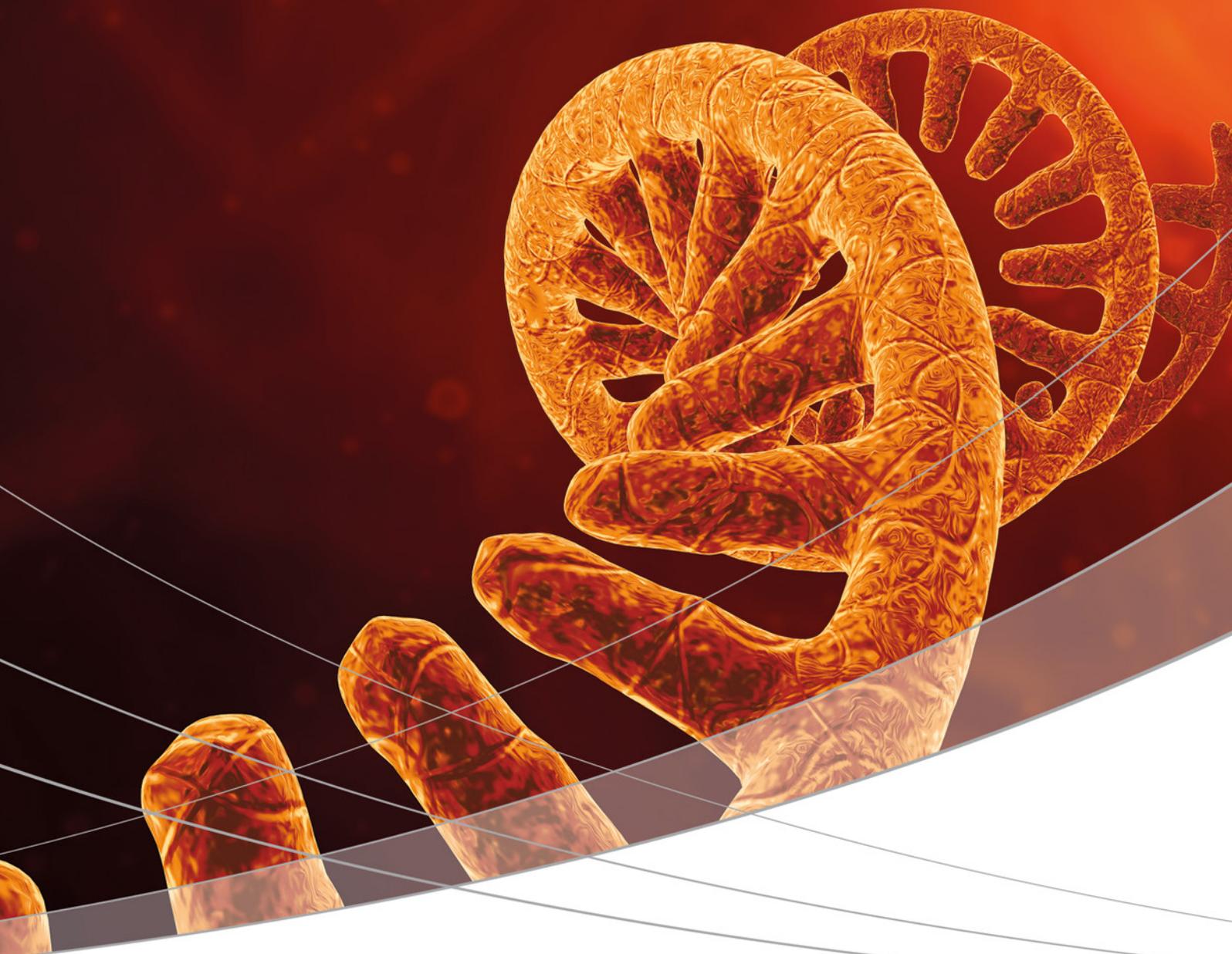


secrets of science

magazine

01 / 2022



Neuer Ansatz für Epitranskriptomik

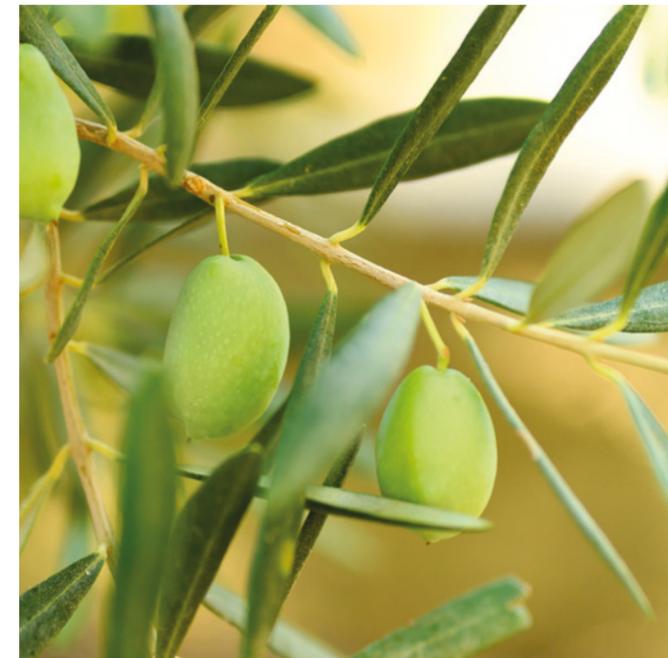
Quantifizierung von RNA-Methylierungen mit der LC-MS/MS

Kein Grund zur Skepsis

Die neuen Shim-pack Scepter-Säulen für LC/LCMS sind robust und äußerst pH-stabil

Smallest giant

TOC-1000e Online-Analysator – spezialisiert auf Reinstwasseranwendungen



Olivenernte und ihre Wirkung auf die Gesundheit
GCMS-QP2010 SE-Anwendung zur Quantifizierung von Linol- (LA) und Linolensäure (ALA) in Olivenöl **Seite 14**



Neuer Ansatz für Epitranskriptomik
Quantifizierung von RNA-Methylierungen mit der LC-MS/MS **Seite 46**



Digitale Version
Mehr Insights, wie zusätzliche Chromatogramme und inhaltliche Details, bietet die digitale Ausgabe



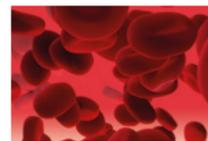
Kein Grund zur Skepsis
Die neuen Shim-pack Scepter-Säulen für LC/LCMS sind robust und äußerst pH-stabil

06



Mit Oligonucleotiden gegen COVID-19
Über die Synthese, Scale-up und Sequenzbestätigung

12



Präzisionsmedizin: Sicherheit und Effizienz von Therapien
Vereinfachte Medikamentenspiegelbestimmung mit DOSINACO-Kits für Gerinnungshemmer

17



And the awards go to...
Red Dot Design Award und iF Design Award für Shimadzu-Produkte

18



Smallest giant
TOC-1000e Online-Analysator – spezialisiert auf Reinstwasseranwendungen

20



Auf die Säule kommt es an
Shim-Pack-Säulen ermöglichen, schwierig zu trennende Substanzen aufzutrennen

24



Gemeinsam stärker
HPLC und SFC: Methodenentwicklung für chirale Verbindungen mit der Nexera SFC

31



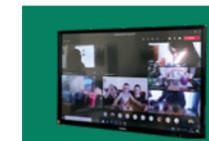
Kleines Paket, große Wirkung
Die Bestimmung von Anionen in Trinkwasser mittels Ionenchromatographie

34



Es grünt so grün ...
Mit Fluoreszenz dem Mikroplastik auf der Spur

38



Der Wandel als Chance
Shimadzu bietet auch virtuelle Schulungen an

42

GEHEIM- NISSE DER WISSEN- SCHAFT

Kundenmagazin erstrahlt in neuem Glanz

Ein neuer Name, ein neues Design – doch die Inhalte wie gewohnt fachlich versiert. Das Shimadzu „Secrets of Science“ Magazin löst die bisherige Shimadzu NEWS ab. Ob tatsächlich die Geheimnisse der Wissenschaft gelöst werden können, bleibt spannend.

Mit technischen Trends, wie Automatisierung, Miniaturisierung und Kopplungstechniken, hat Shimadzu in den letzten Jahren wesentliche Impulse im Markt gesetzt und initiiert neue Entwicklungen. Besonders die Digitalisierung bietet technologisches sowie kreatives Potenzial. Das gilt für die Medizintechnik und die instrumentelle Analytik ebenso wie für das Kundenmagazin von Shimadzu. Als Stimme in die Scientific Community ist auch hier Weiterentwicklung gefragt. Unter dem neuen Titel „Secrets of Science“ ermöglicht es noch mehr Insights und Interaktion.

Zwei auf einen Streich

Zukünftig erscheint das Magazin in zwei Versionen – einmal als Printausgabe und einmal in digitaler Form. Die Printversion eignet sich für den schnellen Überblick und ist durch die Gestaltung der Beiträge auch für Produkt- und Marktfremde interessant.

Mehr Insights, wie zusätzliche Chromatogramme und inhaltliche Details, bietet die digitale Ausgabe – so optimiert, dass sie sich perfekt auf mobilen Endgeräten darstellen lässt. Dort finden auch Experten die Einblicke für ihre fachspezifische Vertiefung. Einfach zu erreichen über den QR-Code im Inhaltsverzeichnis der Printversion.

Leichte Zuordnung, schneller Zugriff

Auch die Kategorisierung der Inhalte wurde angepasst. Es gibt Kategorien mit unterschiedlichen Themenschwerpunkten – von produkt- und applikationsfokussierten Artikeln, über Weiterentwicklungen bis hin zu Events, Interviews sowie Service-Themen und Tipps & Tricks.

Dem Ursprung treu bleiben

Wie bislang die Shimadzu NEWS, gibt es die „Secrets of Science“ drei Mal im Jahr in Deutsch sowie Englisch. Gastautoren aus Wissenschaft und Industrie geben Insights in ihre Aufgabenstellungen und Applikationen. Die Einteilung in Produkt- und Marktkategorien besteht fort und erhält eine neue Darstellung.

Viel Spaß beim Entdecken des neuen Magazins!

Anregungen und Kritik sind herzlich Willkommen.



Kein Grund zur Skepsis

Die neuen Shim-pack Scepter-Säulen für LC/LCMS sind robust und äußerst pH-stabil

Dr. Carola Thiering, Shimadzu Europa GmbH



Die neuen Shim-pack Scepter-Säulen mit Hybridmaterialien vereinen die Vorteile von silika- sowie polymerbasierten Säulen: sie sind effizient, druckstabil und tolerieren weite pH-Bereiche. Zudem gibt es sie als metallfreie Varianten, etwa für sensitive LC/MS-Messungen von biologischen Proben oder chelatisierenden Substanzen.

»Die Trennsäule ist ein High-Tech-Produkt und nicht eine Röhre, die mit Schlamm gefüllt ist.«

Klaus K. Unger, Stefan Lamotte: „Chromatographie: Trennsäulen in der analytischen HPLC“ [1]

Vielmehr ist sie das Herzstück einer Analyse, zusammen mit dem Eluenten, und je nach Analyseziel bieten sich spezifische Säulen an. In ihrem Aufbau und ihrer Packung fließen interdisziplinäres Wissen zusammen; ihre Selektivität beispielsweise hängt von zahlreichen Material- und Verfahrensparametern ab.

Um ein optimales Leistungsspiel aller Teile einer HPLC-Anlage zu unterstützen, spielen nahtlose Qualitäts- und Transportketten besonders in High-Tech-Anwendungen eine wichtige Rolle. Die Nutzer profitieren dabei von einer Zulieferung aus einer Hand und den aufeinander abgestimmten Komponenten und Prozessen. Daher sind Zubehöre und Consumables ein integraler Be-

standteil einer Komplettlösung von Shimadzu.

Mit einer neuen Serie von LC-Säulen erhalten die Anwender ein Mehr an Flexibilität. Die neuen Säulen aus der Shim-pack Scepter-Serie sind mit Hybridmaterialien gepackt und als Metall- sowie metallfreie Varianten erhältlich. Sie ergänzen das silika-basierte, Core-Shell- und Polymer-säulen-Sortiment und decken eine größere Menge an Applikationswünschen als zuvor ab. Die wesentlichen Vorteile von Hybridmaterialien sind ihre pH-Stabilität und Robustheit. Außerdem sind sie in vielen verschiedenen Partikelgrößen sowie Dimensionen verfügbar und somit zwischen UHPLC, HPLC und präparativer LC skalierbar. →



Organo-Silika-Hybrid-Säulen

Aber wie genau kann man sich eigentlich Organo-Silika-Hybridmaterial vorstellen? Die Partikel sind organisch/anorganische silika-basierte Hybridmaterialien, oder anders ausgedrückt: sie basieren auf Hybrid-Silika-Gel (Abbildung 1), für deren Produktion Tetraethoxysilan und 1,2-bis(triethoxysilyl)ethan als Edukte verwendet werden.

Das entstandene Hybridmaterial ist schematisch gezeigt. Dabei stellt die obere Schicht die Oberfläche dar und die untere die interne Struktur des Partikels. Es wird deutlich, dass die Siliziumatome nicht nur durch ein Sauerstoffatom verbunden sind, sondern teilweise auch durch eine Ethylenbrücke. Durch diese Kombination von Silikagel mit Organikanteilen wird das Material sehr robust und pH-stabil.

Auch die Silanolgruppen an der Oberfläche werden zum Teil durch eine Ethylenbrücke ersetzt. Die hierdurch erreichte Abnahme der Silanol-Gruppen an der Oberfläche ist maßgeblich für die Erhöhung der Stabilität und Inertheit des Kieselgels verantwortlich, da es gegenüber chemischen Angriffen abgeschirmt ist.

Dadurch sind die Hybridmaterialien vielseitig für die HPLC einsetzbar. Vorteile sind

- eine hohe Lebensdauer, sogar unter harschen Bedingungen wie einem hohen pH-Wert oder einer hohen Temperatur,
- generell eine hohe chemische und physikalische Beständigkeit,
- eine gute Peakform für alle Arten von Verbindungen und
- Reproduzierbarkeit.

Die Selektivität ist auch über verschiedene Partikelgrößen gleich, daher ist der Methodentransfer zwischen UHPLC und HPLC sehr einfach. Durch die präparativen Säulen im Portfolio ist der Methodentransfer sogar auf die präparative LC übertragbar.

Leichter Methodentransfer; sensitive Messungen

Säulen mit Hybridmaterialien vereinen die Vorteile von silika-basierten und von polymerbasierten Säulen: Sie sind effizient und druckstabil, aufgrund ihrer mechanischen Stabilität. Zudem weisen sie eine hohe Toleranz gegenüber basischen, mobilen Phasen auf und eine geringe Silanol-Azidität. [1]

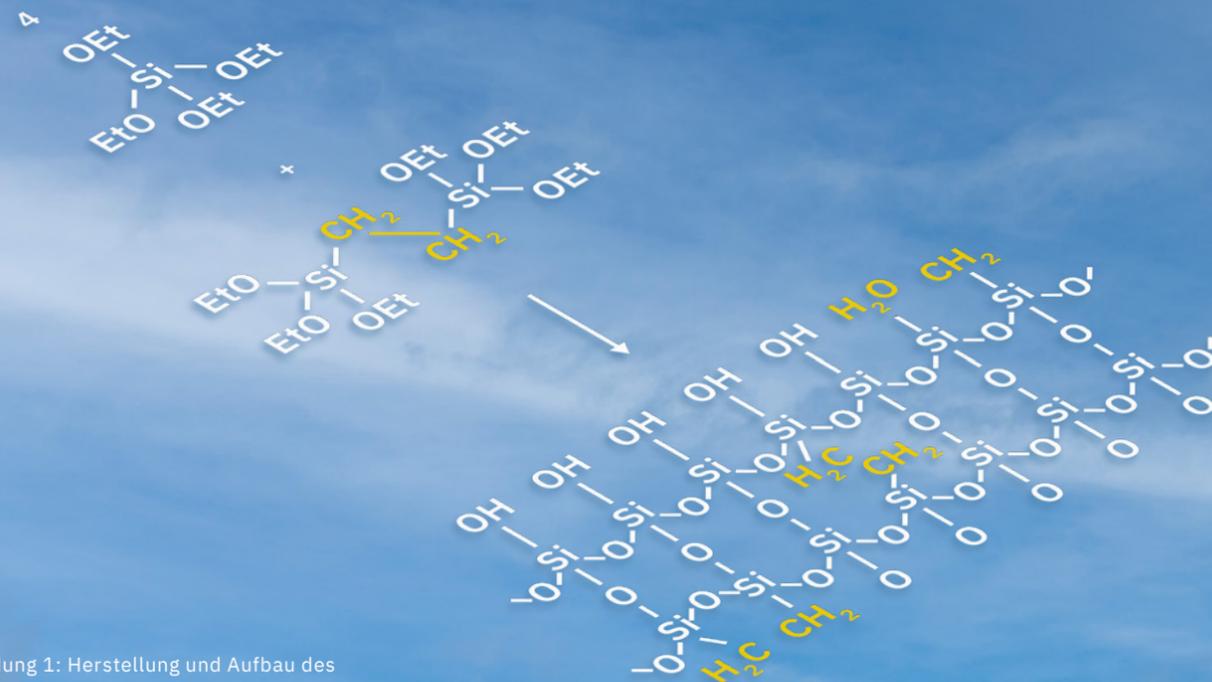


Abbildung 1: Herstellung und Aufbau des Hybrid-Silika-Gels [1]



Abbildung 4: Die Shim-pack Scepter-Säulen bieten eine hohe Stabilität, auch unter niedrigen sowie hohen pH-Werten. Peaks: 1: Saccharin (pKa = 2,2), 2: Dextrometorphan (pKa = 8,3), 3: Amitriptylin (pKa = 9,4), 4: n-Butylparaben (pKa = 8,3), 5: Ibuprofen (pKa = 4,4).

Ein weiterer Vorteil ist, dass es das Scepter-Portfolio auch mit metallfreien Varianten gibt, die sehr effektiv für sensitive LC/MS-Messungen von chelatisierenden Substanzen sind, die ansonsten starkes Tailing zeigen würden. Also kein Grund zur Skepsis – denn insgesamt bilden die Shim-pack Scepter-Säulen ein großes Sortiment und sind durch das Hybridmaterial äußerst robust und langlebig.

Shim-pack Scepter-Portfolio: für zahlreiche Applikationen mit diversen Substanzen

Das Scepter-Portfolio deckt verschiedenste stationäre Phasen und Dimensionen ab. Zu jeder stationären Phase gibt es außerdem eine passende Vorsäule mit Halter. In Tabelle 1 sind alle Phasen mit den jeweiligen Spezifikationen gezeigt.

Alle Säulen sind robust innerhalb eines weiten pH-Bereichs. In den Chromatogrammen in Abbildung 4 (Messparameter und Methoden werden im Folgenden erläutert) wird die Stabilität deutlich. Die Ergebnisse der Analysen auf den verschiedenen, stationären Phasen sind dort bei verschiedenen pH-Werten (2,9; 6,1 und 9,1) gezeigt.

Da hier dieselbe Methode für alle Phasen bei verschiedenen pH-Werten verwendet wird, sind nicht immer alle Substanzen optimal voneinander getrennt. Bei den Chromatogrammen, die mit dem roten Kreis markiert sind, sind alle Substanzen voneinander getrennt. Die Chromatogramme mit dem blauen X weisen coeluiierende oder nicht bestimmbare Peaks auf. Insgesamt wird deutlich, dass die Säulen eine hohe Stabilität bei verschiedenen pH-Bereichen zeigen und dennoch eine sehr gute Trennleistung haben. →

Auch die verschiedenen Retentionsmechanismen werden in Abbildung 4 deutlich: Die HD-C18 zeigt bei kritischen Substanzen eine bessere Trennleistung als die C18. Die C8-Phase zeigt wie erwartet weniger Retention als die C18-Phasen, wohingegen die Phenyl- wie auch die PFPP-Phase ganz andere Trennmechanismen haben, wodurch sich hier teilweise die Retention umkehrt bzw. stark verschiebt. Zusammenfassend bietet das Shim-pack Scepter-Portfolio die passende Säule für zahlreiche Applikationen mit verschiedensten Substanzen.

Messparameter und Methoden

Säulen: Shim-pack Scepter (50 mm x 2,0 mm I.D., 5 µm)
 Mobile Phase: 0,1 min: 95 % H₂O, 5 % ACN
 → 10 min: 10 % H₂O, 90 % ACN
 10-15 min: 10 % H₂O; 90 % ACN
 Ofentemperatur: 25 °C
 Flussrate: 0,2 ml/min
 Detektion: 230 nm

Metallfreie Säulen im Sortiment

Die verschiedenen Säulen des Shim-pack Scepter-Portfolios sind auch metallfrei erhältlich und runden das Angebot ab. Es umfasst an metallfreien Säulen nicht nur die auf silikagel-basierte G-Serie, sondern auch die organosilikahybrid-basierte Scepter-Reihe.

Den schematischen Aufbau der metallfreien Säulen zeigt Abbildung 5. Dort ist gut zu erkennen, dass die Partikel als Füllmaterial nicht direkt mit dem Edelstahlkörper in Kontakt kommen, da dieser mit einer Schicht aus Polyetheretherketon (PEEK) ummantelt ist. Sie betrifft auch die Verbindungsstücke der Säule, sodass die zu untersuchende Probe nicht mit Edelstahl in Kontakt kommt.

Gerade bei biologischen und chelatisierenden Proben ist dies ein großer Vorteil. Sie wechselwirken mit Metall und würden deshalb ohne PEEK-Ummantelung keine symmetrische Peakform und starkes Tailing zeigen, oder sogar eine Abnahme der Signalintensität durch Adsorption. Die Kombination aus Edelstahlkörper und PEEK-Ummantelung ist hierbei sehr gut: Der Edelstahlkörper ist stabil und bietet der Säule so eine hohe Druckstabilität, wohingegen die PEEK-Ummantelung die benötigte Inertheit mitbringt. Die metallfreien Säulen sind auch für LCMS-Analysen sehr gut geeignet und zeigen dort eine hohe Intensität.

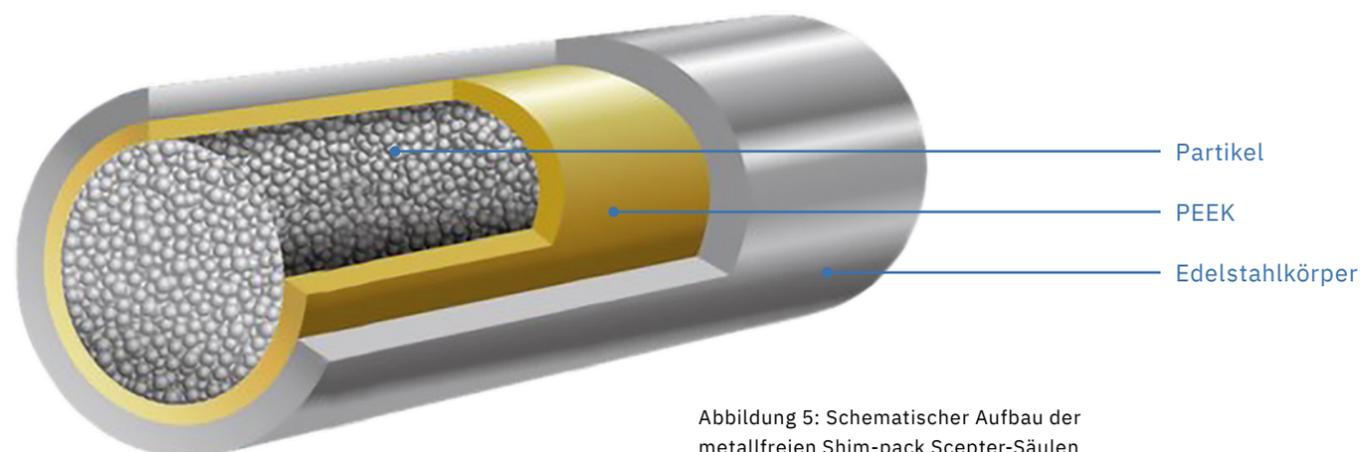


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der metallfreien Shim-pack Scepter-Säulen

Shim-pack Scepter	Umgekehrte Phase						HILIC
	C18	HD-C18	C8	C4	Phenyl	PFPP	Diol-HILIC
Ligandentyp	Trifunktional C18 Allgemeiner Standard Typ	Trifunktional C18 Typ mit hoher Belegungsichte	Trifunktional C8	Trifunktional C4	Trifunktional Phenylbutyl	Trifunktional Pentafluorophenylpropyl	Trifunktional Dihydroxypropyl
Partikel	Organic Silica Hybrid						
Partikelgröße	1,9 µm, 3 µm, 5 µm						
Porengröße	12 nm	8 nm	12 nm	30 nm	12 nm		
Endcapping	Proprietär					Keine	
pH Bereich	1 - 12		1 - 10			1 - 8	2 - 10
100% wässriger Zustand	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	N/A
USP Klassifizierung	L1	L1	L7	L26	L11	L43	L20

Tabelle 1: Die verschiedenen stationären Phasen der Shim-pack Scepter Serie mit den jeweiligen Spezifikationen

Anwendung

Wann ist es sinnvoll, in eine HPLC-Säule mit Hybridmaterial wie die Shim-pack Scepter zu investieren? Wie so oft richtet sich dies nach der Applikation. Die Scepter-Serie zeigt vor allem ihre Vorteile, wenn während der HPLC-Analyse harsche Bedingungen herrschen. Sie bietet Stabilität auch bei einem hohen pH-Wert und hohen Temperaturen. Auch für Methodenentwicklung oder Methodenskalierung zwischen UHPLC, HPLC und präparative LC sind die Scepter-Säulen bestens geeignet, da sie in vielen Dimensionen und Partikelgrößen verfügbar sind und dabei die gleiche Trennleistung liefern.

Hinweis

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



Mit Oligonucleotiden gegen COVID-19

Über die Synthese, Scale-up und Sequenzbestätigung

Dr. Tom Brown jun., Leiter von ATDBio, Southampton / Oxford

Das britische Unternehmen ATDBio ist darauf spezialisiert, qualitativ hochwertige Oligonucleotide für anspruchsvolle Anwendungen herzustellen, einschließlich für COVID-19-Testkits. Um die Nachfrage nach Oligonucleotiden seit Pandemiebeginn zu bedienen, hat ATDBio seine Produktion erweitert und nochmals mehrere LC-Systeme von Shimadzu erworben. Das ermöglicht ATDBio, Oligonucleotide in unterschiedlichen Maßstäben zu synthetisieren – von kleinsten bis zu sehr großen Mengen an Primern und Sonden für COVID-19-Tests – und wird so auch weiterhin einen signifikanten Beitrag zur Bekämpfung der Pandemie leisten.

Synthetische Oligonucleotide, kleine Abschnitte von Einzelstrang-DNS und -RNS, hergestellt über eine chemische Synthese, haben eine wichtige Bedeutung in der Molekularbiologie, der Genetik, der Medizin und darüber hinaus. Als Hauptkomponenten in COVID-19-Testkits haben sie für Aufmerksamkeit gesorgt.



Dr. Tom Brown jun., Leiter von ATDBio

Effektive Lösungen für komplexe Probleme

ATDBio, mit Sitz in Southampton und Oxford, nimmt wahr, wie sich das Tätigkeitsfeld des Unternehmens seit Beginn der Pandemie verändert. Dr.

Tom Brown jun., Leiter von ATDBio, erklärt: »Alle gegenwärtigen genetischen COVID-19-Testverfahren benötigen synthetische Oligonucleotid-Primer und -Sonden. Wir unterstützen unsere Kunden aus Kliniken und Privatunternehmen, einfachere, schnellere und genauere diagnostische Verfahren zu entwickeln. Wir wurden seit Beginn der Pandemie mit Anfragen überschwemmt, und wir fahren unser Oligonucleotid-Synthesepotenzial drastisch hoch, um die Nachfrage zu decken.«

Der Ruf von Shimadzu hinsichtlich Robustheit und Langlebigkeit der Produkte sowie Innovationsstärke und Kundenservice waren für ATDBio entscheidend, Nexera Prep LC-Systeme für seinen Produktionsablauf auszuwählen.

Dr. Brown: »Fast in jedem Labor, in dem ich gearbeitet habe, scheint ein bewährtes UV/Vis-Spektrometer noch immer ohne Probleme seine Dienste zu tun. Ich erinnere mich auch, dass ich als Student 2002 vom



Dr. Asha Brown, Leiterin von ATDBio

Gewinn des Nobelpreises für Shimadzu gelesen habe. Später besuchten wir das Shimadzu-Labor in Milton Keynes, trafen einige Mitarbeiter und waren von ihrem Fachwissen beeindruckt, der Bereitschaft, unsere Herausforderungen zu verstehen, und der Fähigkeit, für uns ein System zu finden, das ideal

zu unserem Bedarf passt. Das Verständnis von Shimadzu für unsere Bedürfnisse, zusammen mit der Lieferung und Unterstützung einer zuverlässigen Lösung, übertrafen jede unserer zuvor gemachten Erfahrungen.«

Dr. Brown fügt hinzu »Im Rahmen unserer jüngsten Erweiterung haben wir zusätzliche LC-Systeme von Shimadzu angeschafft. Wir synthetisieren Oligonucleotide in unterschiedlichen Maßstäben, von sehr kleinem Umfang für Forschungszwecke bis zu sehr großen Mengen an qPCR sowie LAMP-Primern und -Sonden für COVID-19-Tests. Fähig zu sein, zuverlässig über eine große Bandbreite von Synthesemengen zu arbeiten, ist für uns essenziell.«

Schnelle Analyse von Nanokonstrukten mit minimaler Probenaufreinigung

ATDBio engagiert sich auch maßgeblich in Forschung & Entwicklung, was das Unternehmen als wesentlich an-

sieht, um an der Spitze im Segment Nucleinsäuren zu bleiben. Dr. Brown: »Zu jeder Zeit sind wir in verschiedenen Forschungsprojekte eingebunden. Ein aktuelles beinhaltet die DNS-Nanotechnologie, die Oligonucleotide als Baumaterialien einsetzt, um große DNS-Nanokonstrukte zu erzeugen, die das Potenzial zum Wirkstoffanwendungssystem haben.«

ATDBio wird weiterhin dazu beitragen, die COVID-19-Pandemie zu bewältigen sowie die Bereitschaftsplanung für zukünftige Ausbrüche zu verbessern. Dabei spielt auch Shimadzu eine Rolle.

Hinweis

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



Olivenöle und ihre Wirkung auf die Gesundheit

GCMS-QP2010 SE-Anwendung zur Quantifizierung von Linol- (LA) und Linolensäure (ALA) in Olivenöl

PhD. Joanna Grzelczyk, PhD. Ilona Gałązka-Czarnecka,
Prof. PhD. hab. Grażyna Budryn, PhD. Joanna Oracz,
Lodz University of Technology, Institute of Food Technology
and Analysis, Poland

Sie sind wichtig für den Stoffwechsel des menschlichen Körpers, für Knochen, Haut und Haargesundheit: die Omega-6-Fettsäuren. Als ein essentieller Nährstoff müssen sie von außen zugeführt werden. Sie kommen in vielen Lebensmitteln vor, insbesondere in pflanzlichen Ölen und Nüssen. Zur Familie der Omega-6-Fettsäuren zählen zum Beispiel die alpha-Linolensäure (ALA) und die namentlich ähnliche Linolsäure (LA). Spielt die alpha-Linolensäure eine Rolle bei Entzündungsprozessen und deren natürlicher Bekämpfung, so ist Linolsäure wichtig für die Hautgesundheit. Doch wie lange entfalten sie ihre volle Wirkung durch die Lebensmittel, wie lange sind sie darin stabil?

Diesen und ähnlichen Fragen geht das Institut für Lebensmitteltechnologie und -analyse nach, das an der Technischen Universität Lodz in Polen zu Hause ist. Es analysiert bioaktive Verbindungen in Nahrungsmitteln während Wachstum, Zucht, Lagerung, Verarbeitung so-

wie Aufbewahrung und Vertrieb. Brot, Fleisch, Gemüse und Früchte ebenso wie Kaffee werden dabei bezüglich ihrer Wirkung gegenüber Zivilisationskrankheiten beleuchtet. Derzeit untersuchen die Forscher die Stabilität von Omega-Fettsäuren und entwickeln regelmäßig neue Analyse-Techniken zu diesem Thema.

Antioxidative Eigenschaften von ALA und LA in Olivenöl

Olivenöl ist die vorrangige Quelle von „gesunden Fetten“. Es wird u.a. als Dressing für Salate, als Brotaufstrich oder als Kurzbratfett verwendet. Olivenöl ist für seinen hohen Gehalt an Antioxidantien bekannt, die sogenannten freien Radikalen entgegenwirken, also bestimmten Sauerstoff- oder Stickstoffverbindungen, die die Hautalterung und die Entstehung bestimmter Krankheiten begünstigen.

Linol- (LA) und Linolensäure (ALA) sind als starke Antioxidantien bekannt und müssen mit der

täglichen Nahrung aufgenommen werden, um die korrekte Funktion des Körpers effektiv zu unterstützen. [1] Der wissenschaftlichen Forschung folgend schützen ALA und LA den Organismus und helfen gegen Arteriosklerose, Entzündungen, neurodegenerative und Krebs-Erkrankungen. Interessanterweise wurde beobachtet, dass ALA die Bildung von Krebsmetastasen bremst. [2]

Leider gehören ALA und LA nicht zu den stabilen Verbindungen. Deshalb ist es wichtig, Produkte, die diese gesundheitsfördernden Inhaltsstoffe (Nutraceuticals) enthalten, sorgfältig zu lagern. Wegen ihrer chemischen Instabilität ist es wichtig, Olivenöle an dunklen und kühlen Orten aufzubewahren. In einer aktuellen Studie hat das Institut die ALA- und LA-Gehalte in diversen Olivenölen, welche mit und ohne stabilisierende Additive gelagert wurden, verglichen und den Einfluss unterschiedlicher Verpackungen auf die Qualität des Öls nach dem Öffnen untersucht.

Material, Probenaufbereitung und Analyse

Die Forscher untersuchten fünf bei polnischen Einzelhändlern gekaufte Olivenöle der Qualitätsstufe „extra virgine“. Drei Öle kamen aus Italien, zwei aus Griechenland. Die italienischen Produkte enthielten 98 % kalt gepresstes natives Olivenöl und 2 % natürliche Additive: Extrakte von Zitrone, Basilikum und Pilzen aus dem Ökolandbau. Sie waren in leicht getöntem, grünem Glas abgepackt. Die griechischen Öle enthielten 100 % kalt gepresstes Olivenöl „extra virgine“. Eines war in dunklem Glas abgefüllt, dabei komplett etikettiert, das andere in einem Kanister (synthetisches Material C/LDPE). Alle Proben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Öle wurden mit mehreren Lösungen für die Nachweisprozedur vorbereitet und sofort danach mit einem GCMS-QP2010 Massenspektrometer analysiert. (Nähere Spezifikationen siehe Digitalversion des Artikels.) →



Ergebnisse

Die Analyse ergab, dass der höchste LA-Gehalt in 100 %-igem Olivenöl gefunden wurde, und der höchste ALA-Gehalt im Olivenöl mit dem Basilikum-Additiv. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass alle in dieser Studie analysierten Öle die anerkannten Grenzwerte für LA- und ALA-Konzentrationen gemäß Literaturdaten [3] erfüllten. (Mehr Details und Detektionsergebnisse in der Digitalversion des Artikels.)

In der nächsten Phase wurde untersucht, wieviel LA und ALA im Verlauf einer typischen häuslichen Lagerung nach dem Öffnen abgebaut werden. Dazu lagerte das Olivenöl für eine Woche an einem kühlen, dunklen Ort und wurde danach erneut geprüft. Der Gehalt an Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren nahm im Verlauf der Lagerung der geöffneten Behältnisse ab. Die Analyse zeigte, dass LA stabiler war (der Verlust betrug 5 - 13 %) als ALA (mit einem Verlust von 25 - 45 %).

Die beste Verpackung zur Olivenöllagerung bestand in dem Kanister, in dem 95 % der LA (5,45 g/100 ml) erhalten blieb. Dies zeigt, wie wichtig es ist, Olivenöl sachgemäß zu lagern und es so bald wie möglich zu verbrauchen; eine 2-wöchige Lagerung nach Anbruch scheint die Grenze zu sein. Das ermöglicht, die wertvollen Bestandteile zu schonen und seine Eigenschaften als Ergänzung zu be-



Grażyna Budryn:
Mitglied des
Forschungsteams

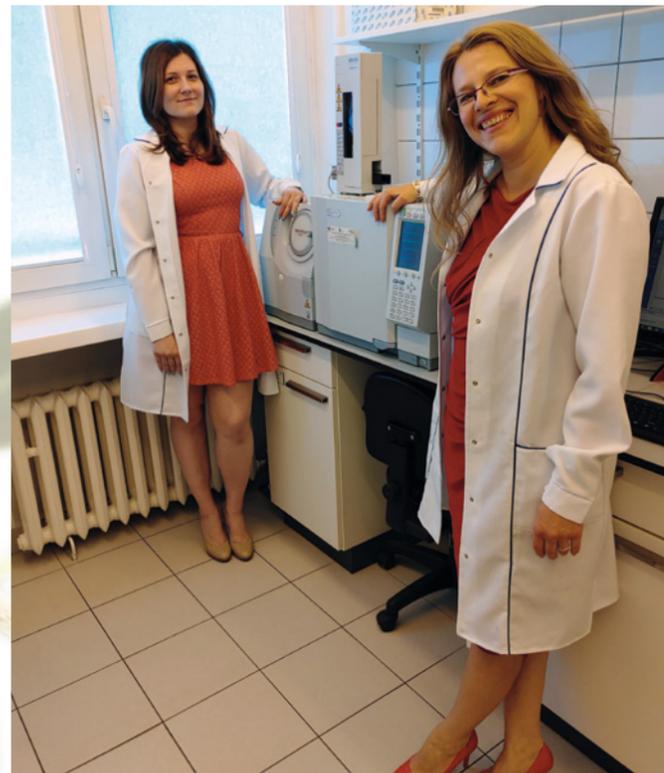
Fazit

Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass die beste Verpackung für Olivenöl ein Kanister ist, da der hohe Gehalt an LA und ALA während der Lagerung erhalten bleibt. Natürliche Aromazusätze wie Zitrone, Basilikum oder Pilze bewirken einen Geschmackseffekt. Sie schützen das Öl nicht vor Oxidation, die den Abbau der wertvollen Fettsäuren verursacht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 100 %-ige Olivenöle aus der Dose große Mengen an Antioxidantien bewahren, um den Körper mit gesunden Fettsäuren zu versorgen, was sich positiv auf seine Funktionen auswirkt.

halten, um den täglichen Bedarf an LA in empfohlenen Dosen von 15 - 20 ml Öl zu decken. Die verwendete analytische Methode erlaubte es, die Olivenölproben einfach, schnell und mit hoher Empfindlichkeit zu analysieren.

Hinweis

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



Präzisionsmedizin: Sicherheit und Effizienz von Therapien

Vereinfachte Medikamentenspiegelbestimmung mit DOSINACO-Kits für Gerinnungshemmer

Pablo Zubiaur Precioso, PhD, MPharm, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de La Princesa

Das Team um Dr. Francisco Abad-Santos, am Universitätsklinikum Madrid, konzentriert sich auf Pharmakogenetik, Medikamentenspiegelbestimmung (Therapeutic Drug Monitoring = TDM) und Präzisionsmedizin. Mit TDM lässt sich beispielsweise feststellen, ob die eingesetzte Dosis noch im therapeutischen Bereich liegt. Für seine Forschung verwendet das Labor-Team DOSINACO, einen von Alsachim hergestellten Reagenziensatz zur Quantifizierung von Gerinnungshemmern im menschlichen Plasma.

Alsachim hat mit Dr. Pablo Zubiaur gesprochen, Pharmakologe in der Abteilung Klinische Pharmakologie, über die Anwendung des Kits und seinen Nutzen.

Wie würden Sie die Forschung in Ihrem Labor kurz umschreiben? Mit unserer Forschung wollen wir die Präzisionsmedizin voranbringen, also Verfahren und Arzneimittel, die individuelle Biomarker einzelner Patienten anwenden, um Nutzen und Risiken von Therapien zu beurteilen. Das umfasst pharmakogenetische Untersuchungen sowie Studien zur Medikamentenspiegelbestimmung. Beide Strategien verbessern in der klinischen Praxis die Sicherheit und Effizienz von Therapien, die Lebensqualität von Patienten und die Nachhaltigkeit der Gesundheitssysteme.

Ich bin verantwortlich für die Koordination des gesamten Teams aus klinischen Pharmakologen, Labortechnikern, Doktoranden der Biotechnologie und einigen Bachelor-Studenten aus unterschiedlichen Disziplinen.

Wie hilft Ihnen DOSINACO bei der Lösungsweise Optimierung Ihrer täglichen Arbeit? Warum haben Sie sich für das Alsachim-Reagenzienkit entschieden? Wir haben eine Beobachtungsstudie aufgesetzt, in der es darum geht, das therapeutische Spektrum und die



Dr. Francisco Abad-Santos (Dritter von links) und sein Team am Universitätsklinikum Madrid

pharmakogenetischen Marker von Apixaban, Dabigatran, Rivaroxaban und Edoxaban festzulegen; das sind Blutgerinnungshemmer. Die analytischen Bestimmungen mit einem kommerziellen Kit wie DOSINACO durchzuführen, ist für uns einfacher. Unseren Recherchen nach ist das Kit das einzige seiner Art auf dem Markt.

Was sind die Trends und Bedürfnisse in Ihrem Sektor, durch die sich Bedarf für den Einsatz von DOSINACO ergibt? Was sind Ihre Erwartungen an die LC-MS/MS-Arzneimittelquantifizierung in der Zukunft? Präzisions- oder individualisierte Medizin ist derzeit in der Entwicklungsphase und wird wahrscheinlich in den kommenden Jahren und Jahrzehnten weitere Verbreitung finden. Daher ist zu erwarten, dass die Zahl der Labore zunehmen wird, die analytische Bestimmungen durchführen müssen. Zumindest – wie in unserem Fall – bedeuten kommerzielle LC-MS-Kits eine beträchtliche Zeitersparnis für Labore wie unseres, die „klein“ sind und nicht 100 % ihrer Aktivität der analytischen Chemie widmen.



And the awards go to...



MALDImini-1, iMScope QT und Packaging Box für GC mit Red Dot und iF Design Award

Design macht die Welt schöner und die Produkte funktionaler – in einer zunehmend technisierten Umgebung spielt der intuitive Umgang mit Geräten eine Schlüsselrolle. Das hat mit Nutzerfreundlichkeit zu tun, mit Ästhetik und der Funktionsweise. In der Shimadzu-Produktentwicklung in Japan beschäftigt sich ein ganzes Team mit Design-Aspekten. Deren Arbeitsergebnisse wurden wiederholt mit den wichtigsten Design-Preisen ausgezeichnet.

Red Dot Design Award und iF Design Award für Shimadzu-Produkte

Beim Design-Gedanken von Shimadzu steht nicht die reine Bedienbarkeit eines Geräts im Vordergrund, sondern vielmehr wie sich Ergebnisse mit einem System erzielen lassen. User-Experience-Design (UX-Design) und User-Interface-Design (UI-Design) sind dabei zentrale Stichworte: sie sorgen für die intuitive Nutzung eines Produkts, und dass es gut aussieht. Je ausgeklügelter die UX/UI-Lösungen, desto zufriedener die Nutzer und desto besser die Ergebnisse mit dem System.



Diese Betrachtungsweise spielt eine große Rolle bei dem Design neuer Geräte. Die UI-Designer begeben sich während der Entwicklungsphase immer wieder in die Rolle der Anwender und deren Bedürfnisse. So entstehen Systeme, die zugleich ästhetisch wie auch funktional sind – immer mit dem Nutzererlebnis im Fokus.

Diese Kombination aus Form und Funktion macht die Systeme von Shimadzu zu komfortablen und effizienten Partnern im Labor. Auch die internationalen Design-Organisationen haben in den letzten Jahren die Arbeit von Shimadzu regelmäßig anerkannt. 2021 wurden drei Shimadzu-Systeme gekürt.

Ausgezeichnetes Design

Der Red Dot Design Award und der iF Design Award sind unter den Top-3 der weltweit wichtigsten Designpreise. Die internationalen Juroren beider Auszeichnungen bewerten die aus aller Welt eingereichten Produkte nach Kriterien wie Innovation, Funktionalität, Qualität, Ergonomie, Ästhetik und Langlebigkeit. Mit einzigartigem Design setzen die prämierten Produkte Maßstäbe für die Zukunft.

Das MS-Imaging System iMScope QT erhielt den „Red Dot: Design Award“, während das digitale Ionen-Massenspektrometer MALDImini-1 mit dem „Red Dot: Best of the Best“ ausgezeichnet wurde – dem höchsten Preis innerhalb des Wettbewerbs.

Die Packaging Box für GC sowie das iMScope QT und das MALDImini-1 erhielten zudem auch den iF Design Award. Die Auszeichnung wird von dem iF International Forum Design aus Hannover vergeben, der weltweit ältesten, existierenden Organisation für Design.

Die Zukunft beginnt mit iMScope QT und MALDImini-1

Das iMScope QT kombiniert das LCMS-9030 Q-TOF Massenspektrometer mit einem optischen Mikroskop der iMScope-Serie. Es identifiziert und visualisiert die Verteilung von spezifischen Molekülen und eignet sich für medizinische und pharmazeutische Anwendungen sowie für Lebensmittel- und Agrar-Industrie. In der Krebstherapie, zum Beispiel, macht das iMScope QT sichtbar, ob die Arzneimittel an der vorgesehenen Stelle im Körper wirken. In der Bedienung gewährleistet es außerdem hervorragende Geschwindigkeit, Empfindlichkeit und Ortsauflösung für die Datenanalyse.

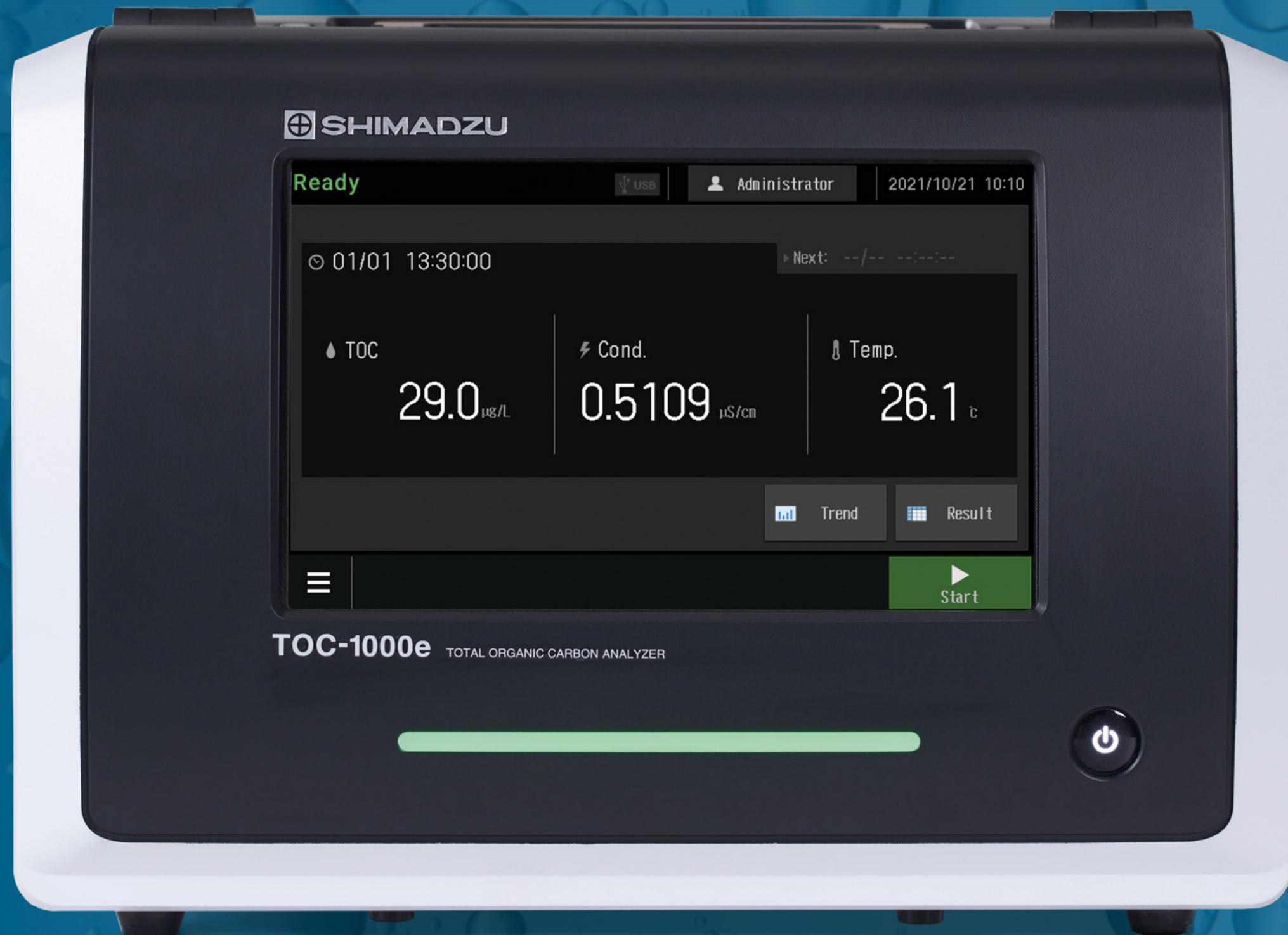
Das neuartige MALDImini-1 ist ein digitales Ionen-Massenspektrometer und steht für eine Revolution auf dem MALDI-Markt. Es kombiniert eine kleine Standfläche, minimale Messzeit und ein Probenvolumen im Mikromaßstab für hochempfindliche MS-Messungen. Damit lassen sich umfassende Strukturanalysen von unterschiedlichen Substanzen wie Peptiden und verdauten Proteinen mit Leichtigkeit durchführen. Momentan ist es eine große Hilfe für Wissenschaftler, die im Zusammenhang mit COVID-19 an Glykan-verbundenen Substanzen arbeiten.

Umweltfreundliche Packaging Box für GC

Das Design der Verpackung schützt die zerbrechlichen Kapillarsäulen für die Gas-Chromatographie vor Stößen und Verunreinigungen während des internationalen Transports sowie der Lagerung. Die Minimierung des verwendeten Materials und die recycelbare Kartonage machen die Packaging Box insgesamt umweltfreundlicher.

Zusammenspiel von Ästhetik und Funktionalität

Im Design findet sich nicht nur die reine Ästhetik wieder, sondern auch immer ein Ausdruck von Funktionalität. In den letzten Jahren erhielt Shimadzu elf Red Dot- und iF Design-Awards für seine Systeme. Das 2019 mit dem Red Dot Design Award ausgezeichnete Spektralphotometer UV-1900, zum Beispiel, hat ein Bedienfeld, das nach ergonomischen Prinzipien gestaltet ist, positioniert im bestmöglichen Betrachtungswinkel für eine leichte Lesbarkeit. Der Anspruch „Excellence in Science“ zeigt sich hier nicht nur im technologischen Fortschritt, sondern auch in der funktionalen Ästhetik, die eine hervorragende Bedienbarkeit für die Anwender gewährleistet.



Smallest giant

TOC-1000e Online-Analysator –
spezialisiert auf Reinstwasser-
anwendungen

Eine technologische Weltneuheit, im kleinsten und leichtesten Gehäuse marktweit: der neue TOC-1000e bedient die Nachfrage nach Online-Analysatoren, die hochempfindlich und schnell die Herausforderungen von Reinstwasseranwendungen meistern. Er ist der erste Prozess-Analysator der eTOC-Serie, der das Portfolio der modernen TOC-Analytik von Shimadzu erweitert. →

Abbildung 1: Der TOC-1000e von Shimadzu ist der erste Prozess-Analysator der eTOC Serie, die auf Online-Analyse für Reinstwasseranwendungen spezialisiert ist

ORIGINALGRÖSSE

Was haben Impfstoffe mit Mikrochips gemeinsam? Wasser ist in deren Produktion ein essenzieller Rohstoff. Denn seiner molekularen Struktur ist zu verdanken, dass es als ideales Lösungsmittel für die unterschiedlichsten Stoffe eingesetzt wird. In Pharmazie und Halbleiterfertigung zählt aber besonders das aufwendig hergestellte Reinstwasser. Es ist notwendig, um Arzneimittel und Kosmetika zu produzieren wie auch Speicherchips, Mikroprozessoren und Flachbildschirme.

Ein Wasser, das praktisch keine Mineralstoffe, gelöste organische Stoffe oder Keime enthält, das sogenannte Reinstwasser, kommt so in der Natur nicht vor. Es muss daher in mehrstufigen Aufbereitungsanlagen aus vorge-reinigtem Wasser gewonnen werden. Doch auch nach seiner Herstellung ist stetiger Aufwand notwendig, denn der leichteste Kontakt zur Atmosphäre oder auch nur ungünstige Verweilzeiten in der Verteilanlage, können zur Verminderung der Reinheit führen. Reinstwasseranlagen werden daher sehr genau und kontinuierlich überwacht.

Reinstwasser, das zur Produktion von Arzneimitteln genutzt wird, unterliegt strengen Regeln und Grenzwerten, wie sie die so genannten Arzneibücher aufführen, etwa die europäische Pharmakopöe (EP) oder die US-amerikanischen Pharmakopöe (USP). Zwei der Parameter sind die elektrische Leitfähigkeit als Maß für die Reinheit von Wasser, und der TOC (Total Organic Carbon), der den gesamten Kohlenstoff aus organischen Verbindungen erfasst. Sie sind die wichtigsten und schnellsten Online-Techniken, um Verunreinigungen zu entdecken.

Um die Qualität des Wassers jederzeit und engmaschig im Blick zu haben, wird neben der Laboranalytik (Offline-Analyse) zunehmend die Prozessanalytik (PAT) nachgefragt. Das verlangt Analytoren, die empfindlich und spezifisch die geforderten Kenngrößen erfassen.

Smallest giant

Der neue TOC-1000e ist auf die Online-Analyse für Reinstwasseranwendungen spezialisiert. Er ist der erste Prozess-Analysator der eTOC-Serie und ergänzt das Portfolio der modernen TOC-Analytik von Shimadzu, die unter anderem Analysen verschiedenster Anwendungen ermöglicht – vom Reinstwasser bis zum Abwasser, von Feststoffen und Wischtests.

Der TOC-1000e ist klein. Sehr klein. Er verschwindet hinter einem DIN-A4-Blatt. Und ist leichter als 3 kg. Dennoch ist seine Leistung gigantisch: Er ermöglicht hochempfindliche Analysen und quecksilberfreie Oxidationstechnik.

Umweltfreundliche UV-Oxidation, optimale Probenbestrahlung

Haben bislang TOC-Analysatoren Quecksilber-UV-Lampen als Lichtquelle in Reinstwasseranwendungen eingesetzt, so nutzt der TOC-1000e erstmals weltweit eine umweltfreundlichere Alternative: eine quecksilberfreie Excimer-Lampe (kurz für „excited dimer“). Sie emittiert im Vergleich zu herkömmlichen Lampen höherenergetisches Licht zur Oxidation organischer Komponenten.

Mit ihrer „Active-Path“-Technologie überträgt sie das UV-Licht optimal auf die Probe. Das Besondere ist, dass die Flusslinie direkt durch das Innere der Excimer-Lampe geleitet wird; das verhindert das Entstehen von Ozon aus Lufteinschlüssen, begünstigt das Ausspülen von Verunreinigungen und erhöht somit die Langzeitstabilität.

Leicht bedienbar, wartungsarm, Vor-Ort-Service

Trotz seiner kleinen Dimensionen bietet der TOC-1000e einen großen übersichtlichen Touchscreen, der eine einfache Bedienbarkeit ermöglicht. Daten und Protokolle lassen sich flexibel per USB oder Netzwerkübertragung ausgeben, etwa als PDF-Datei. Wartung und Kalibrierung sind jährlich vorgesehen. Dabei lassen sich Pumpenkopf und Excimer-Lampe werkzeugfrei über die Frontklappe des TOC-1000e erreichen und austauschen.

Vielfältige Möglichkeiten der Datenausgabe

Messwerte können sowohl analog (4 bis 20 mA) als auch Digital per Feldbus ausgegeben werden. Außerdem lassen sich die TOC-1000e-Systeme mit einem Netzwerk verbinden und die Ergebnisse über vernetzte PCs oder Tablets per Webbrowser einsehen und herunterladen.

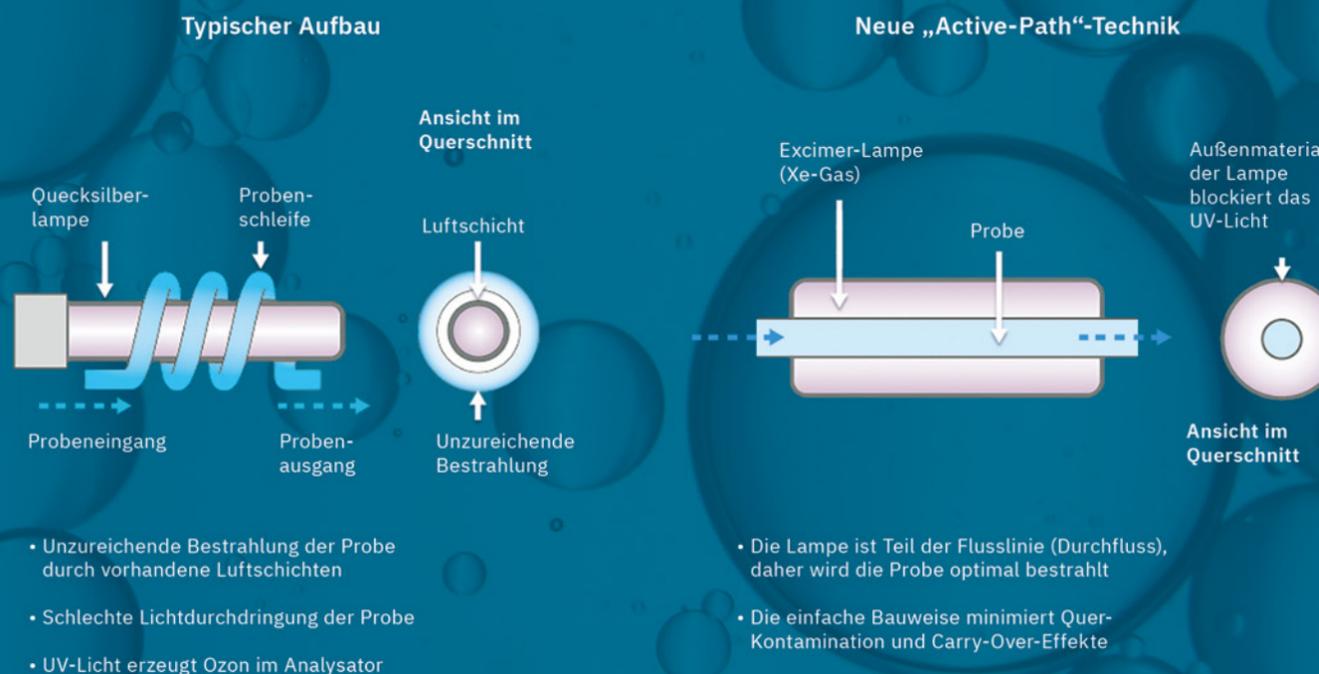
Der kleine und ultraleichte TOC-1000e ist als Tischgerät lieferbar, eignet sich aber auch zur Wand- oder Stangenmontage. In allen Fällen kann ein Probengeber an der Seite angebracht werden, um den Analysator vor Ort zu kalibrieren. Das bietet absolute Flexibilität, was den Aufstellungsort betrifft und ein Einschicken des Geräts ist überflüssig.

Hinweis

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



Abbildung 2: Die Excimer-Lampe verfügt über eine spezielle Bauweise, die „Active-Path“-Technologie, zur effizienten Energieübertragung der Strahlung auf die Probe



Auf die Säule kommt es an

Shim-Pack-Säulen ermöglichen es, schwierig zu trennende Substanzen aufzutrennen

Timofey N. Komarov, Igor E. Shohin, Margarita A. Tokareva, Olga A. Archakova, Dana S. Bogdanova, Alexandra A. Aleshina, Natalia S. Bagaeva, Veronika V. Davydanova, Center of Pharmaceutical Analytics LLC, 117246, Russia, Moscow

Die Entwicklung neuer Medikamente erfordert auch, neue analytische Methoden zu finden, um Therapien zu überwachen sowie den Weg eines Arzneimittels zu kontrollieren, wie es in den Körper gelangt, dort aufgenommen und verdaut wird, die so genannte Pharmakokinetik. Die Methoden müssen arbeits- und kosteneffizient sein. Dabei kommt es auch auf das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten eines Analysesystems an, also etwa dem Chromatograph und der optimalen Säule.

Die HPLC mit zahlreichen Nachweismethoden wird wirksam eingesetzt, um den Arzneimittelgehalt in biologischen Flüssigkeiten zu bestimmen. Eine der schwierigsten Aufgaben in der Praxis ist die chromatographische Trennung von unzureichend zurückgehaltenen Verbindungen, wie es etwa bei Arzneimittelwirkstoffen auf einer Chromatographiesäule der Fall ist. Valganciclovir und Ganciclovir sind Beispiele für derartige Wirkstoffe; beide werden gegen Herpesviren eingesetzt – Ganciclovir als Infusion und Valganciclovir in verschiedener Darreichungsform.

Das Ziel dieser Studie bestand in der Entwicklung eines LC-MS/MS-Verfahrens, um Valganciclovir und Ganciclovir im menschlichen Plasma zu bestimmen; das dient pharmakokinetischen Untersuchungen und der Medikamentenspiegelbestimmung (TDM – Therapeutisches Drug Monitoring). Diese Methode wurde entwickelt und validiert. Linearität in Plasmaproben wurde im Konzentrationsbereich 5 - 1.000 ng/ml für Valganciclovir und 50 - 10.000 ng/ml für Ganciclovir erreicht.



Die HPLC als moderne Analysetechnik ist weit verbreitet zur Bestimmung des Medikamentengehalts in biologischen Flüssigkeiten. Abhängig von den chromatographischen Bedingungen und dem verwendeten Detektor ist es möglich, Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften zu trennen und zu identifizieren – insbesondere auch Substanzen mit ähnlicher Struktur.

Herausforderung: Trennung von Arzneimitteln

Eine der herausforderndsten Aufgaben in der Praxis ist es, Arzneimittel aufzutrennen, die auf einer klassischen RP-Chromatographiesäule wenig zurückgehalten werden. Zahlreiche chromatographische Verfahren lassen sich für diesen Zweck einsetzen, wie HILIC (hydrophile Interaktions-Chromatographie) und Ionenaustausch-Säulen oder Ionenpaar-Reagenzien als Elutionsmittel. Diese Herangehensweisen können sich aber als ineffektiv erweisen, wenn ein Massenspektrometer als Detektor genutzt wird, oder wenn die Arzneimittelmessungen in komplexen biologischen Matrices erfolgen. Der Fall Valganciclovir (VAL, Abbildung 1) und Ganciclovir (GAN, Abbildung 2) verdeutlicht diese Situation.

Wie viele andere antivirale Medikamente sind Valganciclovir und Ganciclovir verhältnismäßig hydrophile Substanzen, was an ihren Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P) deutlich erkennbar ist (Tabelle 1). Diese Eigenschaften müssen bei der Entwicklung einer Analyseverfahren inklusive Probenaufbereitung und Trenntechnik berücksichtigt werden.

Die bisherigen Analyseverfahren nutzen die HPLC mit UV-Detektion [7,8,9] und mit einem Massenspektrometer gekoppelt. [10] Beide Verfahren waren nicht in der Lage, Valganciclovir und Ganciclovir simultan zu messen, sondern jeweils nur eine der Verbindungen.

Optimale Trennung der Substanzen mit MS-Nachweis

Die Autoren dieser Veröffentlichung versuchten, ein Verfahren zur simultanen GAN- und VAL-Bestimmung mit Hilfe der HPLC-UV zu entwickeln. Aber diese Methode benötigte den Einsatz der speziellen Chromatographiesäule „YMC-Pack Polyamine II“ und die Einstellung des Eluentenstroms auf 2 ml/min, was den Verbrauch an Reagenzien deutlich erhöhte. →

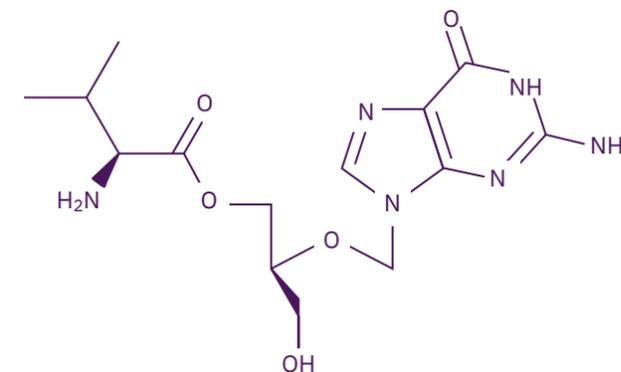


Abbildung 1: Chemische Struktur von Valganciclovir

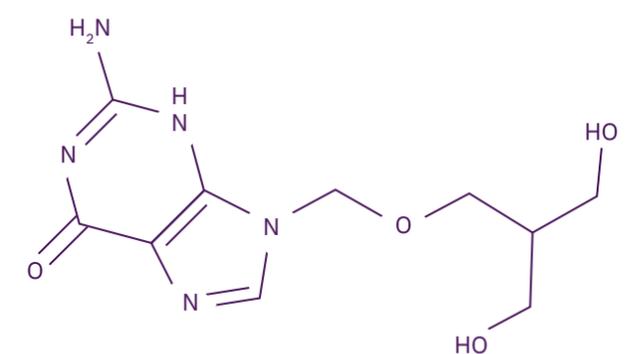


Abbildung 2: Chemische Struktur von Ganciclovir

	Valganciclovir	Ganciclovir	Acyclovir (interner Standard, IS)
Log P	-0,81	-1,66	-0,95
pKa	10,16	8,71	11,98
Referenz	[4]	[5]	[6]

Tabelle 1: Log P und pKa für Valganciclovir, Ganciclovir und Acyclovir

Chromatographie-Säule	Gesamt-kohlenstoff-gehalt, %	Oberfläche, m ² /g
Phenomenex Luna C18(2) 50 × 2 mm, 5 µm	18,2	393
Phenomenex Luna NH₂ 50 × 3 mm, 5 µm	10,2	420
Waters XBridge C18 50 × 4,6 mm, 3,5 µm	18,0	178
YMC Hydrosphere C18 100 × 2 mm, 3 µm	12,2	330
Shim-pack GWS 150 × 4,6 mm, 5 µm	9,5	450

Tabelle 4: Einige Eigenschaften der in dieser Studie eingesetzten Chromatographie-Säulen

Darüber hinaus war eine recht lange Analysedauer (etwa 26 Minuten) erforderlich, um eine optimale Trennung der Substanzen und des internen Standards zu erzielen.

Die Kombination von MS-Detektion und der chromatographischen Auftrennung ermöglicht eine Verminderung der Flussrate und eine signifikante Verkürzung der Analysedauer. Diese Untersuchung zeigt Entwicklung und Validierung der Nachweismethoden von Valganciclovir und Ganciclovir im menschlichen Blutplasma mit Hilfe der LC-MS/MS.

Materialien und Methoden

Für die Analysen wurde eine Nexera XR UHPLC mit einem LCMS-8040-Tandemmassenspektrometer gekoppelt. Mit verschiedenen Referenzstandards und einem internen Standard (Acyclovir) wurden Stammlösungen angesetzt. Durch Verdünnung auf die benötigten Plasmakonzentrationen (Tabelle 2) wurden gemischte GAN- und VAL-Arbeitslösungen und eine ACI-Arbeitslösung hergestellt.

Level	Analytkonzentration, ng/ml		IS Konzentration, ng/ml
	VAL	GAL	ACI
1	5,00	50,00	1000,00
2	10,00	100,00	1000,00
3	25,00	250,00	1000,00
4	50,00	500,00	1000,00
5	100,00	1000,00	1000,00
6	250,00	2500,00	1000,00
7	400,00	4000,00	1000,00
8	750,00	7500,00	1000,00
9	1000,00	10000,00	1000,00
LLOQ	5,00	50,00	1000,00
L	15,00	150,00	1000,00
M	500,00	5000,00	1000,00
H	800,00	8000,00	1000,00

Tabelle 2: Konzentrationen der Zielsubstanzen für Kalibrationsniveaus

Stamm- und Arbeitslösungen sowie intakte Blutplasma-proben wurden bis zur Verwendung tiefgekühlt bei -45 °C aufbewahrt.

Probenaufbereitung

Die Acyclovir-Arbeitslösung und eine Kalibrationsprobe wurden einem Lösungsmittel zugegeben, gevortext und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde in Vials gefüllt und in einen Autosampler gegeben.

Ergebnisse und Diskussion Methodenentwicklung

Eine chromatographische Trennmethode für Valganciclovir und Ganciclovir zu entwickeln, ist aufgrund ihrer geringen Retention auf „klassischen“ Octadecyl-Säulen eine Herausforderung. Ein Einsatz von Säulen mit Aminogruppen lieferte keine gute Retention und keine korrekte Trennung von VAL und GAL. Eine Idee bestand darin, C18-Säulen mit unterschiedlichem Gesamtkohlenstoffgehalt (Tabelle 4) zu testen.

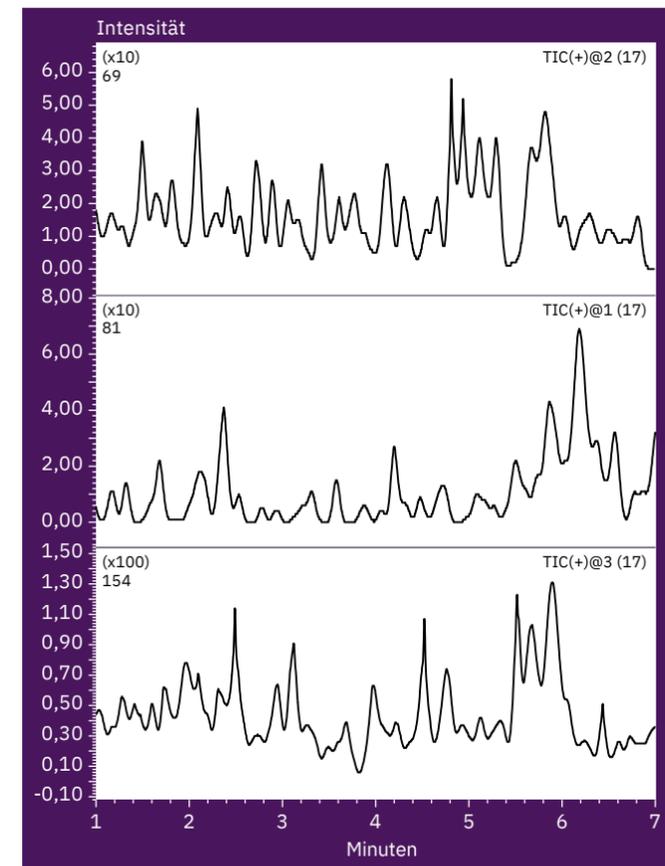


Abbildung 3: Chromatogramm Plasma-Leerprobe

Die besten Ergebnisse wurden mit einer Shim-Pack GWS-Säule mit geringstem Gesamtkohlenstoffgehalt erzielt. Trotz der unwesentlichen Retention von Valganciclovir und Ganciclovir auf dieser Säule, waren die chromatographischen Peaks vom Totvolumen getrennt, und die Methode erfüllte die regulatorischen Anforderungen für eine Validierung, einschließlich der „Selektivitäts“-Parameter.

Methodenvalidierung

Die Methode wurde validiert gemäß Richtlinien zur Arzneimittelprüfungen [12] sowie der FDA- [13] und EMA-Richtlinien [14] für folgende Parameter: Selektivität, Matrixeffekt, Kalibrationskurve, Genauigkeit und Präzision, Rückgewinnung, untere Quantifizierungsgrenze, Verschleppung und Stabilität.

Selektivität

Sechs intakte, aus unterschiedlichen Quellen gezogene Plasmaproben ebenso wie intakte Plasmaproben wurden

getestet; sie waren mit Arbeitslösungen von Valganciclovir und Ganciclovir (5 bzw. 50 ng/ml) versetzt. Zusätzlich wurden intakte Plasmaproben mit Hämolyse und Proben mit erhöhtem Lipidgehalt analysiert. Im Falle von plasmafreien Chromatogrammen (Abbildung 3) überschritt die Intensität der Peaks mit der gleichen Retentionszeit wie die Zielsubstanzen keine 20 % des Signals bei der LLOQ (Lower Limit Of Quantification) und 5 % des internen Standardsignals.

Matrixeffekt

Proben mit Zugabe von Arbeitslösungen von Valganciclovir, Ganciclovir und Acyclovir ebenso wie dotierte Plasmaproben wurden untersucht, um einen Matrixeffekt abzuschätzen. Der Matrixeffekt wurde für niedrige (L) und hohe (H) Konzentrationsniveaus (siehe Tabelle 2) von Valganciclovir und Ganciclovir und für eine Konzentration von 1.000 ng/ml Acyclovir bewertet. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 5 und 6.

Kalibrationskurven

Neun intakte Plasmaproben, versetzt mit Acyclovir, Valganciclovir und Ganciclovir entsprechend der Konzentrationsniveaus 1 - 9 (Tabelle 2) wurden analysiert, um eine Kalibration zu erzeugen. Die Kurven für Valganciclovir (Peakflächenverhältnis zu Konzentrationsverhältnis) und Ganciclovir (gleiche Koordinaten) werden in Abbildung 5 bzw. 6 gezeigt. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten entsprechen den Bestimmungen (> 0,99). Ein Chromatogramm der Probe mit der Konzentrationsstufe 9 ist in Abbildung 4 zu sehen.

Genauigkeit und Präzision

Versetzte Plasmaproben bei LLOQ-, hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsniveaus (siehe Tabelle 2) wurden betrachtet, um Genauigkeit und Präzision der entwickelten Methode abzuschätzen. Fünf unterschiedliche Proben für jede Konzentrationsstufe wurden anhand einer dreifachen Injektion geprüft. Genauigkeit und Präzision wurden innerhalb eines Laufs und unter den Läufen (zwei und drei Läufe) untersucht; Daten zeigt Tabelle 7. Die erhaltenen Werte der relativen Standardabweichung (Präzision) und der relative Fehler (Genauigkeit) entsprechen den Bestimmungen (nicht mehr als 20 % am LLOQ-Niveau, nicht mehr als 15 % bei anderen Niveaus). →

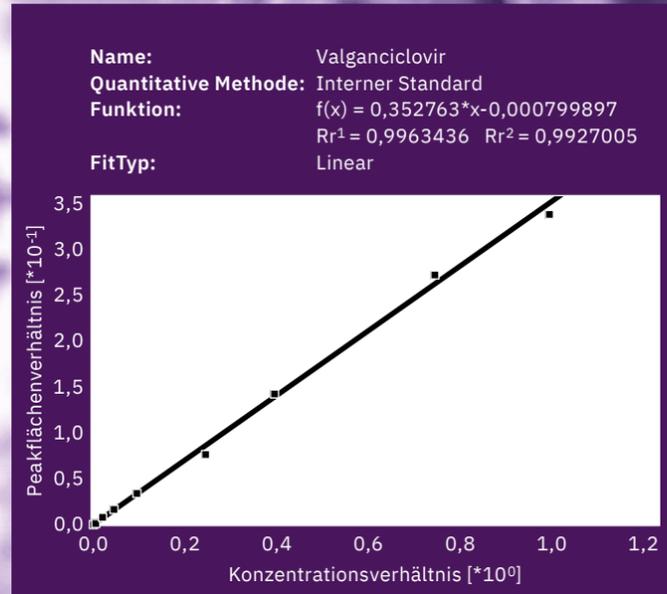


Abbildung 5: Die Kalibrationskurve mit Wiedergabe der Abhängigkeit des Peakflächen-Verhältnisses von Valganciclovir zu Acyclovir gegenüber dem Konzentrationsverhältnis von Valganciclovir zu dem Acyclovir im Plasma

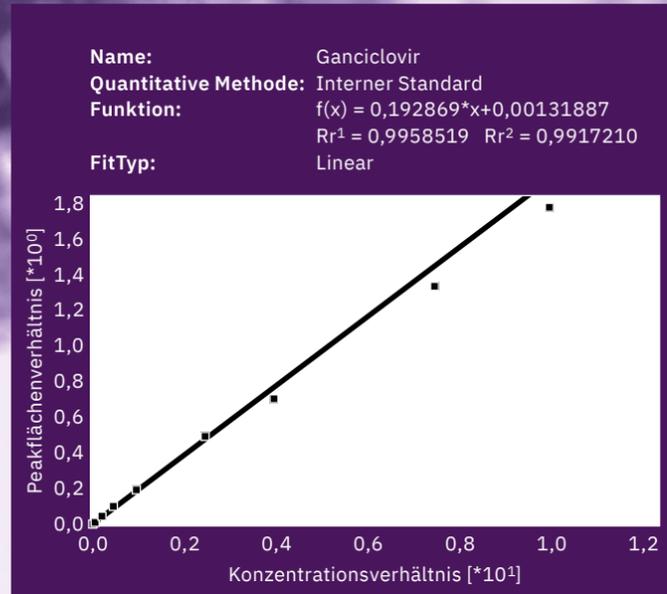


Abbildung 6: Die Kalibrationskurve mit Wiedergabe der Abhängigkeit des Peakflächen-Verhältnisses von Ganciclovir zu Acyclovir gegenüber dem Konzentrationsverhältnis von Ganciclovir zu dem Acyclovir im Plasma

#	Mf von GAL (Level L)	Mf von ACI (Level L)	Normalisierter Mf (Level L)	Mf von GAL (Level H)	Mf von ACI (Level H)	Normalisierter Mf (Level H)	
1	0,91	1,00	0,90	1,00	0,99	1,01	
2	0,87	1,00	0,87	0,99	1,02	0,97	
3	0,91	1,01	0,90	0,98	0,99	0,99	
4	0,92	1,02	0,91	1,01	1,01	1,00	
5	0,90	0,99	0,91	0,99	1,02	0,97	
6	0,94	1,01	0,93	1,01	1,02	0,99	
			Durchschnitt			0,90	
			CV, %			2,18	
				Durchschnitt			0,99
				CV, %			1,50

Tabelle 5: Der Matrixfaktor der Valganciclovir-Berechnungen, normalisiert mit dem IS-Matrixfaktor

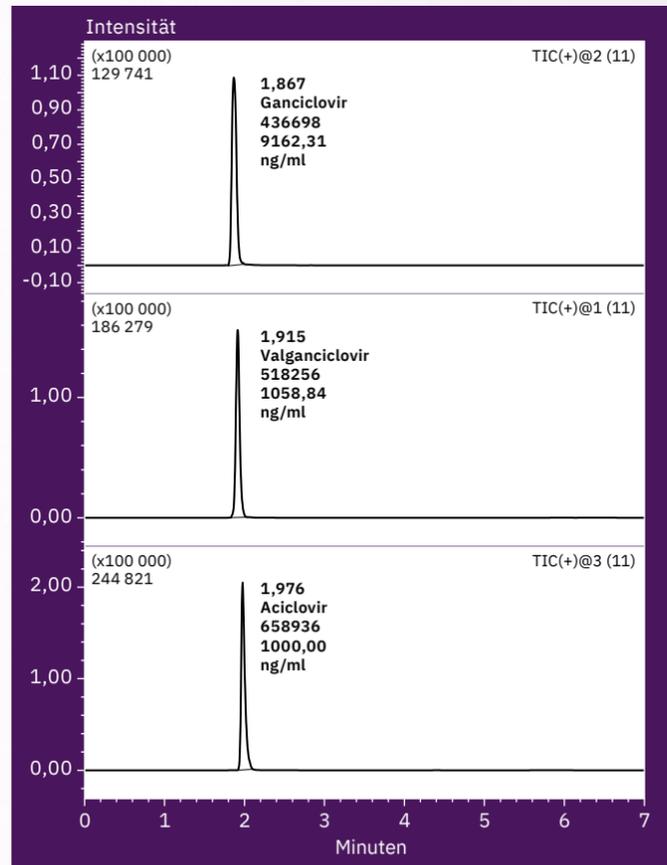


Abbildung 4: Chromatogramm einer Plasmaprobe der Stufe 9

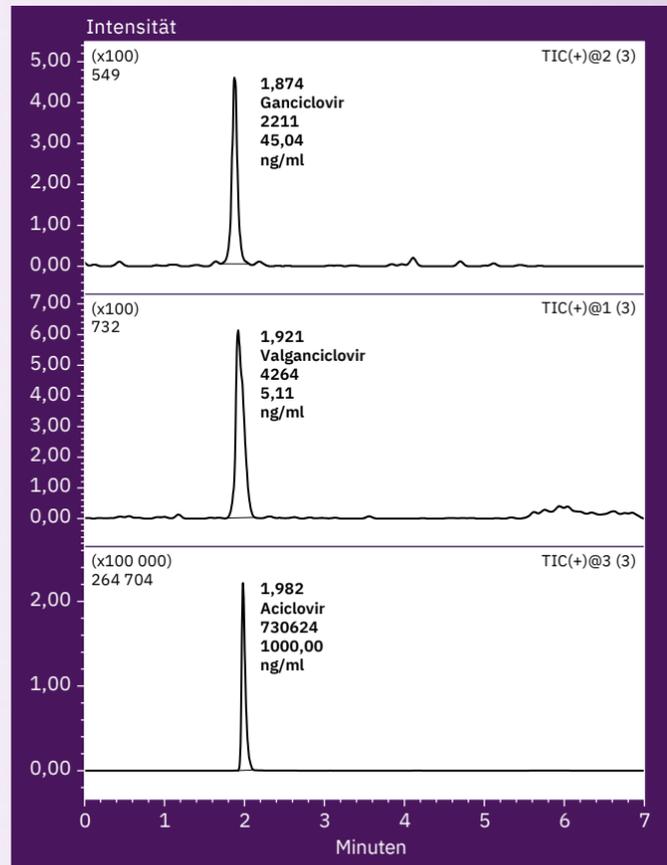
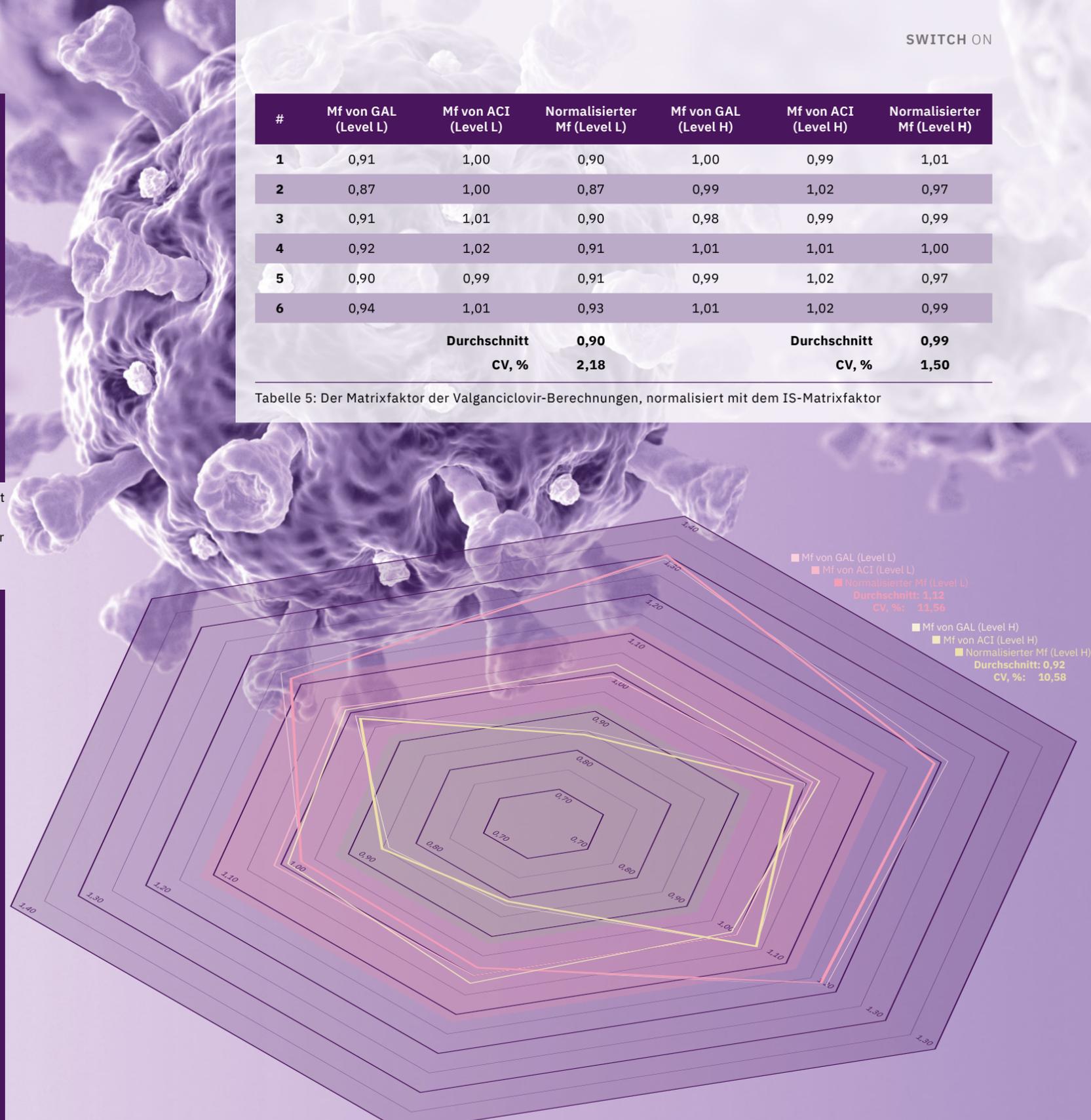


Abbildung 7: Chromatogramm der LLOQ-Plasmaprobe



Grafik zur digitalen Tabelle 6: Der Matrixfaktor der Ganciclovir-Berechnungen, normalisiert mit dem IS-Matrixfaktor

Injiziert (ng/ml)	Durchschnittlich gefunden, ng/ml			SD			RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
Valganciclovir												
5,00	5,80	5,45	5,29	0,08	0,62	0,56	1,37	11,35	10,53	16,08	8,96	5,89
15,00	14,46	14,08	13,72	0,62	0,75	0,80	4,26	5,31	5,86	-3,63	-6,11	-8,52
500,00	550,73	561,04	563,16	5,21	12,53	10,69	0,95	2,23	1,90	10,15	12,21	12,63
800,00	893,66	901,00	900,88	12,41	13,06	12,59	1,39	1,45	1,40	11,71	12,62	12,61
Ganciclovir												
50,00	48,32	47,39	47,18	1,13	2,33	2,06	2,33	4,91	4,37	-3,35	-5,21	-5,65
150,00	145,73	143,35	141,91	6,62	6,30	5,73	4,27	4,39	4,04	-2,85	-4,44	-5,39
5000,00	4740,25	4808,83	4892,22	77,26	104,66	153,94	1,63	2,18	3,15	-5,19	-3,82	-2,16
8000,00	7198,32	7372,03	7482,18	146,29	225,72	252,41	2,03	3,06	3,37	-10,02	-7,85	-6,47

Tabelle 7: Genauigkeit und Präzision des Verfahrens

Rückgewinnung

Drei versetzte Plasmaproben bei niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationsbereichen ebenso wie QC-Proben wurden für die Abschätzung der Rückgewinnungsrate getestet. Und zusätzlich die Plasmaproben mit Hämolyse und erhöhtem Lipidgehalt überprüft. Erzielte Ergebnisse zeigt Tabelle 8. Entsprechend der Bestimmungen sollte eine Rückgewinnung 100 % nicht erreichen. Es ist jedoch notwendig, eine effiziente und reproduzierbare Extraktion von Zielsubstanzen aus biologischen Matrices sicherzustellen. RSD des Rückgewinnungswerts sollte 15 % nicht überschreiten.

Untere Quantifizierungsgrenze

Das LLOQ-Level wurde basierend auf Linearitäts-, Genauigkeits- und Präzisionsdaten bestimmt. Die minimalen Valganciclovir- und Ganciclovir-Konzentrationen im Plasma, für die es möglich ist, VAL und GAL mit RSD- und E-Werten von nicht mehr als 20 % zu quantifizieren, wurden für die Methode als LLOQ festgelegt. Der LLOQ betrug

5,00 ng/ml für Valganciclovir und 50,00 ng/ml für Ganciclovir. Chromatogramme von in Plasma enthaltenem VAL und GAL am LLOQ-Niveau sind in Abbildung 7 wiedergegeben. Die Nachweisgrenze von Valganciclovir lag bei etwa 0,93 ng/ml und die von Ganciclovir bei etwa 0,73 ng/ml (Signal/Rauschverhältnis ca. 3:1).

Fazit

Eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Valganciclovir und Ganciclovir in menschlichem Plasma wurde entwickelt und validiert. Geprüfte Konzentrationsbereiche im Plasma lagen bei 5 - 1.000 ng/ml für Valganciclovir und 50 - 10.000 ng/ml für Ganciclovir. Dies erlaubt es, die Methode für pharmakokinetische Untersuchungen sowie für die therapeutische Arzneimittelüberwachung einzusetzen.

Hinweis

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



	Rückgewinnung (Level L), %			Rückgewinnung (Level M), %			Rückgewinnung (Level H), %		
	Valganciclovir	Ganciclovir		Valganciclovir	Ganciclovir		Valganciclovir	Ganciclovir	
Durchschnitt	88,57	98,94	101,80	93,98	90,95	98,01	88,57	98,94	101,80
SD	6,78	2,76	2,48	8,64	9,83	4,44	6,78	2,76	2,48
RSD	7,66	2,79	2,43	9,20	10,80	4,53	7,66	2,79	2,43

Tabelle 8: Berechnung der Valganciclovir- und Ganciclovir-Rückgewinnung bei L-, M-, H-Niveaus aus unterschiedlichen biologischen Matrices

Gemeinsam stärker

HPLC und SFC: Methodenentwicklung für chirale Verbindungen mit der Nexera SFC

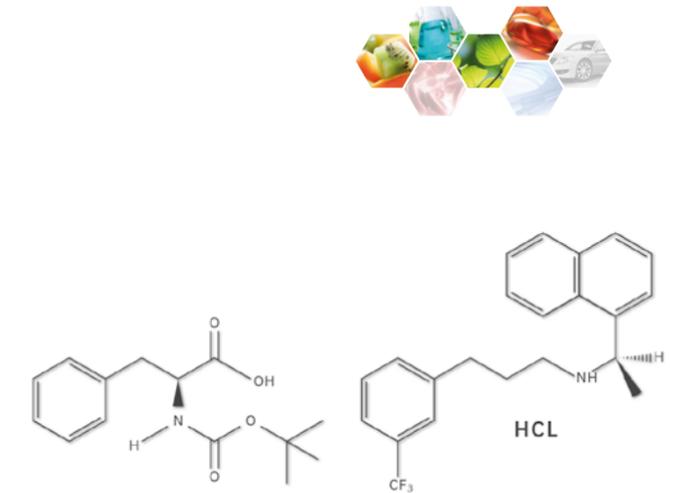


Abbildung 5: Links: Struktur von Boc-DL-Phenylalanin und rechts: Struktur von Cinacalcet-HCl (R-Enantiomer)

Dr. Brigitte Bollig, Shimadzu Europa GmbH

Ein allgemeiner Überblick über die SFC-Technik: Wo sind ihre Unterschiede und Vorteile gegenüber der konventionellen UHPLC und woraus erwachsen Vorzüge im Zusammenspiel? Ein Umschaltssystem zwischen SFC und UHPLC bietet den Anwendern Flexibilität bei der Methodenentwicklung, wie anhand einiger Anwendungsbeispiele gezeigt. Insbesondere zur Trennung einer chiralen Verbindung wird oft eine SFC eingesetzt. Hierzu wird eine Applikation für ein Arzneimittel entwickelt sowie für eine Verbindung, die sich als Startsubstanz für zukünftige organische Synthese verwenden lässt.

SFC – »grüne« Technologie

Die Chromatographie mit überkritischen Fluiden (supercritical fluid chromatography = SFC) ist eine Trenntechnik, die als primäre mobile Phase eine superkritische Flüssigkeit einsetzt. Da superkritische Fluide eine geringere Viskosität und ein höheres Diffusionsvermögen haben als übliche Flüssigkeiten, führen sie zu einem niedrigeren Säulen-Gegendruck als bei der UHPLC-Trennung. Das bedeutet, dass sie sich für eine Hochgeschwindigkeits- und eine hohe Trennraten bei hohen Flussraten nutzen lassen.

Üblicherweise wird superkritisches Kohlendioxid in der SFC eingesetzt. Seine Polarität ähnelt Hexan, einem gesättigten Kohlenwasserstoff. Da es schwierig ist,

Zielsubstanzen unter alleiniger Verwendung von superkritischem Kohlendioxid von einer Säule zu eluieren, wird der mobilen Phase ein organisches Lösungsmittel als Modifizierungsmittel zugefügt. Dies verändert ihre Polarität, sodass sich die Zielsubstanzen von der Säule eluieren lassen.

Arzneimittel, Nahrungsmittel und Umweltprüfungen sowie viele andere Anwendungsfelder benötigen eine große Bandbreite an Trennmethode, etwa zur Auftrennung von chiralen Verbindungen und Strukturisomeren. Aufgrund der unterschiedlichen Trennselektivität der UHPLC und der SFC mithilfe von superkritischem Kohlendioxid sowie organischen Lösungsmitteln, wurden der SFC in den letzten Jahren große Erwartungen als neue chromatographische Trennmethode entgegengebracht.

Zudem lässt sich eine vorhandene UHPLC-Anlage mit spezifischen Geräten zu einem UHPLC/SFC-Umschaltssystem erweitern. Durch den Einsatz zweier Trennverfahren für das Screening während der Methodenentwicklung, gelingt es mit dem System, schneller bessere analytische Bedingungen zu konfigurieren. [1] SFC ist auch als »grüne« Technologie bekannt, da an Verbrauch und Entsorgung organischer Lösungsmittel gespart wird.

Unterschiede zwischen HPLC- und SFC-Trenncharakteristiken

Die SFC-Säuleneffizienz nimmt sogar bei hohen Flussraten nicht so stark ab wie bei der HPLC. →

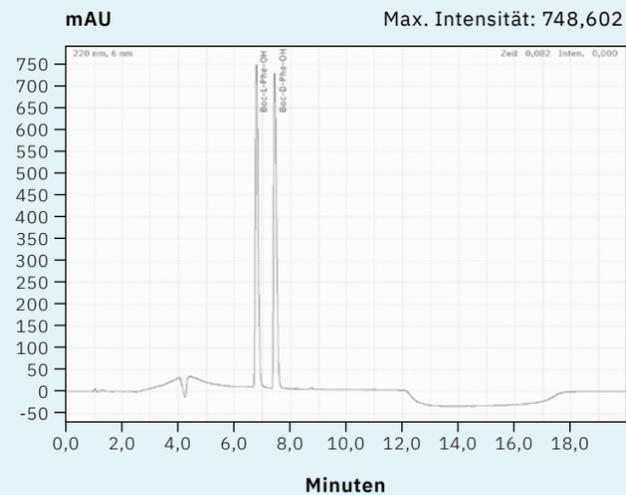


Abbildung 9: Chromatogramm für Boc-DL-Phenylalanin

Daher ermöglicht die SFC eine Hochgeschwindigkeitsanalyse und kürzere Analysezeiten, kann aber zu einer anderen Elutionsreihenfolge und einer unterschiedlichen Trennselektivität führen. Die SFC kann sogar die Auftrennung derjenigen Verbindungen verbessern, die mit einer HPLC schwierig zu trennen sind.

UHPLC/SFC-Umschaltssystem

Berücksichtigt man die Trennbedingungen, können UHPLC und SFC dabei helfen, bessere Trennbedingungen

zu ermitteln. Daher ermöglicht ein Nexera UC/s UHPLC/SFC-Umschaltssystem, den UHPLC- wie den SFC-Analysemodus in einem einzigen System zu nutzen. Die Abbildung 4 unten zeigt das Flussdiagramm.

Das System wurde zusammengestellt aus einer Standard-UHPLC-Anlage, kombiniert mit einer Einheit, die superkritisches Kohlendioxid zuführt, und einer Komponente zur Regulierung des Gegendrucks. Der UHPLC- wie der SFC-Analysemodus lassen sich durch Einschalten (Kontrollmodus

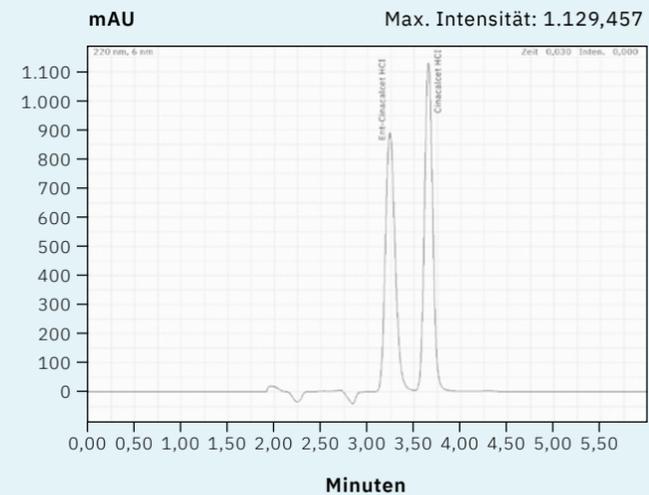


Abbildung 10: Chromatogramm für Cinacalcet-HCl [2]

ON oder OFF) der Kohlenstoffdioxidpumpe und Zuschalten des Gegendruckregulators nutzen. Die Pumpe (zum Einpumpen der organischen Lösungsmittel), den Autosampler, den Säulenofen und den Detektor gemeinsam für SFC wie UHPLC Analyse zu nutzen, minimiert den Raumbedarf wie auch die Ausstattungskosten und steigert die Nutzungsrate der Anlage.

Auch ein bestehendes UHPLC-System lässt sich zu dieser Anlage erweitern. Darüber hinaus lassen sich mit dem Lösungsmittelauswahlventil für die

mobile Phase und dem Säulenschaltventil der Säulen automatisch die Bedingungen der mobilen Phase ändern – für bis zu zwölf Säulen, um eine Vielzahl an Bedingungen zu ermöglichen, was die Effizienz der Methodenentwicklung verbessert. [1]

SFC-Anwendungsentwicklung für chirales Boc-DL-Phenylalanin und Cinacalcet-HCl [2]

Boc-DL-Phenylalanin ist eine chirale Aminosäure, die sich als Ausgangsstruktur für eine zukünftige organische Synthese einsetzen lässt, woraus später Produkte in der Pharma- oder Chemieindustrie resultieren. Cinacalcet ist ein Arzneimittel und wird in der EU unter dem Markennamen MIMPARA® verkauft, um Erkrankungen der Nebenschilddrüse zu behandeln, etwa primären und sekundären Hyperparathyreoidismus oder Tumore. Die chemischen Strukturen sind in Abbildung 5 dargestellt.

Als Ausgangspunkt zur Verfahrensentwicklung wird eine aus der Literatur bekannte HPLC-Normal-Phase-Applikation herangezogen; siehe Abbildung 7 für Boc-DL-Phenylalanin [3] und Abbildung 8 (beide in der digitalen Version) für Cinacalcet-HCl. [4]

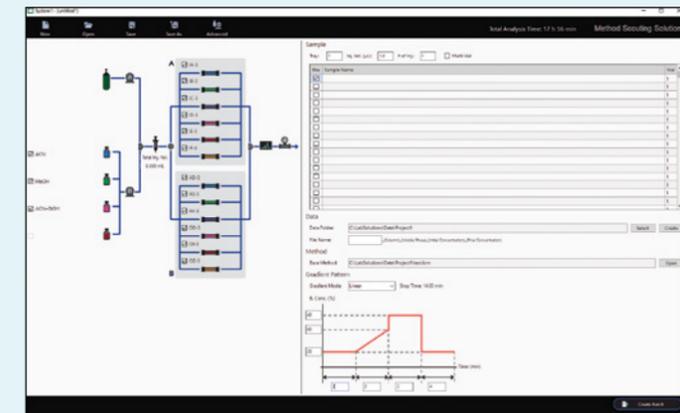


Abbildung 6: Überblick Methoden-Scouting

ben insgesamt 120 Durchläufe und die besten Trennkombinationen werden für eine weitere Verbesserung wie Gradienten- oder Flussrateneinstellungen verwendet.

Für die Verbindung Boc-DL-Phenylalanin wird das Chromatogramm in Abbildung 9 und für die Substanz Cinacalcet-HCl das Chromatogramm in Abbildung 10 als einsatzbereites SFC-Verfahren vorgestellt.

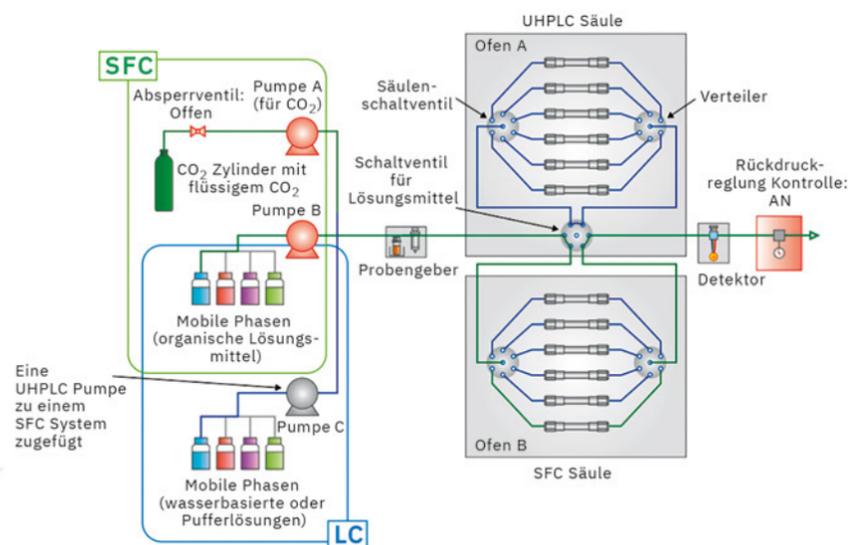
Fazit

Das Nexera UC/s UHPLC/SFC-Umschaltssystem ermöglicht sowohl eine UHPLC- als auch eine SFC-Analyse, ohne die Flusslinie zu verändern. Das Verfahren zur Methodenermittlung mit der Methoden-Scouting-Software, die das Umschalten zwischen dem UHPLC- und SFC-Modus unterstützt, lässt sich dazu einsetzen, automatisch eine Sequenz zu erzeugen und auszuführen, die für die Umschaltmodi benötigt wird. Dazu gehört u.a. das Purgen der mobilen Phase, die im vorangegangenen Modus verwendet wurde, und das Spülen der Flusslinien mit der mobilen Phase, die für den nächsten Lauf benötigt wird. Somit besteht keine Notwendigkeit, komplizierte Prozesse durchzuführen, wie z.B. die Erzeugung von Methoden für jede Kombination von Säule und mobiler Phase.

Durch einfache Festlegung von (1) mobilen Phasen, (2) Säulen, (3) Proben, (4) der Basismethode für die Analyse und (5) Gradientenbedingungen (Ausgangskonzentration, Endkonzentration und Gradient) kann die Software automatisch eine Batch-Tabelle für den Einsatz des Methoden-Scoutings generieren. Dies stellt sicher, dass sogar Erstanwender problemlos das automatische Umschalten zwischen UHPLC und SFC nutzen und einfach eine Methode mit beiden Techniken übertragen und entwickeln können, wie an zwei Anwendungsbeispielen zur Trennung chiraler Verbindungen gezeigt.

Hinweis

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



360°-Trinkwasseranalyse – Episode 3

Kleines Paket, große Wirkung

Die Bestimmung von Anionen in Trinkwasser mittels Ionenchromatographie

Uwe Oppermann, Vadim Kraft, Shimadzu Europa GmbH

Anorganische Ionen in Trinkwasserproben zu bestimmen, ist eine wichtige Anwendung für Trinkwasserversorger. Für die Qualitätskontrolle von Trinkwasser eignet sich die Ionenchromatographie (IC) mit unterdrückter Leitfähigkeitsdetektion, weil sie die hochempfindliche Bestimmung von Anionen ermöglicht. Die IC ist eine etablierte Methode und für die Anionenanalyse gemäß den Vorschriften in den USA und Europa anerkannt.

Im Dezember 2020 hat das Europaparlament die überarbeitete Trinkwasserrichtlinie (Drinking Water Directive = DWD) verabschiedet, und seit Januar 2021 ist sie in Kraft. Die Mitgliedsstaaten haben zwei Jahre Zeit, sie in ihre nationale Gesetzgebung zu übertragen. Sie ersetzt die 20 Jahre alte Trinkwasserrichtlinie (98/83/EC).

Hauptmerkmale der DWD sind ausgebauter Wasserqualitätsstandards, die strenger sind als die WHO-Empfehlungen. Die neue Richtlinie bringt viele Änderungen mit sich: Wichtig aus analytischer Sicht sind die verschärf-

ten Grenzwerte für Verunreinigungen wie beispielsweise die Schwermetalle Blei und Chrom. [1]

Einführung

Ionenchromatographie ist für die Analyse anorganischer Standard-Anionen (Fluorid, Chlorid, Nitrit, Bromid, Nitrat, Sulfat und Phosphat) sowie einiger Desinfektionsnebenprodukte im Trinkwasser anerkannt, um die Vorschriften vieler Länder weltweit zu vervollständigen. Es gibt verschiedene Standards, die Analyseprozeduren beschreiben. Hierzu gehört die unterdrückte Leitfähigkeitsdetektion als eine Hauptnachweismethode. Die wichtigen, in den USA und den europäischen Staaten zum Einsatz kommenden Verfahren sind der Standard U.S. EPA 300.1 sowie die Normen ISO 10304-1 und ISO 10304-4. [2 - 5] Darüber hinaus veröffentlichten auch andere Organisationen Verfahren; erwähnenswert ist die ASTM D4327-Publikation. [6]

Dieser Beitrag beschreibt die Bestimmung von sieben anorganischen Standard-Anionen und drei Des-

infektionsnebenprodukten im Trinkwasser, in Übereinstimmung mit den oben aufgelisteten EPA- und ISO-Verfahren.

Ionenchromatographie für den Anionennachweis

Wie verhält sich das 2020 vorgestellte HIC-ESP-Ionenchromatographie System im Kontext der maximal zulässigen Konzentrationsniveaus der neuen europäischen DWD? Das System ist das ideale Werkzeug für empfindliche Anionenmessungen in Trinkwasserproben und bedient ein breites Anwendungsspektrum, darunter die Umweltanalytik, Medizin, Chemie und Lebensmittelanalytik.

Hohe Sensitivität und Zuverlässigkeit

Bei der Ionenchromatographie erhöht ein Suppressor die Empfindlichkeit, indem er das Hintergrundsignal des Eluenten herabsetzt, die Signalstärke des Analyten steigert und das Baseline-Rauschen reduziert. →

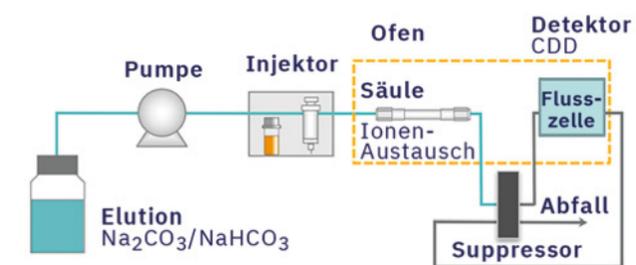


Abbildung 1: Flussdiagramm

Verbindung	Leitungswasser – Labor [mg/l]	Wasser – Wasserspender [mg/l]	Wasser – Wasserflasche [mg/l]
Fluorid	0,12	0,12	0,42
Chlorid	36	36	96
Nitrit	—	—	—
Bromid	0,082	0,080	0,22
Nitrat	12	13	—
Phosphat	0,30	0,27	0,17
Sulfat	70	70	24

Tabelle 1: Anionen-Konzentration in Trinkwasserproben



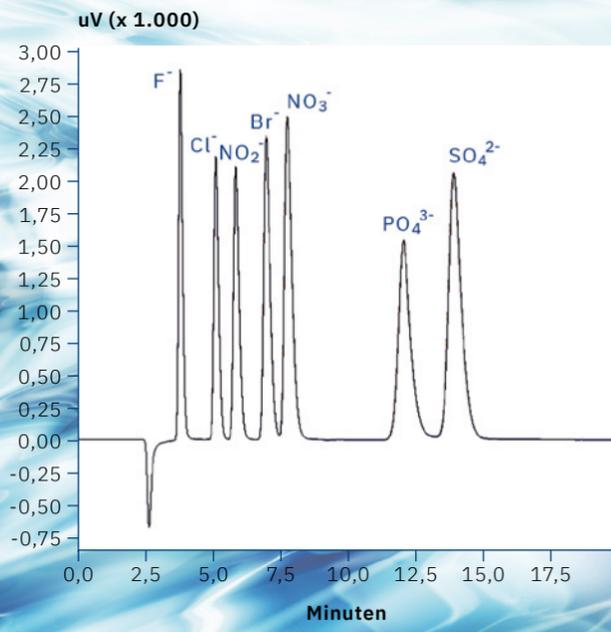


Abbildung 2: Trennung von sieben Standard-Anionen (Säule: Shim-pack IC-SA2)

Die Suppressoreinheit ICDS-40A von Shimadzu arbeitet mit Elektrodialyse, ein elektrochemisch getriebener Membranprozess, bei dem eine Ionenaustauschmembran die Natriumionen aus der Elution entfernt. Die zur Regeneration der Membran notwendigen Wasserstoffionen werden durch Elektrolysieren des Elutionsmittels gebildet, nachdem es den Detektor durchlaufen hat. Abbildung 1 zeigt das Flussdiagramm.

Analyse von sieben Standard-Anionen gemäß ISO 10304-1

Abbildung 2 zeigt die Überlagerung von sechs Chromatogrammen mit der Trennung von sieben Standard-Anionen. Sehr niedrige RSD-%-Werte für die Retentionszeit ($\leq 0,04\%$) und Peakfläche ($\leq 0,45\%$) aller Anionen weisen auf eine hohe Präzision des

Analysesystems hin. Der ICDS-40A-Suppressor mit geringem Totvolumen reduziert die Peak-Dispersion und verbessert die Trennung von Fluorid vom negativen Wasserpeak. Die Einhaltung der Anforderung des ISO-Standards an die gemäß US Pharmacopeia (USP) berechnete Auflösung $R (\geq 1,3)$ war zufriedenstellend. Dieses Verfahren wird zur Trennung von sieben Standard-Anionen innerhalb einer relativ kurzen

Analysedauer empfohlen.

Linearität

Bei der Leitfähigkeitsdetektion lag der lineare Arbeitsbereich für die Konzentration zwischen 0,1 und 5 mg/l; eine

Ausnahme bildeten Bromid und Nitrit, die im Bereich von 0,05 bis 5 mg/l lagen. Der Bestimmungskoeffizient R^2 war bei $\geq 0,9993$ für alle Anionen.

Probenanalyse

Die Konzentration der analysierten Anionen in den Proben variierte, aber alle zeigten einen hohen Konzentrationsunterschied zwischen Phosphat, Sulfat und teilweise Nitrat gegenüber anderen Anionen. Die Proben wurden folglich unverdünnt und verdünnt (1/40, v/v) gemessen, um alle Zielkomponenten jeweils im linearen Konzentrations-Arbeitsbereich zu quantifizieren. Der Gehalt an hochkonzentriertem Phosphat, Sulfat und teilweise Nitrat wurde über die verdünnten Proben berechnet und die Konzentration der restlichen Anionen über die unverdünnten Proben. Tabelle 1 zeigt die Anionenkonzentration in den analysierten Trinkwasserproben.

Analyse von zehn Anionen gemäß EPA 300.1

Abbildung 4 zeigt die Trennergebnisse von zehn Anionen. Dieses Verfahren wird empfohlen für eine Analyse von drei Desinfektionsnebenprodukten –

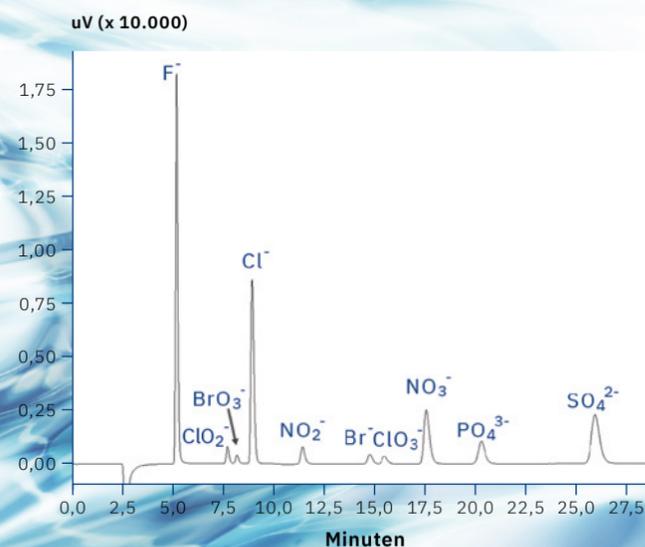


Abbildung 4: Trennung von zehn Anionen (Säule: Shodex IC SI-52 4E)

Verbindung	Wiederfindung Leitungswasser – Labor [%]	Wiederfindung Wasser – Wasser-spender [%]	Wiederfindung Wasser – Wasserflasche [%]
Fluorid	99,8	103,6	99,8
Chlorit	107	107	107
Bromat	105	107	105
Chlorid	110	83,4	110
Nitrit	97	92	97
Bromid	100	100	100
Chlorat	106	101,5	106
Nitrat	98,5	97,9	98,5
Phosphat	91,7	109,6	91,7
Sulfat	120	99,8	120

Tabelle 2: Wiederfindungen in unterschiedlichen Wasserproben

Chlorit, Bromat und Chlorat – in Gegenwart von sieben Standard-Anionen. Alle Anionen werden in weniger als 27,5 Minuten eluiert. Das für dieses Verfahren verwendete Säulenmaterial hat eine geringere Partikelgröße verglichen mit dem eingesetzten Säulenmaterial bei der zuvor diskutierten Analyse der sieben Anionen, was höhere Auflösung ermöglicht.

Die Analysedauer ist zwar lang, der Vorteil dieser Methode besteht aber in der Basislinientrennung der zehn Analyten. Darüber hinaus ist die Auflösung von Bromid und Chlorat höher, sogar bei größerem Injektionsvolumen. Diese Methode wird auch bei der Spurenanalyse von Chlorat und Bromid hilfreich sein.

Linearität und Methoden-nachweisgrenze

Zur Bewertung des Verfahrens und der Gesamtsystemleistung wurden auch Linearität, Methodennachweis-

grenzen (Method Detection Limit = MDL) und Reproduzierbarkeit bestimmt. Die MDL-Untersuchung wurde gemäß dem Verfahren in EPA-Methode 300.1 durchgeführt.

Dazu werden sieben wiederholte Injektionen von MDL-Standards vorgenommen. Sie wurden hergestellt durch Verstärkung einer Leerprobe mit Anionenstandards bis zu einer Konzentration, die 3- bis 5-fach über der Gerätemachweisgrenze liegt. Das MDL wurde berechnet aus $(t) \times (S)$, wobei t der Student-t-Verteilung für das 99 % Konfidenzniveau ($t = 3,14$ für sieben Wiederholungen) entspricht und S der Standardabweichung aus sieben Injektionen.

Die Ergebnisse zur Linearität der Kalibrationskurven zeigen, dass das System einen linearen Verlauf mit einem Bestimmungskoeffizienten R^2 größer als 0,999 für alle zehn Anionen in einem breiteren Konzentrationsbereich produziert hat. Die berech-

neten MDL lagen im unteren ppb-Bereich von 1,3 $\mu\text{g/l}$ (Fluorid) bis 12,6 $\mu\text{g/l}$ (Chlorid).

Reproduzierbarkeit und Genauigkeit

Dieses Verfahren weist auch eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit für die Retentionszeit ($< 0,7\%$ RSD) und die Peakfläche ($< 0,42\%$ RSD) auf. Tabelle 2 zeigt, dass mit Hilfe beider Methoden akzeptable Wiederfindungen bei allen anorganischen Ionen in drei Wassermatrizes erhalten wurden.

Fazit

Das Shimadzu HIC-ESP-Ionenchromatographie-System mit elektrolytischer Eluentenunterdrückung erlaubt eine empfindliche Analyse von anorganischen Standard-Anionen und Desinfektionsnebenprodukten, gemäß der Standards ISO 10304-1, ISO 10304-4 oder EPA 300.1 für unterschiedliche Arten von Wasser, darunter Trink-, Oberflächen- und Abwasser. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass eine robuste und zuverlässige Leistung des IC-Systems für die Bestimmung der analysierten Anionen möglich ist.

Hinweis

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



Es grünt so grün ...

Mit Fluoreszenz dem Mikroplastik auf der Spur

Marion Egelkraut-Holtus, Shimadzu Europa GmbH
Albert van Oyen, Erwin Jansen, Carat GmbH

Wo kommt Mikroplastik her?

Mikroplastik ist global eine der größten Herausforderungen: für die Menschheit, die Tierwelt und die Umwelt. Ursächlich stammt es aus größeren Kunststoffteilen und verwittert oder ist bereits in Alltagsgegenständen enthalten – etwa in Reinigungsmitteln, Kosmetik oder Textilien. Mikroplastik gelangt durch Abwässer in die Meere; nur bedingt können es Kläranlagen zuvor herausfiltern. Einmal im Meer, können diese Kunststoffe nicht mehr entfernt werden. Mikroplastik findet sich in allen Tiefen der Ozeane und kommt von dort in die Nahrungskette.

Kleinstlebewesen nehmen es auf, die eine wichtige Nahrung für Fische sind. Von denen

wiederum ernähren sich Meeressäuger, Vögel und Menschen.

Dieser dritte Teil der Artikelserie über Analyse von Polymeren geht um fluoreszierendes Mikroplastik und wie es mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie der Forschung nutzen kann.

In den letzten beiden Ausgaben des Shimadzu-Magazins wurden Polymere aus Getränkeflaschen des Lebensmittelsektors untersucht (1/2020) sowie industriell gefertigte Polymergranulate (2/2020).



Abbildung 2: PET-Flaschenboden (koffeinhaltige Limonade) und die Fluoreszenz unter einer Xenon-Lichtquelle. Die Flasche wurde dazu in den Probenraum des RF-6000 montiert.



Abbildung 3: Siebfraktionen eines Polycarbonats von links nach rechts zu sehen sind: 500-, 1.500-, 3.000-µm-Partikelfraktionen und 5 mm Granulate

Presse, Umweltschutzverbände und -behörden berichten über Mikroplastik. Es birgt Gefahren für Menschen und Tiere und wird schon in ihren Ausscheidungen gefunden. Aber über die direkte Auswirkung der Mikroartikel im Körper steht die Forschung ganz am Anfang.

Da viele Publikationen immer wieder theoretische Modelle erarbeiten und mit „frisch-generiertem“ Mikroplastik arbeiten, ist hier die Idee, gebrauchtes Material zu recyceln, zu zerkleinern und dann zu Testzwecken einzusetzen. Somit wird nicht neues und

noch mehr Polymer in die Umwelt gebracht, sondern vorhandenes eingesetzt, wobei es hier um Mikromengen geht und nicht um Kilogramm oder Tonnen. Und man kann sich dann den wahren Eigenschaften der Mikroartikel annähern, mit denen sich die Organismen notgedrungen auseinandersetzen müssen.

Abbildung 1: Drei Getränkeflaschen in grüner Farbe von links nach rechts: stark fluoreszierende PET-Flasche für eine koffeinhaltige Limonade, Flasche aus PP für Kindersaft ohne Fluoreszenz aber mit starkem Absorptionsspektrum (rot wird im sichtbaren Bereich geschluckt und zurück bleibt die Komplementärfarbe grün) und eine weitere fluoreszierende PET-Flasche für eine Limonade.

Mikroplastik ist vor allem aufgrund der geringen Größe für die Umwelt gefährlich, da es dadurch eine Vielzahl von Organismen aufnehmen, beispielsweise weil sie es mit Futter verwechseln.

Ein nächster Schritt in der Entwicklung von Innovationen in der →



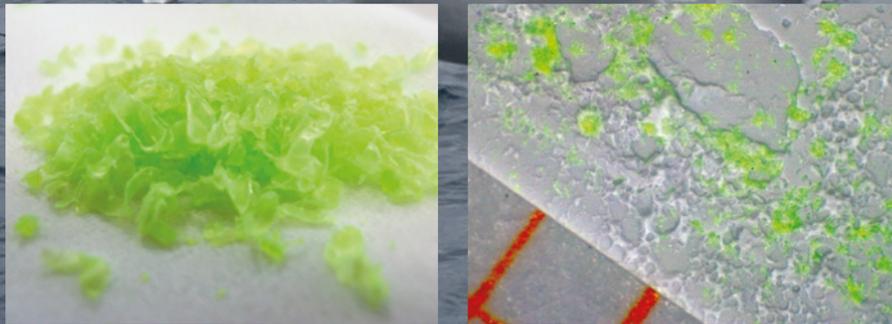


Abbildung 4a (links) und 4b (rechts): Mikropartikel generiert aus der linken PET-Flasche von Abbildung 1 (4a) und eine Auswahl der kleinsten Partikel mit Millimeterpapierskalierung zum Größenvergleich, und die Partikel liegen auf dem BaSO₄-Bett

Umweltforschung könnte fluoreszierendes Mikroplastik sein. Mit ihm ist es möglicherweise einfacher zu bestimmen, ob und wo sich diese Materialien in Organismen ansammeln. Dies ermöglicht dann auch eine bessere Risikobewertung.

Laut einer Applikation sollte es möglich sein, fluoreszierendes Mikroplastik herzustellen anhand von dem lipophilen Farbstoff Nilrot. Aber hier stellt sich die Frage, warum herstellen, wenn es genügend Polymere mit Fluorophoren (Teil 1 + Teil 2) gibt (Abbildung 1)? Daher wurden technische Polymere und eine sehr auffällig grüngelblich leuchtende PET-Getränkflasche (Abbildung 2) gemahlen, um Mikropartikel zu generieren. [1,2]

Das Unternehmen Carat aus Bocholt hat die Idee weiterentwickelt. Es ist spezialisiert auf die Analyse von thermoplastischen Kunststoffen. Für die vorliegende Anwendung hat Carat einen Weg gefunden, die Polymere zu zerkleinern, spezifizieren und zertifizieren zu können. Shimadzu hat mit dem RF-6000 Spektrofluorometer und einem Feststoffprobenhalter eine Lösung zugeliefert, die diese kleinen Partikel messen können.

Mess-Herausforderung Mikroplastik

Mikroplastik führt zu besonderen Anforderungen bei der Analysetechnik.

Die Fluoreszenz ist bekannt für ihre hohen Nachweisgrenzen in Flüssigkeiten. Kann diese Eigenschaft auch auf Partikelgröße übertragen werden? In den beiden vorherigen Ausgaben des Shimadzu-Kundenmagazins (siehe 1 sowie 2/2020) wurden Polymerstücke (2 - 3 cm) und Granulate (5 mm) untersucht.

Die Mikroskopie ist sinnvoll für Proben unter 100 µm, wie zum Beispiel bei der Identifikation der Partikel mit der Infrarot-Spektroskopie. Dieser dritte Teil der Artikelserie betrachtet die Identifikation oder schlicht Wiederfindung von Partikeln kleiner 500 µm mit der Fluoreszenzspektroskopie. Gängige Polymergranulate in der Größe von 5 mm weisen mehr oder weniger starke Fluoreszenz auf, die bei Polymeren mit π-Elektronen-Molekülstruktur (Doppelbindungen) entsteht oder durch Zuschlagstoffe, die fluoreszierend sind. Jetzt werden PC (Polycarbonat) und PET (Polyethylenterephthalat) näher untersucht.

Um Mikropartikel zu simulieren, wurden Polymere mit der Kryo-Mühle auf Partikel unter 500 µm zerkleinert, danach gesiebt und in drei Fraktionen unterschiedlicher Partikelgröße eingeteilt.

Probenvorbereitung und Analysen

Von jeder Fraktion wurden Partikel ins Zentrum eines Bariumsulfat-Betts

(BaSO₄) gestreut, das als Fixierung dient, und mit der Quarzplatte festgedrückt (Abbildung 4). Diese Messungen zeigten lückenlos die Homogenität bis unter 500 µm und Präsenz von Fluoreszenz (Abbildung 5): Je nach Polymer und/oder Additiv ist die Fluoreszenzintensität mit den Mikropartikeln im Vergleich zu höheren Konzentrationen (größere Oberflächen und Schichtdicke der Polymere) abgeschwächt.

Für ein Experiment mit PET-Mikropartikeln würde sich die Mahlung der grellen Flasche eignen. Mit sehr kleiner Menge an Mikropartikeln kann die Fluoreszenz noch intensiv sein, so dass ein Standardfluoreszenzgerät fähig ist, die Anwesenheit des Partikels zu detektieren (Abbildung 6). Messparameter und Probenvorbereitung wurden nicht verändert, um sie vergleichen zu können.

Fazit

In dieser Artikelserie über die Fluoreszenz von Polymeren wurden diverse Anwendungsfelder angesprochen. Untersucht wurden Polymere aus Getränkeflaschen des Lebensmittelsektors (1/2020), industriell gefertigte Granulate und Polymergranulate (2/2020). Die Fluoreszenzspektroskopie zeigte die Fluoreszenz der Polymere und deren eingearbeiteten Additive und gezielt eingesetzte Fluorophore, die als Marker fungieren.

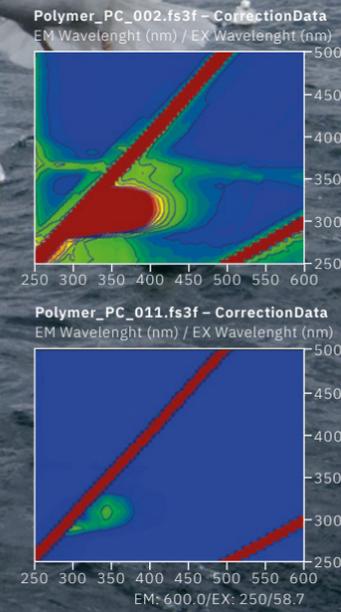


Abbildung 5: Die EEM-Matrizen von Polycarbonatpartikeln in unterschiedlichen Größen, die Skalierung ist auf 10.000 Intensitätseinheiten gesetzt, oben links Granulat, oben rechts ein Partikel aus 3.000 µm, unten links 1.500 µm und unten rechts kleiner 500 µm

Man kann feststellen, dass sich die Fluoreszenz hervorragend als Instrument der Qualitätskontrolle einsetzen lässt. Für alle Kunststoffe konnte gezeigt werden, dass Eigenfluoreszenz auftritt oder Additive (z.B. Luminol-Beimischung gelb, grün und andere) für die Fluoreszenz verantwortlich sind, und dass deren Matrix Fluoreszenz entlässt bis auf eine PP-Probe.

Aufgrund der Nachweisgrenzen der Fluoreszenzspektroskopie kann auch Mikroplastik untersucht werden – kleiner als 500 µm. Wobei hier die Konzentration der Fluorophore die Nachweisgrenzen in Bezug auf die Partikelgröße beeinflussen. Dies ist ein wichtiges Argument bei den Polymeren, die schwache Fluoreszenz ausstrahlen. Eine Rückstandsanalytik

aus einer Filterung, bei der Mikroplastik erwartet wird, wurde hier nicht betrachtet. Dies wäre ein Projekt für eine zukünftige Analyse.

Als Ausblick sind in naher Zukunft Lösungen vorstellbar, die mit für das menschliche Auge unsichtbaren Fluoreszenz-Markern die recycelten PET-Flaschen besser sortieren können und das Recycling auf Lebensmittelverpackungsniveau erhöhen, um die EU-Vorgabe von 95 % Reinheitsanforderung für die Lebensmittelqualität in recyceltem PET zu erreichen. [4]

Hinweis

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

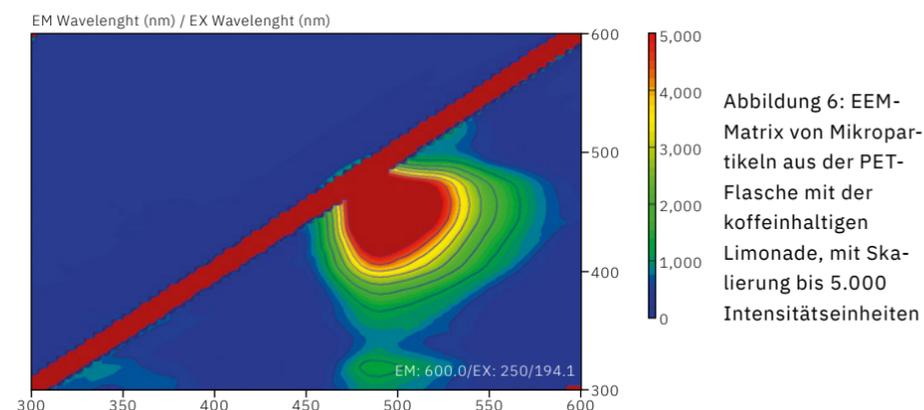


Abbildung 6: EEM-Matrix von Mikropartikeln aus der PET-Flasche mit der koffeinhaltigen Limonade, mit Skalierung bis 5.000 Intensitätseinheiten



Der Wandel als Chance

Shimadzu bietet auch virtuelle Schulungen an

Dr. Benjamin Thomas, Shimadzu Europa GmbH

Die Covid-19-Pandemie gibt dem digitalen Wandel der Arbeitswelt, wie man sie bisher kannte, einen dynamischen Schub. Zielgruppen- und Angebotsstrukturen sind im Umbruch, Austausch und Zusammenarbeit in Unternehmen sowie mit Kunden wandeln sich, Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit erfahren einen neuen Stellenwert, auch der Umgang mit Geschäftsreisen: die digitale Welt als Chance, auch auf lange Sicht neue Wege zu beschreiten.

Blick in die **Laborwelt**. Jeder Bereich (hier UV-Spektroskopie) wird durch Poster für Besucher erklärt.



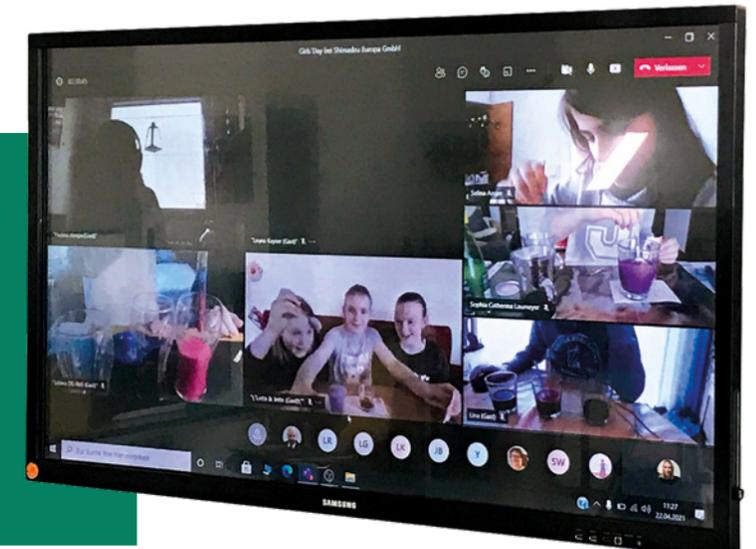
Wie geht ein vertriebs- und serviceorientiertes Unternehmen wie Shimadzu mit einer pandemischen Situation um? Das darauf ausgerichtet ist, mit einer hochqualifizierten Belegschaft eine ortsunabhängige und schnelle Kundenbetreuung zu gewährleisten. Das mit der Europa-zentrale in Duisburg und der gut ausgestatteten „Laborwelt“ eine Weiterbildungs- und Teststätte bietet.

Um die Service-Exzellenz aufrechtzuerhalten, ist es essenziell, dass ein interdisziplinäres Team von Produktspezialisten und Servicetechnikern sich um die Weiterbildung der lokal operierenden Shimadzu-Fachkräfte kümmert, zum Beispiel in gemeinsamen Workshops oder zielgerichteten Installationstrainings für Zubehör. Das Gleiche gilt für die Laborwelt in Duisburg, wo Kunden die Gelegenheit

shimadzu.eu/
kids-education



Der **Girls Day** weckt jedes Jahr die Begeisterung von Schülerinnen für technische Berufe und fand im Jahr 2021 erstmals virtuell statt



haben, Shimadzu-Geräte selbst zu testen, oft anhand selbst mitgebrachter realer Proben.

Zwar sind Werkzeuge, wie Fernzugriff und Videoschalten im Service bereits lange im Einsatz, um schnelle Unterstützung im Feld zu gewährleisten. Auch die Einrichtung der internen E-Learning Plattform „Shimadzu Academy“ lief bereits in vollen Zügen. Doch die Maßnahmen zur Eindämmung der Covid-19-Pandemie ab Mitte 2020 beschleunigten den Umbruch hin zum digitalen Arbeiten auch in Vertrieb und Produktunterstützung.

Von Präsenz zu online

Die Kontaktreduzierung bedeutete große Einschnitte in der international geprägten Arbeitswelt. Das trifft auf viele, auch mittelständische Unternehmen zu, wie die

Shimadzu-Europa-Organisation. Geschäftsreisen wurden plötzlich durch Reisebeschränkungen unmöglich, Branchen-Messen als wichtige Austauschplattform fielen aus und folglich war auch jede Form von Präsenztraining plötzlich nicht mehr durchführbar.

In wenigen Monaten gelang es, die in allen Shimadzu-Abteilungen üblichen Präsenztrainings in Online-Seminare umzuwandeln. Kamera-Equipment war schnell beschafft, und das Know-how sich in der ungewohnten, rein digitalen Arbeitswelt zu bewegen, wurde dynamisch und mit gegenseitiger Unterstützung pragmatisch aufgebaut. Dass diese Form auch über die professionelle Community der Analytik hinaus funktioniert, zeigte der virtuelle „Girls Day“ im April 2021: Dort wurden Schülerinnen der Unter- und Mittelstufe spielerisch mit Fernexperimenten an die Chemie herangeführt – ein Beispiel mit großer Reichweite. →



Blick hinter die Kulissen:
Das GC-2030 wird vor einem
Greenscreen in Szene gesetzt

Fachlicher Austausch

Doch auch interne Fortbildungen und Produktpräsentationen wurden erfolgreich in die digitale Welt übertragen. In der Spektroskopie beispielsweise fanden mehrere „Task Force Meetings“ statt, ein Forum für die in Europa lokal agierenden Shimadzu-Produktspezialisten. Ausgewählte Zubehöre wurden per Video oder Live-Übertragung vorgestellt und mögliche Applikationen oder häufige Kundenanfragen online diskutiert.



Bildschirmfoto vom „Task Force Meeting“. Hier wird eine Durchflusszelle für ein UV-Vis-Spektrometer zur Präsentation vorbereitet.

Fortbildungen: hybride Trainings

Während die Atmosphäre bei den vorab genannten Veranstaltungen informell ist, erfordern zertifizierte Fortbildungen eine Leistungskontrolle, um die Betreuung auf hohem Niveau zu halten. Dazu wurden in der Shimadzu Academy hybride Trainings entworfen als Kombination aus virtueller Präsentation, per Videoschleife vorgeführter Installation oder Messung und einer Abschlussprüfung. Teilnehmer an der Live-Demonstration können durch Fernzugriff auf den Labor-Rechner die Bedienung der Software fast wie bei einem „Hands on“ Training vor Ort erlernen. Ein Spezialist ist dabei immer im Labor präsent, um Zubehöre zu wechseln und den sicheren Betrieb zu gewährleisten.

Das Bereitstellen der aufgezeichneten Videos in der Shimadzu Academy zusammen mit der schriftlichen Prüfung bietet dabei einen weiteren Vorteil: Trainingsinhalte sind jederzeit abrufbar, um Wissen aufzufrischen. Aufwendige Terminplanungen oder eine Beschränkung der Teilnehmerzahl entfallen, was den Wissenstransfer enorm vereinfacht, und Fortbildungsmaßnahmen lassen sich einfach verwalten.

Virtuelle Geräte-Einweisung für Kunden

Die virtuelle Form spielt auch in der Geräte-Einweisung für den Endkunden ihre Vorzüge aus: Üblicherweise per-

sönlich vor Ort bei den Kunden durchgeführt, kann sie als Online-Version in kürzere Sitzungen aufgeteilt werden. So lassen sich pro Sequenz Teilaspekte in den Vordergrund stellen (z.B. ein bestimmtes Zubehör, oder ein bestimmter Messmodus) und im Detail erklären. In der Zeit bis zur nächsten Sitzung haben alle Anwender die Möglichkeit, das Erlernte zu üben und Rückfragen zu sammeln.

Virtuelle Trainings und auf Wunsch Vor-Ort-Präsenz

Nicht alles ist digital vermittelbar, und daher gibt es auch einige Nachteile, etwa rund um den Service: Das Gefühl für technische Handgriffe (z.B. das richtige Anzugmoment einer Stellschraube oder die Überprüfung von Reinigungsschritten) lässt sich nicht ohne Übung am Gerät selbst erlernen. Daher wurden die virtuellen Trainings bei Bedarf um Vor-Ort-Übungen ergänzt – unter Einhaltung eines strengen Hygienekonzepts – einem „Hands on“ Teil, der nach Abklingen der Pandemie dem Mix aus Videos, Chats und E-Learning-Portal wieder hinzugefügt wird.



Manche Erfahrungen lassen sich nur beim gemeinsamen Arbeiten erlernen, sowie bei diesem **Installations-training** für ein komplexes UV-Vis-Spektrometer

Fazit

Der Ausbruch von Covid-19 hat die Digitalisierung der Arbeitswelt beschleunigt und den Umbruch in vielen Branchen vorangetrieben. Auch Shimadzu stieg schnell auf digitale Produktvorführungen und Fortbildungen um. Zwar gibt es Aspekte, die auch in Zukunft ein Präsenztraining erfordern werden, dennoch wird die Nutzung digitaler Werkzeuge ein wichtiger Pfeiler in der Ausbildung und der schnellen Kundenbetreuung bleiben.

Neuer Ansatz für Epitranskriptomik

Quantifizierung von RNA-Methylierungen mit der LC-MS/MS

Epitranskriptomik ist ein aufstrebendes und vielversprechendes Forschungsgebiet mit dem Fokus auf die biochemischen Modifikationen der RNA innerhalb einer Zelle. Aktuell umfasst sie mehr als 170 chemische RNA-Modifikationen, einschließlich der RNA-Methylierung, mit der die Expression bestimmter Gene reguliert wird.

Die Massenspektrometrie in Kombination mit der Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS) hat sich zur Methode der Wahl zur Analyse modifizierter Nucleoside aus biologischen Proben entwickelt. Dieser Artikel stellt die Methodik zur Quantifizierung methylierter Nucleoside aus zellulärer mRNA mit Hilfe der LC-MS/MS (Shimadzu LCMS-8060) vor.

Dr. Alexandre David, Amandine Amalric, Aurore Attina, Pr. Sylvain Lehmann, Dr. Jerome Vialaret, Pr. Christophe Hirtz, Clinical Proteomics Platform, IRMB-PPC, INM, Univ Montpellier, CHU Montpellier, INSERM CNRS, Montpellier, France



Einführung

Die Epitranskriptomik erforscht Modifikationen an der RNA, die an der Regulation der Proteinexpression beteiligt sind. Entscheidend ist hierbei der Zusammenhang zwischen RNA-Modifikationen und Krankheiten. So sind Veränderungen am Epitranskriptom charakteristisch für viele Tumorgewebe.

Das Nucleosid N6-Methyladenosin (m⁶A) – die bekannteste und häufigste Modifikation in der RNA höherer Lebewesen – ist ein markantes

Beispiel. Diese Modifikation tritt nicht nur in der mRNA auf, sondern auch in nicht-kodierender RNA (rRNA, tRNA, snRNA). Da unter normalen physiologischen Bedingungen m⁶A wichtig für die mRNA-Regulation ist, kann jegliche Fehlregulation seiner Menge zu Krankheiten führen. [1]

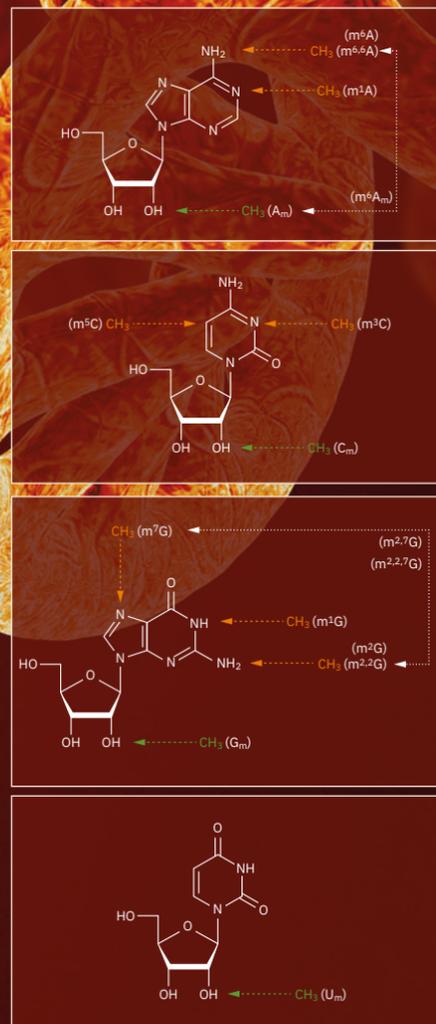
Derzeitige Technologien zum Nachweis einer m⁶A-Modifikation [2] nutzen neueste Sequenzierungsverfahren und liefern überaus wichtige Informationen in Form einer m⁶A-

Kartierung auf gesamtgenomischer Ebene. Allerdings können sie kein genaues quantitatives Ergebnis bereitstellen.

Heute ist die Massenspektrometrie in Verbindung mit einer vorgelagerten flüssigkeits-chromatographischen Trennung (LC-MS/MS) die Methode der Wahl, um modifizierte Nucleoside aus biologischen Proben exakt zu quantifizieren. →

LC-Analysebedingungen																									
System	Nexera LC-40																								
Trennsäule	Synergi Fusion-RP C18 Säule (250 mm x 2 mm, 4 µM, 80 Å)																								
Mobile Phase	A: 5 mM Ammoniumacetat, eingestellt auf pH 5,3 mit Essigsäure B: Acetonitril																								
Gradienten-Elution																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit (Min.)</th> <th>[A] (%)</th> <th>[B] (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>3,0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>3,1</td><td>99</td><td>1</td></tr> <tr><td>13,0</td><td>92</td><td>8</td></tr> <tr><td>23,0</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr><td>25,0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>30,0</td><td>100</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Zeit (Min.)	[A] (%)	[B] (%)	0,0	100	0	3,0	100	0	3,1	99	1	13,0	92	8	23,0	60	40	25,0	100	0	30,0	100	0
Zeit (Min.)	[A] (%)	[B] (%)																							
0,0	100	0																							
3,0	100	0																							
3,1	99	1																							
13,0	92	8																							
23,0	60	40																							
25,0	100	0																							
30,0	100	0																							
Durchflussrate	0,4 ml/min																								
Ofentemperatur	35 °C																								
Temp. des Autosamplers	4 °C																								
Injektionsvolumen	5 µl																								
MS-Analysebedingungen																									
System	Triple Quadrupol LCMS-8060																								
Ionisierungsverfahren	ESI (positiv)																								
Nebulizing gas flow	2,5 l/min																								
Drying gas flow	3 l/min																								
Heating gas flow	12,5 l/min																								
Interface temperature	325 °C																								
DL temperature	225 °C																								
Heat block temperature	380 °C																								

Tabelle 1: Analysebedingungen



Moleküle	Übergänge	Retentionszeit (min)	Target Dwell Time (msec)	Target Collision Energy (E)	Target Q1 Pre Bias (V)	Target Q3 Pre Bias (V)	Interface Voltage (kV)
Adenosin (A)	268,0 > 136,0	11,8	197,0	-18,0	-24,0	-24,0	1,0
2'O-Methyladenosin (A _m)	282,0 > 136,0	14,6	397,0	-17,0	-14,0	-24,0	1,5
N1-Methyladenosin (m ¹ A)	282,1 > 150,1	5,4	197,0	-21,0	-12,0	-26,0	1,5
N6-Methyladenosin (m ⁶ A)	282,1 > 150,1	15,9	397,0	-20,0	-12,0	-16,0	1,5
N6,N6-Dimethyladenosin (m ^{6,6} A)	296,0 > 164,1	18,3	530,0	-25,0	-22,0	-20,0	1,5
N6,2'O-Dimethyladenosin (m ⁶ A _m)	296,0 > 150,0	17,6	397,0	-15,0	-18,0	-32,0	1,5
Cytidin (C)	244,1 > 112,0	3,8	197,0	-12,0	-17,0	-29,0	1,0
2'O-Methylcytidin (C _m)	258,1 > 112,0	7,9	142,0	-15,0	-18,0	-32,0	1,5
N3-Methylcytidin (m ³ C)	258,1 > 126,0	4,5	197,0	-13,0	-10,0	-14,0	1,5
N5-Methylcytidin (m ⁵ C)	258,0 > 126,0	7,3	157,0	-17,0	-14,0	-25,0	1,0
Guanosin (G)	284,1 > 152,0	8,6	142,0	-15,0	-24,0	-23,0	1,5
2'O-Methylguanosin (G _m)	298,1 > 152,0	10,9	174,0	-12,0	-12,0	-17,0	1,5
N1-Methylguanosin (m ¹ G)	298,1 > 166,0	10,6	142,0	-15,0	-11,0	-18,0	0,5
N7-Methylguanosin (m ⁷ G)	298,3 > 166,0	7,3	157,0	-10,0	-30,0	-18,0	1,5
N2,N7-Dimethylguanosin (m ^{2,7} G)	312,1 > 180,0	10,3	142,0	-12,0	-12,0	-17,0	2,5
N2,N2,N7-Trimethylguanosin (m ^{2,2,7} G)	326,15 > 194	12,4	197,0	-20,0	-15,0	-21,0	1,5
Uridin (U)	245,1 > 113,0	5,2	197,0	-11,0	-28,0	-26,0	1,0
2'O-Methyluridin (U _m)	259,1 > 113,0	9,5	142,0	-9,0	-11,0	-19,0	2,5

Tabelle 2: MRM-Parameter

Präanalytische Schritte

Der experimentelle Arbeitsablauf zur Quantifizierung von methylierten Nucleosiden mit der LC-MS/MS wird in Abbildung 1 gezeigt. Zuerst werden Tumorzellen in Petrischalen kultiviert und anschließend die RNA extrahiert, isoliert und in Nucleotide gespalten, die dann zu Nucleosiden dephosphoryliert werden. Schließlich werden die

Proben gefiltert und der LC-MS/MS-Analyse unterzogen.

Analysebedingungen

Zur Nucleosidmessung mit dem LC-MS/MS werden die Nucleoside mit einer Umkehrphasen-UHPLC aufgetrennt und mit einem Shimadzu LCMS-8060-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mittels Multiple

Reactions Monitoring (MRM) im positiven Elektrospray (ESI) nachgewiesen. Einzelheiten der Analysebedingungen und MRM-Parameter sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

Die Modomics-Datenbank [4] enthält Informationen über MRM-Übergänge zahlreicher modifizierter Nucleoside und erlaubt die simultane Messung mehrerer methylierter Nucleoside. →

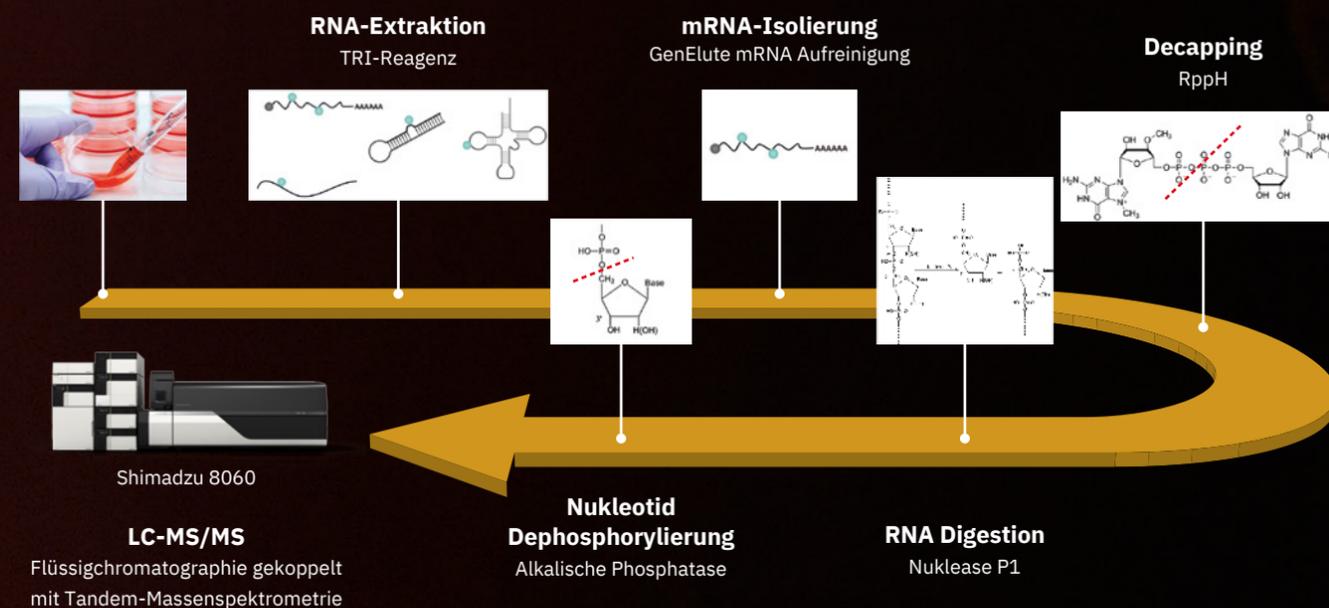


Abbildung 1: Arbeitsablauf für eine markierungsfreie Quantifizierung von RNA-Methylierungen mit einer LCMS-8060

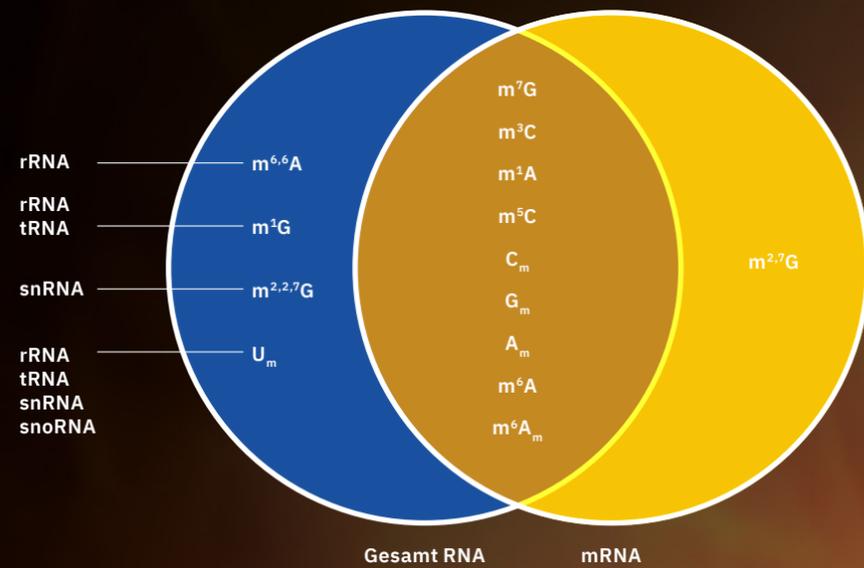


Abbildung 2: Verteilung modifizierter Nucleosidspezies auf verschiedene RNA-Typen. Zehn Nucleoside werden in mRNA gefunden. Vier sind nur in anderen RNA-Typen vorhanden.

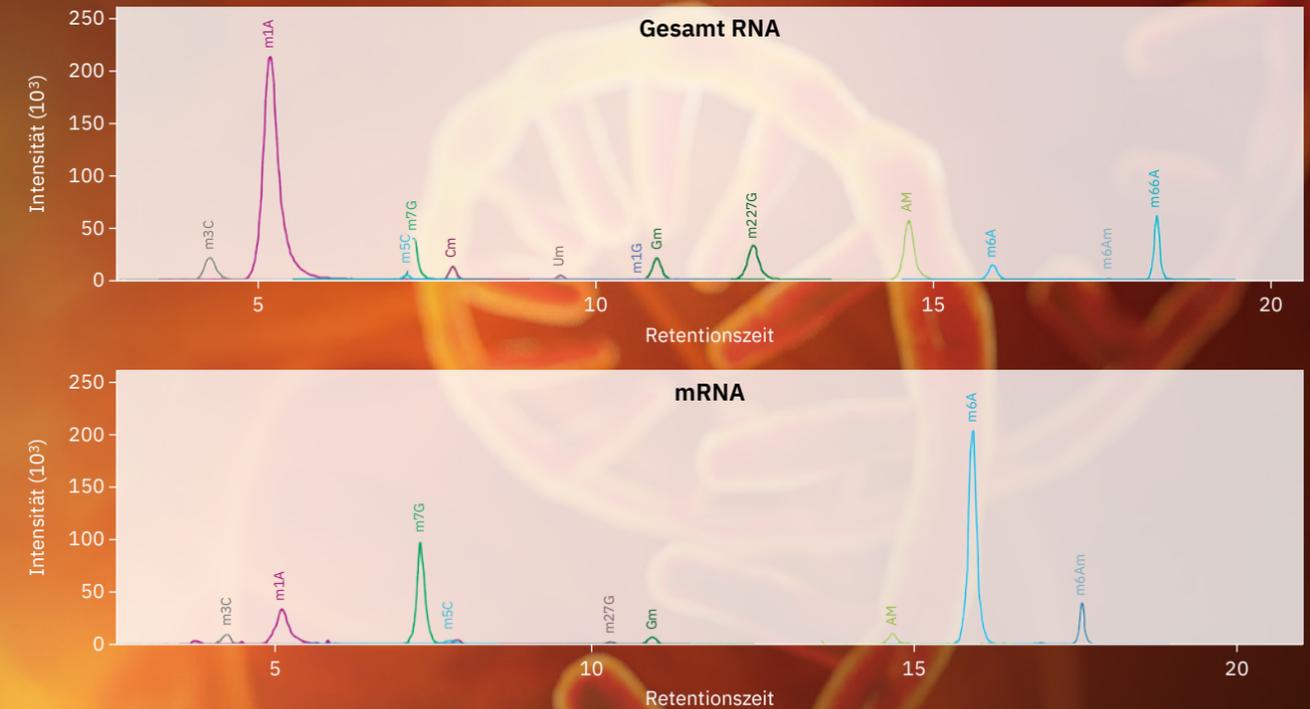
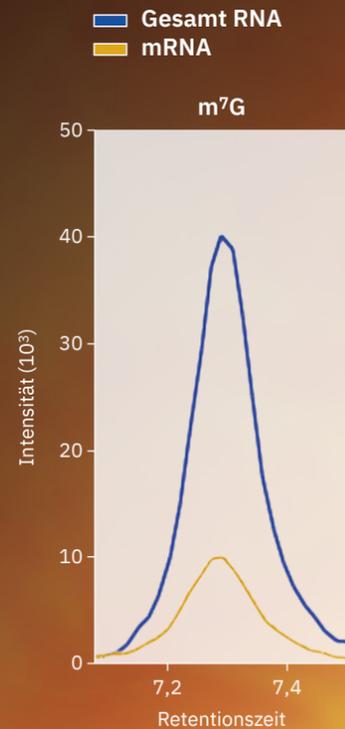


Abbildung 3: Extrahierte Ionenchromatogramme methylierter Nucleoside aus der gesamten RNA und der mRNA, analysiert per LC-MS

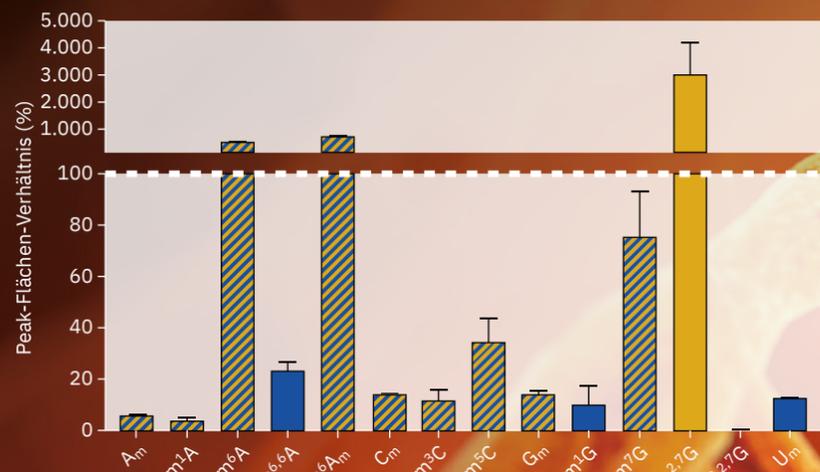


Abbildung 4: A. Ausmaß der RNA-Methylierungen in mRNA (Histogramm) verglichen mit der Gesamt-RNA (punktierter Linie) in CTC44 (n = 3)

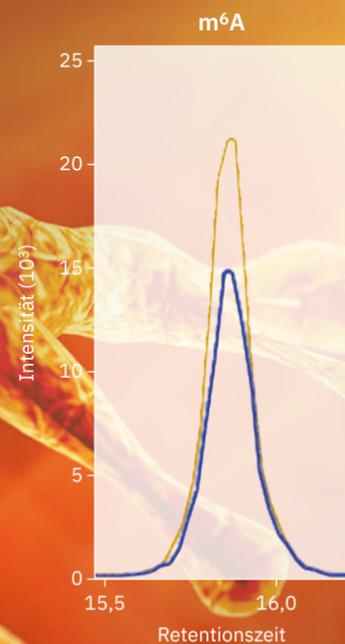


Abbildung 5: Überlagerte extrahierte Ionenchromatogramme von m7G und m6A in der gesamten RNA (blaue Linie) und gereinigter mRNA (goldene Linie)

Quantifizierung methylierter Nucleoside aus messenger-RNA (mRNA)

Die Quantifizierung methylierter Nucleoside, die aus mRNA erhalten wurden, erzielten Ergebnisse für zehn Nucleosidspezies aus der Zielgruppe von 14 methylierter Nucleosidspezies (Abbildung 3). Die verbleibenden vier Spezies wurden ausschließlich in rRNA, tRNA und snRNA beobachtet, und sind – nach dem aktuellen Forschungsstand – in mRNA nicht vorhanden (Abbildung 2).

Des Weiteren wird für die meisten der detektierten Methylierungen

für mRNA im Vergleich zur Gesamt-RNA ein niedrigeres Signal beobachtet (Abbildung 4). Beispielsweise wird m1A in mRNA gefunden, die nur 5 % der gesamten Zell-RNA ausmacht, und auch in tRNA und rRNA mit 15 % beziehungsweise 80 %.

Im Falle der mRNA-Aufreinigung war das Ionensignal für die Methylierungen erhöht, die vorwiegend in mRNA gefunden werden, wie m6A und m6Am (Abbildung 4 - 5).

Fazit

Die Quantifizierung von RNA-Methylierungen mit einem Triple-Quadrupol-LC-MS/MS-System (LCMS-8060 Massenspektrometer gekoppelt an ein Nexera LC-40) stellt einen empfindlichen und zuverlässigen Ansatz für Epitranskriptomik-Untersuchungen dar. Diese Anwendung kann für ein breites Spektrum biologischer Proben (und RNA-Spezies) genutzt werden; sie stellt einen gerichteten und robusten Ansatz für diese Analyse dar.

Hinweis

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



**JEC World**

Paris, Frankreich
08. - 10.03.2022

**Bioprocessing**

Barcelona, Spanien
22. - 24.03.2022

**Euromedlab**

München, Deutschland
10. - 14.04.2022

**HTC**

Gent, Belgien
18. - 20.05.2022

secrets of science
magazine

Herausgeber

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

Redaktion

Uta Steeger,
Sonja Wischnewsky,
Ralf Weber,
Janina Hermann
m/e brand communication
GmbH GWA, Düsseldorf

**Gestaltung und
Produktion****Auflage**

Deutsch: 4.550
Englisch: 4.040

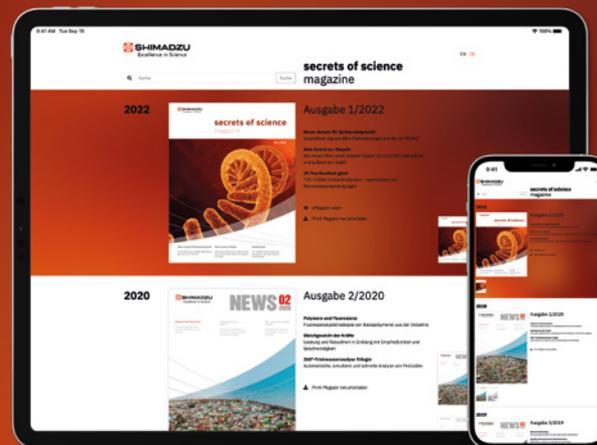
©Copyright

Shimadzu Europa GmbH,
Duisburg, Januar 2022.
Nachdruck, auch auszugs-
weise, nur mit Genehmi-
gung der Redaktion.



Geheimnisse der Wissenschaft

Ein neuer Name, ein neues Design – doch die Inhalte wie gewohnt fachlich versiert. Das Shimadzu „Secrets of Science“ Magazin löst die bisherige Shimadzu NEWS ab. Ob tatsächlich die Geheimnisse der Wissenschaft gelöst werden können, bleibt spannend.

**Digitale Version**

Mehr Insights, wie
zusätzliche Chromato-
gramme und inhaltliche
Details, bietet die digitale
Ausgabe

shimadzu-webapp.eu