Abbildung 4: Kinetische Untersuchung der Agglomeratbildung von Silber-Nanopartikeln

Damit eignet sich das UV-1900 perfekt für Applikationen wie Nahrungsmittel, Pharmaka oder Chemie. Der gesamte Spektralbereich lässt sich in Sekundenbruchteilen scannen. Während bisher für Zeitverlauf-Messungen die Intensität nur bei einer bestimmten Wellenlänge beobachtet werden konnte, lässt sich nun die Änderung des gesamten Absorptionsspektrums untersuchen.

LabSolutions UV-Vis für erweiterte Möglichkeiten

Die neue LabSolutions UV-Vis-Software unterstützt alle Funktionen des UV-1900 und verbessert die Arbeitseffizienz. Die eindeutige und einfache Programmgestaltung ist aus der LabSolutions-Familie bekannt (LabSolutions IR, LabSolutions RF). System- und Messkonfiguration für den Arbeitsablauf werden durch einfach nachvollziehbare Fenster und selbsterklärende Symbole optimiert.

Verschiedene Programme sind über den LabSolutions Manager erreichbar. Vom Start an sind „Spektrum“, „Quantifizierung“, „Photometrie“ und „Zeitverlauf“ verfügbar. Eine neue spektrale Auswertungsfunktion vereinfacht die Qualitätskontrolle mit einer automatischen Proben-Evaluation. Weitere optionale Programme lassen sich hinzufügen, wie zum Beispiel „Farbanalyse“.

Multiple Datensätze lassen sich einfach per Einzelklick auf andere Formate wie Batch-Text oder Microsoft Excel exportieren. Zudem unterstützt LabSolutions UV-Vis die Anwender mit benutzerfreundlichen Funktionen, wie Echtzeitanzeige von Konzentrationen oder automatische Bestimmung von optimalen Parametern zur Peak-Detektion.

Die LabSolutions DB und CS-Plattform von Shimadzu stellt die Übereinstimmung mit den ER/ES-Vorschriften sicher. Diese Werkzeuge liefern eine Projektmanagementfunktion, ausgerichtet

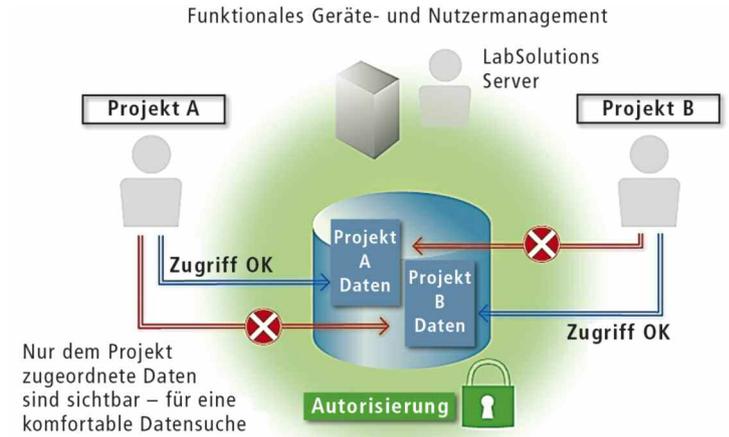


Abbildung 5: LabSolutions DB oder CS Projekt-Management

auf Aufgaben und Systembetrieb. Diese Funktionen erlauben Geräte- und Anwendermanagement, Sicherheitsstrategie und Datenverarbeitung auf der Grundlage von Einzelprojekten, wobei die Effizienz von Datenabfragen und Managementaufgaben verbessert wird.

Fazit

Das neue UV-1900 setzt einen neuen Maßstab für kompakte UV-Vis-Spektrophotometer.

Die Lo-Ray-Light-Beugungsgitter-Technologie in diesem Zweistrahlgerät ermöglicht ausgezeichnete photometrische Werte, wobei ein Farb-Touch-Panel und die Anbindung an LabSolutions UV-Vis einen einfachen, fortschrittlichen

Arbeitsablauf bieten – als Einzelplatzlösung oder über PC-Steuerung, und dabei voll kompatibel mit der UV-Probe-Software.

Durch das breite Angebot an Messabläufen und die Übereinstimmung mit internationalen Richtlinien und Vorgaben eignet sich das UV-1900 für zahlreiche Anwendungsfelder.

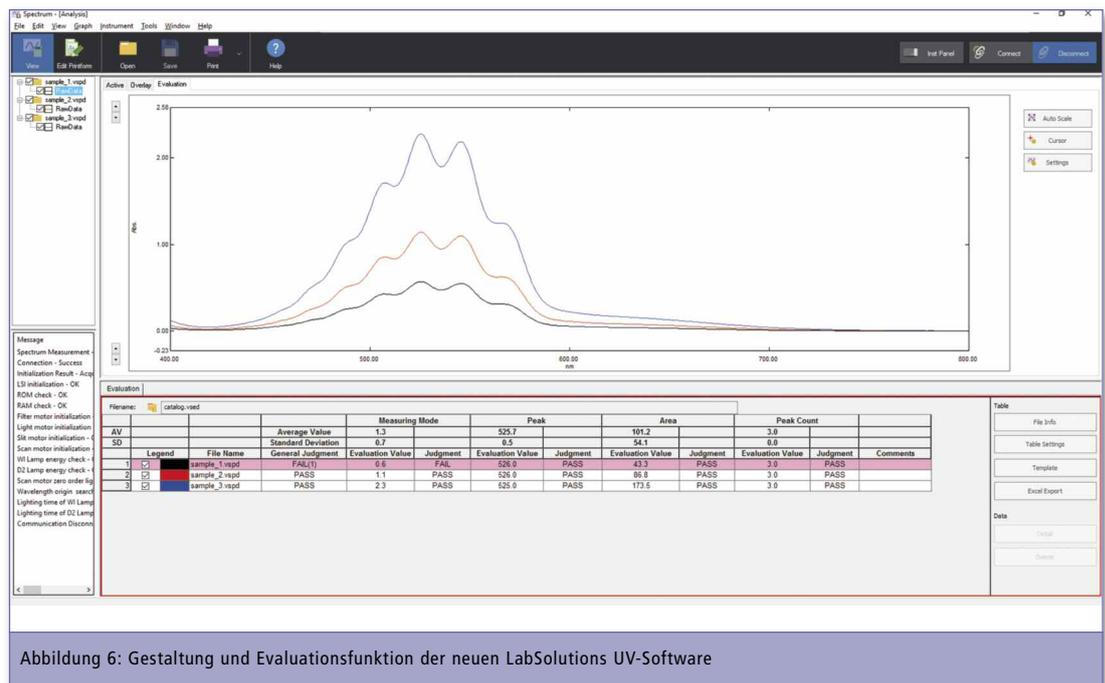


Abbildung 6: Gestaltung und Evaluationsfunktion der neuen LabSolutions UV-Software



In der Herstellung von Arzneimitteln sind höchste Reinheit und sorgfältigster Umgang mit Substanzen und Wirkstoffen wichtige Voraussetzungen. Dazu zählt besonders, Produktionsreste effektiv zu entfernen. Denn nur eine gut gereinigte Anlage verhindert die Kontamination und Verfälschung des produzierten Medikaments und trägt somit zur Sicherheit der Patienten bei.

1988 kam es zum Beispiel zu einem Rückruf von 200 Mio. Dosen eines Cholesterinsenkers – er war mit Pestiziden verunreinigt. Es wird angenommen, dass es zu einer Kreuzkontamination kam, als Lösemittelfässer aus der Pestizidherstellung erneut in der Wirkstoffproduktion genutzt wurden. Der Wirkstoff wurde zur Endfertigung an eine weitere Einrichtung geliefert, wo es letztendlich zur Verunreinigung von kompletten Arzneimittel-Chargen kam – an einem Standort, an dem normalerweise keine Pestizide hergestellt werden. Der Wirkstoff-Hersteller führte zu dieser Zeit weder ausreichende Kontrollen durch, noch gab es validierte Reinigungsprozesse.

Behördliche Anforderungen

Die wesentlichen behördlichen Anforderungen an die Anlagenreinigung wurden daraufhin im Jahr 1993 im „Guide to Inspections – Validation of cleaning processes (7/93)“ der amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde FDA klarer behandelt. Hier werden dokumentierte Beweise verlangt, dass ein zugelassenes Reinigungsverfahren konsistent aktive pharmazeutische Inhaltsstoffe (API), Prozessrückstände, Reinigungsmittel und mikrobielle Verunreinigungen auf Produktkontaktflächen des Herstellungs-Equipments auf ein akzeptables Niveau für die Verarbeitung von Arzneimitteln reduziert. Besonders wichtig ist dies bei der Produktion von Wirkstoffen in Batch-Prozessen, da hier die Anlage für verschiedene Produkte verwendet wird und eine Kontamination der Folgeprodukte zu vermeiden ist.

Nachdem eine Charge des Wirkstoffs in die Weiterverarbeitung

Restlos rein

TOC-Analytik für die Reinigungsvalidierung in der pharmazeutischen Industrie



Abbildung 1: Shimadzu Easy Wiper Swab

geht, werden die verwendeten Arbeitsmittel gereinigt, etwa Reaktoren oder Fermenter, so dass der nächste Batch produziert werden kann. Der eigentliche Reinigungsvorgang ist in der Regel streng festgelegt und wird anschließend analytisch überprüft und dokumentiert. So wird eine Probe aus der Anlage auf bestimmte Parameter untersucht. Bleibt ein festgelegter Grenzwert unterschritten, gilt die Anlage als gereinigt und kann erneut eingesetzt werden. Dieser Vorgang nennt sich Reinigungsvalidierung. Das verwendete Reinigungsverfahren hat großen Einfluss auf die Art der zu nutzenden Probennahmetechnik.

Reinigungsverfahren: Clean in Place

Die CIP-Reinigung (clean in place) erfolgt automatisch und ohne Zerlegung der Anlage. Dafür muss das System im CIP-Design ausgerüstet sein. Dies beinhaltet die Verwendung von Spülköpfen, Auffangbehältern, die Vermeidung von Toträumen und Recycling-Möglichkeiten des Reinigungsmittels. Weil Zeit und Temperatur sowie Reinigungsmittel und Lösungsmittelverbrauch optimiert sind, ist die CIP-Reinigung sehr effektiv. Die automatische Reinigung ermöglicht außerdem eine standardisierte und dadurch leicht zu validierende Prozedur. Im Falle der CIP-Reinigung wird die Spülflüssigkeit des letzten Spülgangs (Final Rinse) als Probe genommen und analysiert.

Dies ist eine besonders einfache, leicht automatisierbare und schnelle Methode.

Reinigungsverfahren: Clean out of Place

Für die COP-Reinigung muss die Anlage auseinander gebaut und die Komponenten einzeln gereinigt werden. Diese Vorgehensweise ist zeit- und personalintensiver. Aufgrund der individuellen Reinigung ist dieses Verfahren nicht standardisierbar. Vorteilhaft sind allerdings die geringeren Anschaffungskosten der Anlage und die Möglichkeit der visuellen Begutachtung.

Im Falle der COP-Reinigung wird der Wischtest (Swab) für die Beprobung von sichtbaren Rückständen verwendet (Abbildung 1). Dazu zählen Überzüge, Krusten, Anbackung in Winkeln und Ecken und besonders schwer lösliche Substanzen. Der verwendete Swab kann in einem Lösungsmittel extrahiert werden, anschließend wird die Extraktionslösung analytisch bestimmt. Wird Wasser als Lösungsmittel für die Extraktion verwendet, bietet sich für die anschließende Analyse die TOC-Analytik an. Alternativ kann der Swab auch direkt (bei Verwendung eines kohlenstofffreien Swab) mit einem TOC-Feststoffmodul vermessen werden.

Einsetzbare Analysenmethoden

Um den Erfolg des Reinigungsverfahrens zu belegen, stehen verschiedene analytische Methoden zur Verfügung, die sich jedoch in Empfindlichkeit und Spezifität unterscheiden. Übliche Methoden sind in Tabelle 1 abgebildet.



Abbildung 2: TOC-L mit SSM-5000A

Mittels spezifischer Methoden, wie HPLC oder GC, können Wirkstoffe und Reinigungsmittel gezielt nachgewiesen werden. Bei manchen chemischen Reinigungsverfahren kann es jedoch vorkommen, dass anfänglich vorhandene Komponenten aufgrund von Zersetzungsreaktionen nicht mehr detektiert werden können. Werden zusätzlich Säuren oder Laugen als Reinigungsmittel eingesetzt, so werden zum Nachweis oft die unspezifischen Parameter pH oder Leitfähigkeit verwendet. Diese ermöglichen es jedoch nicht, Wirk- und Hilfsstoffe zu erfassen.

Um schnell eine Aussage zu treffen, ob die Konzentration von Wirkstoffen sowie Rückständen von Reinigungsmitteln und Hilfsstoffen nach der Reinigung gering genug ist, bietet sich die Ermittlung des Summenparameters TOC an.

TOC-Analytik in der Reinigungsvalidierung

Die TOC-Analytik (Total Organic Carbon = gesamter organischer Kohlenstoff) erfasst in einer Analyse den gesamten Kohlenstoff aus organischen Verbindungen und eignet sich daher besonders, die Verunreinigung durch organische Komponenten zu bestimmen. Dabei wird der Kohlenstoffanteil der Probe zu CO₂ oxidiert und mit einem NDIR-Detektor (nicht

dispersiver IR-Detektor) analysiert.

Der TOC-Wert spiegelt die gesamte organische Verunreinigung durch das Vorprodukt, die eingesetzten Hilfsmittel und die verbleibenden Reinigungsmittel wider. Wässrige Proben (Final Rinse oder in Reinstwasser eluierte Swabs) lassen sich somit schnell und einfach analysieren (Analysenzeit: ca. 4 min).

Voraussetzung ist eine gute Wasserlöslichkeit der zu untersuchenden Substanzen. Bei nicht wasserlöslichen Substanzen bietet sich die direkte Verbrennung der kohlenstofffreien Swabs an. In Tabelle 2 sind beispielhaft Wiederfindungsraten verschiedener wasserlöslicher und -unlöslicher Substanzen bei den erwähnten Beprobungsarten aufgeführt.

Zwei Methoden, ein Gerät

In der Praxis der Reinigungsvalidierung wird zumeist eine Mischung aus Swab-Methode und Final-Rinse-Verfahren angewendet. So kann die gesamte Anlage sowie zusätzlich spezielle kritische Stellen mit höchster Empfindlichkeit untersucht werden. Spülwasser und Swab-Proben, sowohl extrahiert als auch mittels direkter Verbrennung, können mit einem einzigen TOC-Analysator untersucht werden.

Methode	Spezifisch	Nachweisbare Komponenten	
		Wirkstoffe	Reinigungsmittel
TOC	Nein	x	x
pH	Nein		x
Leitfähigkeit	Nein		x
UV-VIS-Spektroskopie		Wellenlängenabhängig	
Chromatographie	Ja	x	x

Tabelle 1: Analysenmethoden

Moderne Analysatoren wie die der TOC-L Serie von Shimadzu übernehmen die Vorbereitung flüssiger Proben automatisch (Ansäuern und Ausgasen). Bei hohen Probenauflagen kann dies bereits im Autosampler durchgeführt werden, um Zeit zu sparen.

Die Systeme arbeiten mit einem hocheffektiven Platin-Katalysator bei einer Verbrennungstemperatur von 680 °C. Eine spezielle Spritzeinheit ermöglicht, die Proben automatisch zu verdünnen, wenn der Kalibrierbereich überschritten wird. Auch Standards werden automatisch verdünnt, um Kalibrierkurven in äquidistanten Konzentrationsabständen zu erstellen.

Zur direkten Verbrennung von Wischproben, wird der Analysator mit dem Feststoffmodul SSM-5000A kombiniert (Abbildung 2). Hier werden Swabs direkt in einer Sauerstoffumgebung bei 900 °C mit einem Katalysator verbrannt. Die Quantifizierung des Verbrennungsprodukts CO₂ ermöglicht

schließlich die Bestimmung des TOC.

Fazit

In der pharmazeutischen Industrie werden verschiedene Reinigungsverfahren eingesetzt, etwa Clean in Place oder Clean out of Place, deren Validierung an bestimmte Techniken gebunden ist. Die TOC-Analytik eignet sich besonders, die Verunreinigung durch organische Komponenten zu bestimmen. Das geschieht mit der Final-Rinse-Methode oder dem Swab-Verfahren, mit ihren eigenen Vor- und Nachteilen. In der Praxis der Reinigungsvalidierung werden beide daher auch kombiniert angewendet. Mit den Systemen der TOC-L Serie lässt sich die Reinigung von Produktionsanlagen in der pharmazeutischen Industrie mittels beider Verfahren schnell und leicht analytisch dokumentieren.

Weitere Informationen zu diesem Beitrag:

- SCA-130-202 TOC-Bestimmung in der Reinigungsvalidierung Final Rinse File „202_Reinigungsvalidierung_Final_rinse_121.pdf“
- SCA-130-203 TOC-Bestimmung in der Reinigungsvalidierung Swab Methode File „203_Reinigungsvalidierung_Swab_methode_121.pdf“



Substanzname	Wasserlöslichkeit	Wiederfindungsraten		
		Rinse	Swab eluiert	Swab direkt
Tranexamsäure	löslich	105,0 %	107,0 %	101,0 %
Coffein wasserfrei	löslich	108,0 %	109,0 %	100,0 %
Propyphenazon	unlöslich	109,0 %	92,2 %	105,0 %
Nifedipin	unlöslich	107,0 %	89,9 %	106,0 %
Gentamicin Salbe	unlöslich	4,4 %	1,7 %	100,0 %
Betamethason Salbe	unlöslich	15,2 %	7,5 %	104,0 %

Tabelle 2: Wiederfindungsraten bei verschiedenen Substanzen und Probenahmearten



SteBLife – neues Kurzzeitverfahren zur Lebensdauerberechnung von Werkstoffen, Proben und Bauteilen

SteBLife reduziert den Versuchsaufwand zur Ermittlung von Ermüdungsdaten um bis zu 95 % unter Nutzung eines servohydraulischen Prüfsystems von Shimadzu

Der Zugang zu zuverlässigen Ermüdungsdaten ist eine Grundvoraussetzung für die Auslegung hochbeanspruchter Bauteile. Im Folgenden wird gezeigt, wie die Potenziale zerstörungsfreier und zerstörender Prüfverfahren genutzt werden können, um einen signifikanten Informationsgewinn bezüglich des Ermüdungsverhaltens zu erzielen, während gleichzeitig Versuchsaufwand und -kosten zurückgehen.

SteBLife ist ein neues Kurzzeitverfahren zur Lebensdauerberechnung zyklisch beanspruchter Werkstoffe, welches das nichtlineare elastisch-plastische Werkstoffverhalten berücksichtigt. Es wurde am Lehrstuhl für Zerstörungsfreie Prüfung und Qualitätssicherung der Universität des Saarlandes entwickelt. Die Anzahl der erforderlichen Ermüdungsversuche um eine vollständige Wöhlerkurve zu ermitteln, kann durch den Einsatz einer stufenförmigen Probe auf einige wenige Versuche reduziert werden. Dies verbessert die Effizienz signifikant im Vergleich zur konventionellen Vorgehensweise bei der Ermittlung von Wöhlerkurven, bei der ca. 15 Ermüdungsversuche erforderlich sind. Nachfolgend wird das SteBLife-Verfahren am Beispiel eines normalisierten C45E-Stahls (SAE 1045) vorgestellt.

Versuchsaufbau

Spannungskontrollierte Einstufenversuche (Constant Amplitude

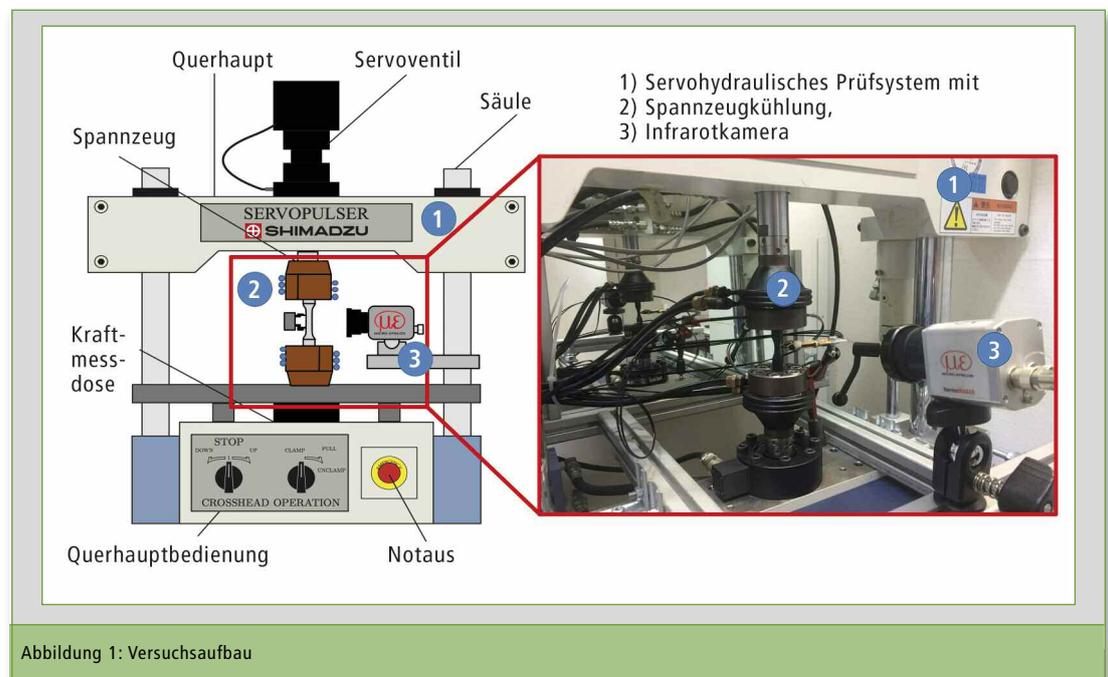


Abbildung 1: Versuchsaufbau

Tests: CATs) wurden an einem servohydraulischen Prüfsystem Typ EHF-L des Unternehmens Shimadzu (Maximallast 21 kN zyklisch/25 kN quasistatisch) mit einer Frequenz von $f = 5$ Hz, einer sinusförmigen Last-Zeit-Funktion und einem Lastverhältnis von $R = -1$ bei Raumtemperatur an C45E Proben durchgeführt.

Die Proben wurden bis zum Probenversagen oder maximal bis zu einer Grenzlastspielzahl von 2×10^6 beansprucht. Um das Ermüdungsverhalten zu charakterisieren, wurde die Temperaturänderung ΔT kontinuierlich während

des Versuchs an der Probenoberfläche entlang der Messstrecke(n) mittels einer Infrarotkamera erfasst. ΔT steht in direktem Zusammenhang mit verformungsinduzierten Veränderungen der Mikrostruktur im verformten Werkstoffvolumen und kann zur Ermittlung der Schädigungsentwicklung genutzt werden. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 1 dargestellt [1, 2].

Um die mechanischen Shimadzu Standard-Spannzeuge zu thermostatieren, wurde ein Kühlsystem auf Basis eines Peltier-Element gekühlten Wasserkreislaufs entwickelt, das den Temperaturunter-

schied zwischen dem oberen und unteren Spannzeug während des Versuchs auf weniger als 1 K reduziert [1].

Ergebnisse

Für die Temperaturmessungen wurden fünf Mess- und zwei Referenzfelder mit einer Größe von jeweils 5×5 Pixeln entlang der Probe in der Software der Infrarotkamera definiert, eine in jeder Messstrecke und zwei an den Einspannschäften.

Jede Prüfstrecke hat einen zylindrischen Querschnitt mit gleichem Volumen. Der Übergang zwischen

den Prüfstrecken wird durch einen Radius mit $r = 4 \text{ mm}$ realisiert, was zu einer milden Kerbe und einer damit verbundenen Spannungskonzentration führt, die in der Berechnung berücksichtigt werden muss. Für homogene Werkstoffe ist nur ein Versuch zur Ermittlung einer Trendwöhlerkurve erforderlich. Hierfür wird $\text{SteBLife}_{\text{stc}}$ (s: single test, tc: trend curve) eingesetzt.

Bei inhomogenen Werkstoffen sind Streubänder für unterschiedliche Ausfallwahrscheinlichkeiten als ergänzende Information für die Bauteilauslegung von technischer Bedeutung. Mit $\text{SteBLife}_{\text{msb}}$ (m: multiple tests, sb: scatter bands) wird dieser Anforderung Rechnung getragen, indem insgesamt fünf Versuche bei der gleichen Beanspruchungsamplitude durchgeführt und die Versuchsergebnisse mittels einer Gaußschen Verteilung ausgewertet werden [3].

Für die $\text{SteBLife}_{\text{msb}}$ -Berechnung in Abbildung 3 wurden insgesamt fünf Proben zyklisch mit einem axialen sinusförmigen Kraftverlauf und einer Kraftamplitude von $F_a = 9,170 \text{ kN}$ ($R = -1$) auf dem servohydraulischen Prüfsystem beansprucht. Aufgrund der Symmetrie der Probengeometrie kann eine Wechselverformungskurve für den Durchmesser 6 (ΔT_1) und jeweils zwei für die Durchmesser 6,2 (ΔT_2) und 6,4 mm (ΔT_3) bei lokalen Spannungsamplituden von 360 (ΔT_1), 337 ($\Delta T_{2o/u}$) bzw. 318 MPa ($\Delta T_{3o/u}$) aufgenommen werden. Die fünf temperaturbasierten Wechselverformungskurven sind für einen SteBLife -Versuch in Abbildung 2a dargestellt.

Das Probenversagen trat bei $N_B = 52.320$ Zyklen auf, was mit konventionell durchgeführten Einstufenversuchen vergleichbar ist. Die Wechselverformungskurven der SteBLife -Versuche liefern die Datenbasis für den σ_a - ΔT -Zusammenhang. Als Eingangsgröße für $\text{SteBLife}_{\text{msb}}$ werden hierfür die ΔT -Werte bei $N_B/2$ entnommen und in Form von σ_a - ΔT -Kurven (Abbildung 2b) aufgetragen.

Zur Ermittlung der kurvenbeschreibenden Parameter für einen Wöhler-Datensatz wird im Folgenden eine Kombination aus Morrow- [4] und Basquin-Gleichung genutzt [5].

Gemäß der $\text{SteBLife}_{\text{msb}}$ -Vorgehensweise wurden die Ergebnisse der fünf durchgeführten Einstufenversuche hinsichtlich ihrer Lebensdauer sowie ihrer σ_a - N_B -Beziehung im LCF-/HCF-Bereich analysiert. N_B sowie die σ_a - N_B -Beziehung zeigen eine Streuung, die der Inhomogenität des Materials zugeordnet werden kann. Für unterschiedliche Ausfallwahrscheinlichkeiten (P_f) können nachfolgend aus der Gauß-Verteilung zugehörige Lebensdauern berechnet werden.

In dem vorliegenden Beispiel wurden $P_f = 5, 50$ und 95% für die Ermittlung der Streubänder gewählt, allerdings können auch Streubänder für andere Ausfallwahrscheinlichkeiten berechnet werden. Die Ergebnisse der Lebensdauerberechnung sind in Abbildung 3 dargestellt, zusammen mit den Lebensdauern von elf konventionell durchgeführten Einstufenversuchen mit konventionel-

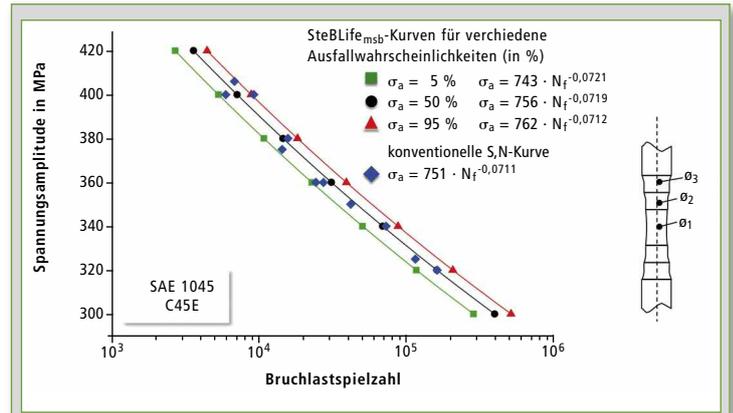


Abbildung 3: Konventionell ermittelte Wöhler-Daten und $\text{SteBLife}_{\text{msb}}$ -Kurve mit berechneten Streubändern für unterschiedliche Ausfallwahrscheinlichkeiten aus fünf SteBLife -Versuchen für einen normalisierten C45E

len Ermüdungsproben. Abbildung 3 unterstreicht eindrucksvoll, dass die herkömmlich ermittelten Lebensdauern durch die auf Basis von $\text{SteBLife}_{\text{msb}}$ berechneten Streubänder zuverlässig beschrieben werden können.

Fazit

Im Rahmen der neuen Lebensdauerberechnungsmethode SteBLife wird eine gestufte Ermüdungsprobe mit fünf Prüfstrecken eingesetzt, mit der sich eine vollständige Wöhlerkurve ermitteln lässt. Zudem ermöglicht der Einsatz zerstörungsfreier Prüfverfahren, wie bspw. der Thermografie, dass die Werkstoffreaktion lokal in jeder Prüfstrecke erfasst werden kann. Hierdurch kann der Aufwand hinsichtlich der experimentellen Ermittlung von Wöhlerkurven um mehr als 90 % reduziert werden und bietet somit die Möglichkeit, mehr ermüdungsrelevante Parameter in Wöhler-Daten zu berücksichtigen.

Mit $\text{SteBLife}_{\text{msb}}$ können Streubänder für unterschiedliche Ausfallwahrscheinlichkeiten berechnet und dabei die Anzahl der erforderlichen Ermüdungsversuche auf lediglich vier bis fünf Versuche reduziert werden. Bei $\text{SteBLife}_{\text{stc}}$ können Trendwöhlerkurven (ohne Streubänder) sogar nach nur einem einzigen Versuch berechnet werden, wodurch sich der Versuchsaufwand um ca. 95 % reduziert, wenn man zugrunde legt, dass bei der konventionellen Vorgehensweise ca. 15 Ermüdungsversuche durchgeführt werden müssen.

Autoren

Dr.-Ing. Peter Starke, Haoran Wu, M. Sc., Prof. Dr.-Ing. Christian Boller, Lehrstuhl für Zerstörungsfreie Prüfung und Qualitätssicherung, Universität des Saarlandes www.uni-saarland.de/lehrstuhl/boller.html Mirnes Hasanbasic, Shimadzu Europa GmbH

Literatur

- [1] P. Starke, A. Bäumchen, H. Wu H, SteBLife – A new short-time procedure for the calculation of S-N curves and failure probabilities. Mater Test 60 (2018) 1-7.
- [2] P. Starke, H. Wu, C Boller, Advanced Evaluation of Fatigue Phenomena Using Non-Destructive Testing Methods. Adv. Mater. Proc. THERMEC 2016 (2016), 1841-1847.
- [3] W.J. Dixon, F. Jr. Massey, Introduction to statistical analysis, The Maple Press Company, York (1969).
- [4] J.D. Morrow, Cyclic plastic strain energy and fatigue of metals. Internal friction, damping and cyclic plasticity, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials (1964) 45-87.
- [5] O.H. Basquin, The exponential law on endurance tests, Proc ASTM 10 (1910) 625-630.

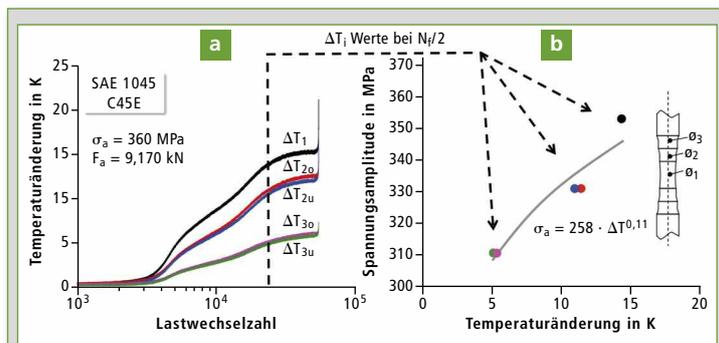


Abbildung 2: a) Wechselverformungskurven auf der Basis der Temperaturänderung für die stufenförmige Probengeometrie, b) Spannungsamplituden-Temperatur-Kurve für einen SteBLife -Versuch mit $\sigma_a = 360 \text{ MPa}$ (bezogen auf 6 mm) für einen normalisierten C45E

Weitere Informationen zu diesem Beitrag:

- P. Starke, A. Bäumchen, H. Wu H, SteBLife – A new short-time procedure for the calculation of S-N curves and failure probabilities. Mater Test 60 (2018) 1-7. <https://www.hanser-elibrary.com/toc/mp/60/2>



Mineralölrückstände in Lebensmitteln

MOSH- und MOAH-Bestimmung mit LC-GC-Online-Verfahren und Comprehensive Chromatographie



Abbildung 1: Das LC-GC-FID-Online-System mit GC-2010 Plus, LC-20ADXR, SPD-20A und CBM-20A LITE

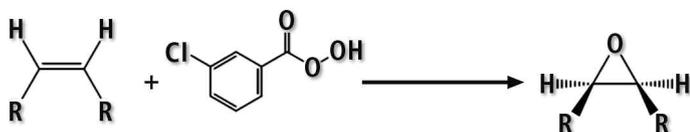


Abbildung 2: Reaktionsschema der Epoxidation

Mineralölrückstände in Lebensmitteln standen in den letzten Jahren im öffentlichen Interesse. Ob Reis, Nudeln, Olivenöl oder Schokolade – es gibt zahlreiche Beispiele für Mineralölverunreinigungen in Lebensmitteln. Derzeit besteht die Herausforderung in der flächendeckenden Präsenz von Mineralölen in Rohstoffen bis hin zum Endprodukt. Zudem gibt es ein Informationsdefizit hinsichtlich Rezeptur, Auswirkungen auf die Gesundheit, Analyse und gesetzlichen Grenzwerten.

Um von vorne zu beginnen: Mineralölkohlenwasserstoffe (MOH) werden in die zwei Gruppen der gesättigten (MOSH) und aromatischen (MOAH) Mineralölkohlenwasserstoffe unterteilt. Die MOSH Fraktion besteht aus verzweigten und unverzweigten offenen, als Paraffine bezeichneten Kohlen-

wasserstoffketten und zyklischen, als Naphthene bezeichneten Kohlenwasserstoffen mit mindestens

einem gesättigten Ring. Sie können sich im menschlichen Organismus anreichern und verursachen Granulome.

Die MOAH Fraktion besteht aus aromatischen Stoffklassen, die stark alkyliert sein können und 1-4 Ringe besitzen. Sie machen bis zu 15 - 30 % des gesamten Mineralölanteils aus und enthalten potenziell mutagene und karzinogene Stoffe [1]. Daher sind die ermittelten Werte von Mineralölkohlenwasserstoffen in Lebensmitteln (Tabelle 1) nicht akzeptabel.

Eine MOH-Analyse ist eine große Herausforderung

Es gibt derzeit keine EU-Vorschriften und keine zugelassene Analysemethode für Mineralölrückstände (ausgenommen für Speiseöl [3]), doch MOSH-Konzentrationen bis zu 2 mg/kg und MOAH-Werte unterhalb von 0,5 mg/kg werden als akzeptabel angesehen [1]. Eine MOH-Analy-

se ist aufgrund der wirklich komplexen Zusammensetzung aus ungelösten und nicht identifizierten Verbindungen eine große Herausforderung. Als Methode der Wahl wird eine Online-Kopplung von HPLC-GC-FID eingesetzt [4].

Das Konzept dieser Methode beruht auf der Trennung des MOSH- und MOAH-Anteils mit Hilfe der Normalphasen-HPLC, einer High-Volume-Injektion (450 µL pro Fraktion) auf einen Zweisäulen-GC zur Gewinnung von Empfindlichkeit, einer weiteren Trennung der zwei Fraktionen (z.B. zur Identifikation von Interferenzen) und einer Detektion mittels zwei Flammenionisationsdetektoren (FID) die als universelle Detektoren eine nahezu identische Response für die Verbindungen von Interesse liefert. So ergibt sich ein vollautomatisches, geschlossenes System ohne die Gefahr einer möglichen Probenverunreinigung im Verlauf des Trenn- und Messprozesses. Um die Elution von der LC und den Transfer zur GC sowie die Quantifizierung zu kontrollieren, wird vor der Probenanalyse ein Mix aus neun internen Standards zugefügt.

Wegen der komplexen Lebensmittelmatrix kann eine Probenaufbereitung und -analyse verzwickelt sein. Trockene Nahrungsmittel wie Reis, Nudeln oder Gewürze werden homogenisiert und mit Hexan/Ethanol extrahiert. Der

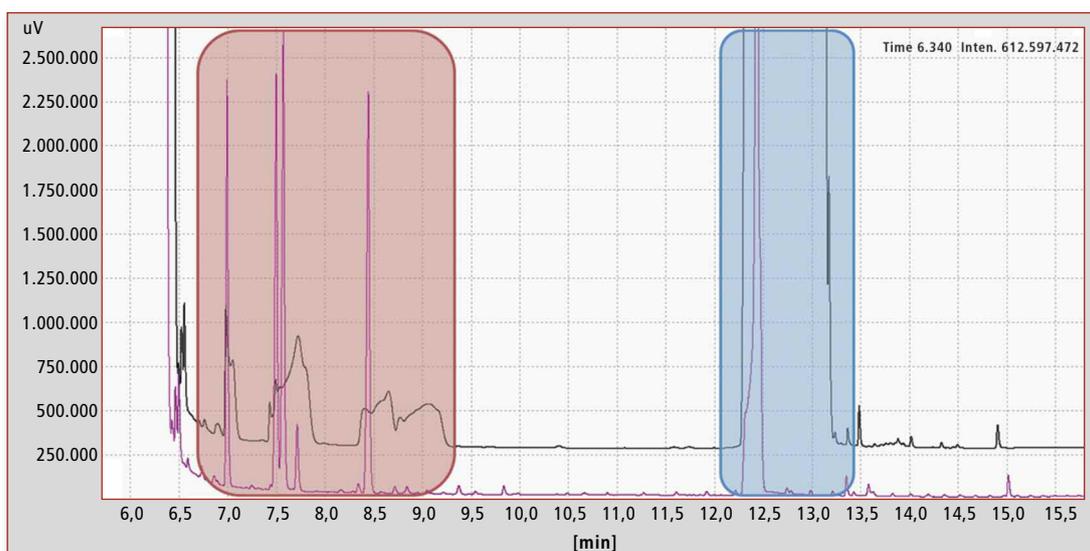


Abbildung 3: MOAH-Anteil einer Probe von nativem „Olivenöl Extra“ vor (schwarze Kurve) und nach Epoxidation (violette Kurve). Die Retentionsbereiche der internen Standards sind rot markiert, Squalen blau.

erhaltene Extrakt wird mit Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Volumen auf 1 ml eingestellt. Aliquote von 50 µl Extrakt werden in die LC injiziert und 450 µl davon werden direkt auf die Vorsäulen für die MOSH- bzw. MOAH-Fraktion transferiert.

Analyse nativer Öle

Eine größere Herausforderung besteht beispielsweise in der Analyse nativer Öle, weil sie natürliche Olefine enthalten können (zum Beispiel Squalen, Styrol, Carotenoide etc.), die mit dem MOAH-Anteil interferieren. Diese Störungen lassen sich durch Epoxidierung mit 3-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) beseitigen. Diese greift an den Doppelbindungen der Interferenzen an, formt daraus Peroxide und beeinflusst das Retentionsverhalten der Verbindungen so, dass sie aus dem MOAH-Transfer Fenster „wandern“ [5].

Es ist möglich, die Epoxidierung vollständig automatisch durchzuführen: Eine Ölprobe wird in ein 10 ml Glasfläschchen eingewogen, und der interne Standard sowie n-Hexan werden zugefügt. Das Fläschchen wird im Autosamplers des LC-GC-Systems platziert und ein 2 ml Autosampler-Vial mit Na₂SO₄ wird vorbereitet. Der Autosampler transferiert das 10 ml-Fläschchen zum Agitator, der auf 40 °C erhitzt wird und das Epoxidationsreagenz hinzufügt. Die Reaktion läuft im Agitator bei 40 °C innerhalb von 15 min ab.

Anschließend werden eine Na₂SO₃ (Natriumsulfit)-Lösung und Ethanol zugegeben, um die Reaktion zu stoppen und die Phasentrennung vor dem Zentrifugieren zu verbessern. Nach der Zentrifugation transferiert der Autosampler das Vial zurück zum Autosampler und ein Aliquot der oberen Hexan-Phase in das vorbereitete 2 ml Autosampler-Fläschchen mit dem Na₂SO₄ (Natriumsulfat). Nach fünf minütigem Trocknen wird ein 50 µl-Aliquot dieser Phase in die LC injiziert und 450 µl werden direkt auf die Vorsäulen für die MOSH- und MOAH-Fraktionierung transferiert.

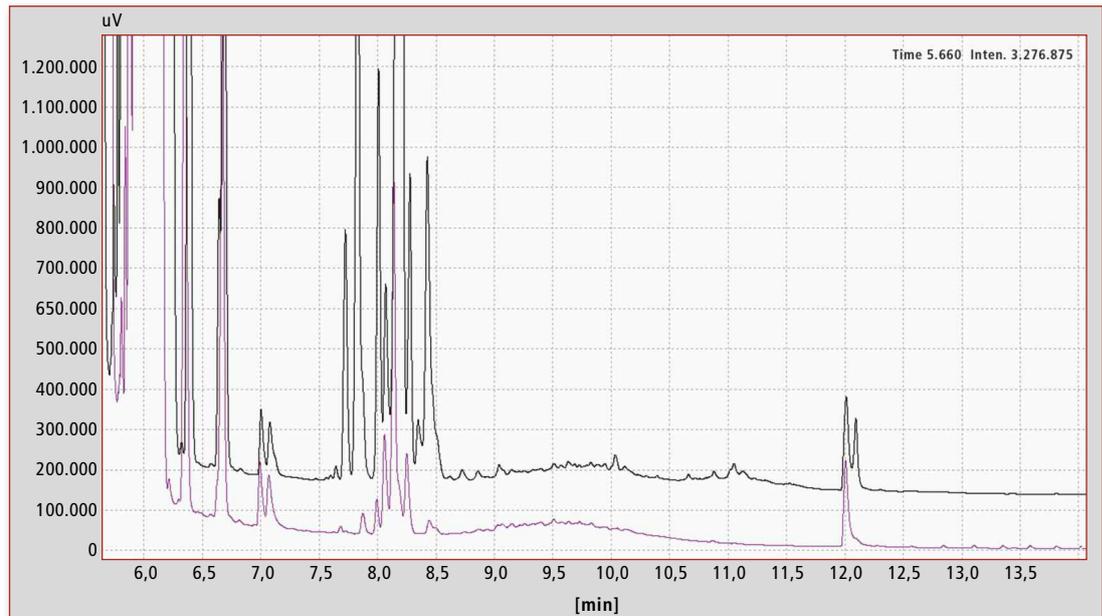


Abbildung 4: MOAH-Chromatogramme eines Kreuzkümmel-Extrakts vor (schwarze Kurve) und nach (violette Kurve) Epoxidation

Abbildung 3 zeigt das Chromatogramm des MOAH-Anteils einer Probe von nativem „Olivenöl Extra“. Die schwarze Kurve zeigt die Probe vor Epoxidierung. Der rot markierte Bereich gibt den Retentionsbereich der internen Standards wieder. Aufgrund der hohen Squalen-Konzentration (blau markiert) ist die Chromatographie erheblich gestört, so dass sich die internen Standards nicht zur Quantifizierung nutzen lassen. Die violette Kurve zeigt die gleiche Probe nach erfolgreicher Epoxidierung. Über 90 % des Squalens wurden entfernt, die internen Standards zeigen eine perfekte Peak-Symmetrie und eine MOAH-Verunreinigung konnte

lich Elimination von Interferenzen und anschließender korrekter Datenauswertung nicht zufriedenstellend ist. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel eines Kreuzkümmel-Extrakts vor und nach Epoxidierung. Es war unmöglich, alle Interferenzen zu beseitigen und ein auswertbares Chromatogramm zu erstellen, obwohl strenge Epoxidierungsbedingungen angewendet wurden.

In solch einem Fall wird ein leistungsfähiges Werkzeug für Trennung und Identifikation eingesetzt: Die MOSH- und MOAH-Anteile werden in der LC vorfraktioniert und mit Hilfe der sogenannten „Fract & Collect“-

dungen auf die internen Standards, die gelb markierten stehen für Mono- und Diterpene. Der grün markierte Bereich zeigt deutlich die MOAH, die in den LC-GC-Chromatogrammen schwerlich zu identifizieren waren.

Für eine Analyse von Schokolade oder Schokoriegeln müssen Fett und natürlich vorkommende n-Alkane entfernt werden. Vor der Analyse erfolgt dies mit Hilfe einer Flash-Chromatographie mit Silizium- und Aluminiumoxid [4].

Gemäß einer vorgeschlagenen Methode, die vom Deutschen Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) veröffentlicht wurde, wird eine Quantifizierung durch Integration der für verschiedene Molekulargewichtsbereiche stehenden „humps“ durchgeführt [6]. Sie empfehlen für Lebensmittelkontakt-Materialien drei Bereiche für die MOSH- (C₁₀-C₁₆, C₁₆-C₂₅ und C₂₅-C₃₅) und zwei für die MOAH-Fraktion (C₁₀-C₂₅, C₂₅-C₃₅).

Für Trockennahrung werden nur die Bereiche bis zu C₂₅ einbezogen. Abbildung 6a (Seite 15) zeigt MOSH (schwarze Kurve) und MOAH (violette Kurve) einer Spaghetti-Probe mit einer MOSH-Konzentration von 12,7 mg/kg von C₁₆-C₃₅. ♦

Reis	1,8 - 160 mg/kg
Fisch (im Vergleich zum Fettgehalt)	10 - 1.200 mg/kg
Kakao und Schokolade	5 - 1.300 mg/kg
Babynahrung (verpackt in Karton)	bis zu 33 mg/kg
In Jute-Säcken gelagerte Produkte (Reis, Kaffee, Kakao)	bis zu 500 mg/kg
Gebäck	bis zu 2.800 mg/kg
Speiseöl	bis zu 6.000 mg/kg

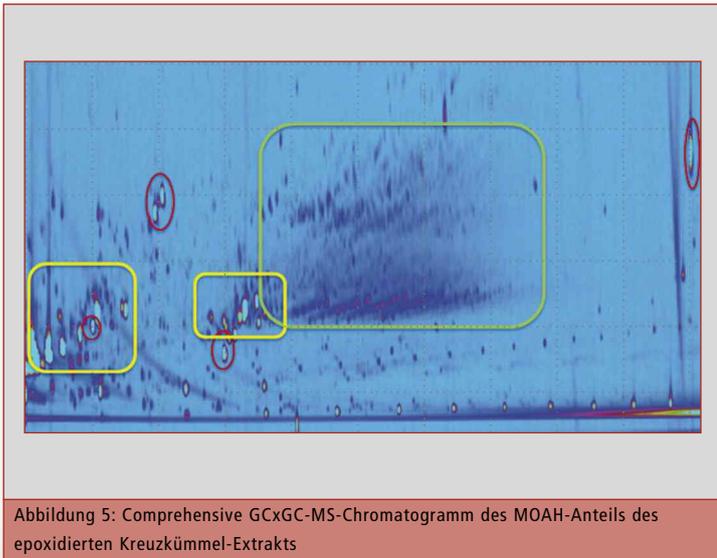
Tabelle 1: Ermittelte Mengen von Mineralölkohlenwasserstoffen in Lebensmitteln [2]

nicht gefunden werden, was im blau markierten Bereich durch Squalen überdeckt wurde.

„Fract & Collect“: Ein leistungsfähiges Werkzeug für Trennung und Identifikation

Es gibt aber auch Proben, bei denen die Epoxidierung hinsicht-

Methode gesammelt. Danach wird eine Comprehensive GCxGC-MS zur weiteren Trennung der von der LC erhaltenen Fraktionen, zur Identifikation und zur Abgrenzung von Interferenzen von MOSH und MOAH eingesetzt. Im vorliegenden Chromatogramm in Abbildung 5 (Seite 14) verweisen die rot markierten Verbindungen



Die internen Standards sind mit Symbolen markiert (schwarze Quadrate – interne Standards MOSH, violette Sterne – interne Standards MOAH).

Die Reisprobe in Abbildung 6b zeigt ebenfalls zusätzliche Peaks im hinteren Teil des Chromatogramms. Diese stammen von natürlich vorkommenden ungeradzahligem n-Alkanen mit einer Kettenlänge von C₂₁ bis C₃₅.

Zusammenfassung

Die Analytik von Mineralölrückständen in Lebensmitteln stellt eine analytische Herausforderung dar. Aufgrund der komplexen Le-

bensmittelmatrix sind oft Hilfsmethoden wie Epoxidierung und Flash Chromatographie erforderlich. Gleichwohl ist eine Online-Kopplung von HPLC mit GC-FID ein wertvolles Werkzeug für eine schnelle und einfache Analyse mit der Möglichkeit einer Automatisierung als wichtigem Erfolgsfaktor.

Für Sie gelesen in chrom+food FORUM 4-18

Autoren

Ao. Univ. Prof. DI Dr. Erich Leitner, Andrea Walzl, B.Sc., M.Sc., Technische Universität Graz, Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, AG „Lebensmittelchemie und Humansensorik“, Stremayrgasse 9/2, 8010 Graz

Abbildung 5: Comprehensive GCxGC-MS-Chromatogramm des MOAH-Anteils des epoxidierten Kreuzkümmel-Extrakts

AKTUELLES

50 Jahre Shimadzu in Europa

Meilensteine in Entwicklung und Technologie

1968 – Shimadzu startet mit einem fünfköpfigen Team in Deutschland und hat sich im 50. Jahr seines Jubiläums in Europa zu einem europaweiten Netzwerk entwickelt mit Niederlassungen und ausgesuchten Händlern in 81 Städten in 47 Ländern. Heute beschäftigt Shimadzu auf dem Kontinent mehr als 700 Mitarbeiter.

In den ersten 25 Jahren wurde die Organisation auf- und ausgebaut, die Entwicklung der Geschäfte vorangetrieben und das Händler-Netzwerk erweitert. Zu Beginn standen die Märkte in Westeuropa im Mittelpunkt, es gab aber auch erste Geschäftstätigkeiten in Ostdeutschland, Russland und Jugoslawien. Shimadzu ist stetig gewachsen, und ein wichtiger Meilenstein war **1987** der Umzug von Düsseldorf nach Duisburg in ein neu errichtetes Gebäude für die Europa-Zentrale, seinerzeit mit 38 Mitarbeitern.

Die Grundlage für die Fortentwicklung während der folgenden 25 Jahre bildeten die eigene Forschung & Entwicklung sowie Produktionskapazitäten in Duisburg. Sie erlaubten Shimadzu, die Anforderungen der Märkte schneller und flexibler zu bedienen. Das 6.300 m² große Gebäude bot zudem genügend Fläche, die vorhandenen Büro- und Produktionsflächen zukünftig zu erweitern. Das war **1992** bereits der Fall:

Weitere 6.000 m² kamen für die Analytik und die Medizintechnik hinzu. Ferner wurde das Shimadzu Applikations- und Trainingszentrum (ShimCAT) eröffnet, um Anwendungsaufgaben vor Ort zu bearbeiten.

Entwicklung von Shimadzu als Unternehmen

Ab den 1990er Jahren als Shimadzu bereits seit 25 Jahren in Europa ansässig war, ebneten der politische und gesellschaftliche Wandel in Osteuropa neue Marktchancen.

Shimadzu begann seine Präsenz zunächst in Deutschland auszubauen und eröffnete zusätzliche Technische Büros. In den folgenden Jahren wurden neue Filialen und Niederlassungen in zahlreichen Ländern gegründet. Es begann **1990** mit der Niederlassung in Österreich; von dort wurden zusätzlich die Länder Tschechoslowakei, Ungarn, Rumänien und Bulgarien betreut. Bereits ein Jahr darauf, nahm Shimadzu Italia seine Geschäfte auf – in Mailand, dem Industrie- und Finanzzentrum des Landes.

1992 wurde Shimadzu Benelux gegründet. Vom Standort im niederländischen s’Hertogenbosch sind schnell die Wirtschaftszentren Amsterdam, Rotterdam und Brüssel zu erreichen. Auch die **1996**

eröffnete Niederlassung in Großbritannien, Milton Keynes, wurde strategisch gewählt: Sie liegt mittig zwischen den Zentren London und Birmingham.

Zagreb, die politische und wirtschaftliche Hauptstadt von Kroatien, ist seit **1997** der Standort von Shimadzu Kroatien für die Betreuung von Kunden entlang der adriatischen Ostküste. Ab **2001** wurde das kroatische Verkaufsgebiet um die Staaten Albanien, Bosnien-Herzegowina, Bosnien, Mazedonien, Montenegro und Serbien erweitert. Ende der 90er Jahre wurde bei Basel die Niederlassung in der Schweiz gegründet. Das Dreiländereck von Frankreich, Deutschland und der Schweiz ist eine der dynamischsten Wirtschaftsregionen der Schweiz. Im Jahr **2002** wurde Shimadzu France, östlich von Paris, eröffnet. Von dort aus wird der gesamte französische Markt bis nach Réunion im Indischen Ozean bedient.

Um auch die Geschäftstätigkeit in Deutschland in diese europäische Struktur einzubinden, wurde **2007** mit Shimadzu Deutschland eine eigenständige Niederlassung gegründet. Natürlich war Shimadzu bereits seit 1968 in Deutschland als dem größten europäischen Markt geschäftlich präsent und aktiv. In diesem Zuge wurden auch alle Technischen Büros in die Deutschland-

Organisation integriert. Aufgrund der schnell wachsenden Belegschaft auf über 110 Beschäftigte bezog die deutsche Niederlassung **2017** eigene Büroflächen außerhalb der Europa-Zentrale.

Parallel zur Entwicklung der Niederlassungen hat Shimadzu auch sein Händlernetzwerk in nahezu allen europäischen Ländern ausgebaut, so dass das Unternehmen auf dem gesamten Kontinent vertreten ist.

Das Konzept von eigenständigen Tochtergesellschaften in ausgewählten europäischen Märkten ist Bestandteil der Zukunftsstrategie („Strategy of the Future“) von Shimadzu. Sie sieht u.a. vor, in größeren Märkten bzw. Ländern eigene Einheiten zu schaffen, um vor Ort neue Entwicklungen und Märkte besser unterstützen zu können.

Als jüngstes Mitglied der europäischen Shimadzu-Familie wurde **2017** ALSACHIM integriert, ein französisches Unternehmen spezialisiert auf die Herstellung von stabilen isotopenmarkierten Standards, Metaboliten und pharmazeutischen Stoffen für analytische Zwecke. Der Markenname ALSACHIM bleibt auf dem Markt präsent und wird mit der Zeile „a Shimadzu Group Company“ aufgeladen. Mit ALSACHIM ist Shimadzu in der Lage, den klinischen Markt mit Komplettlösungen aus Hardware,

Literatur

- [1] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Stellungnahme Nr. 008/2010, 09.12.2010.
- [2] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), EFSA Journal, 2012 10(6), 2704-2889.
- [3] Austrian Standards Institute, ÖNORM EN 16995; Edition: 2017-08-01.
- [4] M. Biedermann, K. Grob, J. Chromatogr. A. 2012, 1255, 56-75.
- [5] M. Nestola, T.C. Schmidt, J. Chromatogr. A., 1505 (2017) 69-76.
- [6] www.bfr.bund.de/cm/343/bestimmung-von-kohlenwasserstoffen-aus-mineralol-oder-kunststoffen.pdf [01.03.2018]

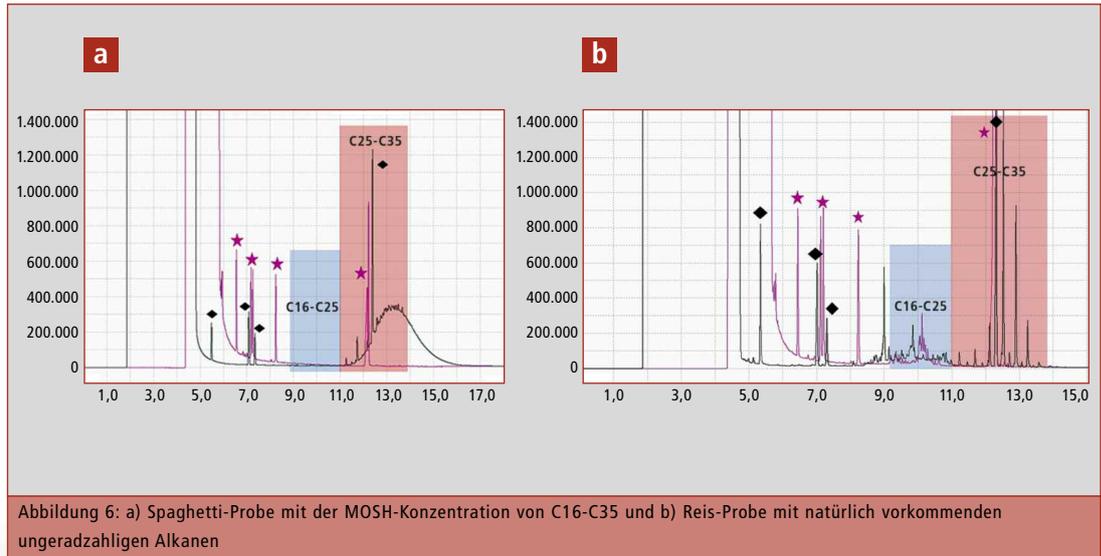


Abbildung 6: a) Spaghetti-Probe mit der MOSH-Konzentration von C16-C35 und b) Reis-Probe mit natürlich vorkommenden ungeradzahlig Alkanen

AKTUELLES

Software sowie Applikationskits zu bedienen.

Neue Lösungen für morgen

2013 wurde die 1.500 m² große Shimadzu Laborwelt eröffnet und 2017 das European Innovation Center (EUIC). Die hochmoderne Laborwelt konzentriert sich auf die wachsenden Herausforderungen von Industrie und Wissenschaft. Sie bietet Demonstrations- und Testmöglichkeiten, um die Kunden den Einsatz der Systeme so real wie möglich erleben zu lassen. Das gesamte Produktangebot von Shimadzu steht für Tests und Anwendungsentwicklung zur Verfügung. Die Laborwelt ist auch das neue Zuhause für ShimCAT.

Mit seinem einzigartigen Anspruch verbindet das EUIC akademisch-wissenschaftliches Know-how von Universitäten mit der Technologiekompetenz von Shimadzu, um kundenorientierten Service auf ein neues Niveau zu heben. Um neue Lösungen für morgen zu entwerfen, kombiniert das EUIC die hochwertigen Analysetechnologien von Shimadzu mit wegweisenden Themen und Fachwissen aus Märkten und Wissenschaft, die Meinungsführer, Vordenker und Experten einbringen.

Technologischer Fortschritt und fortschreitende Digitalisierung

In den letzten zweieinhalb Dekaden feierte die Shimadzu Corporation das 60. Jubiläum der GC-Technologie und der IR-Spektroskopie, den 40. Geburtstag der HPLC sowie das 140-jährige Bestehen des Unternehmens. Shimadzu prä-



1968

Gründung von Shimadzu Europa mit fünf Mitarbeitern in Düsseldorf

1987

Umzug nach Duisburg in ein neu errichtetes Gebäude

1990

Gründung der Niederlassung in Österreich

1990 - 1992

Neue Niederlassungen und Vertriebsbüros in Italien, Polen, den baltischen Staaten, der GUS (Gemeinschaft Unabhängiger Staaten), Georgien, Belgien und den Niederlanden

1996

Gründung von Shimadzu UK

2013

Eröffnung der Shimadzu Laborwelt in Duisburg

2017

Shimadzu Deutschland bezieht eigene Büroflächen außerhalb der Europa-Zentrale

2017

Integration von ALSACHIM als „Shimadzu Group Company“

2017

Eröffnung des European Innovation Center (EUIC)

50th ANNIVERSARY
Shimadzu Europa

sentierte zahlreiche Weltneuheiten für die instrumentelle Analytik sowie die Medizintechnik – viele vorangetrieben durch kleinere Systeme mit geringerer Standfläche sowie Automatisierung, etwa von der Probenaufbereitung bis zur Analyse. Sie sorgen für höhere Effizienz und Produktivität in Labors und Kliniken. Insbesondere Kopplungstech-

niken verbessern Empfindlichkeit und Genauigkeit der Analyse und der Messungen.

Der Markenanspruch „Excellence in Science“ bringt diese Leistungen und den Fortschritt auf den Punkt und geht inhaltlich über den früheren „Solutions for Science“ Ansatz hinaus. „Excellence

in Science“ steht für herausragende Qualität in Technik und Service und jeden einzelnen Aspekt in der Zusammenarbeit mit Kunden. Es verdichtet den Anspruch von Shimadzu, den Konsumenten-, Patienten- und Umweltschutz ebenso wie Produktsicherheit stetig zu verbessern.



Analyse von VOC- und SVOC-Emissionen im Fahrzeuginnenraum

Werkstoffprüfung nach VDA278 mit Thermodesorption

In den vergangenen Jahren zeigen die Maßnahmen, die Verwendung von organischen Komponenten in der Automobilindustrie zu reduzieren, einen bemerkenswerten Fortschritt. In Deutschland sind spezielle VDA278-Bestimmungen für leichtflüchtige organische Bestandteile (Volatile Organic Compounds [VOC]) und schwerflüchtige organische Verbindungen (Semi Volatile Organic Compounds [SVOC]) für nichtmetallische KFZ-Werkstoffe festgelegt worden. Die Automobilhersteller wenden die VDA278 für Formteile im Fahrzeuginnenraum an; sie ermöglicht, die Auswirkungen von Emissionen abzuschätzen und Produkte zu verbessern.

Neuwagen sollen möglichst neutral riechen, jedoch beeinflussen großflächige Geruchsträger wie Teppiche, Dachhimmel oder Sitzbezüge die Wahrnehmung der Kunden. Gerüche im Autoinnenraum sollen weder störend oder gar schädlich sein, sondern im Idealfall zur Kaufentscheidung beitragen.



GCMS-System mit TD-30 Desorptionssystem

Für die Analyse werden die Proben mit Thermodesorptionsanalyse (TD) thermisch extrahiert, im GC getrennt und im Massenspektrometer detektiert. Die Proben werden hierbei auf das TD-Röhrchen aufgegeben und anschließend durch festgelegte Desorptionsprogramme in das GCMS eingeleitet, wodurch eine sehr bequeme und schnelle Analyse von VOC und SVOC ermöglicht wird. Da es sich bei den desorbierten organischen Komponenten teilweise um schwerflüchtige Verbindungen handelt, werden einige wichtige Anforderungen an die Qualität des eingesetzten Analysesystems

gestellt, um die mögliche „Verschleppung“ von Probenbestandteilen zwischen den Messungen zu verhindern.

TD-30: alle Anforderungen der VDA278-Vorschrift werden übertroffen

Shimadzu hat eine neue Lösung für die Gas- und Materialanalyse vorgestellt, dessen flexible Erweiterbarkeit eine große Bandbreite von quantitativen Analysen unterstützt, etwa in Forschung oder Qualitätskontrolle. Das neue TD-30 Desorptionssystem bietet gleich mehrere Eigenschaften, wie besonders inerte Leitungen, maximal verkürzte Verbindungen zwischen GCMS und TD, sowie schnelles Heizen und Kühlen der TD-Röhrchen. Eine eingebaute Überlappungsfunktion erhöht signifikant den Probendurchsatz. Auf diese Weise erfüllt der TD-30 alle Anforderungen der VDA278-Vorschrift und übertrifft diese sogar in allen Punkten.

Gemäß VDA278 werden die Proben (Gummi, Plastik, Leder) in dünne Streifen geschnitten und je etwa 30 mg der Probe wird im TD-Röhrchen platziert. Von beiden Seiten wird das Röhrchen mit

etwa 5 mg Glaswolle versehen und mit Deckeln verschlossen. Die VOC- und SVOC-Komponenten werden bei unterschiedlichen Temperaturen für je 30 min desorbiert und anschließend die gesammelten Fraktionen in das GCMS eingeleitet. Die Analysebedingungen sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Ergebnisse: Evaluierung der Kalibration und der Wiederfindungsraten

Die Standards für die Kalibrationskurven werden durch Verdünnung von Toluol und n-Hexadecan mit Methanol auf 0,5 µg/µl hergestellt. Anschließend werden 4 µl der Lösung auf das Tenax® TA-Röhrchen aufgegeben und mit dem GCMS vermessen, um den Responsefaktor (Rf) zu bestimmen. Die Rfs werden später für die Quantifizierung der Komponenten in den Proben benutzt. Die zugrundeliegende Formel für die Berechnung von Rf ist folgende:

$$R_{f(\text{Toluol/C16})} = \frac{m_{\text{Toluol/C16}} [\mu\text{g}] \times 1.000.000}{\text{Peakfläche}}$$

Die Emission der zu bestimmenden Komponenten wird somit wie folgt berechnet:

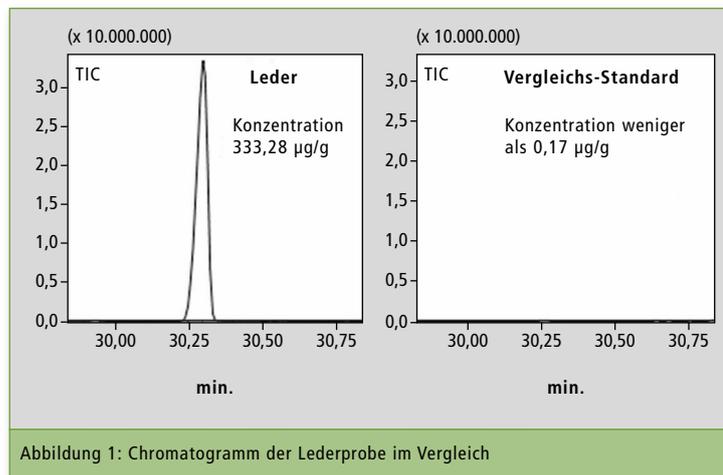


Abbildung 1: Chromatogramm der Lederprobe im Vergleich

$$\text{Emission} \frac{[\mu\text{g/g}]}{[\mu\text{g/g}]} = \frac{R_{f(\text{Toluol}/\text{C16})} \times \text{Peakfläche (Komponente)}}{1.000 \times \text{Probengewicht [mg]}}$$

Zusätzlich werden die Wiederfindungsraten des Analysensystems berechnet, indem eine Mischung aus typischen VOC-Komponenten (Konzentration etwa 0,11 µg/µl) hergestellt und 4 µl der Lösung auf das Tenax TA-Röhrchen aufgegeben werden. Die berechneten Wiederfindungsraten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Analyseergebnisse für nichtmetallische Automobilwerkstoffe

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse (in µg/g) für VOC-Komponenten, die in Gummi, Plastik und Leder bestimmt worden sind. Unter den berechneten Werten aus der Lederprobe ist eine sehr hohe Konzentration von Bis(2-ethylhexyl)-phthalat von 333,28 µg/g (Tabelle 3 und Abbildung 1), welches als Weichmacher in Kunststoffen verwendet wird.

Direkt nach dieser Probe ist ein leeres TD-Röhrchen vermessen worden, um die mögliche Verschleppung von Analyten in die Folgemessung zu bestimmen. Nach der Messung ist ein Wert von 0,17 µg/g Bis(2-ethylhexyl)-phthalat berechnet worden, was

Verwendete Konfiguration der Instrumente	
GCMS	GCMS-QP2020
Thermodesorber	TD-30R
Software GCMS	GCMSsolution™ Ver.4.45
Software TD-30	TD-30 Control Software
GC Säule	SH-Rxi™-5Sil MS (60 m x 0,25 mm I.D., df = 0,25 µm) (SHIMADZU)
TD-30 Einstellungen	
Desorptionstemperatur für TD-Röhrchen	90 °C für 30 min (VOC) / 120 °C für 30 min (SVOC)
Desorptionsflussrate für TD-Röhrchen	60 ml/min
Kühlung der Trap	-20 °C
Desorptionstemperatur der Trap	280 °C für 10 min
Temperatur für Joint	280 °C
Temperatur der Valve	250 °C
Temperatur der Transferline	280 °C
GC Einstellungen	
Control Mode	Pressure
Druck	200 kPa
Injektionsmodus	Split 1:100 (Säulenfluss 1,99 ml/min)
Ofentemperatur	40 °C (3 min) – (10 °C/min) – 300 °C (13,5 min)
MS Einstellungen	
Temperatur der Ion Source	200 °C
Temperatur vom Interface	250 °C
Scan Mass Range	m/z 35-400
Scan-Zeit	0,5 sec
Scan-Geschwindigkeit	769 u/sec

Tabelle 1: Konfiguration der verwendeten Instrumente

lediglich 0,05 % der Konzentration in der Messung davor darstellt (Abbildung 1). Somit konnte eine hohe Qualität des Systems und dessen Eignung für komplexe Proben der VDA278-Norm nachgewiesen werden.

Fazit

Der TD-30 ist die Revolution auf dem Markt der thermischen Desorptionssysteme. Insbesondere

Komponente	Wiederfindungsrate [%]
Benzol	106,5
Toluol	93,5
p-Xylol	99,9
o-Xylol	75,4
2-Ethyl-1-Hexanol	101,3
2,6-Dimethylphenol	94,2
Dicyclohexylamin	89,2

Tabelle 2: Berechnete Wiederfindungsraten

das High-End Model, TD-30R, setzt neue Maßstäbe in diesem

Bereich. Dieses System bietet die höchste Probenkapazität (120) ▶

Automotive

Delivering confidence

full range of analytical and testing solutions



Suspension and other Power Transmission Systems



Environmental Conservation



Electronic Instrumentation Components



Engines, Motors, and Power Sources



Bodies and Interiors



Lithium-Ion Rechargeable Batteries and Fuel Cells



auf dem Markt. Zudem sorgt die horizontale Ausrichtung der TD-Röhrchen für eine verschleppungs-freie Analyse.

Eine Überlappungsfunktion erhöht den Probendurchsatz. Das einzigartige Design der Transfer-Verbindung – ohne kalte Stellen mit dem kürzesten Weg zwischen TD und GCMS – ermöglicht hochempfindliche Analysen über einen sehr weiten Temperaturbereich.

Weitere Informationen zu diesem Beitrag:

- www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Products/literature/GCMS/C146-E349.pdf



Komponente	In VOC Fraktion [µg/g]			In SVOC Fraktion [µg/g]		
	Gummi	Plastik	Leder	Gummi	Plastik	Leder
C8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
Toluol	0,35	0,54	0,53	0,44	0,44	0,24
C9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
C11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31
1,3-Dichlorobenzol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
2-Propyl-1-Pentanol	0,36	0,52	0,73	0,18	0,18	0,78
C12	0,00	0,00	0,17	0,03	0,03	0,06
Nonanal	0,00	0,00	0,43	0,06	0,06	0,87
C13	0,20	0,14	0,26	0,13	0,13	0,13
C15	0,14	0,12	0,36	0,16	0,16	0,14
C16	0,31	0,00	0,60	0,16	0,16	0,86
C18	0,14	0,00	0,73	0,00	0,00	2,02
C19	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	1,37
Dibutylphthalat	0,00	0,00	2,92	0,00	0,00	17,53
C20	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	1,28
C22	0,00	1,09	0,17	0,00	0,00	0,82
C23	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,82
C25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,78
Bis(2-ethylhexyl)phthalat	0,41	1,6	33,67	0,00	0,00	333,28

Tabelle 3: Ergebnisse der quantitativen Analyse



Weltweit werden täglich große Mengen Rohöl in unterschiedliche Mineralölprodukte weiterverarbeitet, zum Beispiel Benzin, Kerosin, Diesel, Heiz- und Schmieröl. Mineralölprodukte sind im Wesentlichen aus zumeist gesättigten Kohlenwasserstoffen zusammengesetzt, sogenannten Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW). Bei der Produktion wie auch dem kommerziellen und privaten Gebrauch von Mineralölprodukten kommt es immer wieder zu Kontaminationen von Gewässern und Boden.

Da die Mineralölkohlenwasserstoffe biologisch schwer abbaubar sind, ist es sehr wichtig, die Belastung von Umweltproben durch MKW zu kontrollieren. Die Analytik von Mineralölkohlenwasserstoffen in Trink- und Oberflächenwässern sowie Abwässern wird durch die Europäische Norm EN ISO 9377-2 festgelegt, im Sprachgebrauch kurz H53 [1].

Die Wasserprobe wird extrahiert und anschließend über Florisil aufgereinigt, um polare Substanzen zu entfernen. Die Analyse des aufgereinigten Extrakts erfolgt mittels Gas-Chromatographie mit

Öl im Wasser?

Schnelle und effiziente Analyse von Mineralölen in Umweltproben nach H53

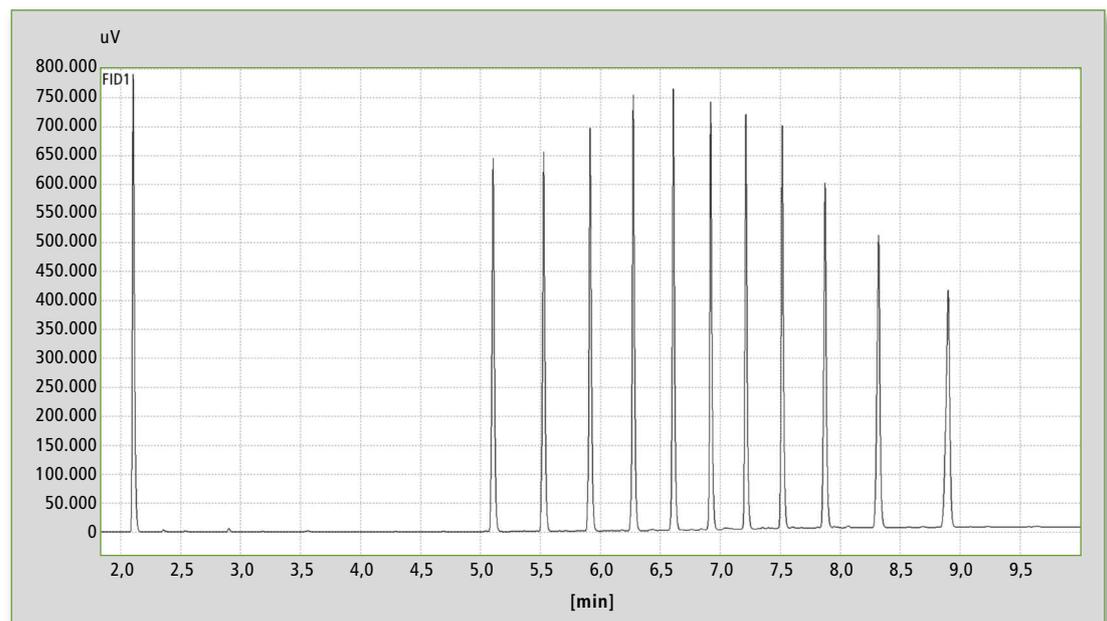


Abbildung 1: Chromatogramm eines Alkanstandards (C10, C20 bis C40, gerade Anzahl C-Atome) in Heptan; C40/C20 > 0,98

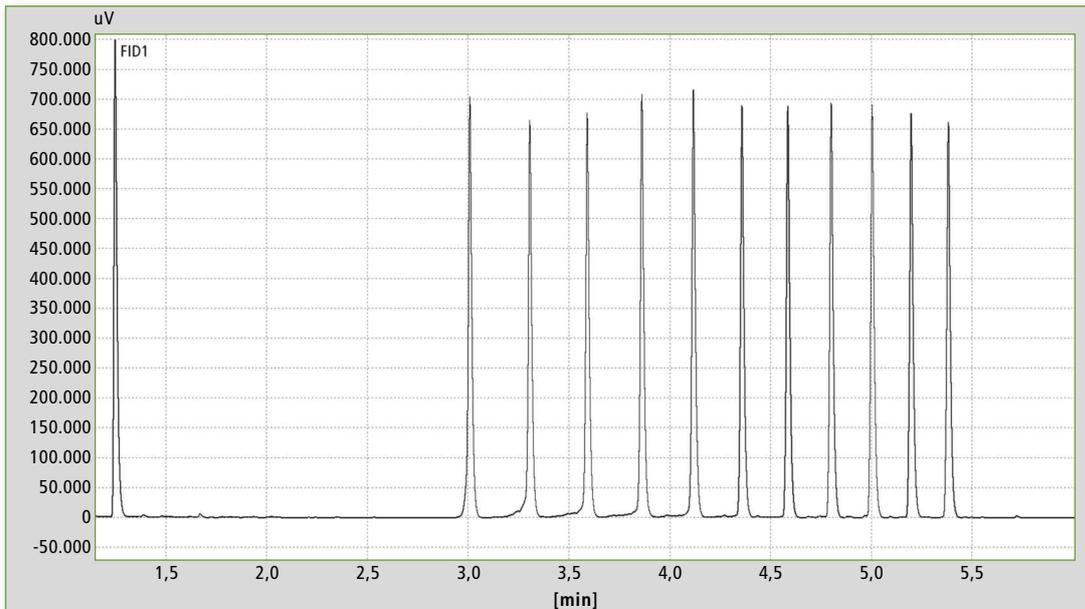


Abbildung 2: Chromatogramm eines Alkanstandards (C10, C20 bis C40, gerade Anzahl C-Atome) in Heptan; fast-GC mit Wasserstoff als Trägergas; C40/20 > 0,90

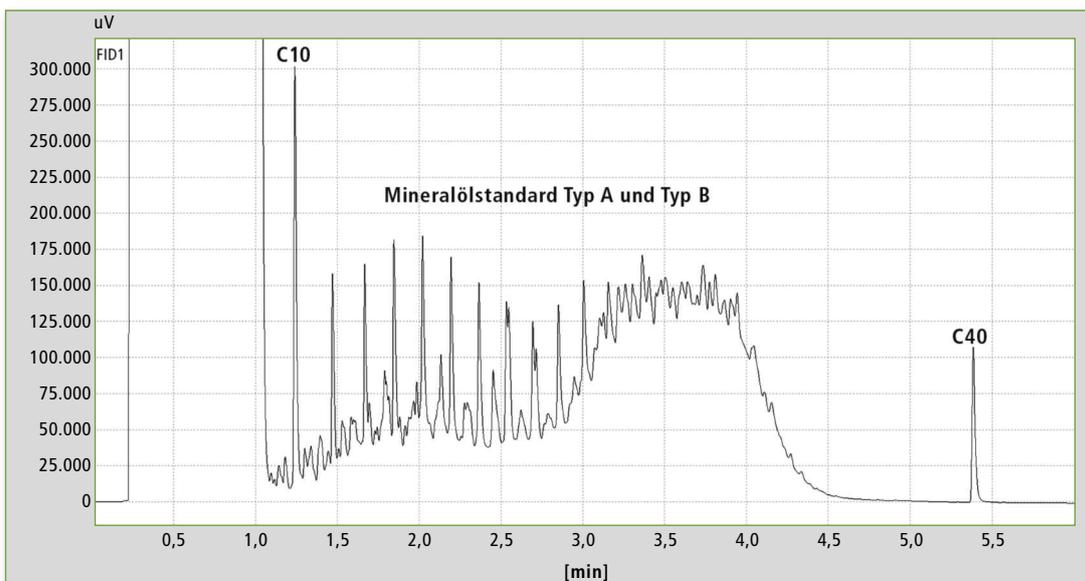


Abbildung 3: Chromatogramm des Kalibrationsstandards 1 mg/ml, Mineralöl Typ A und B in Extraktionslösung mit Retentionszeitmarker C10 und C40

einen Split-Splitlos-Injektor (SPL) einzusetzen, sofern dieser die obige Anforderung erfüllt.

In Wiederholmessungen eines Alkanstandards wurde für den Nexis GC-2030, ein HighEnd-GC-System, ein Verhältnis C40/C20 > 0,98 erreicht (Abbildung 1), sodass ausreichende Diskriminierungsfreiheit gegeben ist. Hierbei wurde eine konventionelle Säule (Rtx-5, 15 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, Restek) sowie eine optimierte Methodik hinsichtlich Basislinientrennung der Alkane und Chromatogrammlaufzeit verwendet (Tabelle 1, Seite 20). Die Retentionszeit des C40 betrug dabei 8,9 min, sodass die Analytik bis C40 in weniger als 10 min abgeschlossen war.

Verkürzung der Analysezeit: Wasserstoff als Trägergas

Unter Verwendung einer stark erhöhten Lineargeschwindigkeit konnte die Analytik weiter beschleunigt werden, um Chromatogramme mit Laufzeiten kleiner als 6,5 min zu erreichen. Weitere Verkürzung, bei gleichzeitiger Verwendung weniger extremer Lineargeschwindigkeiten, wurde durch den Einsatz von Wasserstoff als Trägergas erzielt.

Eine anschließende Nachoptimierung der Säulendimensionen führte zu einer weiteren Reduktion der Analysenzeit: Der Wechsel auf eine MXT-1 mit den Dimensionen 15 m, 0,25 mm ID, 0,1 µm Filmdicke (Restek) ermöglichte mit einer C40-Retentionszeit von 5,4 min schlussendlich eine Chromatogrammlaufzeit von unter sechs Minuten (Abbildung 2, Tabelle 2, Seite 20).

Flammenionisationsdetektion (GC-FID). Einzelsubstanzen aufzuschlüsseln, ist infolge der Komplexität der Kohlenwasserstoffgemische nicht möglich. Die Quantifizierung erfolgt daher über eine Integration der Gesamtpeakfläche zwischen den Markersubstanzen n-Dekan (C10) und n-Tetracontan (C40) [1].

Der so untersuchte Siedepunktsbereich liegt zwischen 175 und 525 °C [2]. Um die Konzentration an Mineralöl zu bestimmen, wird

eine Mineralölmischung (Diesel-Schmierölmischung, Mineralöl Typ A und Typ B) als externer Standard verwendet [1]. Boden- und Schlammproben können analog H53 bestimmt werden, festgelegt durch die Europäische Norm ISO 16703:2011.

Säulenschonend und wartungsfreundlich: der Split-Splitlos-Injektor

Da die Bestimmung der Mineralölkohlenwasserstoffe einen großen

Siedebereich umfasst, wird die Analytik klassisch unter Verwendung eines on-column-Injektors (OCI) durchgeführt, um eine diskriminierungsfreie Probenaufgabe zu gewährleisten. ISO 9377-2 schreibt ein Verhältnis der Alkane n-Tetracontan (C40) zu n-Eicosan (C20) von mindestens 0,8 vor [1]. Nachteile der on-column-Injektion sind die hohe Matrixbelastung der Säule sowie die Verwendung eines Retention-Gaps. Eine säulenschonendere und wartungsfreundlichere Alternative ist es,

Dies führte zu Injektionszyklen von 10 min inklusive Abkühl- und Equilibrierzeit. Die Diskriminierungsfreiheit der Probenaufgabe war mit einem Verhältnis C40/C20 > 0,90 nach wie vor gegeben. Weiterhin konnte infolge der erhöhten Temperaturstabilität der MXT-1 die Maximaltemperatur des Ofenprogramms erhöht werden, was die Chromatogrammlaufzeit für Realproben mit Anteilen im Bereich größer C40 verkürzt. ♦

Gas-Chromatograph	GC-2030
Injektor	Split/Splitlos
Injektortemperatur	280 °C
Injektionsvolumen	1 µl
Splitverhältnis	Splitlos
Säule	Rtx-5 15 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm df (Restek)
Trägergas	He
Trägergasgeschwindigkeit	60 cm/s
Ofenprogramm	60 °C, 1 min, 45 °C/min, 340 °C, 3 min
Detektor	FID
Detektortemperatur	340 °C

Tabelle 1: Methodenparameter konventionelle GC auf Rtx-5 Säule

Basierend auf diesen Optimierungsergebnissen wurden exemplarisch Realproben vermessen. Um eine Kalibrationsreihe herzustellen, wurden ein Mineralölstandard Typ A und Typ B sowie eine bereits mit C10 und C40 versetzte Extraktionslösung verwendet, beide kommerziell erhältlich (Sigma Aldrich, Abbildung 3, Seite 19). Dies reduzierte den nass-chemischen Arbeitsaufwand, hatte jedoch zur Folge, dass kein Hintergrundabzug aus reinem Lösungsmittel ohne Retentionszeitmarker möglich war. Stattdessen wurde die ungespikete Extraktionslösung als Konzentrationslevel 0 in die Kalibrationsreihe mit aufgenommen.

Da die zu erwartende Konzentration der Realproben nicht bekannt war, wurden zwei Kalibrierungen erstellt: eine 6-Punktkalibrierung in einem Bereich von 0 bis 1,5 mg/ml sowie eine 5-Punktkalibrierung in einem größeren Bereich von 0 bis 10 mg/ml (Abbildung 4). Für beide Kalibrierungen wurden Regressionskoeffizienten größer 0,9998 erhalten. Die untersuchten Realproben zeigten unterschiedliche Mineralölverunreinigungen (Abbildung 5). Sie lagen mehrheitlich im kleineren Kalibrierbereich, eine Probe lag jedoch etwas außerhalb im größeren Kalibrierbereich.

Fazit

Mittels eines Split-Splitlos-Injektors können H53-Messungen vereinfacht und beschleunigt werden, sofern dieser die Anforderungen des ISO 9377-2 Standards erfüllt.

Gas-Chromatograph	GC-2030
Injektor	Split/Splitlos
Injektortemperatur	320 °C
Injektionsvolumen	1 µl
Splitverhältnis	Splitlos
Säule	MXT-115 m, 0,32 mm ID, 0,1 µm df (Restek)
Trägergas	H2
Trägergasgeschwindigkeit	80 cm/s
Ofenprogramm	50 °C, 0,7 min, 95 °C/min, 115 °C, 65 °C/min, 200 °C, 55 °C/min, 370 °C, 0,22 min
Detektor	FID
Detektortemperatur	370 °C

Tabelle 2: Methodenparameter fast GC auf MXT-1 Säule

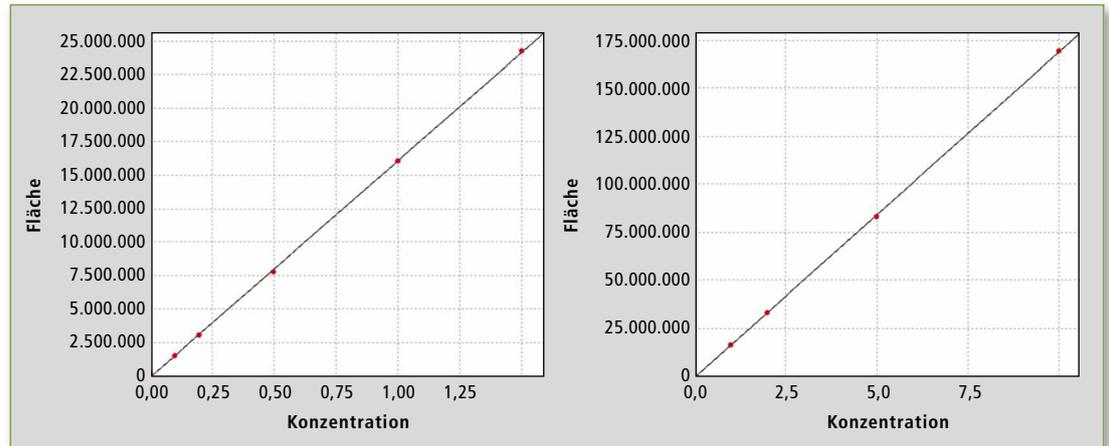


Abbildung 4: Kalibrationsreihen im Bereich 0 bis 1,5 mg/ml (links) sowie 0 bis 10 mg/ml (rechts)

Das Flächenverhältnis C40/C20 muss dafür oberhalb von 0,8 liegen, was der Nexus GC-2030 mit einem Verhältnis größer 0,9 mehr als erfüllt. Mithilfe von Wasserstoff als Trägergas können unter Auswahl einer geeigneten Säule die Chromatogrammlaufzeiten, bei gleichbleibender Zuverlässigkeit der Ergebnisse, signifikant auf bis zu 6 Minuten verkürzt werden.

Literatur

- [1] Wasserbeschaffenheit – Bestimmung des Kohlenwasserstoff-Index – Teil 2: Verfahren nach Lösemittelextraktion und Gaschromatographie (ISO 9377-2:2000); Deutsche Fassung EN ISO 9377-2:2000.
- [2] Auswertung von Mineralöl-Gas-Chromatogrammen, Handbuch Altlasten, Band 3, Teil 5, Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie.

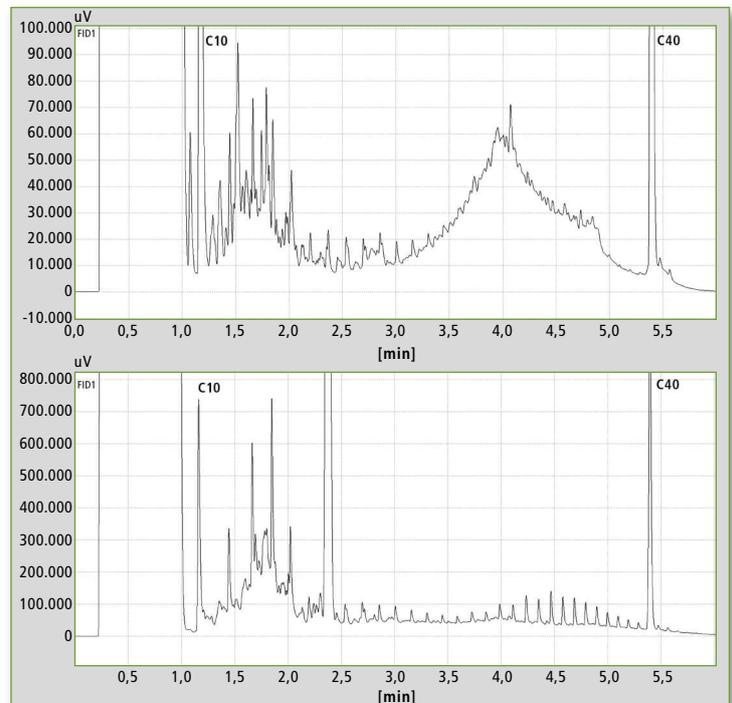


Abbildung 5: Chromatogramme zweier Realproben



Die Qual der Wahl

Nicht alle C₁₈-Säulen zeigen dasselbe Trennverhalten

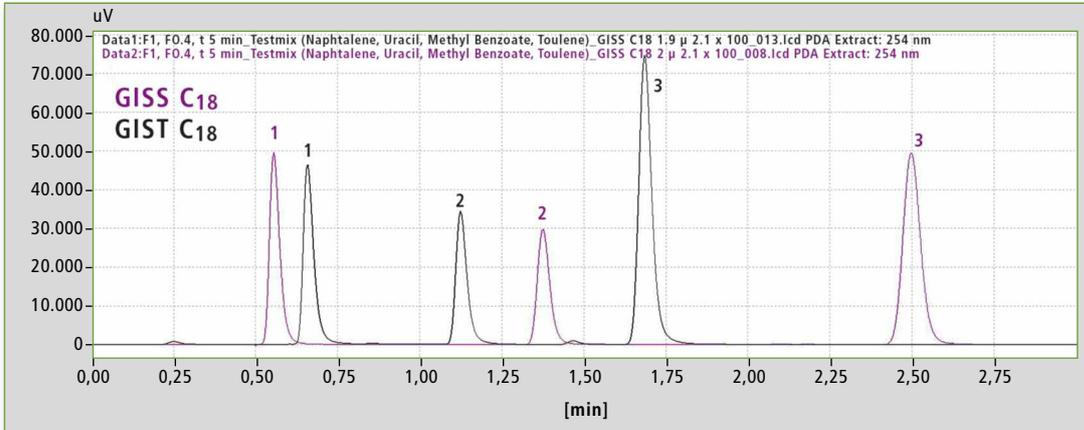


Abbildung 1: Vergleich von zwei unterschiedlichen stationären Phasen, gepackt mit C₁₈-modifiziertem Kieselgel (GISS und GIST). Dimensionen: 2,0 x 100 mm, 2 µm Partikelgröße; Mobile Phase: 35 % Wasser, 65 % Acetonitril. Proben: 1) Uracil 2) Benzoessäure-methylester 3) Naphthalin

Die Auswahl an verschiedensten Flüssigchromatographie-Säulen ist riesig, mit sehr vielen stationären Phasen zur Auswahl. Selbst wenn die zu verwendende stationäre Phase klar definiert ist, gibt es zahlreiche Unterschiede. Dieser Artikel bezieht sich ausschließlich auf Kieselgelbasierte stationäre Phasen mit C₁₈-Modifikation, auch Octadecylsilane oder ODS-Säulen genannt – der allgemeine Standard für die Umkehrphasen-Chromatographie. Um die Problematik an einem Beispiel zu erläutern, sind in Abbildung 1 zwei Chromatogramme von unterschiedlichen Shim-pack C₁₈-Säulen gezeigt.

Sowohl Probe als auch verwendete Methode und Säulendimensionen sind in diesem Beispiel identisch. Rein chemisch betrachtet, liegt hier also das gleiche Trennprinzip vor – dennoch unterscheiden sich die Retentionszeiten stark voneinander. Peak 3 (Naphthalin) zeigt auf der GISS C₁₈ eine Retentionszeit von 1,68 Minuten während es bei Verwendung der GIST C₁₈ erst nach 2,50 Minuten eluiert.

Die Schwierigkeit, eine passende C₁₈-Säule auszusuchen, ist groß, da sich unterschiedliche Säulen unterschiedlich verhalten können. Dies hängt von der Art des Kiesel-

gels und dessen Herstellung ab sowie von Modifikation und Packtechnik der Säule.

Hilfen, um C₁₈-Säulen zu vergleichen und zu charakterisieren

Aufgrund der riesigen Säulenauswahl ist es wichtig, die chemischen und physikalischen Eigenschaften und Unterschiede der verschiedenen stationären Phasen zu vergleichen, um somit die Selektivität zu charakterisieren. Dafür gibt es verschiedene Ansätze, wie zum Beispiel von Engelhardt, McCalley oder Tanaka veröffentlicht [1, 2, 3]. Auf letzteren wird hier im Folgenden weiter eingegangen.

Der Tanaka-Test liefert charakteristische Werte, anhand derer sich das Trennverhalten einer Säule genauer beurteilen lässt. Sie werden unter standardisierten Bedingungen aus den Retentionszeiten spezieller Analyten errechnet. Dies ermöglicht, stationäre Phasen entsprechend zu vergleichen, und leichter eine informierte Wahl treffen zu können. Da die Methoden und alle anderen Parameter für den Tanaka-Test vorgeschrieben sind, ergeben sich vergleichbare Werte – selbst wenn die Messungen in unterschiedlichen Laboren durchgeführt werden. Der Tanaka-Test ist somit ein nützli-

ches Werkzeug, um verschiedene Säulen miteinander zu vergleichen.

Parameter des Tanaka-Tests

Mit dem Test werden verschiedene Säulencharakteristiken beschrieben: Dazu gehören die Kapazität, Hydrophobizität, sterische Selektivität sowie Silanol-Wechselwirkungen. Diese Parameter (Tabelle 1, Seite 22) werden anhand der Reten-

tionszeiten geeigneter Standardsubstanzen bestimmt, gemessen unter vorgegebenen Analysebedingungen.

Ergebnisse von vielen Säulen anhand des Tanaka-Tests sind eine gute Hilfe, herauszufinden, welche Säulen in die engere Auswahl kommen. Der frei zugängliche „Column Selector“ von ACD/Labs beinhaltet Tanaka-Werte vieler Säulen zum Vergleich [4]. Aber auch andere Parameter und Spezifikationen, die wichtig sind für die Auswahl der geeigneten Trennsäule für eine bestimmte Applikation, werden im Folgenden beschrieben und erklärt.

Wichtige Spezifikationen und Parameter für die Säulenauswahl

Um eine geeignete stationäre Phase für ein Trennproblem auszuwählen, helfen die in Tabelle 2 (Seite 23) angegebenen Säulenparameter und Spezifikationen sehr gut weiter. Im Unterschied zum Tanaka-Test kommen diese Werte vom Säulenhersteller und sind direkt zugänglich.

Zusätzlich ist die Säuleneffizienz wichtig. Diese wird in theoretischen Böden (N) gemessen. Je höher die Bodenzahl, desto schmaler ist der Peak und/oder desto mehr Retention erfährt er auf der Säule. ▶

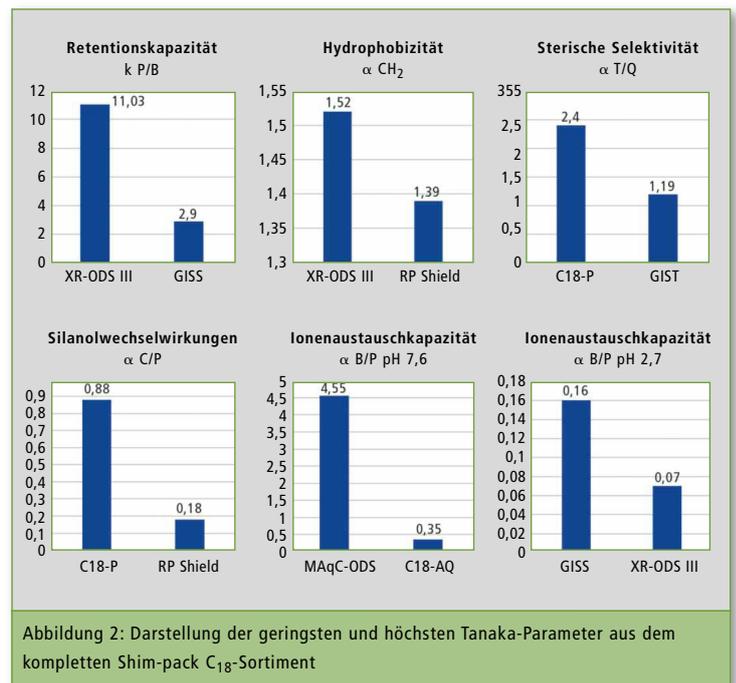


Abbildung 2: Darstellung der geringsten und höchsten Tanaka-Parameter aus dem kompletten Shim-pack C₁₈-Sortiment

$$N = \frac{L}{H} = 5,55 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2$$

L = Länge der Säule
 H = Bodenhöhe
 t_R = Retentionszeit
 W_h = Peakbreite auf halber Höhe

Eine schmaler Peak und damit eine höhere Bodenzahl kommt zustande durch eine kleine Partikelgröße, eine geringe Partikelgrößenverteilung und eine gute Packungsprozedur. Somit spiegelt ein hoher N Wert eine gute Packungsqualität der Säule wider.

Ein weiterer Faktor ist die Qualität des Kieselgels. Dieser Punkt ist heutzutage vernachlässigbar, da alle modernen Säulen qualitativ hochwertiges Kieselgel enthalten. In der Vergangenheit kam es durch hohe Partikelgrößenverteilung, schlecht gepackte Säulenbetten und hohem Anteil an sauren Silanolgruppen zu breiter Peakform, nicht nur für basische Analyten.

Neben diesen allgemeinen Spezifikationen gibt es noch weitere Modifikationen, die das Retentionsverhalten verschiedener C₁₈-Säulen beeinflussen. Diese werden im Folgenden am Beispiel der verwendeten Säulen für diesen Artikel erklärt.

Verwendete Säulen

Diese Shim-pack C₁₈-Säulen wurden für die Untersuchung genutzt: XR-ODS III und MAqC-ODS; von der Shim-pack G Serie, GIST C₁₈, GIST C₁₈-AQ, GISS C₁₈, GIS RP-Shield, und GIS C₁₈-P. Die Shim-pack G Serie bietet ein vollständiges Portfolio mit vielen verschiedenen Dimensionen. Dies hat den Vorteil, dass Trennmethoden auf Phasen mit sehr kleinen Dimensionen (UHPLC) entwickelt und bis hin zu sehr großen Säulen für präparative Anwendungen skaliert werden können.

Die XR-ODS III gehört zur XR Series; sie wird ausschließlich mit kleinen Partikelgrößen gepackt. Somit ist sie für Hochdruckapplikationen mit hoher Auflösung und Sensitivität gut geeignet.

Die MAqC-ODS ist eine C₁₈-Säule, die zusätzlich Metall enthält.



Shim-Pack LC-Säulen von Shimadzu

Durch den Metallgehalt gibt die Säule Kationenaustauscheffekte, was basische Substanzen stärker retardiert. Die Säule eignet sich sehr gut für die Analyse von wasserlöslichen Vitaminen und basischen Komponenten.

Die GIST C₁₈-Säule weist eine hohe Inertheit auf. Sogar ionische Komponenten können mit symmetrischen Peaks und hoher Reproduzierbarkeit gemessen werden.

Verglichen mit konventionellen C₁₈-Säulen, zeigt die GIST C₁₈-AQ Säule eine sehr gute Retention gegenüber hydrophilen, polaren Analyten. Außerdem kann man sie mit 100 % wässriger mobiler Phase verwenden, ohne dass ein Verlust von Retention auftritt.

Die GISS C₁₈-Säule hat die gleiche Inertheit sowie Stabilitätsbereich

wie die GIST C₁₈. Sie wird für schnelle Trennungen verwendet und ist ideal für LC-MS-Applikationen geeignet. Die GISS hat mit 20 nm die größte Porengröße im Shim-pack Sortiment und ist daher auch die ideale Wahl für größere Analyten mit Molekulargewichten bis zu 20.000 Da.

Die GIS RP-Shield Säule hat eine polare funktionelle Gruppe, die zwischen der Siliziumdioxid-Oberfläche und den C₁₈-Gruppen eingebettet ist. Dadurch ist sie auch unter 100 % wässrigen Bedingungen stabil. Die polare funktionelle Gruppe ist basen-deaktiviert, somit bekommen vor allem saure Analyten eine gute Peakform. Es ergibt sich also eine schwache Wechselwirkung zu basischen Analyten und eine starke Wechselwirkung zu sauren Analyten. Durch die zusätzliche Wechselwirkung von Wasserstoffbrück-

enbindungen erhält die Säule eine andersartige Selektivität im Vergleich zu herkömmlichen C₁₈-Säulen.

Bei der GIS C₁₈-P-Säule ist die C₁₈-Modifikation polymerisch gebunden, statt monomerisch wie bei den meisten anderen ODS-Phasen. Dadurch bietet sie eine hohe sterische Selektivität für die Trennung von planaren und nicht-planaren Analyten. Ideale Anwendungen sind beispielsweise die Trennung von PAKs oder Analyse von strukturähnlichen Komponenten (Vitamin D2 und D3).

Messparameter und Methoden

Instrument: LC-2040C 3D (Shimadzu)

Säule: Shim-pack XR-ODS III; (75 mm x 2,0 mm I.D., 1,6 µm); Alle anderen Shim-pack C₁₈ (150 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm); Shimadzu

Mobile Phase:

- A: 20 % Wasser, 80 % Methanol;
- B: 30 % Wasser, 70 % Methanol
- C: 60 % Wasser, 30 % Methanol, 10 % 200 mM KH₂PO₄; pH 2.7
- D: 60 % Wasser, 30 % Methanol, 10 % 200 mM KH₂PO₄; pH 7.6

Ofentemperatur: 40 °C

Flussrate und Injektionsvolumen sind den Säulendimensionen angepasst.

Ergebnisse

Die Messergebnisse des Tanaka-Tests zeigen interessante Unter-

Tanaka Parameter	Säulen Charakteristik	Erklärung
K PB K Pentylbenzol	Retentionskapazität	Menge / Dichte der Alkylketten bzw. Kohlenstoffgehalt / Oberfläche
α CH ₂	Hydrophobizität	Oberflächenbedeckung. Je kleiner der Wert, desto weniger Hydrophobizität
α T/O k Triphenylen, o-terphenyl	Sterische Selektivität	
α C/P k Koffein, Phenol	Silanolwechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen)	Endcapping; wenn das Endcapping nicht gut ist / viele freie Silanolgruppen oder polare Gruppen vorhanden sind, ist der Wert hoch
k Benzylamin Phenol pH 7,6	Ionenaustauschkapazität pH 7,6 (Restsilanol pH 7,6). Anzahl der freien Silanolgruppen auf der Säule	Ein hoher Wert spiegelt eine hohe Ionenaustauschkapazität bei pH 7,6 wider
k Benzylamin Phenol pH 2,3	Ionenaustauschkapazität pH 2,3 (Restsilanol pH 2,3). Anzahl der sauren Silanolgruppen auf der Säule	Ein hoher Wert spiegelt eine hohe Ionenaustauschkapazität bei pH 2,3 wider

Tabelle 1: Auflistung und Erklärung der einzelnen Tanaka-Parameter

schiede zwischen den verschiedenen C₁₈-Säulen im Shim-pack Sortiment. Als Beispiele werden in Abbildung 2 (Seite 21) die am stärksten voneinander abweichenden Werte verglichen (siehe auch Tabelle 1).

Der k P/B Wert zeigt die Retentionskapazität der Säule für unpolare Substanzen. Säulen, die geringe Retentionszeiten für Amylbenzene liefern, haben kleine Werte. Für schnelle Analysen bietet sich in dem Fall die GISS-Säule an; benötigt man eine Säule mit hoher Retention, ist die XR-ODS III eine gute Wahl.

Der α CH₂ Parameter macht eine Aussage über die Hydrophobizität und Selektivität für Substanzen einer homologen Reihe, die sich wie die Testsubstanzen nur durch Anzahl an C-Kettengliedern unterscheiden. Auch hier zeigt die hydrophobe XR-ODS III Phase einen hohen Wert. Die RP-Shield hingegen, mit der eingebetteten polaren Gruppe weist deutlich weniger Retention und Selektivität für die unpolaren Testsubstanzen auf, der erhaltene Wert für α CH₂ ist deutlich geringer.

Der nächste Parameter, α T/O, verdeutlicht die Fähigkeit der Säule, planare und nicht-planare Moleküle voneinander zu trennen (sterische Selektivität). Die C₁₈-P-Säule ist also sehr gut, um strukturähnliche Analyten zu trennen, die sich nur in ihrer räumlichen Anordnung unterscheiden.

Silanolwechselwirkungen, also die Fähigkeit der Säule, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen,

			Beispiel Säule
Kohlenstoffbeladung	Hohe Werte	Hohe Retention für unpolare Analyten	XR-ODS III
Kohlenstoffbeladung	Kleine Werte	Geringe Retention für unpolare Analyten	GISS
Oberfläche	Hohe Werte	Hohe Retention für unpolare Analyten	XR-ODS III
Oberfläche	Kleine Werte	Geringe Retention für unpolare Analyten	GISS
Porengröße	Bis ca. 10 nm	Benutzbar für Moleküle bis zu ca 5.000 Da	Alle Shim-pack Säulen (außer GISS)
Porengröße	Bis ca. 20 nm	Benutzbar für Moleküle bis zu 20.000 Da	GISS
Porengröße	30 nm und mehr	Gute Peakform für Makromoleküle (Peptide und Proteine)	Nicht im Shim-pack Sortiment vorhanden
Reines Kieselsäuregel	Alle modernen / neuen	Bessere Peakform für basische Analyten	
	Viele alte	Schlechte Peakform für basische Analyten durch viele Wechselwirkungen	

Tabelle 2: Auflistung wichtiger Säulenspezifikationen mit deren Auswirkung auf die Trennung und einem Säulenbeispiel aus dem Shim-pack Sortiment

werden durch den α C/P Wert beschrieben. Es lässt sich dadurch auch eine Aussage über die Qualität des Endcapping treffen. Dieser Wert ist mit Vorsicht zu genießen, da hier die RP-Shield einen sehr geringen Wert zeigt, obwohl sie eine polare Gruppe enthält. Diese eingebettete Funktionalität besitzt jedoch die entgegengesetzte Polarität der Silanolgruppen – daher der reduzierte α C/P Wert.

Die letzten beiden Parameter spiegeln die Ionenaustauschkapazität der Säule bei pH 7,6 bzw. pH 2,3 wider, also in einer mobilen Phase mit pH über und unter dem pKa der Silanolgruppen, bei dem Ionisierung zu O⁻ einmal gefördert (pH 7,6) und einmal unterdrückt (pH 2,3) wird. Hier zeigt die MAQC-ODS, die mit enthaltenem

Metall deutlich saure Gruppen enthält, auch bei pH 7,6 Kationenaustauscheffekte.

Fazit

Die Auswahl einer passenden C₁₈-LC-Säule ist eine anspruchsvolle Aufgabe. Es gibt sehr viele verschiedene C₁₈-Typen und diese unterscheiden sich teilweise stark in ihren Trenneigenschaften. Die Klassifizierung nach den Parametern des Tanaka-Testprotokolls kann eine Hilfe sein, die richtige Wahl zu treffen.

Literatur

[1] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, J. Chromatogr. Sci. 27 (1989) 721.

[2] H. Engelhardt, H. Low, W. Gotzinger, J. Chromatogr. A 544 (1991) 371.
 [3] D. V. McCalley, J. Chromatogr. A 636 (1993) 213.
 [4] <http://www.acdlabs.com/resources/free-ware/colsel/>

IMPRESSUM

Shimadzu NEWS, Kundenzeitschrift der Shimadzu Europa GmbH, Duisburg

Herausgeber
 Shimadzu Europa GmbH
 Albert-Hahn-Str. 6 - 10 · D-47269 Duisburg
 Telefon: +49 (0)203 76 87-0
 Telefax: +49 (0)203 76 66 25
 shimadzu@shimadzu.eu
 www.shimadzu.eu

Redaktion
 Uta Steeger
 Telefon: +49 (0)203 76 87-410
 Ralf Weber, Maximilian Schulze

Gestaltung und Produktion
 m/e brand communication GmbH GWA
 Düsseldorf

Auflage
 Deutsch: 5.650 · Englisch: 4.340

© Copyright
 Shimadzu Europa GmbH, Duisburg,
 Juli 2018. Nachdruck, auch auszugsweise,
 nur mit Genehmigung der Redaktion
 gestattet.

Windows ist Warenzeichen der Microsoft Corporation. ©2018 Apple Inc. Alle Rechte vorbehalten. Apple, das Apple Logo, Mac und Mac OS sind Warenzeichen von Apple.

50th ANNIVERSARY Shimadzu Europa
 Quiz 'n' Win



Die Zukunft der Massenspektrometrie für das toxikologische Screening

Das European Innovation Center – Interview mit Prof. Saint-Marcoux, Universitätsklinik Limoges, Frankreich

Der Toxikologe Prof. Franck Saint-Marcoux (Dr. der Pharmazie) vertritt die Position eines Universitätsprofessors für Toxikologie und leitet den Fachbereich Klinische und Forensische Toxikologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie an der Universitätsklinik Limoges (Frankreich). Er hat einen Masterabschluss in analytischer Chemie, einen Masterabschluss in weiterführenden Studien der Pharmazie und hat 2004 promoviert auf dem Gebiet der pharmakokinetischen Modellierung. Er ist Autor oder Co-Autor von mehr als 70 Veröffentlichungen in internationalen Referenzmagazinen (peer-reviewed journals) und war bisher an etwa 50 Tagungen und internationalen Veranstaltungen beteiligt.

Seit April 2017 arbeitet er als Experte für klinische Anwendungen mit dem European Innovation Center von Shimadzu, um Methoden und Tools zu entwickeln, die Tandem-LC-MS in der Toxikologie umzusetzen.

Prof. Saint-Marcoux, würden Sie kurz Ihre Forschung skizzieren? Was ist der derzeitige Stand der Technik?

Wir arbeiten im Labor an Fragen zur klinischen und forensischen Toxikologie. Das umfasst z.B. versehentliche Belastungen durch Pharmaka oder toxische Verbindungen, Selbst-Vergiftungen, Verdacht auf Überdosierung, Überwachung von Suchtkranken, Fahren unter Drogeneinfluss (DUID) oder Dopingkontrollen. In jeder Situation ist es die Aufgabe des



Prof. Saint-Marcoux, Universitätsklinik Limoges, Frankreich

Toxikologen, Fremdstoffe bzw. Xenobiotika eindeutig zu identifizieren (auch wenn Hinweise dazu fehlen), toxikologisch hohe Konzentrationen zu messen oder sehr niedrige Nachweisgrenzen zu erzielen, und quantitative Ergebnisse zu liefern. Meist muss dies rund um die Uhr mit einer schnellen Probenanalyse möglich sein.

Jedoch verschieben sich die Ziele ständig! Es gibt immer neue Arzneimittel, für die eine therapeutische Medikamentenüberwachung notwendig ist. Dies bedeutet, dass eine individuelle Dosisinstellung basierend auf der Medikamentenspiegelbestimmung im Blut erfolgen kann. Es gibt auch ständig

neue illegale Drogen zu untersuchen. Dies erklärt, warum wir laufend Forschungsarbeiten durchführen, um relevante, moderne, praktische und effiziente Analyseverfahren zu entwickeln, hauptsächlich unter Einsatz von LC-MS oder GC-MS.

Können Sie die Forschung beschreiben, die Sie mit dem European Innovation Center von Shimadzu betreiben?

Ganz allgemein entwickeln wir in der Kooperation neuartige Analysemethoden für die Toxikologie. Seit Beginn unserer Zusammenarbeit fokussieren wir die Entwicklung von Screening-Abläufen

mit Hilfe eines LCMS-8060 Triple-Quadrupol-Massenspektrometers.

In einem ersten Ansatz wurde eine Spektraldatenbank für die LC-MS/MS-Plattformen von Shimadzu entwickelt. Sie enthält über 8.000 MRM-Übergänge für 1.280 zertifizierte Referenzstandards (einschließlich 37 deuterierte interne Standardverbindungen) mit 6.084 registrierten Spektren im positiven und negativen Modus. Diese Bibliothek nutzt die Produkt-Ionen-Spektren, die sich für die Routinesuche und den Nachweis von chemischen Verbindungen mit Treffern in der Referenzbibliothek nutzen lassen.

Neu an dem Ansatz ist die Erfassungsmethode von Spektren, die die „Rekonstruktion“ eines Spektrums erlaubt, das alle spezifischen Übergänge eines Moleküls enthält. Es handelt sich um einen sogenannten „MRM-Spektrum-Modus“. Im Gegensatz zu anderen bisher publizierten Ansätzen, wobei methodisch alle Moleküle zwei oder drei Kollisionsenergien mit Hilfe des Produkt-Ionen-Scannings ausgesetzt werden, haben wir die Kollisionsenergie für bis zu 15 Übergänge in einem Molekül optimiert. Dieser Ansatz macht es möglich, äußerst spezifische und reiche Spektralinformationen zu erhalten.

Zur Zeit verfolgen wir ein Forschungsprojekt zur Bewertung der quantitativen Leistungsfähigkeiten des auf dieser Bibliothek beruhenden Screening-Verfahrens. Etwas präziser: Wir entwickeln eine Methode für die am häufigsten über-

wachten Wirkstoffe, eingeschlossen Antidepressiva, Anxiolytika, Drogen, Analgetika sowie Antipsychotika, und testen ihre Leistungsfähigkeiten für infratherapeutische, therapeutische und toxische Konzentrationen in einem quantitativen Ansatz. Erste Ergebnisse sind vielversprechend und wir stellen bald ein erstes Verfahren vor.

Unterdessen entwickeln wir vollautomatische Extraktionsmethoden, die vom programmierbaren Probenvorbereitungssystem CLAM-2000, direkt an ein LCMS-8060-System angekoppelt, durchgeführt werden. Das erste Verfahren wurde für die Bestimmung von 42 Amphetaminen, Kokain und Opiate entwickelt. Diese Arbeiten sind kürzlich zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Warum sind Sie an diesem Forschungsthema interessiert? Worin besteht das Ziel? Warum ist es wichtig?

Das Screening ist der erste Schritt im Analyseablauf, wenn die Art oder die Gegenwart eines Wirkstoffs vollständig unbekannt ist, was in der klinischen und forensischen Toxikologie oft der Fall ist. Gewöhnlich geht das Screening einer spezifischen Analyse voraus, die eine Quantifizierung der detektierten Verbindung erlaubt. Erwartet werden Verfahren, die Detektion sowie Quantifizierung ermöglichen.

Zusätzlich eliminieren automatisierte Prozessschritte eventuelle technische Fehler in der Vorbereitung. Zudem sparen sie Laborzeit, weil die Mitarbeiter andere Tätigkeiten durchführen können während das System automatisch läuft.

Auf welche Weise helfen die Geräte von Shimadzu bei Ihrer Forschung

Das LCMS-8060 ist ein leistungsfähiges Laborsystem. Welche Anwendung wir auch bisher entwickelt haben: Verglichen mit konventionellen 2 MRM pro Verbindung haben wir keinen Verlust der Empfindlichkeit durch die Datenerfassung im MRM-Spektrum-Modus festgestellt. Beispielsweise bei der Methode zur Bestimmung illegaler Drogen betrug die

Verweilzeit und die Pausenzeit für die Datenerfassung typischerweise 3 ms und 1 ms, was bedeutet, dass die maximale Zeit einer Proben-schleife weniger als 1 Sekunde beträgt, sogar im intensivsten Bereich der überlappenden Substanz-Elution. Zum jetzigen Zeitpunkt lassen sich 220 MRM gleichzeitig messen, wobei im Durchschnitt immer noch 20 Datenpunkte über einen Peak gemessen werden.

Ein CLAM-2000 ist das erste System, das Verfahren ohne menschlichen Eingriff ermöglicht, sobald das Primärröhrchen eingeführt wird. Die Probenaufbereitung wird mit dem LC-MS/MS-System synchronisiert, wobei kein Zeitverlust eintritt, während die Fähigkeit der Online-Probenaufbereitung und der direkten Injektion sofort nach der Probenaufbereitung erhalten bleibt.

Worin sehen Sie die Stärken von Shimadzu verglichen mit anderen Anbietern, und zwar nicht auf die Geräte beschränkt?

Mit dem European Innovation Center war Shimadzu das erste Unternehmen, das uns eine direkte und effektive Zusammenarbeit vorgeschlagen hat. Dies ist eine spannende und eine „Win-Win“-Partnerschaft!

Alle Arbeiten werden betreut vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Limoges sowie von Shimadzu, namentlich Stéphane Moreau vom Standort Duisburg, Deutschland, und Alban Huteau aus dem französischen Marne-la-Vallée. Der überseeische Geschäftsbereich Massenspektrometrie der Shimadzu Corporation

mit Neil Loftus und Alan Barnes ist ebenfalls mit großem Engagement an diesen Entwicklungen beteiligt. Ein wichtiger Punkt besteht darin, dass wir mit Tiphaine Robin eine Promotionsstudentin haben, die sich diesem Projekt vollständig widmet.

Haben Sie Wünsche oder Anforderungen an Shimadzu hinsichtlich Unterstützung oder Technologie, die helfen würden, Ihre Verfahren oder Forschung zu verbessern, auch wenn diese Wünsche zur Zeit schwer zu erfüllen wären?

Wir haben verschiedene Projekte im Sinn, etwa die Entwicklung von analytischen Methoden in einem anstehenden Q-TOF-System oder die Entwicklung von analytischen Methoden basierend auf Microsampling Wing Devices. Bedauerlicherweise benötigen wir mehr Personal. Eine potenzielle Lösung würde darin bestehen, einen zweiten Promotionsstudenten mit Shimadzu zu teilen.

Wagen wir einen Blick in die Zukunft: Was wird auf den klinischen und forensischen Gebieten passieren, und wie wird das die Analysegeräte in 10 Jahren beeinflussen, etwa die klinische MS und klinische Verfahren?

In naher Zukunft werden wir auf zahlreiche Herausforderungen bei den pre-analytischen, analytischen und post-analytischen Schritten stoßen.

Erstens: Instrumente, die weniger invasiv als die üblichen Blutproben sind oder die es Patienten erlauben, selbst Proben zu nehmen, werden mehr und mehr in den Vordergrund rücken. Dies beinhaltet, dass wir mehr und mehr neuen Probenarten begegnen: Trockenblutproben, Speichel-

proben oder Mikrovolumina an Blut. Derzeit bestehen Blutproben gewöhnlich aus nicht weniger als 50 bis 100 µl. Wenn wir erwarten, dass moderne Beprobungsstrategien gezielt zu Proben von weniger als 5 µl führen werden, können Sie sich die Empfindlichkeitszunahme vorstellen, die wir benötigen.

Zweitens: mehr und mehr Medikamente werden der „personalisierten“ oder „zielgerichteten“ Medizin angehören. Dies wird eine Entwicklung von verfeinerten Analyseverfahren nach sich ziehen, wie die „Nano-Surface and Molecular Orientation Limited“ (nSMOL) Methode, die Shimadzu für die Messung von Therapeutika auf Basis monoklonaler Antikörper entwickelt hat.

Wir müssen auch an hocheffiziente Labore denken, die hinsichtlich Probenaufbereitung noch nutzerfreundlicher werden und den Arbeitsaufwand minimieren. Dabei wird ein CLAM-2000 sehr hilfreich sein. Ein System muss auch flexibel genug sein, viele Probenarten zu bearbeiten. Ich möchte dies mit Trockenblutproben oder Mikroröhrchen umsetzen und wünsche mir andersartige Extraktionsverfahren.

Sehr oft wird die Zeit, die der Bearbeitung und Prüfung von Daten gewidmet wird, nicht berücksichtigt, obwohl es ein Kernpunkt ist. Man kann nicht irgendein Labor mit hohem Durchsatz in ein Effizienz-Labor transformieren, wenn Sie keine Software haben, die Ihnen hilft, schnell Ergebnisse zu liefern. In meinem Labor sehe ich, dass wir die meiste Zeit feinjustierte Methoden mit automatischen Extraktionsverfahren und extrem kurzen Analyseläufen anwenden, aber dennoch Stunde um Stunde aufwenden, um die Daten zu prüfen. Sind die Eichkurven ok? Sind die Bereiche der internen Standards ok? Sind alle Peaks gut integriert? Sind die internen Qualitätskontrollen ok? Wir benötigen definitiv Hilfsmittel, die automatisch diese Fragen beantworten und uns sicher die Analysen fahren lassen, genauso wie neue Automobile uns sicher auf der Autobahn fahren lassen!



CLAM-2000



Protein- und Peptiduntersuchungen sind unerlässlich für das Verständnis vieler biologischer Abläufe auf der molekularen Ebene. Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ist die bevorzugte Methode für qualitative und quantitative Protein- und Peptidanalysen geworden – aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit, Genauigkeit und Eignung zur Analyse komplexer Mischungen. Allerdings kann die Analyse von Peptiden in geringen Konzentrationen problematisch werden wegen nicht ausreichender Ionisationseffizienz einiger Peptide. Einer der Wege, dieses Problem zu umgehen, ist das Einbringen eines Ionisationsverstärkers ins Analysemolekül. Eine Arbeitsgruppe an der polnischen Universität Breslau entwickelte einen neuen, auf einem 2,4,6-Triphenylpyridinium-Rest basierenden Ionisationsmarker, wodurch eine LC-MS-Analyse von Peptiden auf Attomol-Niveau mit Hilfe des MRM-Modus (*multiple reaction monitoring*) ermöglicht wird.

Derivatisierung mit Piryliumsalzen

Höhere Empfindlichkeit bei Peptidanalysen mit LC-MS/MS

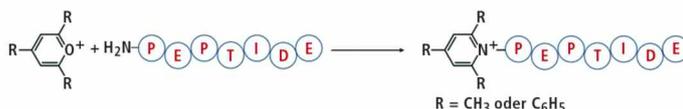


Abbildung 1: Reaktion von 2,4,6-trisubstituierten Piryliumsalzen mit Peptiden

basischste Aminosäure Arginin enthalten, die stärksten Signale auf [1].

Eine Methode, die Ionisationseffizienz eines Peptides ohne Arginin zu steigern, ist das Einbringen einer festen Ladungsgruppe in das zu analysierende Molekül. Die Forscher der Universität Breslau

deute Proteine. Die derivatisierten Peptide erzeugen protonierte 2,4,6-Triphenylpyridinium-Ionen in ausreichender Menge im Verlauf der CID-Fragmentierung (*collision induced dissociation*), die sich durch die Verwendung eines selektiven Modus als nützlich erwiesen hat, wie z.B. MRM, oder ein Precursor-Ionenscan.

Derzeit wird dieser Ansatz an echten Urinproben getestet. Das Untersuchungsziel besteht in der Entwicklung einer Methode, die einen frühen Nachweis eines Präeklampsiezustands (PE) basierend auf tryptischen Podocin-Fragmenten erlaubt, die als PE-Biomarker anerkannt sind. Bei PE handelt es sich um eine multiple Funktionsstörung, die noch immer als eine Hauptursache von Mütter- und Neugeborenensterblichkeit und -erkrankungsraten gilt.

LC-MS-Analyse

Die LC-MS von derivatisiertem, tryptisch abgebauten Rinderserumalbumin (BSA) wurde mit einem LCMS-8050 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer von Shimadzu durchgeführt. Für das Experiment im Precursor-Ionenmodus wählten die Forscher das Ionenfragment mit m/z 308,2 bei einer Kollisionsenergie von 45 eV, das ein protoniertes 2,4,6-Triphenylpyridinium-Kation darstellt. Dasselbe LC-MS-Massenspektrometer wurde für die Analyse der isobaren Peptidmodelle (Duplex) im MRM-Modus als auch beim Q1Q3-Scan eingesetzt.

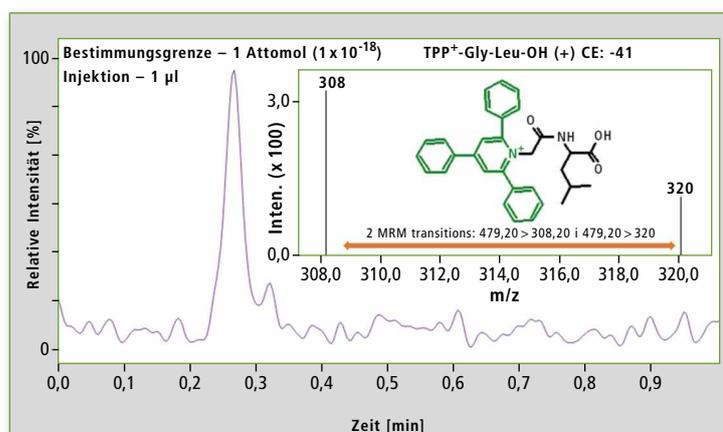


Abbildung 2: MS-Spektrum, das für ein Attomol des derivatisierten Dipeptids TPP⁺-Gly-Leu-OH mit dem LCMS-8050 von Shimadzu erhalten wurde

Einführung

Aufgrund einer nicht-ausreichenden Ionisationseffizienz sichert die Massenspektrometrie nicht immer eine erfolgreiche Analyse von niedrig abundanten Peptiden, woraus eine begrenzte Analyseempfindlichkeit resultiert.

Die Protonenaffinität des Peptidmoleküls, die Ionisationseffizienz, ist der die Ionisationsausbeute beeinflussende Schlüsselparameter. Daher weisen Peptide, welche die

haben den Einsatz von 2,4,6-Triphenylpyryliumsalzen für die Peptid-Derivatisierung vorgeschlagen [2].

Pyryliumsalze reagieren leicht mit sterisch ungehinderten primären Aminen zu geladenen Pyridiniumsalzen. Diese Reaktion erweist sich insbesondere selektiv gegenüber der ϵ -Aminogruppe des Lysins. Daher wurden die 2,4,6-Triphenylpyryliumsalze für die Derivatisierung synthetischer Peptide ebenso eingesetzt wie für tryptisch ver-

Das Forschungsteam schlug auch eine neue Methode zur Gewinnung isobarer Peptide vor durch Kombination von ¹⁸O-Enzymmarkierung und Modifizierung von Peptiden durch ¹²C- und ¹³C-Isotopologen der 2,4,6-Triphenylpyryliumsalzen. Diese Kombination führt zur Bildung von isobaren Duplexen. Das nachfolgende Fragmentierungsexperiment führt zur Bildung von Referenzionen, die sich um 4 Da unterscheiden. Ihr Vergleich dient der quantitativen Bewertung der Peptide in Vergleichsproben.

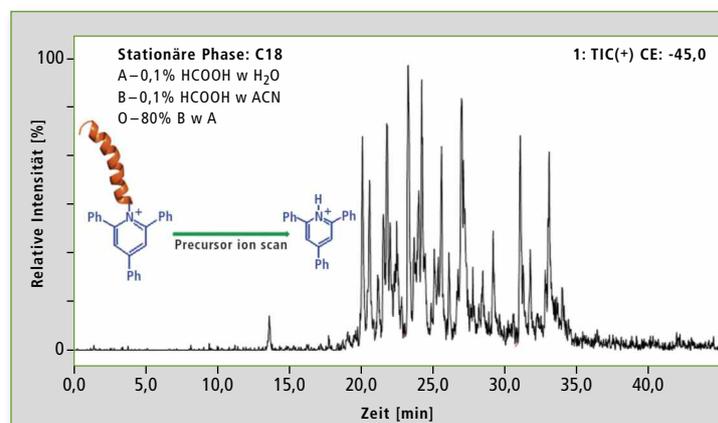


Abbildung 3: LC-MS-Analyse von tryptisch verdautem derivatisiertem BSA, die mit dem Precursor-Ionen-Scanmodus durchgeführt wurde

Die Trennung wurde durchgeführt auf einer RP-Aeris Peptide (50 x 2,1 mm, 3,5 µm)-Säule mit einer Gradientenelution von 5 - 60 % B in A (A, 0,1 % HCOOH in Wasser; B, 0,1 % HCOOH in MeCN) bei Raumtemperatur über eine Dauer von 45 min für verdautes BSA (Flussrate: 0,1 ml min⁻¹) und 15 min für die isobarischen Peptidmodelle (Flussrate: 0,2 ml min⁻¹). Die Proben wurden in 400 µl einer Wasser-Acetonitril-Mischung gelöst.

Derivatisierungsverfahren

Eine Probe wurde in Dimethylformamid (DMF) gelöst und anschließend der dreifache Überschuss an 2,4,6-Triphenylpyryliumsalz und der gleiche Überschuss von Triethylamin (TEA) zugegeben. Die resultierende Mischung wurde gevortext und bei 70 °C für 20 min inkubiert. Zuletzt wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft und lyophilisiert.

Ergebnisse

Nachweisgrenze

Das derivatisierte Dipeptid H-Gly-Leu-OH diente zur Überprüfung der analytischen Nachweisgrenze. Der selektive MRM-Modus wurde für diesen Zweck angewendet und für das untersuchte Dipeptid konnte eine Nachweisgrenze von 1 Attomol gezeigt werden (Abbildung 2).

Analyse von tryptisch verdautem BSA

Zur Analyse von derivatisiertem BSA-Precursor wurde der Ionen-scanmodus genutzt. Das protonierte 2,4,6-Triphenylpyridinium-Kation von 308 m/z bei 45 eV Kollisionsenergie wurde als Test-Ion gewählt. Dadurch wurden ausschließlich solche Peptide beobachtet, die Ionisationsmarker enthielten (Abbildung 3).

2,4,6-Triphenylpyridiniumsalz-basierte isobarische Peptide (Duplex)

Ein ¹⁶O/¹⁸O-Austausch wird in der vergleichenden Proteomik häufig eingesetzt. Der tryptische Proteinverdau wurde in H₂¹⁸O durchgeführt, was den Einbau von

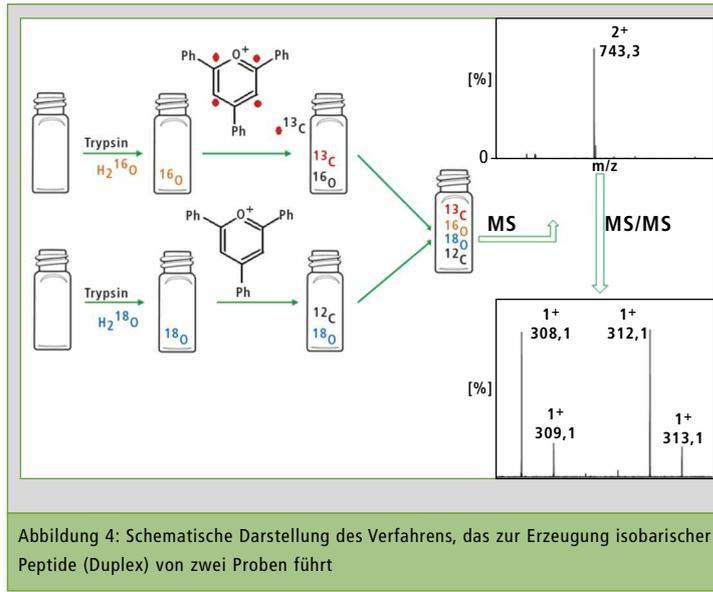


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verfahrens, das zur Erzeugung isobarischer Peptide (Duplex) von zwei Proben führt

zwei schweren Sauerstoffatomen in die Carboxylgruppe des Lysins zur Folge hat. Mit diesem Ansatz sind einige Unwägbarkeiten verbunden, z.B. ein Back-Exchange-Effekt oder eine Überlagerung isotopischer Peaks. Das Forschungsteam schlug eine Modifikation dieses Ansatzes durch zusätzliche Nutzung von 2,4,6-Triphenylpyryliumsalzen vor.

Eine Probe wird in H₂¹⁸O und unmarkiertem 2,4,6-Triphenylpyryliumsalz verdaut, eine andere Probe dagegen in unmarkiertem H₂O und markiertem 2,4,6-Triphenylpyryliumsalz (Abbildung 4). Danach werden die Proben zusammengeführt und zusammen analysiert. Durch Fragmentierung der Ionen, die den isobarischen Peptiden entsprechen, entstehen Referenzen mit einem Massenunterschied von 4 Da (markiertes und unmarkiertes 2,4,6-Triphenylpyridinium). Ihr Intensitätsvergleich erlaubt die Bestimmung der relativen Peptidkonzentration in den zwei Proben. Daher besteht kein Risiko der Überlagerung isotopischer Peaks. Darüber hinaus wurde kein Back-Exchange-Effekt beobachtet, da das Pyridinium-modifizierte Lysin nicht vom Enzym erkannt wird.

Die Analyse von Peptiden im Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)-Modus ermöglicht einen Peptidnachweis mit hoher Empfindlichkeit. Dies resultiert aus dem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis. Daher wurde die

diesem Experiment wurden zwei äquimolare Mengen analysiert und somit zwei diagnostische Peaks mit vergleichbarer Intensität beobachtet. Das Vorhandensein von 2,4,6-Triphenylpyridinium-Anteilen in Peptiden steigert die Ioneneffizienz. Die Analyse modifizierter isobarischer Peptide im MRM-Modus könnte daher eine beträchtlich verbesserte Nachweisgrenze zum Ergebnis haben.

Echte Probenanalyse

Die synthetisierten isotopisch markierten und unmarkierten 2,4,6-Triphenylpyryliumsalze wurden zur Analyse eines tryptischen Podocin-Abbaus verwendet, welches aus dem Urin von Schwangeren stammt. Der analysierte Urin stammt aus unterschiedlichen PE-Stadien. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 6 (Seite 28). Der Einsatz von Pyryliumsalzen ermöglicht sowohl eine Steigerung der Analyseempfindlichkeit als auch das Einbringen von stabilen Peptid-Isotopen, welche im Gegenzug eine LC-MRM-MS-Analytik mit Hilfe der multiplen Isotopenverdünnungstechnik ermöglichen. ▶

Analyse der isobarischen Peptidmodelle (Ac-Leu-Val-Asn-Glu-Val-Thr-Glu-Phe-Ala-Lys-OH; 66-75 BSA-Fragment) mit Hilfe des MRM-Modus durchgeführt. Das Forschungsteam nutzte die diagnostischen Referenzen (m/z 308 und 312) für die MRM-Übergänge. Die Analyseergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

Ein Full-Scan-Spektrum der isobarischen Peptidmodelle wird im oberen Teil der Abbildung gezeigt. Der deutliche Peak bei m/z 743 entspricht dem Duplex. In

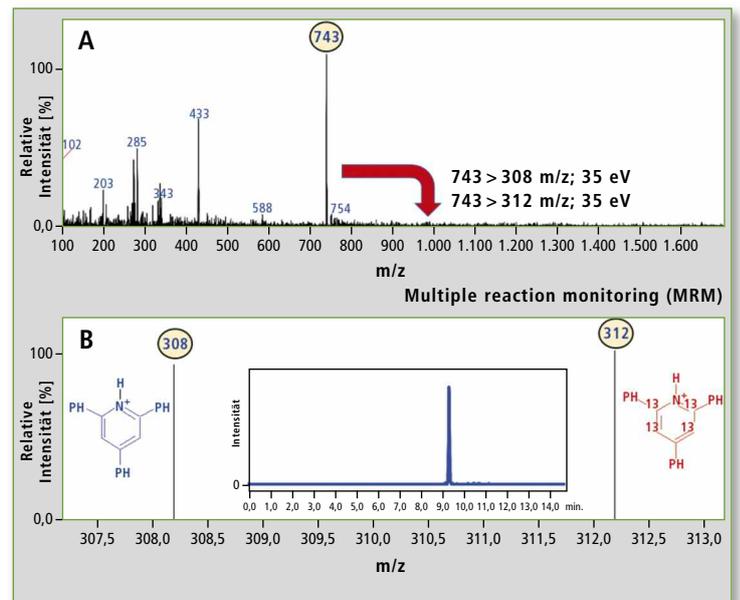


Abbildung 5: A) ESI-MS-Spektrum, das für die durch Derivatisierung von Ac-Leu-Val-Asn-Glu-Val-Thr-Glu-Phe-Ala-Lys-OH gebildeten, isobarischen Peptidmodellen erhalten wurde B) ESI-MS-Spektrum, das für die isobarischen Peptidmodelle (Duplex) im MRM-Modus anhand der 743 > 308 und 743 > 312 m/z-Übergängen erhalten wurde. Der Einschub zeigt ein LC-MS-Chromatogramm, das im MRM-Modus erhalten wurde.



Forschungsteam von links nach rechts: Piotr Stefanowicz, Remigiusz Bąchor, Zbigniew Szewczuk, Monika Kijewska, Mateusz Waliczek

Fazit

Ein neuer Ionisationsverstärker basierend auf einem 2,4,6-Triphenylpyridinium-Rest wurde konzipiert, welche eine hochempfindliche Peptidanalyse auf Attomol-Niveau mit Hilfe der LC-MS erlaubt. Ein großer Vorteil dieses Ionisationsverstärkers besteht in dem komfortablen Derivatisierungsprozess und der hohen Selektivität gegenüber der

ϵ -Aminogruppe des Lysins. Darüber hinaus benötigt die Pyrylium-Salzreaktion keine aktiven Gruppen mit geringer Stabilität in wässrigen Lösungen. Eine geeignete Kombination im $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ -Austausch und eine Derivatisierung mit 2,4,6-Triphenylpyryliumsalzen oder seinen $^{13}\text{C}_4$ Isotopologen ermöglicht die Erzeugung isobarischer Peptide. Der Intensitätsvergleich des Signals der aus den isobarischen Peptiden

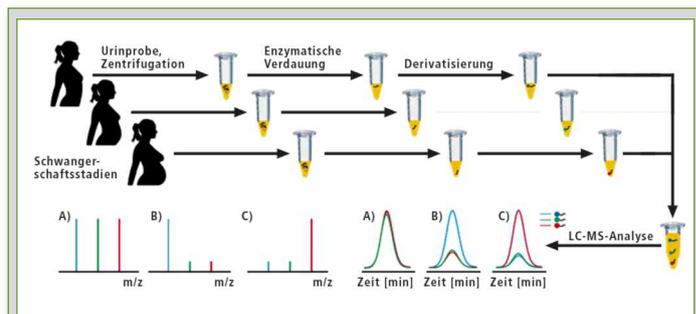


Abbildung 6: Schematische Darstellung der empfindlichen „Shotgun“-Proteomics-Analyse von Urinproteinen, die von derselben Patientin bei verschiedenen PE-Stadien stammen. Die aus den Proben isolierten und zu unterschiedlicher Zeit gesammelten tryptischen Peptide werden mit Hilfe von Ionisationsverstärkern derivatisiert, die mit einer unterschiedlichen Zahl stabiler Isotope markiert sind. Die derivatisierten Proben werden kombiniert und die Änderungen der relativen Podocin-Konzentrationen und anderer Biomarker werden mit einem LC-MS mit Hilfe des Isotopenverdünnungsansatzes analysiert.

stammenden Referenzen erlaubt eine Quantifizierung der Peptide. Kürzlich wurden Pyridiniumsalze für eine LC-MRM-MS-Analyse von Podocin als Biomarker des PE-Stadiums zur Anwendung gebracht.

Autoren

Mateusz Waliczek, Ph. D, Monika Kijewska, Ph.D., Remigiusz Bąchor, Ph.D., Piotr Stefanowicz, D.Sc., Zbigniew Szewczuk, Prof. Chem. Fakultät, Universität Breslau, Polen

Literatur

- [1] D.R. Zook, H. Forsmo-Bruce, S. Briem, Chromatographi 52 (2000) 60-64.
- [2] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, Sci. Rep. 6 (2016), 37720.
- [3] X. Yao, C. Afonso, C.J. Fenselau, Proteome Res. 2 (2003) 147-152.
- [4] K.C.S. Rao, R.T. Carruth, M.J. Miyagi, Proteome Res. 4 (2005) 507-514.

Shimadzu live

IMSC Florenz, Italien 26. - 31.08.2018 www.imsc2018.it	TIAFT Gent, Belgien 26. - 30.08.2018 www.tiaft2018.org	Dioxin Krakau, Polen 26. - 31.08.2018 www.dioxin2018.org
MSACL Salzburg, Österreich 09. - 13.09.2018 www.msacl.org	ISC Cannes - Mandelieu, Frankreich 23. - 27.09.2018 www.isc2018.fr	SFC Straßburg, Frankreich 17. - 19.10.2018 www.greenchemistrygroup.org



@ShimadzuEurope

NEWS – gedruckt und digital



Printversion: Wenn Sie die Shimadzu News regelmäßig erhalten wollen, senden Sie uns einfach Ihre Post-Adresse an folgende E-Mail: shimadzu-news@shimadzu.eu



Auch als App: Die Shimadzu NEWS gibt es auch als WebApp unter www.shimadzu-webapp.eu



Registrieren Sie sich für unseren Newsletter: www.shimadzu.eu/newsletter