

Polymere und Fluoreszenz

Fluoreszenzspektroskopie
von Basispolymeren aus der
Industrie

Gleichgewicht der Kräfte

Leistung und Robustheit in
Einklang mit Empfindlichkeit
und Geschwindigkeit

360°-Trinkwasseranalyse Trilogie

Automatische, simultane
und schnelle Analyse von
Pestiziden





APPLIKATION

- »Plug und Play«-Lösung für das Krankheits-Screening – MALDI-8020 zum Screening der Sichelzellenanämie 4
- Maßgeschneiderte Software-Lösungen für jede Messung – Makro-Programmierung für Shimadzu UV-Vis und FTIR 8
- Auf der sicheren Seite: Steroidnachweis in Arzneimitteln und Nahrungsergänzungsmitteln mit einem LCMS-8045 11
- MSⁿ-Analyse nicht-derivatisierter und Mtp-derivatisierter Peptide – Zwei aktuelle Untersuchungen zur Anwendung von LC-MS-IT-TOF-Geräten 18
- Polymere und Fluoreszenz – Teil 2: Wieviel Fluoreszenz zeigt ein Polymer für eine Qualitätskontrolle? 26

PRODUKTE

- Gleichgewicht der Kräfte – LCMS-8060NX: Leistung und Robustheit mit Empfindlichkeit, und Geschwindigkeit 7
- 360°-Trinkwasseranalyse: Episode 2 – Automatische, simultane und schnelle Analyse von Pestiziden mit Online-SPE und UHPLC-MS/MS 14
- Vieleseitiges Tool für die Automobilindustrie – Neue HVM-G3 Serie 17
- Kopfschmerz ade – Anleitung zur Auswahl der idealen C18-Säule 22
- Validierte Methode für monoklonale Antikörper-Medikamente – Bewertung der nSMOL-Methodik in menschlichem Serum 24

AKTUELLES

- Eine globale Lösung dank globaler Zusammenarbeit – Innovationszentren von Shimadzu als Partner der wissenschaftlichen Forschung 2

MÄRKTE

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



Enrico Davoli mit dem PESI-MS-System – einem Gerät zu reinen Forschungszwecken (research-use only = RUO)

Eine globale Lösung dank globaler Zusammenarbeit

Krebsdiagnostik: Innovationszentren von Shimadzu als Partner der wissenschaftlichen Forschung

Es begann 1875 als Ein-Mann-Unternehmen im japanischen Kyoto und hat heute weltweit mehr als 10.000 Mitarbeiter: Shimadzu trägt mit seinen Lösungen dazu bei, „der Gesellschaft zu nützen durch Wissenschaft und Technologie“, so die Unternehmensphilosophie. Für seine zukünftigen Gerätegenerationen, die den eigenen Anspruch „Excellence in Science“ tragen, hat Shimadzu rund um den Globus Innovationszentren (SIC - Shimadzu Innovation



Silvia Giordano und Enrico Davoli vor dem Mario-Negri-Institut, Mailand

Center) eingerichtet. 2017 wurde für Europa in Duisburg das European Innovation Center (EUIC) eröffnet.

Basierend auf seinem seit mehr als 50 Jahren entwickelten Netzwerk in Europa, betreut Shimadzu seit 2017 über ein Dutzend aktuelle Projekte mit dem EUIC. Sie umfassen Lebensmittel-, Umweltschutz und klinische Anwendungen mit Fokus auf neue Methoden, Werkzeuge, Techniken, Diagnostik und Lösungen. Eine ganz aktuelle Zusammenarbeit wird die Krebsbehandlung voranbringen.

Forschung zur Verbesserung der Krebserkennung

An einem neuen Ansatz, Krebszellen zu diagnostizieren, forscht Shimadzu zusammen mit Dr. Enrico Davoli. Er arbeitet am Mario-Negri-Institut für Pharmakologische Forschung im italienischen Mailand, und war der erste Präsident der italienischen Gesellschaft für Massenspektrometrie. Shimadzu regte die Zusammenarbeit für Europa an, nachdem das Unternehmen erfolgreich eine Kooperation mit Professor Sen Takeda von der Yamanashi Universität in Japan begonnen hatte. Dabei geht es um ein neues System, das künstliche Intelligenz (KI) mit einer Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie-Sonde (PESI-MS - Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry) kombiniert, um den forschungsbasierten Nachweis von Krebszellen der Leber zu fördern (Yoshimura et al., 2012).

Leberzellkarzinome sind eine häufige Ursache bei Krebstod. Zur üblichen Behandlungsweise gehört die Abtragung der Krebszellen. Die Fachwelt diskutiert, wie viel gesundes, in die Teilentfernung einbezogenes Gewebe der Leber für das Überleben des Patienten am besten ist: Einige Forscher halten eine kleine Pufferzone für akzeptabel, in der gesundes Gewebe entfernt wird, während andere der Ansicht sind, dass nichts anderes als das Tumorgewebe entfernt werden sollte.

Im Verlauf einer Operation leitet der Chirurg eine Probe zur histol-

ogischen Untersuchung an einen Pathologen weiter, um zu entscheiden, ob mehr Gewebeentfernung notwendig ist. Jede Probe benötigt etwa 30 Minuten zur Aufbereitung und Analyse, was nicht nur hohe Kosten verursacht, sondern auch mit einer hohen Infektionswahrscheinlichkeit einhergeht.

Neue Lösung dank globaler Partner

Japan ist ein führendes Land bei den Behandlungsergebnissen für Leberkrebs, größtenteils aufgrund der neuartigen diagnostischen Techniken in Japan (Kudo, 2018). Im Projekt von Davoli und Shimadzu wird KI darauf trainiert, eine Probe von PESI-MS-Daten ohne irgendeine Histologie oder Laboraufbereitung zu analysieren. KI trifft eine binäre Entscheidung mit statistischer Wahrscheinlichkeit – normal oder Krebs. Vom Zeitpunkt der Probengewinnung durch den Chirurgen bis zur KI-Entscheidung dauert der gesamte Vorgang nicht länger als zwei Minuten.

Nachdem Takeda und Shimadzu die Effektivität dieses Ansatzes in Japan gezeigt hatten, ergab sich die Frage, ob eine Hochrechnung auch auf andere Länder möglich sei, da die KI ursprünglich mit Daten von japanischen Proben trainiert worden war. So trat Shimadzu mit Davoli in Verbindung und fragte an, ob er Zugang zu Gewebeproben aus italienischen Kliniken habe. Davoli war begeistert mitzuwirken.

„Ein Forscher wünscht sich sein ganzes Leben lang, einen Prototyp zu besitzen und der erste zu sein, der etwas versucht. Das Instrument ist brandneu. Der Ansatz ist brandneu. Es war eine sehr gute Gelegenheit“, sagt er.

Die ersten Ergebnisse sind vielversprechend, und mit Förderung von Shimadzu erweitert Davoli seine Probensammlungen auf andere solide Tumore. „Unser Plan besteht darin, mit anderen europäischen Nationen zusammen zu arbeiten, um PESI-MS an anderen Populationen zu testen“, sagt er und fügt hinzu, dass das EUIC am Aufbau eines kontinen-

talen Forschungsverbunds wesentlich beteiligt war.

SICs als wirtschaftlich-akademischer Partner

In gewisser Weise lassen sich Shimadzu Innovation Center als Hybrid aus Industrie und Wissenschaftswelt betrachten. Alle SICs haben das Ziel, neue Märkte zu erschließen, aber Märkte wachsen nicht nur aus wirtschaftlichem Antrieb, sondern auch durch wachsende Kompetenz und Expertise, erläutert Dr. Ann-Christin Niehoff, EUIC-Produktmanager für analytische Bildgebungstechnologien (Imaging).



Prof. Sen Takeda von der Universität Yamanashi beim Shimadzu Global Innovation Summit 2017

„Mehr als 90 % der promovierten Chemiker bleiben nicht im Wissenschaftsbetrieb. Wir helfen beim Aufbau ihrer Karriere“, sagt sie. Deshalb fördert Shimadzu Promotionsstudierende und kann sogar Mitantragsteller für Zuschüsse sein. Zu den Beispielen gehören gemeinsame Projekte an der Klinik im französischen Limoges, und dem University College London, England, bei denen das EUIC mit Promotionsstipendien für drei Jahre unterstützt.

Unabhängig von der hohen Qualität seiner technologischen Lösungen sieht Shimadzu das primäre Ziel seiner SICs darin, der Gesellschaft zu nützen. SICs

betrachten ihre Forschungskoperationen daher wie eine wissenschaftliche Zusammenarbeit, die niemals die akademische Unabhängigkeit gefährdet, zu Publikationen ermutigt und die Hochschul-Ausbildung unterstützt.

Der Erfolg von SICs baut auf neuen Gedanken und Zugangsweisen auf. Deshalb stimmen sich die Teams von Shimadzu fortlaufend mit den Universitätsforschern ab, um von wissenschaftlichen Fragestellungen zu erfahren, bei deren Lösung Innovationen von Shimadzu helfen können. Deshalb bilden SICs auch Forschungsnetzwerke, wodurch auch Davoli und Takeda einander vorgestellt wurden. Takeda wurde eingeladen, während des Shimadzu Global Innovation Summit 2017 im japanischen Kyoto zu sprechen. Dort lernte er auch andere wissenschaftliche Partner von Shimadzu kennen und konnte sich mit Ihnen über ihre letzten Ergebnisse in der analytischen Forschung austauschen.

„Der Gesellschaft zu nützen durch Wissenschaft und Technologie“ – diese Philosophie wenden Shimadzu und seine SICs an, um akademisch-wissenschaftliches Fachwissen von Universitäten in technologische Lösungen zu übertragen und einige der weltweit größten Herausforderungen zu lösen.

Die Informationen inklusive der Partner und der Titel der in diesem Artikel genannten Personen entsprechen dem Stand zum Zeitpunkt der Interviews (Dezember 2018).

Referenzen

Kudo, M. (2018). Management of Hepatocellular Carcinoma in Japan as a World-Leading Model. *Liver Cancer* 7, 134-147.

Yoshimura, K., Chen, L.C., Mandal, M.K., Nakazawa, T., Yu, Z., Uchiyama, T., Hori, H., Tanabe, K., Kubota, T., Fujii, H., et al. (2012). Analysis of renal cell carcinoma as a first step for developing mass spectrometry-based diagnostics. *J Am Soc Mass Spectrom* 23, 1741-1749.



»Plug und Play«-Lösung für das Krankheits-Screening

Das MALDI-8020 zum Screening der Sichelzellenanämie



3D-Illustration von Sichelzellen

Die Weltgesundheitsversammlung verabschiedete 2006 eine Resolution, die Sichelzellenanämie (Sickle Cell Disease = SCD) als gesundheitspolitische Priorität anzuerkennen, und rief die Länder dazu auf, die Krankheit zu bekämpfen. Diese Resolution wurde 2009 auch von den Vereinten Nationen übernommen. In diesem Zusammenhang wurden weltweit zahlreiche Screening-Programme in vielen Laboren ins Leben gerufen.

SCD bezeichnet eine Gruppe erblicher Erkrankungen roter Blutkörperchen. Ursache ist anomales Hämoglobin (HbS), das durch Mutationen des Beta-Hämoglobins entsteht. Diese Krankheit wurde bereits im Jahr 1910 be-

schrieben. Derzeit finden sich ca. 80 % aller Fälle von Sichelzellenanämie in tropischen Regionen, insbesondere südlich der Sahara. Aufgrund von Migrationsbewegungen steigen die Zahlen aber in den letzten Dekaden auch in Europa.

Die Anforderungen der Gesundheitsschutzmaßnahmen bedienen

Screening-Programme sind Erstmaßnahmen zum Gesundheitsschutz und müssen daher auf zuverlässigen Analysemethoden

und Datenverarbeitungssoftwares basieren. Wirtschaftlichkeit ist eine weitere Anforderung und hat zum Einsatz von Hochdurchsatz-Systemen geführt, die die Kosten der einzelnen Analysen mindern. Gleichzeitig erlauben sie durch eine größtmögliche Automatisie-



Abbildung 1: Arbeitsablauf eines automatisierten Screenings



Abbildung 2: Spezifische Unterstützung für das Fleximass-Target

rung, dass sich die Ärzteteams ausschließlich auf anomale Proben konzentrieren können. Das MALDI-MS (Massenspektrometer) von Shimadzu in Kombination mit Technologiepaketen des Unternehmens Biomaneó aus dem französischen Dijon begegnen diesen Herausforderungen. Sie umfassen ein Probenverarbeitungs-Kit sowie Datenverarbeitungs- und Managementsoftware.

Zweistufiges Verfahren für genauere Ergebnisse

Screening-Programme werden üblicherweise nach einem zweistufigen Verfahren organisiert. Bei der ersten Stufe handelt es sich in der Regel um eine Routinemethode, die in der Lage sein muss, pathologische Proben auch mit nur einer einzigen Mutation nachzuweisen und sie eindeutig einer von drei Gruppen zuzuordnen: Heterozygote ohne HbS-Varianten, Heterozygote mit HbS-Varianten und HbS-Homozygote. Der zweite Schritt basiert auf einer zweiten Standard-Referenzmethode und dient dazu, die ersten Ergebnisse zu bestätigen.

Ein Screening auf Hämoglobinoopathien lässt sich bei Neugeborenen durchführen, um eine frühzeitige Versorgung der Kinder zu sichern; das ermöglicht, die Lebenserwartung wesentlich zu erhöhen. Ein zweiter Screening-Anwendungsbereich betrifft Jugendliche oder Erwachsene im Zuge der Primärprävention, die es Menschen ermöglicht, ihren homozygoten AA- oder heterozygoten XS-Status zu erfahren. Menschen, die nur ein Sichelzell-Gen

und ein normales Gen vererbt haben, besitzen eine Sichelzell-Veranlagung (SCT) und sind heterozygot-XS. Menschen mit SCT zeigen für gewöhnlich keine SCD-Symptome, können aber die Veranlagung auf ihre Kinder übertragen.

Effiziente Analysemethode

Das Screening Neugeborener wird üblicherweise zentral in spezialisierten Labors durchgeführt. Die hierfür verwendete biologische Probe besteht aus einem trockenen Blutropfen auf Vliespapier.

Der Einsatz von MALDI-MS in klinischen Labors hat sich bereits bewährt, insbesondere bei der Identifikation von Mikroorganismen (beispielsweise der Einsatz von VITEK®MS). MALDI-MS-Techniken werden den Anforderungen von Screening-Anwendungen gerecht, speziell hinsichtlich Automatisierung, Empfindlichkeit, Auflösung, Stabilität, Analysegeschwindigkeit, Zuverlässigkeit und Robustheit auch bei hohen Analyserraten sowie Benutzerfreundlichkeit.

Mit der Einführung eines Screenings auf Sichelzellanämie hat Biomaneó gezeigt, dass ein Benchtop-MALDI-8020-Massenspektrometer den oben dargelegten Qualitätskriterien entspricht und den Einsatz der MALDI-MS auf Laborebene leichter, komfortabel und schnell macht.

Neue Technik, Hochdurchsatz, Anwenderfreundlichkeit

Biomaneó hat eine „Plug and Play“-Analyselösung entwickelt, die ein Probenverarbeitungs-Kit und die MALDI-MS-Technik mit einer Software zur automatischen Ergebnisinterpretation durch Kombination mit klinischen Daten bündelt (Abbildung 1).

Das erste NeoSickle®-Kit wurde in zwei Ausführungen entwickelt: Die erste ist für Hochdurchsatz-Analysen per Roboter bestimmt; dazu wurde eigens eine Unterstützung für den Einsatz des Fleximass-Targets des MALDI-8020 (Abbildung 2) entwickelt und das Roboter-Skript wurde angepasst. Bei der zweiten Version handelt es sich um ein Kit für Labors, die etwa 200 Proben pro Tag manuell analysieren. Das Fleximass-Target ist für beide vorgenannten Optionen geeignet.

Auflösung ist ein extrem wichtigstes Kriterium bei Analysen von Hämoglobinopathien

Betrachtet man das anomale Hämoglobin, entsteht eine SCD durch Mutationen im Beta-Hämoglobin-Gen (HbS), wodurch Glutaminsäure an Position 6 durch Valin ersetzt wird und zu einer Massenverminderung von 30 Da führt. Die erste NeoSickle-Lösung basiert auf der Analyse des gesamten Proteins, was eine ausreichende Massenaufklärung bei

Massen von etwa 15 kDa erfordert. Abbildung 3 zeigt das erwartete Auflösungsvermögen des MALDI-8020, um die verschiedenen Hämoglobinketten HbS, HbA und HbF nachzuweisen.

Bei diesem ersten Ansatz ist es nicht möglich, andere Varianten von Hämoglobinketten wie HbC und HbE zu trennen, die gegenüber der normalen HbA-Kette einen Massenunterschied von 1 Da aufweisen. Der zweite, von Biomaneó genutzte Ansatz besteht deshalb aus der Analyse von Peptiden der Hämoglobinketten. Auflösung und dynamischer Bereich des Benchtop-MALDI-8020 erlauben die Auftrennung der interessierenden Peptide. Abbildung 4 (Seite 6) illustriert die Möglichkeit, Probengruppen homozygoter AA oder heterozygoter AE zu trennen.

Empfindlichkeit und Dynamikbereich des Nachweises

Andere ausschlaggebende Kriterien beim SCD-Screening sind Empfindlichkeit und Dynamikbereich des Nachweises. Tatsächlich besitzt die Probe eines sehr früh geborenen Säuglings einen sehr niedrigen Prozentsatz, weniger als 3 % der Erwachsenen-Hämoglobinkette verglichen mit anderen Verbindungen in der Probe (fötale Beta-Hämoglobin- und Alpha-Hämoglobinkette). ♦

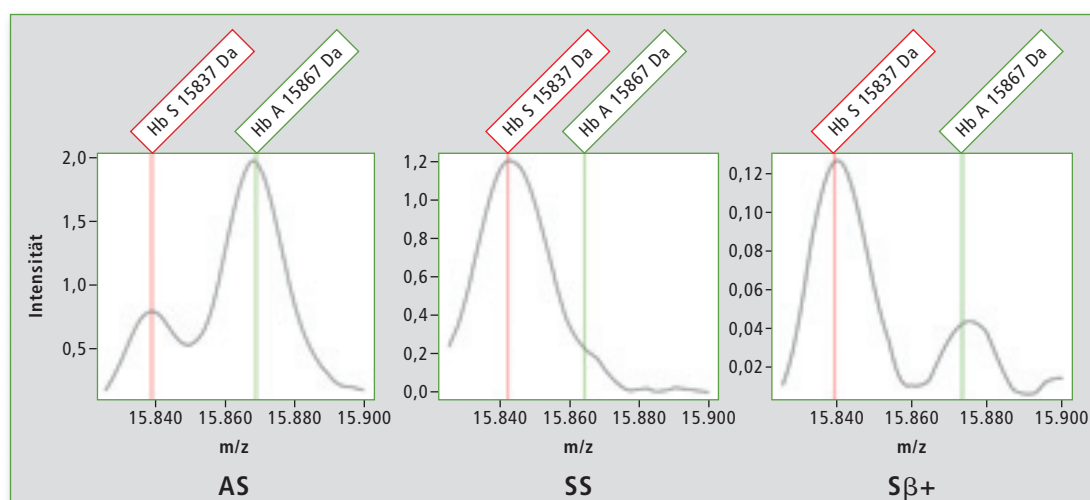


Abbildung 3: Das erhaltene Probenspektrum aus Heterozygote AS-, Sbeta+ - und Homozygote SS mit dem Nachweis von Hämoglobin HbA- und HbS-Ketten

Nachweis und Unterscheidung der HbS-Beta-Hämoglobinkette ist in diesen Proben sehr wichtig, um eine weitere Blutentnahme und/oder eine falsche Klassifizierung der Neugeborenen zu vermeiden. Diese Untersuchung zeigt die hohe Qualität des MALDI-8020-Gerätes anhand des Klassifikationsprozentsatzes, der bei sehr früh geborenen Babys oberhalb von 90 % liegt.

SCD-Screening wird in zentralisierten Laboren durchgeführt, die täglich eine große Zahl von Proben analysieren. Die Technik muss somit automatisiert und/oder komfortabel für die Laboranten sein. Benutzerfreundlichkeit ist ein unverzichtbares Kriterium für den Betrieb und die Verwendung der Massenspektrometrie in Analyselaboren. Die Benutzerfreundlichkeit des Benchtop-MALDI-8020 erweist sich klar als Vorteil für Labore mit großer, eventuell fluktuierender Mitarbeiterzahl, die nicht unbedingt auf MALDI-MS spezialisiert ist.

MALDI-8020 ist das System der Wahl

Das MALDI-8020 erfüllt diese Kriterien mit gut kalibrierten und standardisierten Methoden. Die Bedienung des MALDI-8020 ist intuitiv, was seine rasche Integration in Laboruntersuchungen erlaubt und die Arbeit des technischen Personals erleichtert. Zudem ist das System sehr kompakt und lässt sich leicht auf einem Labortisch unterbringen.

Der Durchsatz ist in Screening-Laboren eine zentrale Bedingung, die bei der Einführung neuer Analysemethoden berücksichtigt werden muss. Die in die NeoSickle-Lösung eingebundene Erfassungsmethode der Spektren kombiniert mit der Leistungsfähigkeit des Benchtop-MALDI-8020 erlaubt die Analyse eines MALDI-Targets mit 48 Proben in weniger als drei Minuten. Inklusive Target-Tausch im Gerät ermöglicht dieser Durchsatz 576 Analysen pro Stunde.

Das französische Screening-Hauptlabor für SCD analysiert etwa 600 Proben täglich, d.h. über

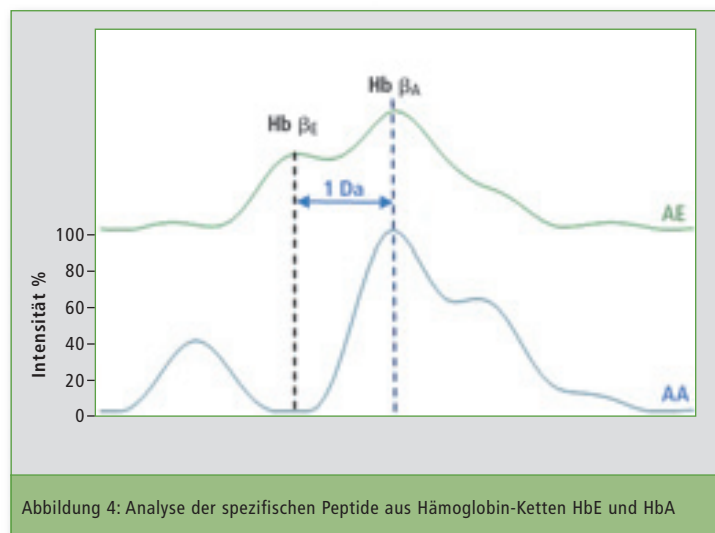


Abbildung 4: Analyse der spezifischen Peptide aus Hämoglobin-Ketten HbE und HbA

150.000 Proben pro Jahr oder etwa 20 % aller Geburten. Weniger als sechs Analysestunden pro Tag mit einem MALDI-8020 würden ausreichen, um alle Neugeborenen in einem einzigen Labor zu screenen.

Vollständige Erfüllung der Bedürfnisse von Screening-Labors

Neben dem täglichen Durchsatz stellen die Lebensdauer des Geräts und geringe Wartungsanforderungen das letzte Kriterium dar. Um die Geräteleistung bei einer Zielsetzung von 500.000 Tests pro Jahr zu erhalten, bietet das MALDI-8020 mit TrueClean eine automatisierte Quellenreinigung.

So lässt sich die Extraktions-elektrode in-situ reinigen, ohne das Gerätevakuum zu brechen; es handelt sich um ein automatisiertes und rasches (<10 min) UV-Laser-basiertes Verfahren. Darüber hinaus minimiert eine Ionenoptik mit weiter Öffnung das Risiko der Quellenverschmutzung im Laufe der Zeit und sorgt damit für eine stabile Plattform.

Diese Charakteristiken und Ergebnisse zeigen die Eignung des Benchtop-MALDI-8020-Massenspektrometers für den Nachweis von Hämoglobinopathien beziehungsweise für Hochdurchsatz-Analysen komplexer Blutproben. Es erfüllt sehr klar die Bedürfnisse von Screening-Laboren.



Abbildung 5: Screenshot der NeoScreening LIMS nach Analyse einer Platte

Leistung und Geschwindigkeit der MALDI-Geräte bedeutet, dass sie nur in sehr wenigen Ausnahmefällen ausschließlich für eine einzelne Anwendung eingesetzt werden. Für Kliniken oder Labore ist es effektiv, die in diese Technologien gemachten Investitionen optimal zu nutzen. Daher ist die Systemvielseitigkeit ein wichtiges finanzielles Kriterium, das in Betracht zu ziehen ist. Für Labore mit einer geringen Zahl an Screening-Analysen liegt der Vorteil eines MALDI-8020 im Management der Erfassungsparameter, denn die Akquisitionsmethoden fassen alle für die Gerätekontrolle notwendigen Parameter zusammen. Das macht ein MALDI-8020 für vielfache Anwendungen einsetzbar, ohne das Risiko, Individualanalysen zu stören.

Um die Leistung der automatisierten Hochdurchsatz-Datenproduktion mit einem MALDI-8020 zu steigern, hat Biomaneio ein Software-Paket entwickelt (LIMS: Laboratory Information Management System), das die Ergebnisse zusammenfasst und bei der Interpretation der massenspektrometrischen Daten assistiert. Das LIMS NeoScreening® erlaubt Dateien zu erzeugen, die für die Kontrolle des MALDI-8020 und den Start eines Analyselaufs notwendig sind, wobei Daten auch automatisch abgerufen werden und dann die Verarbeitung und Klassifizierung jedes Probenergebnisses erfolgt.

Fazit

Die Erfassungsgeschwindigkeit und die Einfachheit eines Verfahrenswechsels macht das Benchtop-MALDI-8020 ideal für viele Anwendungen und zu einem unverzichtbaren Messgerät für biochemische Labore. Im Zusammenhang mit dem SCD-Screening erfüllt ein MALDI-8020 alle Erfordernisse. Dieses kompakte, einfach einsetzbare und hochleistungsfähige Instrument ist für die meisten Screening-Anwendungen geeignet.

NeoSickle® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Biomaneio.

NeoScreening® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Biomaneio.



Gleichgewicht der Kräfte

Das LCMS-8060NX bringt Leistung und Robustheit in Einklang mit Empfindlichkeit und Geschwindigkeit



Das neue LCMS-8060NX gekoppelt an die Nexera LC-40 Serie

Seit 2010 belebt Shimadzu regelmäßig den Markt mit wegweisenden Triple-Quadrupol-LC-MS-Technologien. Es begann mit dem LCMS-8030, das einen schnellen Polaritätswechsel von 15 ms vereint mit ultraschneller Elektronik für eine kurze Datenaufnahme- (Dwell Time) und Spannungseinstellzeit (Pause Time) sowie mit hoher Scan-Geschwindigkeit und einer schnellen Kollisionszelle. Diese Techniken sind am Markt bestens bekannt als ultra-schnelle Massenspektrometrie (Ultra Fast Mass Spectrometry = UFMS). 2015 wurde mit dem LCMS-8050 ein Polaritätswechsel von 5 ms und eine Scan-Geschwindigkeit von 30.000 amu/s eingeführt, die neue Möglichkeiten eröffnet, Tandem-LC-MS einzusetzen.

Die hohe Geschwindigkeit dieser neuen Techniken ermöglicht, gleichzeitig eine hohe Anzahl von Fragmenten für jede Substanz zu erfassen (umfangreicher als die Standard MRM-Technik (Multiple Reaction Monitoring), die üblicherweise nur zwei Fragmente für jeden Precursor verwendet). Dieser sogenannte MRM-Spektrum-

Modus erlaubt eine sichere und eindeutige Identifizierung von Substanzen und eine vereinfachte Auswertung von Multikomponenten-Analysen, da im Falle von Interferenzen andere MRM-Übergänge zur Auswertung herangezogen werden können, ohne eine wiederholte Analyse durchführen zu müssen.

Danach eingeführte Systeme, das LCMS-8060 (2016) und das LCMS-8045 (2017), basieren auf der erfolgreichen LCMS-8050-Plattform. Sie bietet dem Markt eine Bandbreite verschiedener Empfindlichkeiten, die individuelle Bedürfnisse mit Anwenderflexibilität verbindet.

Nutzerfreundlich, robust und hochempfindlich

Es besteht eine allgemeine Marktnachfrage nach robusten und gleichzeitig hochempfindlichen Geräten. Das LCMS-8060 ist bereits ein hochrobustes System, das bei zahlreichen Applikationen im klinischen Sektor oder in der Lebensmittelsicherheit zum Einsatz kommt. Der Bedarf an höherer Robustheit sowie

nutzerfreundlicher Methodenentwicklung und Analyse bestärkt Shimadzu, bestehende Laborlösungen weiter zu überarbeiten und neue Produkte zu entwickeln, um die ständig wachsenden Anforderungen moderner Analytiklabore ideal bedienen zu können.

Aktuell erweitert das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer LCMS-8060NX das LC-MS-Sortiment von Shimadzu und bietet für eine zunehmend anspruchsvolle Analytik neue Lösungen im High-End-Bereich. Eine noch leichtere Handhabung, die hohe Stabilität auch bei höchstem Probendurchsatz und ein breites Spektrum an Standardparametern schaffen ein Gleichgewicht von hoher Empfindlichkeit und Robustheit.

Mit der neuen IonFocus-Ionenquelle trennt ein LCMS-8060NX effizient Ionen von ungeladenen Neutralteilchen bereits in der Quelle. Nur geladene Moleküle gelangen ins System, während die neutralen Partikel effizient entfernt werden.

Die Möglichkeit zur individuellen Steuerung weiterer Standardpara-

meter für Einstellungen in der Ionenquelle dehnt die Möglichkeiten für hochempfindliche Analysen weiter aus. Die zusätzliche Verbesserung im Design des Ionenflugwegs etabliert das LCMS-8060NX als bestes Triple-Quadrupol-LCMS seiner Klasse.

Analytical Intelligence für ein vereinfachtes Labormanagement

Gekoppelt an die neue Nexera LC-40 Serie mit der qualitativen Strategie der „Analytical Intelligence“ bietet auch das neue LCMS-8060NX eine herausragende Lösung für Routineanalytik. „Analytical Intelligence“ ermöglicht den Anwendern, mühelos den Gerätestatus zu überprüfen, die Ressourcenauslastung zu optimieren und einen höheren Durchsatz zu erreichen. Die Strategie vereinfacht das Labormanagement und ermöglicht eine höhere Produktivität, maximale Zuverlässigkeit und bessere Gerätevernetzung durch IoT-Funktionen (Internet of Things) künstlicher Intelligenz (Artificial Intelligence = AI) und M2M-Kommunikation (Machine to Machine).



Maßgeschneiderte Software-Lösungen für jede Messung

Makro-Programmierung für Shimadzu UV-Vis und FTIR

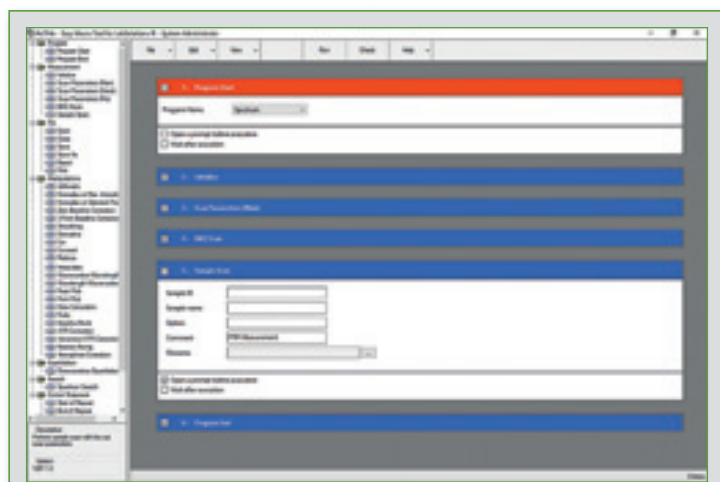


Abbildung 1: Beispiel für ein EasyMacro zur Messung einer Probe mit vordefinierten Messparametern

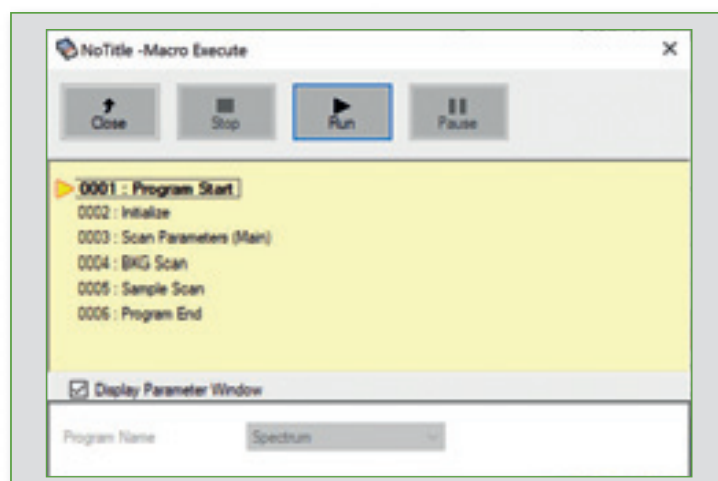


Abbildung 2: Kontrollfenster von EasyMacro. Das LabSolutions-IR-Programm läuft im Hintergrund ab. Die Ausführung des Makros kann in jedem Schritt unterbrochen werden.

Die Datenausgabe von Spektrophotometern hat seit der Zeit der mechanischen Schreiber eine lange Entwicklung hinter sich. Heute steht den Nutzern ein umfangreiches Software-Paket zur Verfügung, das verschiedenste Methoden zur Messung und Auswertung der Daten bereitstellt. Während sich die Spezifikationen – wie Messgeschwindigkeit, Signal-Rausch-Verhältnis oder Auflösung – mit jeder Gerätegeneration graduell verbessern, ist die enthaltene Software ebenfalls zu einem wichtigen Verkaufsargument geworden.

Obwohl die LabSolutions Software-Pakete bereits eine breite Auswahl an Werkzeugen anbieten, gibt es nach wie vor Bedarf nach maßgeschneiderten Lösungen zu spezifischen Fragestellungen. So suchen manche Kunden eine einfache Bedienoberfläche und automatisierte Analysen, um das Laborpersonal bei Routineaufgaben zu unterstützen. Andere Anwender benötigen spezielle Methoden der Datenauswertung, die nicht in LabSolutions integriert sind.

Beide Anforderungen werden durch maßgeschneiderte Software oder Makros erfüllt. Shimadzu bietet dafür verschiedene Werkzeuge an, je nach Komplexität der Aufgabe. Welche Möglichkeiten gibt es, Shimadzu FTIR und UV-Vis Spektrophotometer durch maßgeschneiderte Software anzusteuern?

FTIR – EasyMacro

Der Ausgangspunkt für die meisten FTIR-Makros ist das Werkzeug EasyMacro, enthalten im Lieferumfang von LabSolutions IR. Es erlaubt den Anwendern, typische Arbeitsabläufe durch Zusammenfügen vorgefertigter Code-Blöcke zu automatisieren, wie „Proben-

messung“, „Glättung“ oder „Spektrensuche“. Zwischen diesen Blöcken können Hinweisenfenster mit frei definierbarem Text eingefügt werden, um beispielsweise in Landessprache aufzufordern, die Probe einzusetzen oder das ATR-Zubehör zu reinigen. Ein Beispiel ist in Abbildung 1 gezeigt.

In diesem Beispiel wird die Spektrum-Software benutzt. Schritt 1 ist der Start der Software, das voreingestellte Gerät wird in Schritt 2 initialisiert, und in Schritt 3 werden schließlich die Messparameter gesetzt. Während das Makro abläuft, wird die Mess-Software im Hintergrund gestartet. Ohne den Befehl „Scan Parameters“ würden

die zuletzt eingestellten Parameter verwendet. In Schritt 4 und 5 werden zuerst der Hintergrund und anschließend die Probe gemessen. Proben- und Dateiname können im Makro fest vorgegeben werden, aber in diesem Beispiel wird vor der Messung ein Dialogfenster geöffnet, um diese Informationen einzugeben. Jedes EasyMacro beginnt mit „Program Start“ und endet mit „Program End“, um die Software nach dem Ablauf korrekt zu schließen.

EasyMacro hat den großen Vorteil, dass keine Programmierkenntnisse erforderlich sind, um ein solches Makro zu entwickeln. Die vorgefertigten Blöcke verhin-

Tool	Easy Macro	VB Macro
Instrument	IRSpirit, IRAffinity-1s, IRTracer-100	IRSpirit, IRAffinity-1s, IRTracer-100
Entwickler	Kunde oder Shimadzu	Shimadzu
Anwendung	Einfache Automatisierung, starten von VB Macros	Komplexe Automatisierung, IRPilot, Validierung
Beschreibung	Drag & Drop von vorgefertigten Code-Blöcken	Visual Basic Quellcode in LabSolutions IR
Vorteile	Einfach zu verstehen Verhindert Syntaxfehler Kann komplexere Makros nachladen	Volle Integration in LabSolutions IR Enthält VB Klassen, zum Beispiel Formular Ermöglicht komplexe Programmierung
Nachteile	Nur Spektrum und Postrun automatisierbar	Endkunde hat keinen Zugriff auf den Editor

Tabelle 1: Vergleich der Makro-Werkzeuge für Shimadzu FTIR

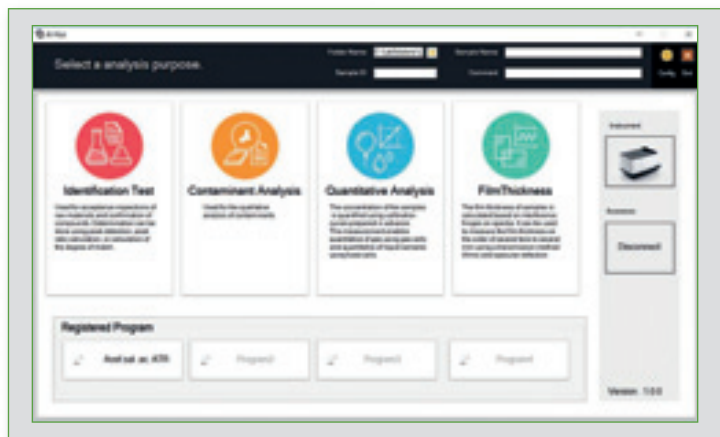


Abbildung 3: Bedienoberfläche des IRPilot

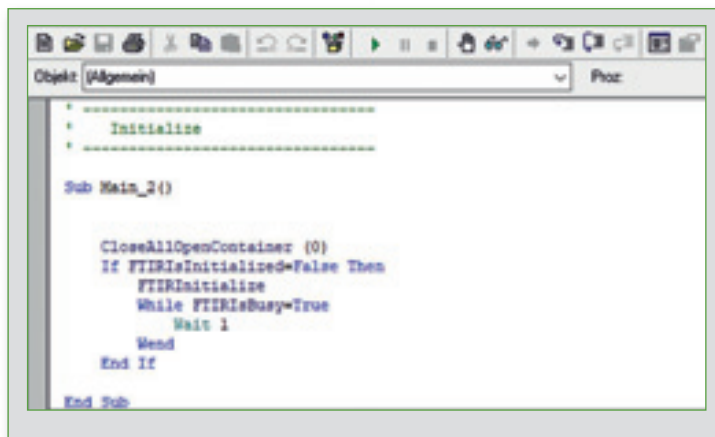


Abbildung 4: Der »Initialize« Block aus EasyMacro konvertiert in Visual Basic Quellcode

den Syntaxfehler oder einen schädlichen Code. Für Anwender ist im Kontrollfenster sichtbar, ob beim Ablauf des Makros ein externer Code aufgerufen wird, und der Programmablauf kann in jedem Schritt unterbrochen werden.

Die meisten Anwender begegnen EasyMacro durch die Validierungsfunktionen der Shimadzu FTIR-Spektrophotometer, die durch solche Makros aufgerufen werden. Jeder Block von

EasyMacro erzeugt einen Visual Basic Code, der von LabSolutions IR interpretiert wird.

FTIR – Visual Basic (VB) Macro

Der Visual Basic Code hinter einem EasyMacro kann extrahiert und als Basis für komplexere LabSolutions VB Makros genutzt werden. Ein sehr komplexes Beispiel ist der IRPilot aus dem Lieferumfang des Shimadzu IRSpirit, gezeigt in Abbildung 3.

Der Visual Basic Makro Editor in LabSolutions IR stellt für trainierte Spezialisten eine komplette Entwicklungsumgebung bereit. Fertig entwickelte Makros können beim Nutzer zur Werkzeuggeste von LabSolutions IR Spectrum oder Postrun hinzugefügt oder über den „Load Basic File“-Block aus EasyMacro heraus gestartet werden. Abbildung 4 zeigt einen Screenshot vom LabSolutions IR VB Makro Editor mit dem automatisch generierten Code des „Initialize“-Blocks aus EasyMacro.

die Software die enthaltenen Befehle aus und schreibt die Resultate in die „Response“ Textdatei im gleichen Ordner.

Die Syntax dieser Kommandos ist leicht zu verstehen, und die einzige Anforderung an die Entwicklungsumgebung ist, dass Textdateien geschrieben und gelesen werden können. Da sich Nutzerrechte und Protokollierung in LabSolutions DB oder CS nicht durch diese Befehle umgehen lassen, ist der Einsatz einer solchen Software-Lösung auch in validierter Umgebung möglich. Eine bidirektionale Kommunikation zwischen LabSolutions und einem kundenspezifischen LIMS-System wird ermöglicht, indem letzteres „Command Files“ erzeugt und anschließend die von LabSolutions automatisch generierten Text- oder pdf-Dateien importiert.

UV – Automatic Control

In der Welt von LabSolutions UV-Vis gibt es kein zu EasyMacro vergleichbares Werkzeug, da LabSolutions UV-Vis bereits an vielen Stellen automatisierbar ist, beispielsweise durch den automatischen Export in Textdateien, vordefinierte Postrun-Berechnungen oder die Evaluierungsfunktionen. Eine weitergehende Automatisierung von LabSolutions UV-Vis und sogar die externe Ansteuerung über kundenspezifische Programme bietet die Automatic-Control-Option. Eine typische Anwendung ist die Kommunikation zwischen LabSolutions UV-Vis und der Steuer-Software eines Autosamplers.

UV – String-Kommandos

Der schnellste Zugang zur Gerätekontrolle durch maßgeschneiderte Software besteht in den externen Befehlen, die im Handbuch des UV-1280 und UV-1900i dokumentiert sind. ▶

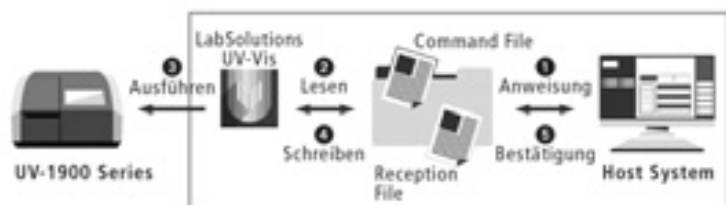


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kommunikation zwischen LabSolutions UV-Vis und einem Host-System per Automatic-Control-Option

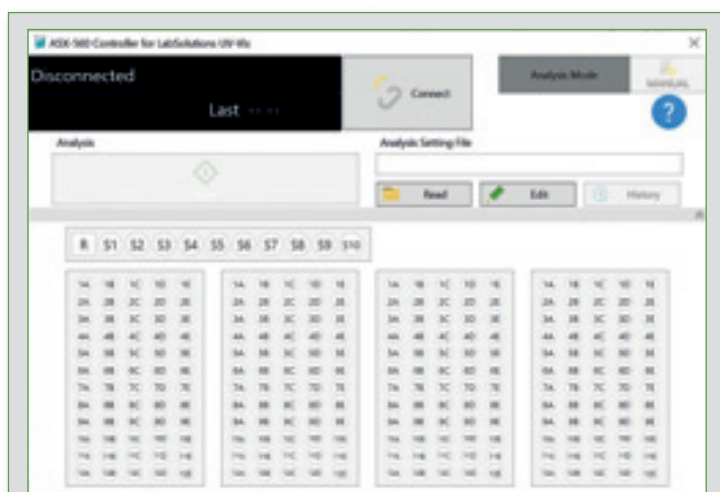


Abbildung 6: Autosampler-Ansteuerung als Beispiel einer LabSolutions UV-Vis Automatic-Control-Anwendung

Die verfügbaren Befehle ähneln den Blöcken aus LabSolutions IR EasyMacro. Textdateien mit diesen Befehlen werden in einem speziellen Ordner abgelegt, den die LabSolutions UV-Vis kontinuierlich durchsucht. Wird eine „Command“ Textdatei gefunden, führt

Tool	LabSolutions UV-Vis Automatic Control	String Kommandos	UV-OCX
Instrument	UV i-Selection (UV-1900i, UV-2600i, UV-2700i, UV-3600i plus, SolidSpec-3700i)	UV-1280, UV-1900i	UV-1280, UV-1900i, UV-2600i, UV-2700i
Entwickler	Kunde oder Shimadzu	Kunde oder Shimadzu	Shimadzu
Anwendung	Einfache Automatisierung, Autosampler, LIMS-Anbindung	PC-Kontrolle von UV-1280, Excel Makros, Drittanbieter-Software	Maßgeschneiderte Software mit voller Gerätekontrolle
Beschreibung	Kontrolle von LabSolutions UV-Vis über einfache Textdateien	ASCII-Kommandos für einfache Gerätekontrolle	Indirekte Gerätekontrolle über Active X Steuerlement
Vorteile	Kommandos unabhängig vom Gerät Einfach zu implementieren LabSolutions DB/CS Nutzerrechte nicht verletzbar	Kommandos offen zugänglich Kurzer, effizienter Quellcode Freie Wahl der Programmierungsumgebung	Nahezu vollständige Kontrolle über Gerätefunktionen Kommunikationsfehler werden verhindert Hilfe für Entwickler durch Microsoft IntelliSense
Nachteile	Nur bestimmte Funktionen von LabSolutions UV-Vis nutzbar	Gute Programmierkenntnisse notwendig	Keine LabSolutions Integration möglich

Tabelle 2: Vergleich der Makro-Werkzeuge für Shimadzu UV-Vis

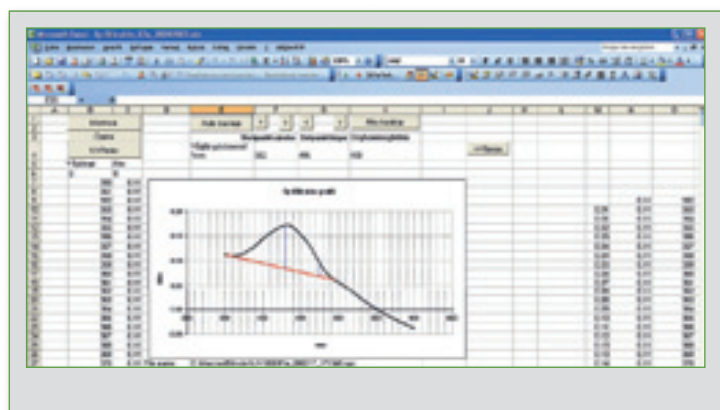


Abbildung 7: Excel-Makro für Bilirubin in Rückenmarkflüssigkeit als typische kundenspezifische Anwendung der externen Befehle

Sie sind auch als String-Kommandos bekannt, da die Kommunikation durch ASCII-Zeichenfolgen (englisch „ASCII string“) erfolgt, die über eine virtuelle COM-Schnittstelle übertragen werden.

Diese Befehle werden typischerweise genutzt, um maßgeschneiderte Excel-Makros mit Gerätekontrolle auszustatten oder Treiber für Software zu schreiben, die Spektrophotometer verschiedener Hersteller einbindet. Beispiel-Quellcode für die Implementierung dieser Befehle in Microsoft Visual Basic 2015 und die notwendigen Einstellungen sind im Gerätehandbuch dokumentiert. Zur Umsetzung ist ein tieferes Verständnis der Schnittstellen-

Programmierung erforderlich als bei LabSolutions UV-Vis Automatic Control.

UV – OCX-Kommandos

Eine weitere Möglichkeit zur direkten Gerätekontrolle bietet die Option UV-OCX. Hier wird ein Active X Steuerelement genutzt, um zwischen dem Quellcode aus VBA oder Microsoft.net Framework und dem Maschinencode des Spektrophotometers zu übersetzen. Mit dieser Option können UV-1280, UV-1900i, UV-2600i und UV-2700i angesteuert werden.

Verglichen mit den String-Kommandos erfordern diese OCX-Kommandos weniger Kenntnisse über Schnittstellen, da die Kommunikation mit dem Gerät vom OCX-Steuerelement übernommen wird. So werden auch Fehler verhindert, wie zum Beispiel das Setzen nicht zulässiger Wellenlängen-Werte. UV-OCX wird als Klasse mit vordefinierten Metho-

den und Eigenschaften implementiert. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, die Übersetzung zwischen Quellcode und ASCII-Zeichenfolge selber zu entwickeln.

In einer Programmierungsumgebung, wie Microsoft Visual Studio oder dem Microsoft Excel VBA Editor, stellt UV-OCX auch hilfreiche Funktionen bereit, wie die intelligente Code-Vervollständigung, um Syntaxfehler zu verringern.

Fazit

Makro-Programmierung ist ein leistungsfähiges Werkzeug zur Unterstützung der Kunden. Einige Makros ermöglichen Anwendungen, die nicht von der Standard-Software abgedeckt werden, während andere Makros dem Zweck dienen, zeitraubende Arbeitsschritte zu automatisieren



Abbildung 10: Die optionale VisEase Software, die mit UV-OCX entwickelt wurde



Abbildung 8: Einfaches Gerätekontroll-Fenster in einem VBA-Formular mittels UV-OCX

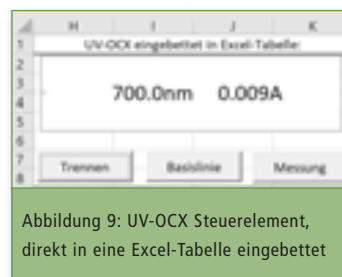


Abbildung 9: UV-OCX Steuerelement, direkt in eine Excel-Tabelle eingebettet

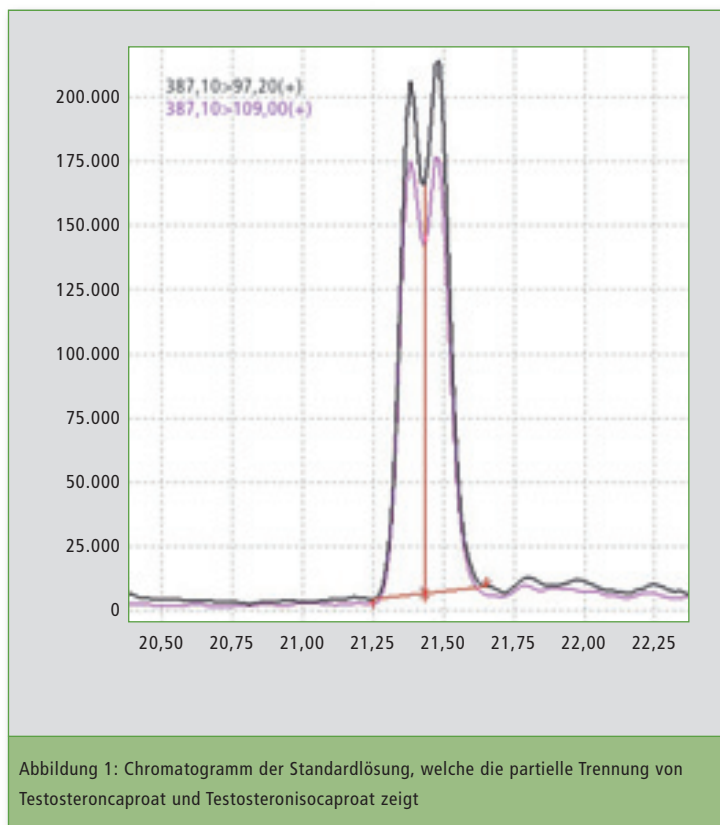
und Anwenderfehlern vorzubeugen. Die beste Herangehensweise hängt dabei nicht nur von der Komplexität der Aufgabe ab, sondern auch von der Erfahrung des Entwicklers. Tabelle 1 vergleicht die verschiedenen Werkzeuge zur Programmierung von Shimadzu FTIR-Instrumenten, und Tabelle 2 zeigt die entsprechenden Werkzeuge für Shimadzu UV-Vis Geräte.



Auf der sicheren Seite: steroidfreie Nahrungsergänzungsmittel

Steroidnachweis in Arzneimitteln und Nahrungsergänzungsmitteln mit einem LCMS-8045

Anabolika finden sich häufig in Stichproben von Nahrungsergänzungsmitteln und Arzneimitteln Zubereitungen, entweder mit Doping-Aktivitäten verbunden [1] oder wegen Kreuzkontaminationen während der Produktion [2]. Methodenentwicklungen zum Nachweis von Steroiden in derartigen Proben können herausfordernd sein; die Technik muss fähig sein, zahlreiche Steroide mit großen Unterschieden in der Polarität nachzuweisen. Die zu überwachenden Verbindungen umfassen relativ polare Steroide wie Anastrozol ebenso wie Steroid-Ester mit geringer Polarität, die zunehmend in Stichproben von Nahrungsergänzungsmitteln aufgetreten sind [3].



Die entwickelte Methode prüft auf Testosteroncaproat und Testosteronisocaproat, eine schwierige Isomerenkomposition, die teilweise getrennt wurde (Auflösung 0,6 laut Eur.Ph.), so dass die Analysetechnik nachweisen konnte, welches der beiden Isomere in der Probe enthalten ist. Im Falle des Tibolon, ein synthetisch hergestellter Arzneistoff mit Hormonwirkung, werden drei MRM-Übergänge dargestellt, die auf eine Derivatisierung verzichten, was die Regel ist bei Tibolon und seinen Metaboliten. Zuletzt wird eine umfassende Begründung für die Wahl der MRM-Übergänge bei Steroid-Estern geliefert, die auf Fragmenten der freien Steroide basieren.

Instrumentierung, Methodenparameter und Probenaufbereitung

Die Versuche wurden mit einem Nexera X2 UHPLC-System durchgeführt, das mit einem

LCMS-8045 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt ist. Das System besteht aus zwei LC-30AD Pumpen, einem SIL-30AC Autosampler und einem CTO-20AC Säulenofen mit einem Flusslinien-Auswahlventil. Das Ventil wurde zur Flussumleitung der mobilen Phase eingesetzt, um die ersten 1,5 Minuten zu verwerfen und eine Kontamination des Massenspektrometers mit früh-eluierenden Matrixkomponenten zu vermeiden.

Die chromatographische Trennung wurde mit einer Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT, 50 x 4,6 mm, 3,5 µm (Artikelnummer 835975-902) bei 40 °C erreicht. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus 0,1 % wässriger Ameisensäure und Methanol, mit Gradientenelution zur Elution bei einer Flussrate von 0,4 ml/min eingesetzt. ▶

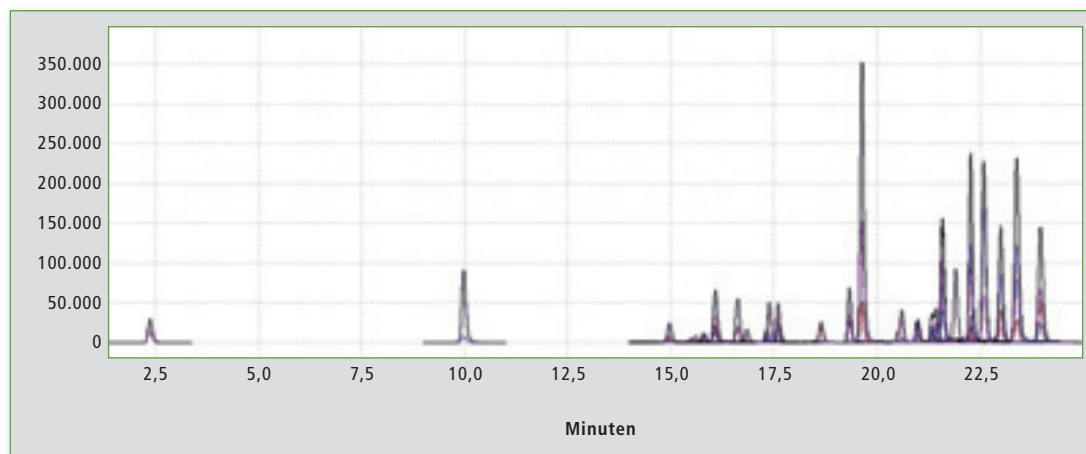


Abbildung 2: Chromatogramm der Standardlösung

Zeit (min)	% B
0,0 - 5,0	35
5,0 - 20,5	35 → 100
20,5 - 25,0	100
25,01 - 31,0	35

Tabelle 1: Gradientenelutionsprogramm

Durch diese Parameterwahl ergaben sich Retentionszeiten von 2,4 - 24 Minuten und eine Gesamtlaufzeit von 31 Minuten inklusive Äquilibrationsschritt.

Flüssigchromatographie

Die Strategie der Methodenentwicklung zielte darauf ab, bezüglich der Polarität ein breites Substanzspektrum einzuschließen und gleichzeitig eine angemessene Laufzeit zu gewährleisten – für insgesamt 16 ausgewählte Steroid-Ester. Hinsichtlich der Flussrate der mobilen Phase wurden 0,5 ml/min und 0,4 ml/min getestet, wobei die letztere aufgrund der gesteigerten Empfindlichkeit gewählt wurde.

Zwei unterschiedlich zusammengesetzte mobile Phasen wurden untersucht, die erste bestehend aus einem Gradienten von 1 mM wässrigem Ammoniumacetat und 1 mM methanolischem Ammoniumacetat sowie die zweite aus einem Gradienten von 0,1 % wässriger Ameisensäure und Methanol. Die zweite mobile Phase wurde gewählt, da sie ein einfacheres Herstellungsverfahren gewährleistet. Die Aziditätsänderung in der mobilen Phase durch Ameisensäure schien geringe Effekte auf die Retentionszeit der Substanzen zu haben, in dem

früh-eluierende Verbindungen eine etwa 20 % höhere Retention zeigten, spät-eluierende dagegen eine etwa 10 % höhere Retention.

Zwei Analysensäulen wurden getestet, eine Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT, 50 x 2,1 mm, 1,8 µm (Artikelnummer 822700-902) und eine Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT, 50 x 4,6 mm, 3,5 µm (Artikelnummer 835975-902). Da die erste Säule Partikel unterhalb von 2 µm enthält, war eine erheblich kürzere Probenlaufzeit zu erwarten, jedoch wurden mit beiden Säulen vergleichbare Retentionszeiten erhalten. Da eine UHPLC-Säule für Überdruck und Verstopfen nach wenigen Analysen anfällig ist, wurde eine 3,5 µm-Säule für die Aufgabe bevorzugt – mit einem Injektionsvolumen von 2 µl.

Die Temperatur des Autosamplers wurde anfänglich auf 4 °C eingestellt, um die Stabilität der Proben sicherzustellen. Da eine starke Ausfällung von Matrixkomponenten beobachtet wurde sobald die Fläschchen 4 °C ausgesetzt wurden, wurde der Autosampler auf Raumtemperatur gehalten und eine 24-stündige Stabilität für die Analyten etabliert.

Probenaufbereitung

Die zu bestimmenden Verbindungen wurden in sechs Gruppen ähnlicher Struktur unterteilt: Testosteron und Testosteronester, Trenbolonester, Nandrolon und Nandrolonester, Methenolonester, Boldenonester und Drostanolon-

ester. Von den Fragmenten der Steroid-Ester der gleichen Gruppe wird erwartet, bis zu einem gewissen Grade übereinzustimmen; das wurde im Verlauf der anfänglichen massenspektrometrischen Experimente bestätigt, wie in Tabelle 2 ersichtlich. Daher können die gemeinsamen, dort aufgeführten Fragmente genutzt werden, MRM-Übergänge für andere Steroid-Ester zu wählen, die auf

Fragmenten der freien Steroide basieren.

Hinsichtlich der Testosteron-Gruppe wurde m/z 109 zur Quantifizierung verwendet und m/z 97 zur Bestätigung. Beide Ionen sind charakteristische Testosteron-Fragmente, und ihr Einsatz ist in der Literatur belegt [1-3]. Da sich die beiden Ionen mit Fragmenten des Steroid-Kerns im Molekül decken, wurde darüber hinaus ihre Eignung für alle Testosteronester untersucht und bestätigt. Ein vergleichbares Prinzip wurde bei der Nandrolon- und Nandrolonester-Gruppe verfolgt, m/z 257 und m/z 239. Für die Gruppe der Trenbolonester wurde m/z 253 und m/z 107 verwendet, für die Gruppe der Boldenonester m/z 135 und für Drostanolonpropionat m/z 215.

Die optimierten massenspektrometrischen Parameter lauten:
Positive Ionisierung: (ESI, Kapillarspannung -4 kV)
Heizblocktemp.: 400 °C
Desolvatisierungstemp.: 250 °C

Gruppe	Vorläufer-Ion	Produkt-Ion 1	Produkt-Ion 2
Testosteron			
Testosteron	289,4	109,1	97,0
Methyltestosteron	303,4	109,1	97,1
Testosteronpropionat	345,1	109,1	97,0
Testosteronphenylpropionat	421,6	105,1	97,1
Testosteroniscaproat	387,1	109,0	97,2
Testosteroncaproat	387,1	109,0	97,2
Testosteronenanthat	401,6	271,3	183,0
Testosterondecanoat	443,7	109,2	97,0
Testosteronundecanoat	457,7	109,0	97,1
Trenbolon			
Methyltrenbolon	285,0	227,1	198,0
Trenbolonacetat	313,0	253,1	107,5
Trenbolonenanthat	383,1	253,1	107,5
Trenbolonhexahydrobenzylcarbonat	411,1	253,0	107,5
Nandrolon			
Nandrolon	275,4	257,2	239,0
Nandrolonphenylpropionat	407,1	257,1	105,2
Nandrolondecanoat	429,7	257,3	239,0
Methenolon			
Methenolon (nur zur Referenz)	303,0	83,0	187,0
Methenolonacetat	345,0	83,1	97,0
Methenolonenanthat	415,1	82,9	187,1
Boldenon			
Boldenon (nur zur Referenz)	287,5	134,6	120,5
Boldenoncypionat	411,6	135,4	125,1
Boldenonundecylenat	453,2	135,2	67,2
Drostanolon			
Drostanolon (nur zur Referenz)	305,0	161,0	215,0
Drostanolonpropionat	361,1	269,2	215,2

Tabelle 2: Prinzip der Auswahl von MRM-Übergängen

Verbindung	Retentions-Zeit (min)	MRM-Quantifizierung	Referenz-Ion 1	Referenz-Ion 2	C std (ug ml ⁻¹)	S/N-Verhältnis
Clenbuterol	2,4	277,3 → 203,3	167,5	—	0,05	1,9 x 10 ³
Anastrozol	10,0	294,0 → 225,1	210,1	—	0,05	1,2 x 10 ⁴
Fluoxymesteron	14,9	337,0 → 281,2	317,2	299,2	1,0	204
Oxandrolon	15,0	307,0 → 289,2	93,4	—	1,0	213
Nandrolon	15,2	275,1 → 239,1	257,2	—	5,0	87
Methyltrenbolon	15,6	285,0 → 227,1	198,0	—	0,05	61
Methandienon	16,1	301,0 → 283,1	283,1	149,1	0,5	694
Testosteron	16,1	289,1 → 109,2	97,0	—	0,05	44
Methyltestosteron	16,9	303,1 → 108,8	96,8	—	0,05	207
Mesterolone	17,4	304,5 → 269,2	229,2	—	5,0	103
Trenbolonacetat	17,7	313,0 → 253,1	107,5	—	0,05	388
Danazol	17,6	338,4 → 148,0	121,2	—	0,5	891
Stanozolol	17,4	328,6 → 81,0	121,1	—	1,0	471
Tibolon	16,6	313,3 → 295,1	91,1	105,1	5,0	252
Methenolonacetat	19,3	344,6 → 82,8	187,1	297,2	1,0	557
Oxymetholon	18,6	333,0 → 159,1	279,1	—	1,0	110
Testosteronpropionat	19,7	345,1 → 109,1	97,0	271,0	0,05	2,2 x 10 ³
Nandrolonphenylpropionat	20,7	407,1 → 105,2	257,1	—	0,05	616
Drostanolonpropionat	21,0	361,1 → 269,2	215,2	—	5,0	552
Testosteronphenylpropionat	21,0	420,6 → 105,0	97,1	—	1,0	646
Testosteronisocaproat	21,4	387,1 → 97,2	109,0	—	0,05	148
Trenbolonenantat	21,5	383,1 → 253,1	107,5	—	0,05	867
Testosteroncaproat	21,5	387,1 → 97,0	109,1	—	0,05	188
Trenbolonhexahydrobenzylcarbonat	21,6	411,1 → 253,0	107,5	—	0,05	2,1 x 10 ³
Boldenoncaproat	21,6	411,1 → 135,1	125,1	—	0,5	3,216
Testosteronenantat	21,9	401,1 → 96,8	109,0	—	0,5	194
Methenolonenantat	22,3	415,1 → 187,1	144,9	—	0,5	2,0 x 10 ³
Boldenonundecylenat	22,6	453,2 → 135,2	67,2	—	1,0	3,0 x 10 ³
Nadrolondecanoat	23,0	429,4 → 257,3	274,6	239,0	0,2	1,5 x 10 ³
Testosterondecanoat	23,4	443,2 → 109,2	97,0	43,1	0,2	1,6 x 10 ³
Testosteronundecanoat	24,0	457,2 → 109,0	169,1	—	0,2	1,1 x 10 ³

Tabelle 3: MRM-Übergänge für jede Komponente

Heizgastemp.: 350 °C
 Trocknungsgasfluss: 10,0 l/min
 Zerstäubergasfluss: 3,0 l/min
 Heizgasfluss: 10,0 l/min

Die Verweilzeit wurde auf 20 ms eingestellt, ausgenommen:
Nandrolon: 100 ms
Fluoxymesteron: 50 ms

Methyltrenbolon: 150 ms
Methenolonacetat: 50 ms
Drostanolonpropionat: 150 ms

Fazit

Eine Analysemethode wurde entwickelt, um 31 Steroide in Arzneimitteln und Nahrungsmittelergänzungen nachzuweisen. Dies ist die erste Methode zur Identifikation von Testosteroncaproat in Gegenwart seines Isomers Testosteronisocaproat, und umgekehrt. Schlüsselparameter, die die Analyse der 31 Steroide beeinflussen, wurden ermittelt und berücksichtigt.



Autoren

Dr. Gerasimos Liapatas,
 Dr. Manos Barbounis
 Applications Department of N.Asteriadis S.A.
 31 Dervenion Str. & Poseidonos Str., 144
 51 Metamorfossi – Athen, Griechenland
 mb@asteriadis.gr

Literatur

- [1] C. Borges, N. Miller, M. Shelby, M. Hansen, C. White, M.H. Slawson, K. Monti, D.J. Crouch, Analysis of a challenging subset of World Anti Doping Agency-Banned steroids and anti-estrogens by LC-MS-MS, *Journal of Analytical Toxicology*, 31 (2007) 125-131.
- [2] S. Fekete, J. Fekete, K. Ganzler, Validated UPLC method for the fast and sensitive determination of steroid residues in support of cleaning validation in formulation area, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 49 (2009) 833-838.
- [3] M. Thevis, Y. Schrader, A. Thomas, G. Sigmund, H. Geyer, W. Schanzer, Analysis of confiscated black market drugs using chromatographic and mass spectrometric approaches, *Journal of Analytical Toxicology* 2008;32:232-240.

Abbildung 3: Fragmentierungsverlauf der Verbindungen der Testosteron-Gruppe und der Boldenon-Gruppe [3]



360°-Trinkwasseranalyse: Episode 2

Automatische, simultane und schnelle Analyse von Pestiziden mit Online-SPE und UHPLC-MS/MS



1 56 Liter Wasser – so viel verbrauchen EU-Bürger täglich pro Kopf. Grundwasser und Oberflächengewässer wie Flüsse, Seen, Talsperren sowie Meerwasser dienen als Ressourcen. Die sichere und hohe Qualität des Wassers ist für die öffentliche und individuelle Gesundheit unverzichtbar, ebenso für die Wirtschaft.

Pathogene Mikroorganismen gefährden die Wasserbestände, aber auch chemische Substanzen aus Haushalt, Landwirtschaft, Gewerbe oder der Natur. Mangelhafte Qualität und Quantität erzeugen massive Probleme und verursachen hohe soziale und wirtschaftliche Kosten. Strenge und stetige Kontrollen sind daher unerlässlich.

Wie in den Shimadzu NEWS 1/2020 in Episode 1 der Wassertrilogie dargestellt, erfüllen ICPMS-2030 und TOC-L von Shimadzu die analytischen Anforderungen für eine effektive Trinkwasserkontrolle. Die Systeme sind anwenderfreundlich und bieten eine wirtschaftliche Lösung für moderne Labore. Diese Episode 2 beschäftigt sich mit der empfindlichen Online-SPE-UHPLC-MS/MS-Technik.

Hintergrund

1998 verabschiedete die Europäische Union (EU) die Trinkwasserrichtlinie 98/83/EC1 (Drinking Water Directive = DWD) [2]. Für mehr als 20 Jahre hat die DWD die Qualität von Wasser für den menschlichen Verbrauch festgelegt. Die Beurteilung dieser Richtlinie wurde in das Arbeitsprogramm 20152 als Teil des behördlichen Fitness- und Leistungsprogramms der Kommission aufgenommen („Programm zur Gewährleistung der Effizienz und Leistungsfähigkeit der Rechtsetzung“ = REFIT), um zu bewerten, ob dieses Instrument weiterhin seinen Zweck erfüllt. Als erste vollständige Evaluierung der DWD wurde sie im Dezember 2016 als Arbeitsdokument der Kommissionsdienststellen (Commission Staff Working Document = SWD, 2016, 428 abschließend) veröffentlicht.

Der Umgang der Landwirtschaft mit der DWD ist ein entscheidender Faktor für sicheres und hochwertiges Trinkwasser. Düngung oder Pflanzenschutz mit Pestiziden wirken sich beträchtlich auf die Trinkwasserqualität aus. Um

Die Gesamtentnahme an Frischwasser in ganz Europa beläuft sich auf etwa 182 Mrd. m³/Jahr – zu etwa gleichen Anteilen gewonnen aus Grundwasser und Oberflächenwasser. EU-Trinkwasser stammt von etwa 11.000 Groß- und 85.000 Kleinversorgern, die etwa 80 % beziehungsweise 20 % der Bevölkerung beliefern.

Mehr als 60 % der EU-weiten Wasserinfrastruktur besteht aus Dienstleistungen, die von Unternehmen der öffentlichen Hand erbracht werden – der Rest sind regulierte Unternehmen, zu unterschiedlichen Anteilen privatwirtschaftlich strukturiert. Die europäische Wasserwirtschaft ist ein wirtschaftlich bedeutender Akteur (1 % des BIP) mit einem Jahresumsatz innerhalb der EU von etwa 80 Mrd. Euro. Sie stellt circa 500.000 Vollzeit-Arbeitsplätze und investiert jährlich etwa 7 Mrd. Euro [1].

Kontaminationen aus der Landwirtschaft zu vermeiden, wurden Parameter wie Nitrate und Pestizide in die DWD einbezogen. Diese Standards tragen dazu bei, das Ausbringen von Dünger und Pflanzenschutzmitteln zu reduzie-

same natürliche Abbau tragen zur Verunreinigung des Oberflächen- und Grundwassers bei – den wichtigsten Quellen für Trinkwasser. Diese Belastung kann für Tiere, Menschen und Ökosysteme gefährlich sein – mit einem sofort-

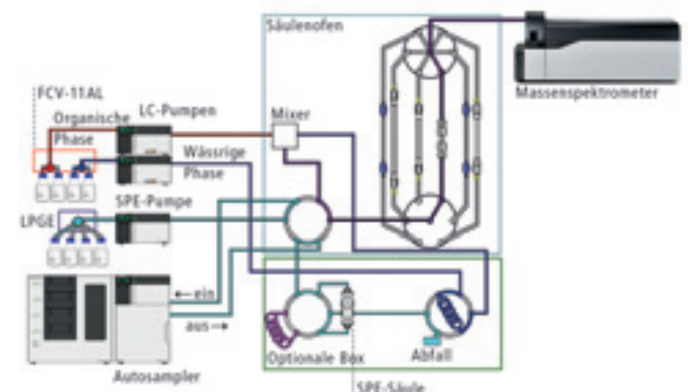


Abbildung 1: Schema der Online-SPE und UHPLC-MS/MS (Patentnummer: WO 2016/098169 A1)

ren, so die Umwelt zu schützen und sicheres Trinkwasser von hoher Qualität zu gewährleisten.

Pestizide im Trinkwasser

Pestizide werden häufig für den Pflanzenschutz eingesetzt. Ihr intensiver Gebrauch und der lang-

tigen oder einem Langzeiteffekt. Bezüglich dieser Substanzen haben einige Untersuchungen Gesundheitsauswirkungen aufgedeckt, wie Veränderungen im Nervensystem, Erkrankungen des Immunsystems, Fertilitäts- und Entwicklungsstörungen sowie Krebs. Deshalb wurde in der DWD eine Konzentrationsgrenze

von 0,1 µg/l für einzelne Pestizide und 0,5 µg/l für die Gesamtmenge an Pestiziden festgelegt.

Bestimmung von 272 Pestiziden in Wasser

Herkömmliche Trennmethode benötigen ein langwieriges Vorbereitungsprotokoll, um die durch Umweltstandards festgesetzten Schwellenwerte zu erreichen. Die schnelle und empfindliche Online-SPE-LC-MS/MS-Methode von Shimadzu quantifiziert gleichzeitig 272 Pestizide in Oberflächen- und Grundwasser. Diese hochempfindliche Technik benötigt Lösungsmittel und Reagenzien hoher Qualität für die mobilen Phasen (LCMS-Grade Biosolve¹).

Zwei Oberflächenwasser- und eine Grundwasserprobe wurden mit Standardpestiziden von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) versetzt. Sechs Kalibrationsstufen von 1, 10, 20, 50, 100 und 500 ng/l wurden dreimal in jeder Matrix angefertigt.

SPE-UHPLC-Betriebsbedingungen: Nexera X2

System: Shimadzu Nexera X2
Säule SPE: Mayi-ODS C18
Säule LC: C18AQ CS Interchim 2,6 µm 150 * 3 mm
A/B (SPE): Wasser/Acetonitril + 0,002 % Ameisensäure + 2 mM Ammoniumformiat
A: Wasser + 0,002 % Ameisensäure + 2 mM Ammoniumformiat
B: 50/50 Acetonitril/Methanol + 0,002 % Ameisensäure + 2 mM Ammoniumformiat
LC-Fluss: 0,7 ml/min
SPE-Elutionsfluss: 0,2 ml/min
Ofentemperatur: 40 °C
Injektionsvolumen: 1.000 µl

MS-Betriebsbedingungen: LCMS-8050

System: Shimadzu LCMS-8050
ESI-Ionisationsmodus: Positiv und negativ
Verweildauer: 4 bis 199 msec, um mindestens 15 Datenpunkte pro Peak zu erhalten
Fluss des Zerstäubergases: 2,8 l/min
Fluss des Heizgases: 10 l/min
Fluss des Trocknungsgases: 10 l/min
Desolvatisierungsgrenze: 150 °C

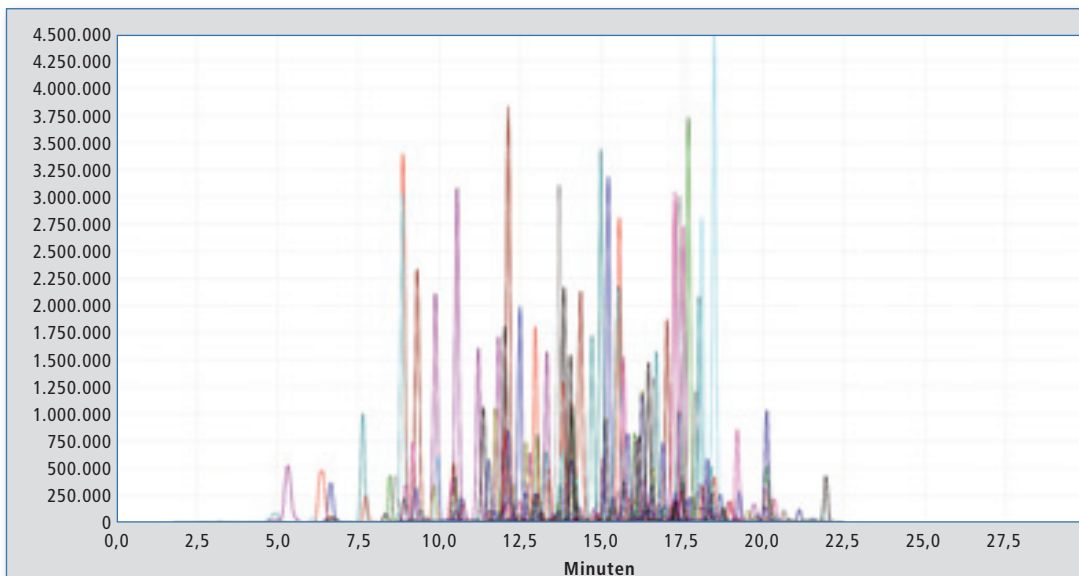


Abbildung 2: Chromatogramm von Grundwasser mit 100 ng/l versetzt

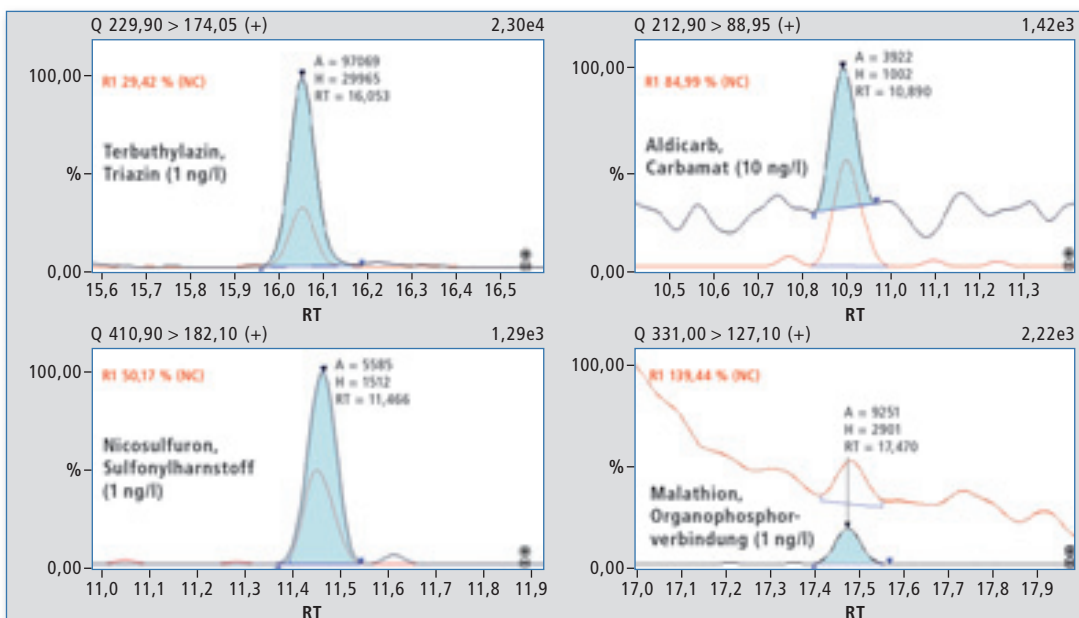


Abbildung 3: Beispiel eines Chromatogramms an der unteren Quantifizierungsgrenze

Temperatur des Heizblockes: 300 °C
Temperatur der Schnittstelle: 350 °C

Die Analyse zeigt die unterschiedlichen, in drei Wasserproben hergestellten Konzentrationsstufen (Abbildung 2).

Eine der vorigen, mit verschiedenen Konzentrationsstufen versetzten Matrices wurde ausgewählt, um eine Kalibrationskurve zu generieren. Die anderen dotierten Wasserproben dienen als Kontrollen. Die 23 verschiedenen Iso-

topen markierten Standards wurden hinzugefügt, um eine interne Kalibrierung durchzuführen. Um den Matrixeffekt zu beseitigen, wurden interne Standards (ISTD) gewählt, die die Hauptfamilien von Pestiziden abdecken, wie Phenylharnstoffe, Triazine, Carbamate, Sulfonylharnstoffe und Organophosphorverbindungen.

Die Quantifizierungsgrenzen wurden für jede Verbindung durch ein Signal-Rausch-Verhältnis größer 10 festgelegt. Tabelle 1 klassifiziert die Verbindungen gemäß ihrer Quantifizierungsgrenzen: 1, 10

und 25 ng/l. Die erhaltenen LLOQs (lower limit of quantification/untere Quantifizierungsgrenze) entsprechen den Anforderungen der europäischen Richtlinien und den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation WHO.

Leistungsbewertung

Die Reproduzierbarkeit wurde auf der niedrigsten Konzentration eines jeden Wassers mit drei Injektionen bestimmt. Ungeachtet der Wassermatrix lag die Reproduzierbarkeit bei weniger als 15 % für alle 272 Zielsubstanzen. ♦

Verbindungen mit LOQ bei 1 ng/l					
4MBC	Chlorfluazon	Ethidimuron	Ioxynil	Oxamyl	Simazin
Acetamiprid	Chloridazon	Ethiofencarb	IPPMU	Oxasulfuron	Simazin Hydroxy
Acetochlor	Chlorsulfuron	Ethiprol	IPPU	Oxazepam	Simetryn
Niflumsäure	Chlortoluron	Enbucanazol	Iprovalicarb	Oxydemeton Methyl	Spirotetramat
Alachlor	Clethodim	Fenobucarb	Isoprothiolan	Paclobutrazol	Sulfometuron Methyl
Ametryn	Coumafen	Fenothiocarb	Isoproturon	Penconazol	Sulfosulfuron
Amidosulfuron	Coumatetralyl	Fenpyroximat	Isoxaben	Penoxsulam	Tebuconazol
Aminocarb	Cyanazin	Fensulfothion	Lufenuron	Phosphamidon	Tebufenosid
Atenolol	Cybutryn	Fenuron	Malaoxon	Pinoxaden	Tebutam
Atrazin	Cycloxydim	Fipronil Sulfon	Malathion	Pirimicarb	Tebuthiuron
Atrazin Desethyl	Cyflufenamid	Fluazinam	Mandipropamid	Pirimicarb Desmethyl	Teflubenzuron
Atrazin-OH	Cyproconazol	Flufenacet	Mecarbam	Pirimicarb II	Tepraloxymid
Azaconazol	DCPMU	Fluometuron	Mefluidid	Prochloraz	Terbumeton
Azamethiphos	Desmetryn	Fluopicolid	Mercaptodimethur	Progesteron	Terbumeton Desethyl
Azimsulfuron	Dichlorophen	Fluoxastrobin	Metabenzthiazuron	Promecarb	Terbuthylazin
Azinphos Ethyl	Dicrotophos	Flupyrasulfuron Methyl	Metalaxyl	Prometryn	Terbuthylazin Desethyl
Azinphos Methyl	Diethofencarb	Fluridon	Metazachlor	Propachlor	Terbuthylazin Hydroxy
Azoxystrobin	Difenacoum	Flurtamon	Metconazol	Propazin	Tetraconazol
Bensulfuron Methyl	Difenoconazol	Flusilazol	Methomyl	Propiconazol	Thiabendazol
Benthiavalicarb Isopropyl	Difethialon	Fluxapyroxad	Metobromuron	Propoxur	Thiacloprid
Bisphenol S	Diisobutylphthalat	Foramsulfuron	Metolachlor	Propoxycarbazon	Thiazafluron
Buturon	Dimetachlor	Formetanat	Metosulam	Propyl Paraben	Thiobencarb
Coffein	Dimethenamid	Fosthiazat	Metoxuron	Proquinazid	Thiophanat Methyl
Carbamazepim	Dimethomorph	Fuberidazol	Metribuzin	Prosulfuron	Triadimefon
Carbamazepin Epoxyd	Dimetilan	Halosulfuron Methyl	Metropolol	Pyrazophos	Triazamat
Carbaryl	Dimoxystrobin	Hexaconazol	Metsulfuron Methyl	Pyrifenoxy	Tribenuron Methyl
Carbendazim	Diniconazol	Hexaflumuron	Monolinuron	Pyrimethanil	Trietazin
Carbetamid	Dinoseb	Hexazinon	Monuron	Pyroxsulam	Trietazine-2-OH
Carbofuran	Dinoterb	Hexythiazox	Myclobutanil	Quizalofop Ethyl	Triflumizol
Carbofuran 3 Hydroxy	Diuron	Hydroxypropazin	Neburon	Rimsulfuron	Trimetoprim
Carboxin	Econazol	Imazapyr	Nicosulfuron	Rotenon	Trinexapac Ethyl
Chlorantraniliprol	Epoxiconazol	Imazaquin	Oruface	Sebutylazin	Triticonazol
Chlorbromuron	Erythromycin	Imidacloprid	Oryzalin	Siduron	Vamidothion
Verbindungen mit LOQ bei 10 ng/l					
245T Fenoprop	Cyprosulfamid	Fenarimol	Imazamox	Metazachlo oa	Quizalofop
Aldicarb	Cyromazin	Fenoxycarb	Imazofuluron	Methidathion	Roxythromycin
Atrazin Desisopropyl	Desethyl Terbutylazine 2-OH	Flazasulfuron	Iodosulfuron Methyl	Oxadixyl	Tembotriol
Bentazon	Desmedipham	Florasulam	Isoprocab	Paraaxon	Testosteron
Benzafibrat	Dia2hydroxy	Flufenacet	Isoxadifen Ethyl	Phenmedipham	Thiencarbazon Methyl
Brodifacoum	Dichlorprop-P	Fluroxypyr	Lorazepam	Phoxim	Thiodicarb
Bromadiolon	Diclofenac	Fomesafen	MCPA	Propamocarb	Tolytriazol
Butyl Paraben	Dimetachlor oa	Forchlorfenuron	MCPD	Propanolol	Triasulfuron
Chloroxuron	Epitestosteron	Haloxypol	Medroxyprogesteron	Propyzamid	Triazoxid
Clofentezin	Ethoxysulfuron	Haloxypol Methyl	Mesosulfuron Methyl	Prothioconazol	Triclopyr
Clorsulon	Ethyl Paraben	Imazalil	Metamitron	Pymetrozin	Trietazin Desethyl
Closantel					Tylosin
aVerbindungen mit LOQ bei 25 ng/l					
2,4-D	Dea 2 Hydroxy	Fluquinconazol	Linuron	Titrosulfuron	Triflururon

Tabelle 1: Quantifizierungsgrenze in ng/l für jede Verbindung

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten Wiederfindungsraten von 85 bis 115 % für die Kalibrationsstandards und die Kontrollproben.

Fazit

Shimadzu bietet eine einzigartige, automatisierte und empfindliche Methode an, um eine große Zahl von Pestiziden in Wasser zu quantifizieren. Die Quantifizierungsgrenzen lagen im Bereich von 1 bis

25 ng/l bei einer Probeninjektion von 1 ml. Die Wiederfindungsraten reichen von 85 - 115 %, wobei die Reproduzierbarkeit bei kleiner als 15 % für die vollständige Liste liegt. Letztlich ist diese Technik geeignet für die Schwellenwerte des aktuellen normativen Umfelds wie der DWD. Sie ist ein perfektes Beispiel, wie Chromatographie und Massenspektrometrie zusammengehen als leistungsstarke, anwenderfreundliche und zeitsparende Technik, die die Bedürfnisse der Anwender bedient.

Zusätzlich zur Pestizid-Kontamination sind für Trinkwasserversorger und Wasseraufbereitungsanlagen die erhöhten Konzentrationsniveaus an Nitrat eine Herausforderung. Nitrate werden durch extensive landwirtschaftliche Verfahren freigesetzt.

Episode 3 der Wasser-Trilogie wird in der nächsten Shimadzu NEWS einen Überblick geben, wie sich Anionen mit Hilfe der Ionenchromatographie analysieren lassen, etwa Nitrate oder andere.

Biosolve ist der Handelsname der BioSolve® Company (TBC)

Referenzen

- [1] REFIT EVALUATION of the Drinking Water Directive 98/83/EC, 2016.
- [2] European Drinking Water Directive 98/83/EC1.



Vielseitiges Tool für die Automobilindustrie

Neue HMV-G3 Serie: neu konzipiert mit Farbkamera und Datenschutzfunktionen

Zentraleinheit der HMV-G3 Serie

Die Zukunft der Mobilität, die zukünftige Nutzung von Kraftfahrzeugen ebenso wie ihre Antriebstechniken sind facettenreich wie nie zuvor. Die Automobilindustrie mit ihren immer kürzeren Entwicklungszeiten hat derzeit Ideen und Vorhaben in ihren F&E-Abteilungen (Forschung & Entwicklung), die diese zukünftigen Bedürfnisse erfüllen sollen. Zugleich ist diese Industrie einer der wettbewerbsintensivsten Märkte mit sehr hohen Qualitätsstandards.

Als ein weltweiter Zulieferer der Automobil-Logistikkette stellt Shimadzu das gesamte Spektrum instrumenteller Analytik und Prüflösungen bereit für Chromatographie, Spektroskopie, Massenspektrometrie, TOC und Materialprüfung. Dies umfasst Maschinen, Motoren und Stromquellen, Karosserien und Innenräume, Umweltschutz, Aufhängungs- und Kraftübertragungssysteme, Elektronik, Batterien und Brennstoffzellen. Diese Vielfalt der Prüfmethoden entspricht den geltenden Standards, Normen, Vorschriften und Konformitätsanforderungen.

Tests von antriebszugehörigen Teilen sind kritische Parameter

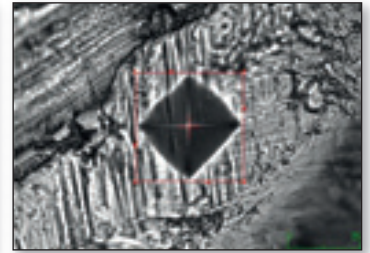
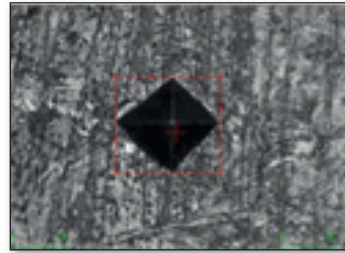
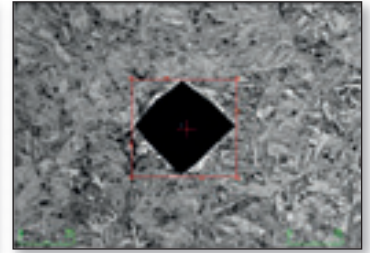
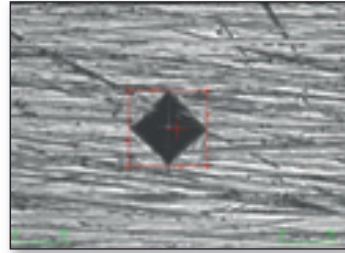
Insbesondere eine Härteprüfung von eisenhaltigen und nicht-eisen-

haltigen Komponenten nach internationalen Standards ist ein bekanntes Verfahren auf dem Automobilmarkt. Verschleiß- und Festigkeitsmerkmale von rotierenden Komponenten und Gussteilen im Motor oder anderen antriebszugehörigen Parts werden streng getestet, weil sie kritische Parameter sind. Falls ein Verfahren nicht ordnungsgemäß ausgeführt wird, sind zusätzliche Kosten die Folge und im riskantesten Fall steht die Fahrgastsicherheit auf dem Spiel.

Die neuen HMV-G3-Härtetester von Shimadzu zielen auf Forschungs- und Produktionsverfahren. Neue Funktionen verbessern die Datenzuverlässigkeit, berücksichtigen ISO-Vorgaben bezüglich der Vickers-Härtetests als Standard und lassen sich erweitern.

Für mechanische Bauteile, Metalle, Beschichtungen, Keramiken und Kunststoffe

Ein Mikro-Härtetester ist in der metallographischen Strukturfor-schung, bei der Qualitätskontrolle von Waren und zur Erstellung zertifizierter Produktdokumente unverzichtbar. Die zuverlässige Härteprüfung in eingeschränkten mikroskopischen Bereichen ist notwendig für kleine mechanische Präzisionsteile, für Metallstrukturen oder für bearbeitete Oberflächenbeschichtungen und Über-



Verbesserung der automatischen Auslesefunktion

züge. Neben Metallen ist ein Mikro-Härtetester auch bei der Bewertung von Feinkeramiken und technischen Kunststoffen hilfreich.

Die Geräte der HMV-G3 Serie messen die Vickers-Härte mit sehr geringen Prüfkraften. Ein gleichmäßiger rechteckiger pyramidaler Diamant, als Eindringkörper bezeichnet, übt eine Kraft auf die Probe aus. Die Härte der Probe lässt sich über eine Messung der entstandenen Vertiefung an der Oberfläche berechnen.

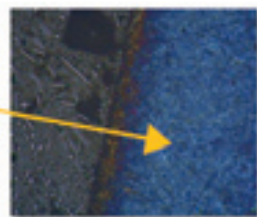
In den letzten Jahren stieg die Nachfrage nach verbesserten

Datenmanagementfunktionen, leichter Handhabung und erweiterten Funktionen entsprechend der Anwendungsgebiete.

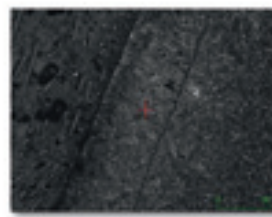
Konform mit ISO-Standards

Alle Modelle der Shimadzu-HMV-G3 Serie sind nun standardmäßig normgerecht bei Messungen mit niedrigen Prüfkraften gemäß den ISO-Standards bei Vickers-Härtetests. Schutzfunktionen, die die Datenzuverlässigkeit steigern, sind ebenso als Standard integriert wie Dokumentationsfunktionen. Optional lässt sich die Arbeitsfläche mikrometergenau per Motor positionieren, und es wurde eine 5-Megapixel-Kamera, industrieweit die beste, in die Serie integriert. Das System lässt sich anwendungs- und nutzerspezifisch konfigurieren.

Oberflächenbeschichtung erscheint blau



Farbiges Bild



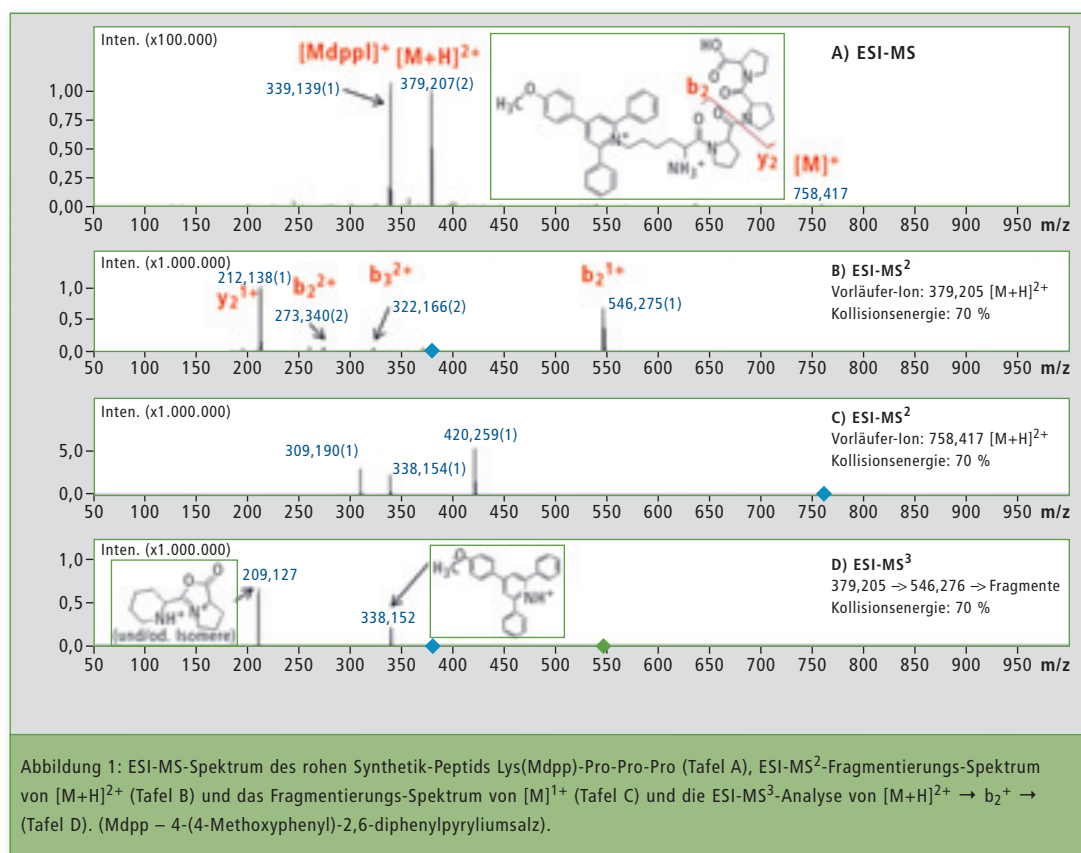
Monochromes Bild der selben Probe

Im Vergleich: Farbiges und monochromes Bild



MSⁿ-Analyse nicht-derivatisierter und Mtp-derivatisierter Peptide

Zwei aktuelle Untersuchungen zur Anwendung von LC-MS-IT-TOF-Geräten



Ein LC-MS-IT-TOF koppelt die Techniken der Ionenfalle (QIT) und der Flugzeitanalyse (TOF – Time-of-Flight). Die QIT-Ionenfalle bietet leistungsstarke MSⁿ-Fähigkeiten. Nach Auswahl des geeigneten Vorläufer-Ions lassen sich mehrere MSⁿ-Experimente im Verlauf einer einzigen Probenaufgabe durchführen. Es werden Produkt-Ionen erhalten, die als Vorläufer-Ionen für die nächste Fragmentierungsstufe dienen. MSⁿ-Spektren mit einer hohen Massengenauigkeit liefern eine verbesserte Zuverlässigkeit der Signalzuordnung und eine Strukturanalyse durch den Fragmentierungsablauf.

Ein IT-TOF-Gerät bietet hohe Auflösung und Genauigkeit für alle MS- und MSⁿ-Modi ebenso wie Massenzustabilität und ausgezeichnete Auflösung für LC-MS-Analysen. Solche Eigenschaften machen ein LC-MS-IT-TOF zum bevorzugten Instrument für moderne wissenschaftliche Untersuchungen zur Verunreinigungsanalyse, für die Erstellung metabolischer Profile und zur Biomarker-Forschung [1].

Die Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe für Chemie und Stereochemie von Peptiden und Proteinen der Chemischen Fakultät der Universität Wrocław,

Polen, untersucht Peptide und Proteine hauptsächlich mit Hilfe der Massenspektrometrie. Professor Zbigniew Szewczuk und sein Team erforschen die Struktur natürlicher und synthetischer Peptide, Peptidkonjugate und -addukte, indem sie nach posttranslationalen Modifikationen und Biomarkern suchen. Auf Grund der geringen Konzentration einiger Peptide in biologischen Proben besteht in der Empfindlichkeitssteigerung der MS-Analyse eines der wichtigsten Forschungsziele der Arbeitsgruppe.

Zwei Beispiele für aktuelle Untersuchungen werden hier vorge-

stellt, die aufgrund der benötigten MSⁿ-Analytik nur durch den Einsatz eines LC-MS-IT-TOF-Systems möglich wurden.

1. MSⁿ-Analyse mit 4-(4-Methoxyphenyl)-2,6-diphenylpyryliumsalz-derivatisierter Peptide mit LC-MS-IT-TOF

Tandemmassenspektrometrie ist ein leistungsfähiges Werkzeug in der Proteomikforschung. Trotz der rapiden Entwicklung dieser Technik besteht noch immer das Problem unzureichender Empfindlichkeit wegen der schlechten Ionisierung einiger Peptide, die in der biologischen Probe in geringer Konzentration vorhanden sind. Der Einbau einer funktionellen Gruppe erlaubt, dieses Problem zu umgehen. Sie bringt eine stabile positive Ladung innerhalb des Peptidmoleküls ein, steigert damit die Ionisierungseffizienz und ermöglicht einen empfindlichen Nachweis mit der Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS).

Kürzlich haben Forscher diverse effiziente Methoden zur Peptid-Derivatisierung durch eine quartäre Ammoniumsalz(QAS)-Synthese entwickelt [2]. Die höchste Intensitätssteigerung (etwa 1.000-fach) wurde bei Pyrylium-Ionisierungsreagenzien beobachtet, die leicht mit der primären Aminogruppe in der Lysinseitenkette reagieren, um Pyridiniumsalze mit stabiler positiver Ladung zu bilden [3]. Die mit Pyrylium-Reagenzien derivatisierten Peptide lassen sich sogar auf attomolarem Niveau (10⁻¹⁸) nachweisen. Eine neue Art von isobarer Peptid-Markierung wurde ebenfalls vorgeschlagen [4], die auf dem Austausch der ¹⁶O/¹⁸O-Paarung und der Derivatisierung von Isotopologen der Pyridiniumsalze beruht.

Allerdings ist es notwendig, nach neuen Ionisationsmarkern zu suchen, die einen vergleichbaren Grad an Ionisierungssteigerung zeigen und verbesserte Eigenschaften besitzen (höhere Löslichkeit, Empfindlichkeit und Analysepräzision). Forscher entwickelten kürzlich ein neues Ionisierungsreagenz (4-[4-Methoxyphenyl]-2,6-diphenylpyryliumsalz, Mdppl), um die Anwendbarkeit in der Proteomikforschung zu verbes-

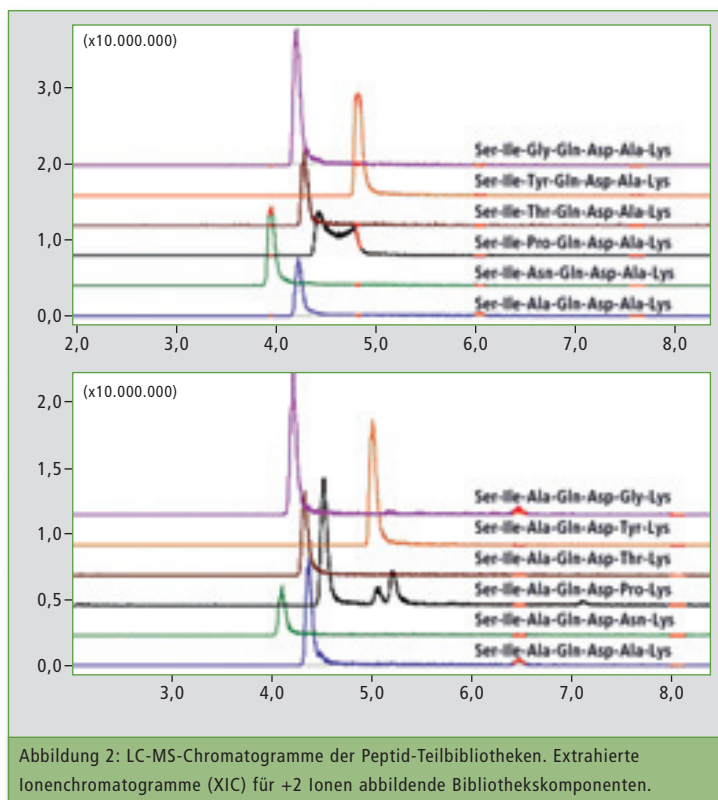


Abbildung 2: LC-MS-Chromatogramme der Peptid-Teilbibliotheken. Extrahierte Ionenchromatogramme (XIC) für +2 Ionen abbildende Bibliothekskomponenten.

sern (unveröffentlichte Daten). Spezifische MSⁿ-Übergänge werden für die eindeutige Analyse bestimmter, mit Mdppl derivatisierter Peptide eingesetzt.

Das 4-(4-Methoxyphenyl)-2,6-diphenylpyryliumsalz wurde mit der Seitenkettenaminogruppe eines Modell-Peptids verknüpft (Lys-Pro-Pro-Pro). Abbildung 1 zeigt die ESI-MS- und ESI-MSⁿ-Analyse von Lys(Mtppl)-Pro-Pro-Pro.

Bei MS²-Experimenten wurde eine Reihe von b- und y-Ionen erhalten. Aufgrund des Anstiegs der Kollisionsenergie vergrößerte sich die Stärke des Signals m/z 338, obwohl sie weiterhin recht gering war. Nach dem MS³-Experiment entsprach der Peak bei m/z 209 dem inneren Fragment der Peptidsequenz. Das Signal ist für Pyridiniumsalz charakteristisch, erscheint aber hauptsächlich beim ladungsfernen Fragmentierungsmechanismus [5].

Um diese Aussage eindeutig zu bestätigen, wurde ein MS³-Experiment durchgeführt, bei dem für die erste Fragmentierungsreaktion ein [M+H]²⁺ ausgewählt wurde, das ein einziges mobiles, für einen ladungsgerichteten Fragmentierungsmechanismus verantwortli-

ches Proton enthält. Resultierende einfach geladene Fragmente enthalten kein mobiles Proton und können einer Fragmentierung gemäß ladungsfernen Fragmentierungsmechanismus unterliegen. Eine Kombination dieser zwei aufeinander folgenden Fragmentierungsreaktionen, die nach verschiedenen Mechanismen ablaufen, können nur mit Hilfe von mit Ionenfallen (IT = ion trap) ausgestatteten Geräten durchgeführt werden.

Eine präzise Analyse der sich ergebenden Fragmente benötigt hochauflösende Spektren, die sich nur mit IT-TOF-Geräten garantieren lassen. Die Forscher stellten fest, dass eine Fragmentierung von einfach geladenen Ionen Informationen über die Ionisierungsstelle gibt, wohingegen das gleiche Experiment für ein zweifach geladenes Ion mehr Information über die Peptidsequenz liefert. In Kombination liefern diese Experimente zuverlässigere und umfangreichere Strukturinformationen. Das Ionenfragment m/z 338 lässt sich beim MRM oder Vorläufer-Ionenscan einsetzen, um all die Peptide zu untersuchen, die 4-(4-Methoxyphenyl)-2,6-diphenylpyrylium-Gruppen enthalten.

Als ein MS³-Ergebnis erscheinen [M+H]²⁺ → b₂⁺ → Fragmente bei

m/z 209 und 338, entweder als [M+H]²⁺ oder [M]⁺ (Abbildung 1B, 1C). Die MS³-Technik führt daher zu eindeutigen Fragmenten, was bedeutet, dass sie sich einsetzen lässt für eine empfindliche und eindeutige Analyse von Anzeige-Ionen bei proteomischen Untersuchungen von mit Mtppl derivatisierten Verbindungen wie beispielsweise: 379 → 546 → 338 und 379 → 546 → 209. Dies eröffnet vollständig neue Möglichkeiten für den Einsatz einer MSⁿ-Analyse bei der quantitativen und qualitativen Proteomik.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich die MSⁿ-Technik erfolgreich für eine empfindliche Peptidsequenzierung mit hohen Kollisionsenergien einsetzen lässt. Diese schnelle Bestätigung der Struktur derivatisierter Peptide ist extrem zuverlässig. Eine MSⁿ-Analyse ermöglicht die eindeutige Identifikation von Peptidfragmenten, die sich aus MS²-Experimenten ergeben. Die Genauigkeit des IT-TOF-Instruments erlaubt die Summenformel von Fragmenten zu bestimmen, was es möglich macht, Strukturformeln anhand der erhaltenen Ionen vorzuschlagen. Weiterhin bieten sie zudem auch neue und schnelle Methoden zum Nachweis von Biomarkern in den getesteten Proben. MSⁿ-Experimente kombinieren zwei Fragmentierungsmechanismen: ladungsfern und ladungsgerichtet.

2. Innere Fragmente, die im MSⁿ-Verlauf zur Analyse von Peptid-Isomeren gebildet werden

Die Bedeutung der massenspektrometrischen Analyse bei der Peptidforschung ist auf diversen Ebenen offensichtlich – von der Charakterisierung natürlicher oder synthetischer Produkte, über die Sequenzanalytik, bis hin zu Stabilitätsstudien und Quantifizierung. Es gibt auch ein steigendes Interesse an massenspektrometrischen Anwendungen für physikochemische Untersuchungen. Dazu gehören Ladungsvarianten, molekulare Interaktionen und Stabilitätsstudien von zusammengesetzten Molekülen.

Die wesentlichen Vorteile der Massenspektrometrie bestehen in

der hohen Empfindlichkeit und der eindeutigen Produktidentifikation mit ausgezeichneten Nachweismöglichkeiten sowie der Möglichkeit zur Anwendung bei isotopisch modifizierten Referenzmaterialien.

Die Lipophilizität chemischer Verbindungen, ausgedrückt als Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP), ist ein sehr wichtiger Parameter in der medizinischen Chemie. Üblicherweise wird logP mit der traditionellen Flaschen-Schüttelmethode (shake-flask method = SFM) ermittelt, die sehr zeitaufwendig ist, beträchtliche Materialmengen benötigt und im Falle von stark hydrophoben Verbindungen nur begrenzt einsetzbar ist. Zahlreiche chromatographische Methoden wie RP-TLC und RP-HPLC ergänzen oder ersetzen eine SFM. Sie bieten verschiedene praktische Vorzüge, darunter Reproduzierbarkeit, Unempfindlichkeit gegenüber Verunreinigungen und Abbauprodukten, einen größeren Dynamikbereich sowie eine verminderte Probenbehandlung und einen geringeren Probenumfang [6]. Einer der Hauptvorteile der HPLC bei der Lipophilizitätsbestimmung besteht ▶

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: 5.020 · Englisch: 3.270

© Copyright

Shimadzu Europa GmbH, Duisburg,
Juni 2020. Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit Genehmigung der Redaktion gestattet.

Windows ist Warenzeichen der Microsoft Corporation. ©2020 Apple Inc. Alle Rechte vorbehalten. Apple, das Apple Logo, Mac und Mac OS sind Warenzeichen von Apple.

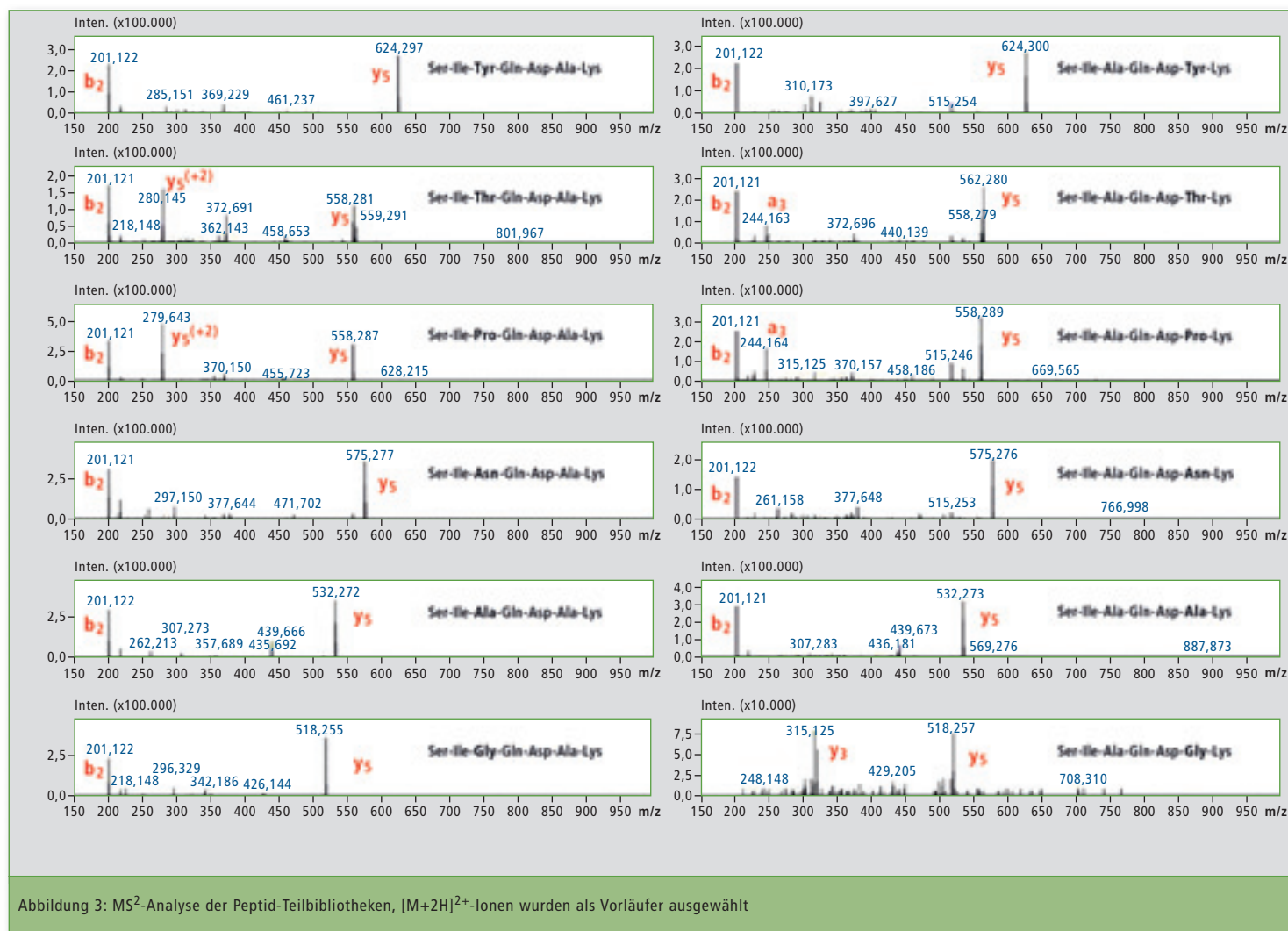


Abbildung 3: MS²-Analyse der Peptid-Teilbibliotheken, [M+2H]²⁺-Ionen wurden als Vorläufer ausgewählt

in der Fähigkeit, unmittelbar die Eigenschaften einer Reihe von Verbindungen durch Analyse von Mischungen zu vergleichen.

Wegen der Blut-Hirn-Schranken-Problematiken wird Lipophilizität intensiv bei der Konzeptionierung und Entwicklung von Neuropharmaka untersucht. Diverse Forschungsgruppen studieren die antinozepitive Aktivität von Peptiden [7,8], und es besteht ein erhebliches Interesse an der Anwendung von RP-HPLC zum Vergleich der Lipophilizität der vorgeschlagenen Analoga.

Ein LC-MS-Verfahren erscheint ideal für diese Anwendung, da zusätzliche nützliche Hinweise über den Ladungszustand der untersuchten Peptide erhalten werden. Ein komplexerer Tandem-MS²-Ansatz wird im Falle von isomeren Peptiden benötigt, um die Peak-Reihenfolge den richtigen Probenkomponenten zuzuordnen. Im aktuellen Projekt stießen die

Forscher auf ein Problem, das einen fortschrittlicheren Ansatz zur Unterscheidung von Peptid-isomeren erfordert.

Um den Effekt einer Sequenzmodifikation auf das chromatographische Verhalten von Peptiden und nachfolgend ihre Lipophilizität zu untersuchen, wurde eine Peptidbibliothek konzipiert und aufgebaut, die auf dem Podocin-Fragment 290 - 296 mit der Sequenz Ser-Ile-Ala-Gln-Asp-Ala-Lys basiert. Alanin-Reste wurden als variable Stellen ausgewählt und ersetzt durch Tyrosin, Threonin, Prolin, Glycin und Asparagin, um ein breites Spektrum an Änderungen zur Verfügung zu stellen.

Teilbibliothek 1:
Ser-Ile-**Xxx**-Gln-Asp-Ala-Lys

Teilbibliothek 2:
Ser-Ile-Ala-Gln-Asp-**Xxx**-Lys
wobei **Xxx** für Gly, Tyr, Thr, Pro, Asn oder Ala steht

Die zwei resultierenden Teilbibliotheken (modifiziert an Position 3 bzw. 6) wurden mit einem LC-MS analysiert. Die Peptide in jeder Teilmenge unterscheiden sich im Molekulargewicht, und die MS-Analyse reichte aus, die Signale zuzuordnen. Über extrahierte Chromatogramme (XIC) dargestellte Elutionsprofile sind in Abbildung 2 gezeigt. Retentionszeit-Unterschiede zwischen Peptidisomeren sind minimal, und der Positionseffekt der modifizierten Rückstände auf die Retentionszeit konnte erst untersucht werden, nachdem eine Methode zur Unterscheidung von Peptidisomeren für eine Reihenanalyse erarbeitet werden konnte.

Die Forscher benutzten die Teilbibliotheken zur MS²-Analyse, indem sie [M+2H]²⁺-Peptid-Ionen als Vorläufer (Abbildung 3) einsetzten. Die hohe Massenstabilität von TOF erlaubte die Durchführung einer langen Reihe von LC-MS-Experimenten ohne Nach-

kalibrierung. Vorläufer-Ionen von überlappenden chromatographischen Peaks wurden erfolgreich ausgelesen und aufgrund der hohen Auflösung und Genauigkeit der IT-TOF-Anordnung fragmentiert. Praktisch in allen Fällen erzeugte die Fragmentierung b₂- und y₅-Ionen, die bei den Peptidisomeren paarweise identisch sind und nicht verwendet werden können, um Peaks im Chromatogramm einer Bibliotheksmischung zuzuordnen. Einige beobachtete Unterschiede wurden als +2 Fragment-Ionen (Thr- und Pro-Peptide) identifiziert oder waren ziemlich schwach (Gly-Analog).

Die Analyse wurde mit einem IT-TOF-Gerät von Shimadzu durchgeführt, und es wurde entschieden, das MSⁿ-Merkmal zu nutzen sowie y₅-Ionen der weiteren Fragmentierung (MS³) zu unterwerfen. Die Tyr-Analoga wurden für Voruntersuchungen ausgewählt, und die in Abbildung 4 gezeigten Ergebnisse offenbaren

interessante Unterschiede in den MS³-Fragmentierungsmustern. Der charakteristische MS³-Übergang wird in weiteren Lipophilizitätsstudien der Podocin-Peptidfragmentbibliotheken genutzt werden.

Basierend auf individuellen Eigenschaften der untersuchten Peptidsequenz konnten normale MS²-Experimente nicht bestätigen, welcher Ala-Rest in einem vorliegenden Peptid ersetzt wurde. Die Peptid-Isomere konnten nur identifiziert werden, nachdem ein tieferer Einblick in die Fragmentierung mit Hilfe der MS³-Funktion der IT-TOF-Anordnung erhalten wurde.

Fazit

Wissenschaftliche Herausforderungen konnten schnell, erfolgreich und effizient gelöst werden dank der MSⁿ-Fähigkeit und der hohen Massengenauigkeit des LC-MS-IT-TOF-Instruments von Shimadzu.

Methoden:

Pyryliumsalz-Synthese: Die Synthese von Pyryliumsalzen umfasst zwei Schritte. Der erste besteht in der Synthese eines spezifischen Chalkon, das auf einer Kondensationsreaktion mit verschiedenen, kommerziell verfügbaren Aldehyden und Ketonen beruht. Die Reaktion wird in alkalischer Umgebung durchgeführt – in Gegenwart von 10 % NaOH in Ethanol. Im zweiten Schritt wird eine Zyklisierungsreaktion mit dem erhaltenen Chalkon und einem geeigneten Keton abgeschlossen. Die Reaktion benötigt das Vorhandensein von Trifluor-

methanesulfonsäure (TFMSA) als Gegen-Ion.

Derivatisierungsverfahren: Eine Modellpeptidprobe wurde in Dimethylformamid (DMF) gelöst und ein geeignetes Pyryliumsalz und Trimethylamin (TEA) im Überschuss hinzugefügt. Die Mischung wurde bei 60 °C für drei Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff verdampft und der Rückstand lyophilisiert.

Die **Peptid-Bibliothekssynthese** wurde mit massiver Unterstützung unter Einsatz von Fmoc-Chemie umgesetzt, und äquimolare Mischungen von Peptid-Derivaten wurden bei verschiedenen

Schritten genutzt. Für die LC-MS-Experimente wurden Rohprodukte eingesetzt.

MS- und MSⁿ-Experimente: MS und MSⁿ wurden mit einem IT-TOF-Massenspektrometer von Shimadzu vorgenommen. Für Experimente im Vorläufer-Ionenmodus wurde ein dem Pyryliumsalz entsprechendes Fragment-Ion ausgewählt.

LC-MS-Bedingungen: Eine UHPLC Nexera, ausgestattet mit einer Aeris Peptide XB-C18-Säule (50 x 2,1 mm, 3,6 µm) wurde eingesetzt unter Verwendung einer Gradientenaufreinigung von 5 bis 60 % B in 15 min, A: 0,1 % HCOOH in Wasser, B: 0,1 % HCOOH in Acetonitril, Flussrate 0,2 ml/min. Das IT-TOF-Gerät wurde im positiven Ionen-Modus betrieben, und der 150 - 1.000 m/z-Bereich wurde analysiert.

Danksagungen

Die Forschung wurde teilweise unterstützt durch die Forschungsförderung Nr. UMO-2016/23/B/ST4/01036 vom Nationalen Wissenschaftszentrum in Polen. Die Autoren danken O. Uysal und P.U. Godigamuwa Acharige für die Bibliothek-Synthese. Ein Dank geht auch an Andrzej Reszka (Shim-Pol, Polen) für den Zugang zum IT-TOF-Instrument von Shimadzu.

Autoren

Dr. Dorota Gaszczyk, Prof. Zbigniew Szewczuk, Dr. Alicja Kluczyk
Faculty of Chemistry, University of Wrocław
50-383 Wrocław – Polen

Literatur

- [1] www.shimadzu.com/an/lcms/lcmsittof/itof.html, accessed 14.01.2020
- [2] M. Cydzik, M. Rudowska, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, J. Pept. Sci. 17 (2011), 445-453
- [3] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, Sci. Rep., 6 (2016), 1-12
- [4] M. Waliczek, R. Bachor, M. Kijewska, D. Gaszczyk, K. Panek-Łaszczyńska, A. Konieczny, K. Dąbrowska, W. Witkiewicz, K. Marek-Bukowiec, J. Tracz, M. Luczak, Z. Szewczuk, P. Stefanowicz, Anal. Chimica Acta, 1048 (2019), 96-104
- [5] M. Rudowska, D. Wojewska, A. Kluczyk, R. Bachor, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 23 (2012), 1024-1028.
- [6] C. Liang, J. Qiao, H. Lian, J. Chrom. A, 1528 (2017) 25-34
- [7] H. Liu, B. Zhang, X. Liu, Ch. Wang, J. Nib, R. Wanga, Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 1694-1702
- [8] K. Wtorek, R. Artali, J. Piekłina-Ciesielska, J. Koszka, A. Kluczyk, L. Gentilucci, A. Janicka, Eur. J. Med. Chem. 179 (2019) 527-536

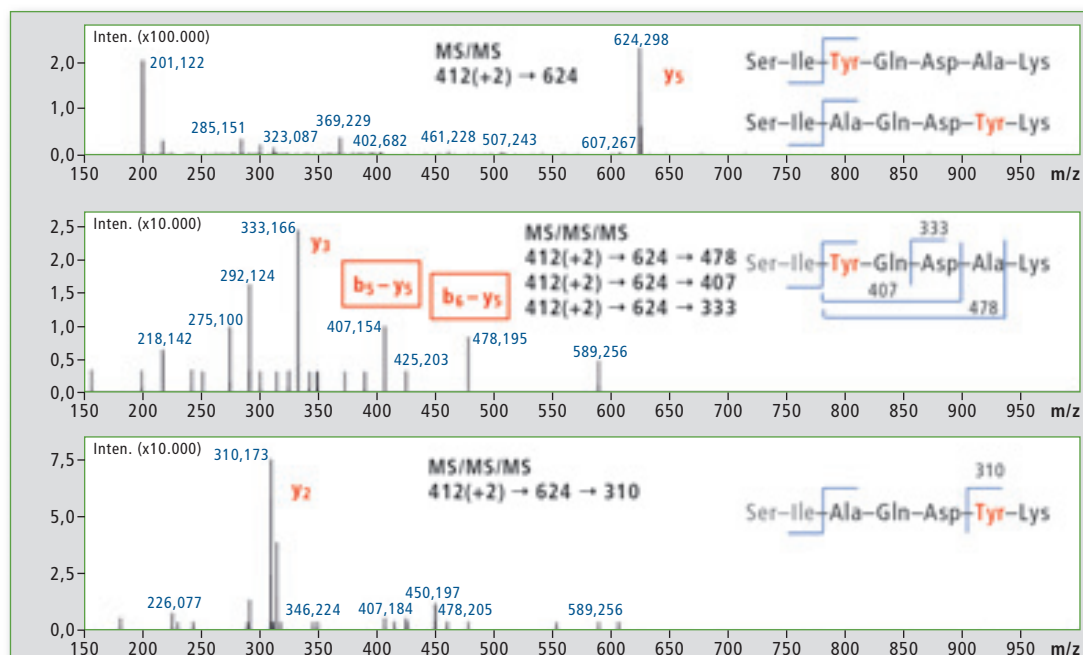


Abbildung 4: MSⁿ-Analyse von Tyr-enthaltenen Bibliothekselementen. MS²-Ergebnisse waren nicht ausreichend, charakteristische Ionen zu erzeugen, wohingegen MS³-Experimente verwendet werden konnten, Isomere eindeutig zu identifizieren.



Die Autoren des Artikels (von links): Dr. Dorota Gaszczyk, Prof. Zbigniew Szewczuk und Dr. Alicja Kluczyk



Kopfschmerz ade

Eine Anleitung zur Auswahl der idealen C18-Säule



Kopfschmerzen bei der Säulenauswahl?

Die Multitalente der Flüssigchromatographie: C18-Säulen werden vielfältig in der pharmazeutischen, klinischen, Nahrungsmittel- und Umwelt-Industrie für Applikationen in der Umkehrphasen(RP-)chromatographie eingesetzt. Bei marktweit Tausenden von Alternativen kann es schwierig sein, die richtige C18-Säule zu wählen. Wie findet man angesichts ihrer Vielseitigkeit die am besten geeignete Säule? Shimadzu bietet daher für sein Portfolio an C18-Säulen eine Anleitung, die den Auswahlprozess vereinfacht (Abbildung 1). Dadurch gibt es keine Kopfschmerzgefahr mehr durch die Informationsflut.

Shim-pack Velox: maximiert die Trennleistung durch die CoreShell-Technologie

Entwickelt um die Leistung von LC-Systemen zu erhöhen, ermöglichen die Shim-pack Velox-Säulen mit der CoreShell-Technologie von Shimadzu, auf jedem LC Instrument eine erhöhte Trennleistung und schnellere Analysen zu erreichen. Ob es darum geht, eine hocheffiziente LC-Trenntechnik zu entwerfen, eine vorhandene Methode zu übertragen, die den Durchsatz steigert und die Auflösung beibehält oder die Auflö-

sung einer komplexen Trennung zu verbessern – Shim-pack Velox-Säulen erfüllen die Bedürfnisse jedes Anwenders.

Aufgrund ihrer Robustheit erzielen die Säulen ausgezeichnete Langlebigkeit, sogar für die herausforderndsten Probenmatrizes.

Die Shim-pack Velox SP-C18-Serie (Sterically Protected = sterisch geschützt) wurde speziell für Anwendungen bei niedrigen pH-Bedingungen konzipiert; sie bietet ein ausgewogenes Retentionsprofil mit langen Lebensspannen sogar unter schwierigen sauren Bedingungen, die für eine LC-MS/(MS)-Analyse notwendig sind.

Shim-pack Scepter: ausgezeichnete Stabilität und Leistung unter verschiedensten Bedingungen

Diese neue Generation organischer, hybrid-basierter Silica-Säulen erreichen eine ausgezeichnete Stabilität und Leistung über einen breiten pH-Bereich. Mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften erweisen sich Shim-pack Scepter-Säulen als effektiv bei der Methodenentwicklung und sind für vielfältige Anwendungen geeignet. Bedingt durch ihre

und daher hohen Hydrophobizität ist ideal für die Analyse von Isomeren. Dies ist vor allem für pharmazeutische Anwendungen nützlich, bei denen medizinische Verbindungen von Verunreinigungen ähnlicher Struktur getrennt werden müssen.

Shim-pack Arata LC-Säulen: beispiellose Auflösungen und Peakverläufe bei basischen Verbindungen

LC-Säulen, mit dem Anspruch für basische Verbindungen konzipiert zu sein, scheitern oft daran eine angemessene Auflösung bestimmter Verbindungen zu erreichen. Diese Problematik wurde mit den Shim-pack Arata-Säulen erfolgreich überwunden. Sie beseitigen Schwierigkeiten, wie die Gegenüberstellung von hochpolaren basischen Verbindungen, die Verschlechterung des Peakverlaufs von sauren Verbindungen oder die langen Äquilibrierungszeiten, die bei der geringen Ionenstärke in der sauren mobilen Phase benötigt werden.

Die Shim-pack Arata Peptide C18-Säule liefert eine ausgezeichnete Trennleistung von Peptiden, sogar bei schwacher Ionenpaarung in der sauren mobilen Phase, und

eignet sich somit für MS-Detektoren. Da die Adsorption von Peptiden an Partikel minimiert ist, sichert die Shim-pack Arata Peptide C18-Säule eine hohe Rückgewinnung von Peptiden und liefert eine exzellente Peptidanalyse.

Shim-pack G-Serie: geeignet für allgemeine wie spezielle Anwendungen

Die Shim-pack G-Serie besteht aus GIST, GISS und GIS, die nicht nur für konventionelle Analysen entwickelt wurde, sondern auch für Hochgeschwindigkeits- und präparative Methoden – wegen der unterschiedlichen Partikelgrößen. Zur Shim-pack GIST-Serie gehören Standardsäulen für allgemeine Anwendungen, während Shim-pack GIS-Säulen speziell für die präparative Chromatographie und Shim-pack GISS für MS-Analysen ausgelegt sind.

Shim-pack GIST-Serie: höchste Inertheit und lange Lebensdauer

Säulen der Shim-pack GIST-Serie sind mit neu entwickelten, hochreinen, offenporigen Silica-Kügelchen gepackt. Die überragende chemische Inertheit verbessert nicht nur die analytische Präzision, sondern verlängert auch die Lebensdauer der Säule. Sogar bei starken Ionenverbindungen sorgt sie für symmetrische Peaks. Unerwünschte Adsorption und Peakverbreiterung werden auf ein Minimum reduziert. Die Säule ist imstande, einen breiten pH-Bereich (1-10) abzudecken, und ist damit für viele Anwendungen geeignet.

Darüber hinaus ist die Shim-pack GIST-Serie in verschiedenen Partikelgrößen verfügbar, was es erleichtert, ihre Hochgeschwindigkeitsanalyse auf konventionelle Methoden zu übertragen.

Verglichen mit herkömmlichen C18-Säulen realisiert eine Shim-pack GIST C18-AQ eine starke Retention von hydrophilen, hochpolaren Verbindungen, während sie eine hohe Inertheit und Langlebigkeit in hoch- oder 100 % wässrigen mobilen Phasen beibehält. Darüber hinaus vermindert sie die Adsorption basischer und saurer Verbindungen und erzielt

überragende Peakformen bei der Analyse von Metallkomplexen.

Shim-pack GISS-Serie: Hochgeschwindigkeitsanalyse mit höchster chemischer Inertheit und langer Lebensdauer

Die Shim-pack GISS-Serie verfügt über die gleiche höchste chemische Inertheit und den größeren pH-Bereich wie die Shim-pack GIST-Serie, sorgt aber für rasche Trennungen mit symmetrischen Peaks. Die Optimierung von Oberfläche, Porengröße und chemischer Bindung liefert überragende Peakformen. Deshalb eignen sich diese Säulen ideal für LC-MS(/MS)-Analysen. Zur Shim-pack GISS-Serie gehören auch eine 1,9 µm und eine 3 µm HP-Serie für UHPLC-Analysen.

Shim-pack GIS-Serie: Hohe Remanenz, geringerer Säulen-Rückdruck, hohe chemische Inertheit

Diese Säulen sind mit hochreinem Silikagel gepackt und eignen sich ideal als allgemeine HPLC-Säulen. Äußerst einheitliche Partikel sorgen für eine stabile mobile Phase und einen bemerkenswert niedrigen Druck. Shim-pack GIS-Säulen helfen nicht nur Lösungsmittelkosten zu reduzieren, sondern mindern auch die Systembelastung. Die einheitliche Silica-Oberfläche und stabile chemische Modifikationen sichern zudem eine hohe Analysereproduzierbarkeit.

Eine Shim-pack GIS C18-P ist mit einer an das Polymer gebundenen

Octadecylgruppe versehen, die eine hohe sterische Selektivität für die Trennung von planaren und nicht-planaren Verbindungen bietet, wie Vitamin D2/D3 oder PAKs.

Eine Shim-pack GIS RP-Shield enthält zwischen der Silica-Oberfläche und einer Octadecylgruppe eingebettete polare funktionelle Gruppen, was sie stabil für eine 100%-wässrig-mobile Phase ohne Phasenkollaps macht. Die eingebettete polare funktionelle Gruppe ist auch extrem basen-deaktiviert, was es der Säule ermöglicht, außerordentliche Peakformen für Säuren zu liefern. Sie sorgt zudem für eine einzigartige Selektivität aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen, sodass sie für Trennungen geeignet ist, die nicht

durch andere Methoden umgesetzt werden können, wie hydrophobe Wechselwirkungen oder π - π -Wechselwirkungen.

Shim-pack MC: eine perfekte Säule für die Mikro-LC

Shim-pack MC-Säulen sind kompatibel mit Flussratenbereichen der mobilen Phase, von einem bis zu Dutzenden von Mikrolitern pro Minute, was sie zu idealen Säulen für die Mikro-LC macht.

Weitere Informationen zum C18-Säulensortiment unter: www.shimadzu.eu/hplc-columns

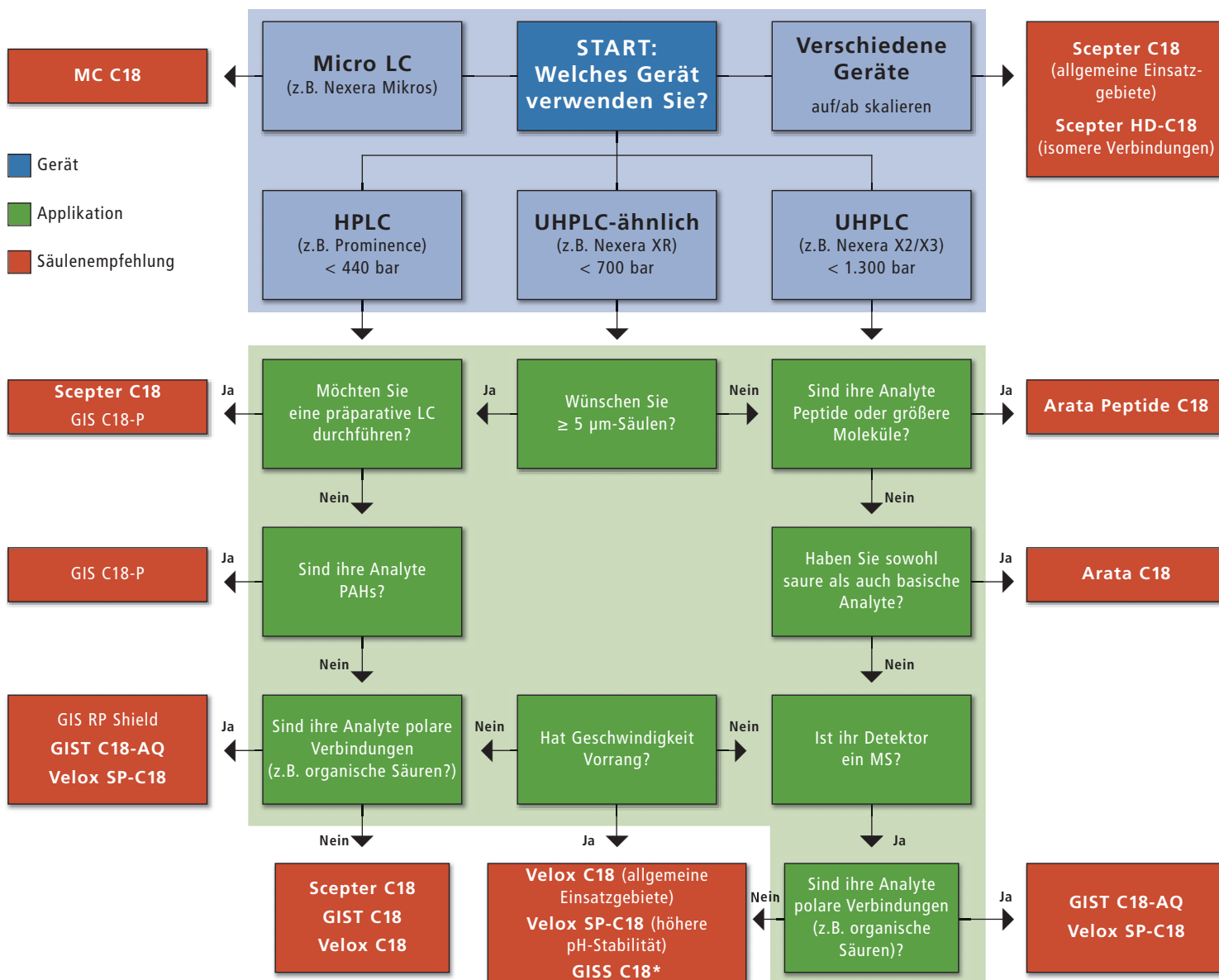
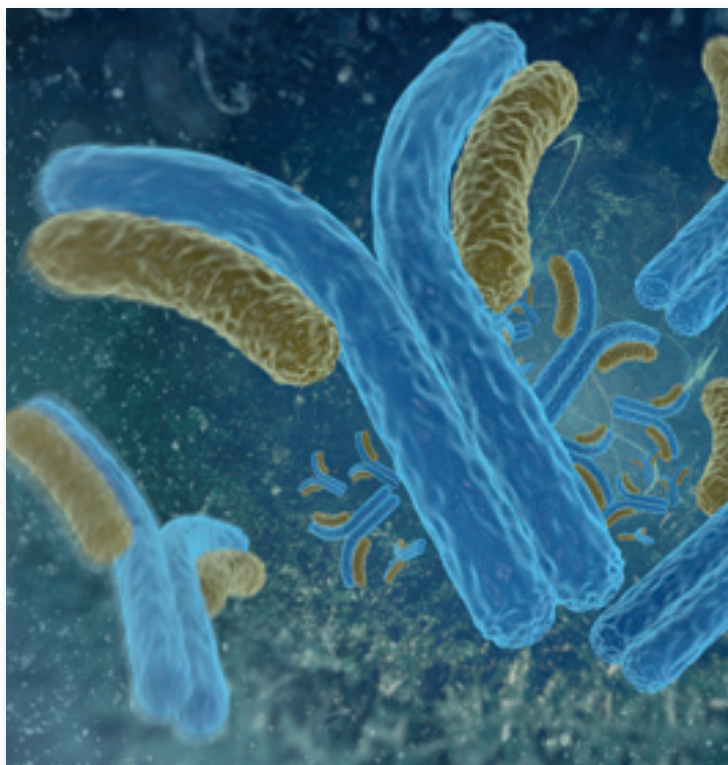


Abbildung 1: Anleitung zur Auswahl der richtigen Säule. *Die Velox-Serie, mit CoreShell-Technologie, ist erste Wahl für Hochgeschwindigkeitsanalysen. Die empfohlenen Säulen für eine MS sind **fett** dargestellt.



Validierte Methode für monoklonale Antikörper-Medikamente

Bewertung der nSMOL-Methodik bei der Bevacizumab-Bestimmung in menschlichem Serum



3D-Illustration von Antikörpern

Entwicklung und Validierung bioanalytischer Methoden für Proteine können durch die mangelnde Verfügbarkeit von Prüf-reagenzien erschwert werden. LC-MS/MS-Analysen erlauben eine Herangehensweise, die allgemeine Reagenzien nutzt. Bei solchen Analysen sind aber das Proben-handling sowie die Aufarbeitung der Proben entscheidende kritische Parameter für die nötige Selektivität und Empfindlichkeit der Messungen.

Die nSMOL-Technologie (nano-Surface and Molecular Orientation Limited Proteolysis) liefert einen einzigartigen Ansatz, um monoklonale Antikörper(IgGs)-Medikamente in biologischen Proben zu quantifizieren. Sie ermöglicht die selektive Proteolyse der FAB-Region im Antikörper mithilfe

eines speziellen Protein-A-Bindungsharzes und Trypsin-immobilisierter Nanopartikel für den Proteinabbau.

Überprüfung der Methode mit einem Medikament zur Krebsbehandlung

Wissenschaftler von Shimadzu haben diese Technik getestet und erfolgreich eine validierte Methode für diverse monoklonale Antikörper-Medikamente entwickelt [1, 2]. Als Teil einer unabhängigen Methodenüberprüfung beurteilte das kalifornische Auftragsforschungsunternehmen Intertek Pharmaceutical Services die Technik und validierte eine LC-MS/MS-Methode für Bevacizumab mithilfe eines Validierungsprotokolls, das mit industriellen Standards und den Regulierungsstan-

Konzentrationen der Qualitätskontrolle (ng/ml)								
Lauf #	100		300		3.000		7.500	
	Gefundene Menge (ng/ml)	Dev. (%)	Gefundene Menge (ng/ml)	Dev. (%)	Gefundene Menge (ng/ml)	Dev. (%)	Gefundene Menge (ng/ml)	Dev. (%)
1	97,1	-2,90	276	-8,00	2.540	-15,3	7.110	-5,20
	91,2	-8,80	264	-12,0	2.910	-3,00	6.960	-7,20
	88,1	-11,9	306	2,00	3.030	1,00	8.370	11,6
	105	5,00	276	-8,00	2.910	-3,00	7.660	2,13
	90,2	-9,80	238	-20,7	2.860	-4,67	7.850	4,67
	79,1	-20,9	292	-2,67	3.110	3,67	8.030	7,07
2	a	a	302	0,667	2.800	-6,67	6.970	-7,07
	107	7,00	311	3,67	3.170	5,67	7.370	-1,73
	132	32,0	271	-9,67	2.720	-9,33	6.990	-6,80
	117	17,0	286	-4,67	2.720	-9,33	7.020	-6,40
	111	11,0	297	-1,00	2.910	-3,00	6.580	-12,3
3	108	8,00	281	-6,33	2.740	-8,67	6.740	-10,1
	118	18,0	289	-3,67	2.750	-8,33	7.610	1,47
	104	4,00	292	-2,67	2.500	-16,7	7.780	3,73
	86,4	-13,6	a	a	3.070	2,33	4.560 b	-39,2 b
	98,5	-1,50	254	-15,3	2.840	-5,33	7.590	1,20
Mittelw.	102		282		2.850		7.380	
sd	14,1		19,9		190		515	
% CV	13,8		7,05		6,65		6,98	
% Dev	2,17		-5,89		-5,04		-1,66	

Tabelle 1: Ergebnisse der Qualitätskontrolle für Bevacizumab in menschlichem Serum.

a = Keine nachgewiesene Antwort des Analyten. Probe wird verworfen.

b = Ausreißer per Dixon-Test; Wert fließt nicht in die statistische Berechnung ein.

dards für pharmazeutische Wirkstoffkandidaten übereinstimmt [3, 4]. Bevacizumab ist ein Medikament zur Behandlung zahlreicher Krebsvarianten.

Um den Nutzen der nSMOL-Technik zu beurteilen, wurde die LC-MS/MS-Analyse von Bevacizumab in menschlichem Serum über den Bereich einer Standardkonzentration von 100 ng/ml bis 10.000 ng/ml entwickelt. Zunächst wurde hierbei dem Standard-Probenbearbeitungsprotokoll gefolgt, das den internen Standard des Kit-Systems verwendet. So wurden bereits Ergebnisse mit hinreichender Genauigkeit und Präzision erreicht. Für die intern entwickelte Chromatographie-Methode ergab der analoge inter-

ne Standard allerdings untypische Messergebnisse bei hohen Analyt-Konzentrationen in eingefrorenen QC-Proben.

Geeignet für eine rasche Methodenentwicklung?

Im nächsten Schritt wurde die Methode auf eine 96-well-Mikrotiterplatten-Methode optimiert. Hierzu wurde ein stabil peptid-markierter interner Standard verwendet. Die Optimierung sollte den Probendurchsatz, die Selektivität und die Leistungsfähigkeit der Methode verbessern. Wesentliche Veränderungen an den entscheidenden Protokollschritten des Shimadzu-Protokolls wurden nicht vorgenommen. Hierbei sollte festgestellt werden, ob sich das

nSMOL Kit-System eignet, um rasch Methoden ohne aufwendige Optimierung zu entwickeln.

Bei Verwendung von 10 µl Serum wurde die untere Grenze der Quantifizierung (LLOQ = lower limit of quantification) mit einem soliden Signal-Rausch-Verhältnis (>20:1 S/N) beobachtet. Die Probenaufarbeitung auf ein 96-well-Mikrotiterplatten-Format umzusetzen, erforderte eine Methodenänderung bei der Aliquotgröße, aufgrund eines unbekannten Empfindlichkeitsabfalls. Hierbei wurden 10 µl als ein mehr als akzeptables Probenvolumen angesehen.

Die Leistungsfähigkeit der Analyse bezüglich der Standardabweichung im Verlauf der Validierung war hinreichend und lag deutlich unterhalb des $\pm 20\%$ Akzeptanzkriteriums (Tabelle 1). Interassay-Abweichungen wurden mit prozentualen Werten im Bereich von -5,89 % bis -1,66 % (2,17 % beim LLOQ) und Interassay-Präzisionswerten bei $\leq 7,05\%$ (13,8 % beim LLOQ) bestimmt. Die Signalintensität von Blankproben lag in allen Fällen unterhalb von 20 % des LLOQ-Wertes, was eine hinreichende Selektivität zeigt.

Keine wesentlichen Matrixeffekte

Eine möglichst geringe Matrixbelastung ist für jede LC-MS/MS-Analyse sehr wichtig. Bei dieser Validierung wurden niedrig- und hochkonzentrierte Qualitätskontrollproben (QC) aus sechs unterschiedlichen Serumchargen menschlichen Serums angefertigt und zum Vergleich ebenso aus einem hyperlipämischen und einem hämolytischen Serum. Die Wahl der QC-Bewertungen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Matrices lag darin begründet, einen strengen Ansatz im Falle der nSMOL-Bewertung zu testen, da die unterschiedlichen Matrices in den QC-Proben sich bei der Probenaufar-

beitung und dem Trypsinabbau unterschiedlich auswirken können und zudem bei der massenspektrometrischen Analyse durch Ionensuppression- oder Verstärkungseffekte zu Abweichungen der Messergebnisse führen können.

Bei den Experimenten zum Matrixeffekt lagen mindestens zwei Drittel der einzelnen Chargen innerhalb von 20 % der Nennkonzentration und die mittlere Gesamtkonzentration lag ebenfalls innerhalb 20 %, was darauf hinweist, dass keine wesentlichen Matrixeffekte vorhanden waren (Tabelle 2). Zusätzlich lagen sowohl die hämolytischen als auch die hyperlipämischen QC-Chargen innerhalb der 20 %-Abweichung der Nennkonzentration (Abbildung 3). Da einige individuelle Chargen außerhalb der 20 % lagen, und da es auch in den gemessenen Konzentrationen der hyperlipämischen Charge einen Ausreißer gab, könnten weitere chromatographische Anpassungen oder Modifikationen bei der Probenaufarbeitung hilfreich sein, um die Leistungsfähigkeit der Methode zusätzlich zu verbessern.

Fazit

Insgesamt erzielte die nSMOL-Methode mit einer nur minimalen Anpassung des Standardverfahrens eine hinreichende Leistungsfähigkeit bei der Validierung der Bestimmung von Bevacizumab in menschlichem Serum. Der Einsatz von nSMOL in verschiedenen Laboren, könnte eine individuelle Anpassung rechtfertigen, und es wird wie bei jeder LC-MS-Analytik die Verwendung stabil markierter interner Standards ausdrücklich empfohlen.

nSMOL ist eine Marke der Shimadzu Corp.

Autoren

Michael H. Buonarati, Ph.D., Senior Director
Dale Schoener, Scientific Director
Intertek Pharmaceutical Services

Charge #	Konzentrationen der Qualitätskontrolle (ng/ml)			
	300		7.500	
	Gefundene Menge (ng/ml)	Dev. (%)	Gefundene Menge (ng/ml)	Dev. (%)
Charge 1	340	13,3	8.160	8,80
Charge 2	393	31,0	8.680	15,7
Charge 3	351	17,0	8.620	14,9
Charge 4	225	-25,0	5.540	-26,1
Charge 5	326	8,67	7.350	-2,00
Charge 6	342	14,0	8.110	8,13
Mittelwert	330		7.740	
sd	56,0		1.180	
% CV	17,0		15,2	
% Dev	9,83		3,24	
A.V.	4/6		5/6	

Tabelle 2: Matrixeffekte für Bevacizumab in einzelnen Anteilen menschlichen Serums. A.V. = Akzeptanzverhältnis.

Probenotyp	Konzentrationen der Qualitätskontrolle (ng/ml)			
	300		7.500	
	Konz. (ng/ml)	Dev. (%)	Konz. (ng/ml)	Dev. (%)
Hyperlipämisches Serum	373	24,3	8.670	15,6
	342	14,0	8.550	14,0
	346	15,3	8.450	12,7
	Mittelwert	354	8.560	
sd	16,9		110	
% CV	4,77		1,29	
% Dev	17,9		14,1	
Hämolisier-tes Serum	301	0,333	7.810	4,13
	252	-16,0	7.610	1,47
	276	-8,00	7.420	-1,07
Mittelwert	276		7.610	
sd	24,5		195	
% CV	8,87		2,56	
% Dev	-7,89		1,51	

Tabelle 3: Matrixeffekte für Bevacizumab in hämolytierten und hyperlipämischen Anteilen menschlichen Serums

Referenzen

- [1.] Iwamoto N., Umino Y., Aoki C., Yamane N., Hamada A., Shimada T. Fully validated LC-MS bioanalysis of Bevacizumab in human plasma using nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis. Drug Metab Pharmacokinet. 31 (2016), 46-50.
- [2.] Iwamoto N., Takanashi M., Umino Y., Aoki C., Hamada A., Shimada T. Application of nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis to LC-MS bioanalysis of Cetuximab. Bioanalysis. 8 (2016), 1009-20.
- [3.] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2018.
- [4.] Jenkins R., Duggan JX., Aubry AF., Zeng J., Lee JW., Cojocar L., Duffield D., Garofolo F., Kaur S., Schultz GA., Xu K., Yang Z., Yu J., Zhang YJ., Vazvaei F. Recommendations for validation of LC-MS/MS bioanalytical methods for protein biotherapeutics. AAPS J. 17 (2015), 1-16.

Shimadzu News Magazine – The App

Applications, Products and Latest News from Shimadzu – Get it now!





Wieviel Fluoreszenz zeigt ein Polymer für eine Qualitätskontrolle?

Polymere und Fluoreszenz – Teil 2: Fluoreszenzspektroskopie von Basispolymeren aus der Industrie



Mikroplastik und Kunststoffe in der Umwelt sind weltweit eine der größten Herausforderungen: für die Menschheit, die Tierwelt und die Umwelt. Am Beispiel von PET-Flaschen wurde gezeigt, dass deren Fluoreszenz-Intensität Rückschlüsse auf die Materialzusammensetzung gibt. Dieser Teil 2 der Artikelfolge erweitert den Fokus auf verschiedene Polymere, und Teil 3 in der nächsten NEWS untersucht die Partikelgröße und ihren Effekt auf die Fluoreszenz.

Wie im Teil 1 in der letzten Ausgabe berichtet, lässt sich Polyethylenterephthalat (PET) mit der Fluoreszenzspektroskopie gut untersuchen, wobei einfach ein Stück der PET-Flaschenwand zur Fluoreszenzbestimmung genutzt wurde. Fluorophore wurden dabei sichtbar, die man vielleicht nicht in den transparenten, farblosen oder leicht bläulichen klaren Polymerstücken vermutet hätte.

Im nächsten Schritt werden Polymere untersucht, die nicht aus dem Verbraucherbereich kommen, sondern „frisch“ oder „recycelt“ direkt aus der industriellen Herstellung. Dazu wurden glasklare und farblose Polymere ausgewählt, wie Polycarbonat (PC), Polystyrol (GPPS), Styrolacrylnitril (SAN) und ein Rezyklat aus Polycarbonat (PCrec).

Die hier aufgezählten industriellen Polymervarianten werden als „Glas-Ersatz“ zum Beispiel in der Industrie eingesetzt, weil sie Härte (Schlagfestigkeit) und Robustheit mit sich bringen. Die Granulate zeigen teils eine zylindrische Form oder leicht trübe Linsenform. Die untersuchten Biopolymergranulate, wie Polylactide (PLA) und Polybutylensuccinat (PBS), waren transparent und farblos, mit leichter Trübung. Die nicht-aromatischen Polymere wie Polypropylen (PPHomo), Polyethylen (PE) und Polyvinylchlorid (PVCsoft) erschienen ebenfalls als farblose, trübe und weiche Granulate in Linsenform.

„Industrielle“ Polymere und wiederverwertete Polymere sind in dieser Applikation alle farblos, transparent oder trübe. Die Erwartung wäre, dass nun alle

Polymere ihre naturgemäße Fluoreszenz zeigen.

Fluoreszenz kann dann entstehen, wenn das Molekül viel Energie aufnehmen kann. Betrachtet man die Moleküle von PC, GPPS und SAN oder dem PET, dann lassen sich in den Strukturen energiereiche Ringsysteme erkennen.

Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Wenn ein Elektron im Grundlevel S_0 -Licht ausgesetzt wird, verändert sich die Energie des Elektrons im Molekül. Dadurch wird es in den angeregten Zustand S_1 mit höherem Energielevel gebracht (Abbildung 2). Dieser angeregte Zustand ist nicht langzeitstabil und verändert sich schnell, in dem es dem Grundzustand entgegenstrebt. Das angeregte Elektron wird deaktiviert unter Ausstrahlung der Energie durch Hitze oder Licht. Das Licht dieses Wegs von Zustand S_1 zu S_0 wird Fluoreszenz genannt. Der zweite aufgeführte Weg der Anregung von T_1 nach S_0 wird Phosphoreszenz genannt. Im T_1 -Zustand befinden sich drei Elektronen auf höherem Energieniveau (angeregter Triplett-Zustand). S_1 ist der Angeregte-Singulett-Zustand (1 angeregtes Elektron auf höherem Energielevel).

Polycarbonate enthalten mehrere phenylbasierende Molekülgruppen, die sehr energiereich sind durch die π -Elektronen der Doppelbindung im Ring. In der Fluoreszenz lassen sich aus einem energiereichen Ringsystem mit harter Strahlung Elektronen in höhere energetische Orbitale (S_1)

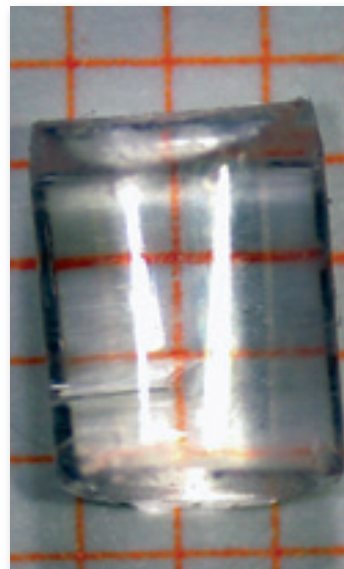
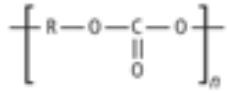


Abbildung 1: Ein typisches Polymergranulat in glasklarer und farbloser zylindrischer Form auf einem Millimeterpapier. Das orangefarbene Gitter im Hintergrund des Granulats entspricht 1 mm pro Quadrat.

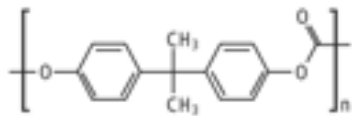
heben. Diese Energielage ist instabil und das Elektron verlässt dieses Orbital unter Aussenden von Photonen (Leuchten = Fluoreszenz).

Die Bedeutung der Phenyl-Gruppe

Die allgemeine Struktur der PC ist



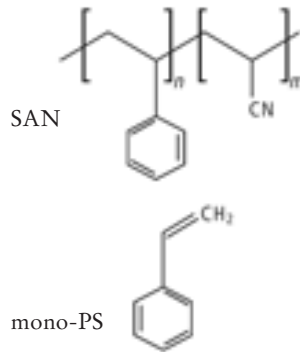
wobei R als Platzhalter für Hydroxyphenole steht. Am bekanntesten ist die PC-Variante, die mit Bisphenol A unter Einsatz von Phosgen hergestellt wird, wobei Phenol als Abfallprodukt anfällt.



Die Molekülstruktur zeigt 2-Ringsysteme (phenolisch) und eine Carbonylgruppe mit der üblichen $\text{C}=\text{O}$ Doppelbindung, die durch die Stellung in der Estergruppe $\text{R}-\text{CO}_2$ elektronisch aufgeweicht wird. Hier stehen genügend π -Elektronen für eine Fluoreszenz zur Verfügung. In dem in dieser Applikation verwendeten Polycarbonat, ist das PC Monomer auf Basis von BPA (Bisphenol A) erstellt worden. Rezyklierte Proben des PC sollten im Sinne einer Qualitätskontrolle zu identifizieren sein, da diese

Spuren fluoreszierender Beimengungen enthalten können.

Rein chemisch besteht SAN aus Styrol und Acrylnitril. Als dominierende Molekülstruktur liegt wieder der Phenylring in der Styrol-Komponente vor.



Da bei allen betrachteten Polymeren die Phenyl-Gruppe eine bedeutende Rolle in der Molekülstruktur spielt, könnte man davon ausgehen, dass die analytischen Fluoreszenzwellenlängenpaare in gleichen Bereichen zu finden sind.

Poly lactide und Polybutylensuccinat sind Kettenmoleküle, die eine Estergruppe enthalten, die mit energiereichen Elektronen ausgerüstet sind, wie es in den Strukturen zu erkennen ist.

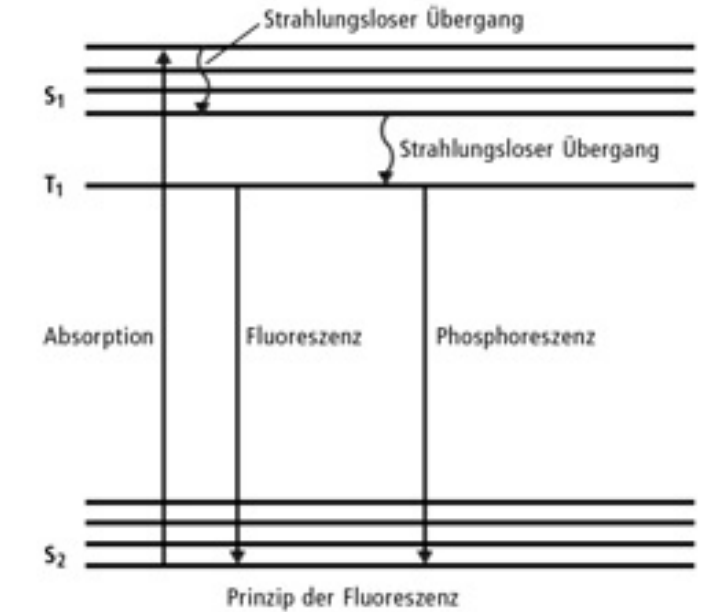
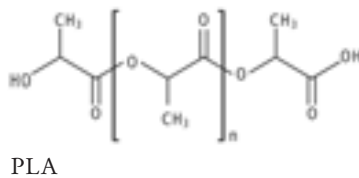
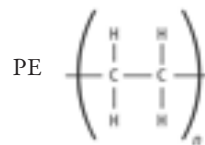


Abbildung 2: Die imaginären Achsen wären hier wie folgt zu sehen: die X-Achse entspricht der Zeit und Wellenlängen, die Y-Achse steht für Energie. Die Anregung durch Licht (Pfeil nach oben) zu der Zeit 00:00 bei vorgegebener Wellenlänge, führt nach kurzer Zeit (Verweilzeit im S1 und Abgabe von erster Energie) zu einem Wellenlängenversatz zu den langen Wellenlängen. Daher gilt: Fluoreszenz braucht eine Anregung/Lichtquelle und erscheint kurz nach der Anregung mit höheren Wellenlängen. Eine weitere Schlussfolgerung ist, dass harte Strahlung reduziert um Energie weicher wird oder sich von kurzweiliger (harter) zu langweiliger (weicher) Strahlung verändert.

PE, PP und PVC sind im Vergleich dazu Kettenmoleküle, bei denen keine überschüssigen energiereichen π -Elektronenverbindungen oder aromatische Elemente für eine Fluoreszenz zur Verfügung stehen.

PE

$$\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2 \right]_n$$


Probenvorbereitung

Die Probengröße und Position in dem Bariumsulfat (BaSO_4)-Bett im Feststoffhalter sind bei den Messungen zu berücksichtigen. Das Experiment mit den Granulaten zeigte, dass die Spaltgeometrie des Lichtspots eine wesentliche Rolle spielt. Die Abbildung des Spalts (Rechteck) zielt genau auf das Zentrum des runden Halters. Der Innendurchmesser des BaSO_4 -Betts ist 2,5 cm. Je nach gewähltem Spalt wird diese runde Fläche entsprechend mehr oder weniger groß rechteckig

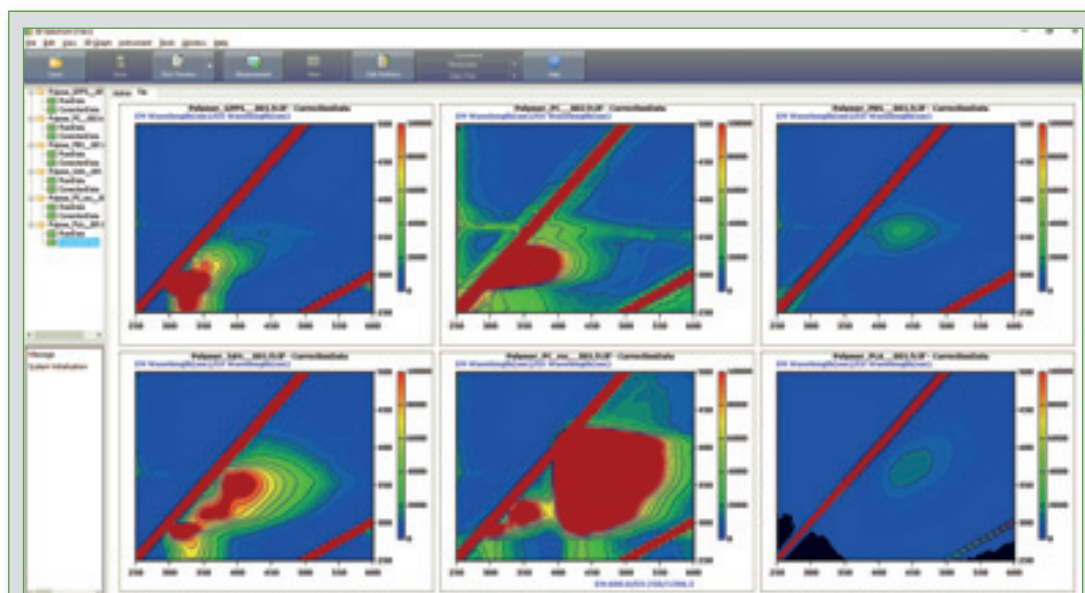


Abbildung 3: Fluoreszenzspektren von sechs unterschiedlichen Polymeren: oben von links nach rechts – GPPS, PC und PBS; unten von links nach rechts – SAN, PCrec und PLA (Positionen der Spots in der EEM siehe Tabelle 1 [Seite 28]).

Polymer	Bereich [nm]	Form [μm]
Industriell	Hotspot (EM/EX)	Pellet
PC	350/310	Zylindrisch
PC rec	305/290	Linse
	350/310	
	435/375	
	435/400	
SAN	315/290	Zylindrisch
	370/315	
	400/350	
GPPS	310/290	Zylindrisch
Biopolymer		
PLA	370/275	Linse
	440/360	
PBS	430/360	Linse
Nicht aromatisch		
LDPE	285/260	Trübe Linse
	330/290	
PP homo	300/280	Trübe Linse
	330/300	
PVC soft	405/325	Trübe Linse
	445/360	

Tabelle 1: Aktive Fluoreszenzzonen (Hotspots) von den Polymergranulaten in unterschiedlichen Erscheinungsformen – Granulat zylindrisch und linsenförmig

ausgeleuchtet. Das Granulat wurde im Zentrum des Halters eingebettet und mit einer Quarzplatte verschlossen. Dies wird erwähnt, da die Granulate nicht eben sind und diese sich aufgrund ihrer Größe und Härte nicht mit dem BaSO_4 homogenisieren lassen. BaSO_4 ist hier in der Funktion als Fixierpulver.

Auswertung der Messungen

Gemäß der beschriebenen Natur zeigen die verschiedenen Polymere auch verschiedene Fluores-

zenz. In den Abbildungen 3 (Seite 27) und 4 sind die ermittelten EEM-Matrizen (Anregungs [Excitation]-Emission-Matrix) dargestellt.

Auffällig ist, dass sich in allen Polymeren Fluoreszenzaktivitäten finden ließen. Die erwartete Aussage „keine Fluoreszenz mit LDPE und PP“ wurde nicht erfüllt. Es scheinen hier bereits Zuschlagstoffe enthalten zu sein, die eine Fluoreszenz begünstigen. Der Vergleich zwischen PC und PCrec ist ein Beispiel, das zeigt, dass mit Hilfe eines Zuschlags-

stoffs (zum Bleichen) das Rezyklat farblos und transparent erscheinen soll (Tabelle 1).

Fazit

Jedes hier eingesetzte Polymer weist ein eigenes Fluoreszenzspektrum auf. Bei den industriellen Kunststoffen PC, GPPS, SAN wird die Fluoreszenz von der Fluoreszenzaktivität des Phenylrings bestimmt, während die Kettenmoleküle der Kunststoffe PLA und PBS unter anderem durch die Ester fluoreszieren. Gemäß des Molekülaufbaus und sterischer Hinderungen und

unterschiedlicher Anregungspositionen in dem kompakten PLA-Molekül weist dieses dem Bedarf an Energie entsprechend harte Strahlung auf, während das PBS mit langen CH_2 -Ketten weniger harte Strahlung benötigt. Die nicht-aromatischen Polymere wie LDPE, PPhomo und PVCsoft weisen Fluoreszenz auf, obwohl man in diesen π -Elektronen armen Stoffen keine erwartet.

Die Fluoreszenzspektroskopie lässt sich somit einfach für eine Qualitätskontrolle einsetzen, um „Unsichtbares“ sichtbar zu machen.

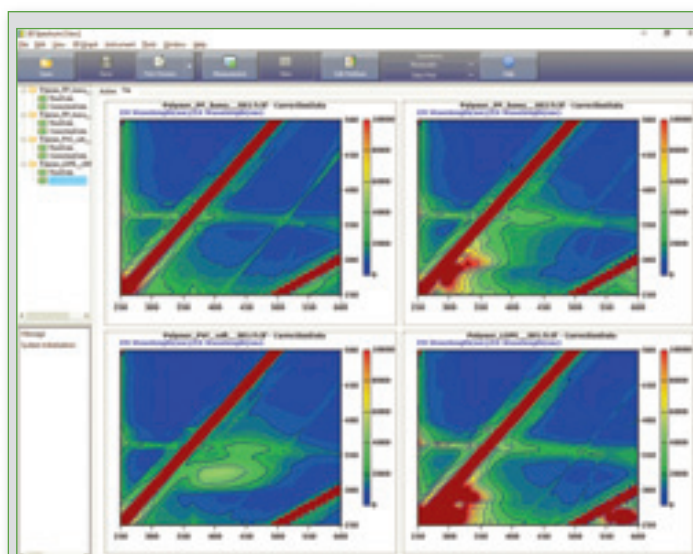


Abbildung 4: Sicht für langkettige nicht aromatische Polymere bei gleicher Skalierung der Intensität. Oben links liegt keine Probe vor – es ist die Kontroll-EEM von der Quarzplatte über dem BaSO_4 -Bett, oben rechts PPhomo, unten links PVCsoft und unten rechts LDPE (Low density Polyethylen).

NEWS – gedruckt und digital



Shimadzu Digital Classrooms. Ganz nach Ihrem Interesse – wählen Sie Ihre Wunschthemen und verschaffen Sie sich Vorsprung mit unseren Webinaren.
www.shimadzu.eu/support/digital_classrooms



@ShimadzuEurope



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