forschen.
vernetzen.
anwenden.

Innovationsreport 2023

Industrielle Gemeinschaftsforschung

IGF-Forschungsvorhaben 21280 N

Entwicklung und Validierung eines Totalreflexions-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors (TRR-FLD) für die Flüssigkeitschromatographie in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle

Laufzeit:

01.08.2020 – 31.12.2022

Beteiligte Forschungsstelle(n):

Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V.
Forschungsabteilung Forschungsanalytik & Miniaturisierung

Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Industrielle Gemeinschaftsforschung

Schlussbericht vom 04.04.2023

zu IGF-Vorhaben Nr. 21280 N

Thema

Entwicklung und Validierung eines Totalreflexions-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors (TRR-FLD) für die Flüssigkeitschromatographie in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle

Berichtszeitraum

01.08.2020 - 31.12.2022

Forschungsvereinigung

Umwelttechnik

Forschungseinrichtung(en)

Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e.V.

Heinrich Heine Universität Düsseldorf - Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Forschungsnetzwerk Mittelstand

Gefördert durch:

Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 5

Tabellenverzeichnis 11

Abkürzungsverzeichnis 13

1 Einleitung und Zielsetzung des Projektes 15

2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse 17

2.1 Einleitung 17

2.2 Experimenteller Aufbau des TRR-FLD 18

2.2.1 Aufbau 1: Turmaufbau mit Strahlteiler 20

2.2.2 Aufbau 2: Flüssigkern-Lichtwellenleiter 22

2.2.3 Aufbau 3: Durchflussküvette 23

2.3 Identifizierung und Herstellung geeigneter Proben kleiner und großer Moleküle 28

2.3.1 Einleitung 28

2.3.2 Niedermolekulare Wirkstoffe 28

2.3.3 Biopharmazeutika 31

2.4 Entwicklung eines Workflows für die pharmazeutische Analytik auf Basis der Heart-Cut-2D-LC 33

2.4.1 Einleitung 33

2.4.2 Niedermolekulare Wirkstoffe 34

2.4.3 Prüfung auf Reinheit 34

2.4.4 Gehaltsbestimmung 35

2.4.5 Zweite Dimension 36

2.4.6 Identifizierung 43

2.4.7 Validierung 44

2.4.8 Biopharmazeutika 46

2.5 Entwicklung eines Schalt- und Ventilkonzepts zur zeitunabhängigen Erfassung relevanter Zielanalyten 55

2.5.1 Einleitung 55
2.5.2 Theoretische Überlegungen zum Peak-Parking Konzept 56
2.5.3 Experimentelle Umsetzung des Stop-Flow Konzepts 58
2.5.4 Experimentelle Umsetzung des Low-Flow Konzepts 60
2.6 Kopplung von 2D-LC mit TRR-FLD 62
2.6.1 Einleitung 62
2.6.2 Zeitfenster für eine Raman-Messung 62
2.7 Einsatz der 2D-LC-TRR-FLD-Kopplung zur Messung kleiner und großer Moleküle 63
2.7.1 Einleitung 63
2.7.2 Messungen mit Aufbau 2: Flüssigkern-Lichtwellenleiter 63
2.7.3 Messungen mit Aufbau 3: Durchflussküvette 70
2.8 Entwicklung einer Auswertungsmethodik für die kombinierte UV-Resonanz Raman- und Fluoreszenz-Spektroskopie 83
2.9 Bewertung der Messdaten zur Optimierung des experimentellen Aufbaus und der Messparameter 90
2.9.1 Einleitung 90
2.9.2 Entwicklung einer Betriebsroutine für stabile Raman-Messungen 90
3 Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele 93
3.1 Entwicklung eines kombinierten UV-Resonanz-Raman- und Fluoreszenz-Detektors (TRR-FLD) 93
3.2 Entwicklung einer 2D-LC Methode zur umfassenden Charakterisierung von (bio-)pharmazeutischen Formulierungen 94
3.3 Entwicklung eines Peak-Parking Konzepts zur Kopplung der 2D-LC mit dem TRR-FLD 96
4 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten 97
5 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft 100

5.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses 100

5.2 Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen 100

5.3 Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen 100

5.4 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts 102

6 Verwendung der Zuwendung 103

6.1 Forschungsstelle (IUTA e. V.) 103

6.1.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) 103

6.1.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans) 103

6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) 103

6.2 Forschungsstelle (HHU) 103

6.2.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) 103

6.2.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans) 103

6.2.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) 103

7 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 104

8 Literaturverzeichnis 105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Basiskomponenten des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors. 18

Abbildung 2: Vertikaler Turmaufbau des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors mit Strahlteiler in 180° rückwärtiger Streulichtanordnung. 21

Abbildung 3: Schematische Darstellung des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter in coaxialer Transmissionsanordnung. . 22

Abbildung 4: Schematische Darstellung des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors mit Durchflusszelle in 90° Streulichtanordnung. 24

Abbildung 5: Vergleich der Lichtstärke der drei experimentellen Aufbauten am Beispiel eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (70:30 v/v). Pulsenergie: 19,5 µJ, Frequenz: 20 Hz, Belichtungszeit: 10 s. 25

Abbildung 6: Strukturformeln von Doxo- und Epirubicin. Es handelt sich um Stereoisomere, die sich nur in der räumlichen Orientierung der gelb eingekreisten OH-Gruppe unterscheiden. Die Darstellungen wurden der Referenz[4] entnommen. 28

Abbildung 7: UV-Absorptionsspektren von Doxorubicin und Epirubicin mit eingezeichneter Laserwellenlänge. Die Absorptionsspektren sind identisch, weswegen beide Kurven überlagern. 29

Abbildung 8: Vergrößerter Chromatogramm-Ausschnitt zur Reinheitsbestimmung nach Ph. Eur. von Doxorubicin-Lösungen. Bei der um 8 Monate gealterten Doxorubicin-Lösung (rot) zeigt sich eine deutliche Zunahme an Verunreinigungen gegenüber einer frisch angesetzten Lösung (schwarz). Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. 30

Abbildung 9: UV-Absorptionsspektren von Rituximab mit eingezeichneter Laserwellenlänge..... 31

Abbildung 10: Darstellung zur Affinitätschromatographie. Verschiedene Antikörper werden durch ihre Bindungsaffinität zu den FcγIIIa-Rezeptoren der stationären Phase aufgetrennt. Je größer die Affinität der Antikörper zu den FcγIIIa-Rezeptoren ist, desto

später eluieren sie von der chromatographischen Trennsäule. Die Darstellung wurde der Referenz[7] entnommen. 33

Abbildung 11: Chromatogramme zur systematischen Methodenentwicklung in der zweiten Dimension. Mit Hilfe einer statistischen Versuchsplanung (DoE) wurde der Versuchsraum in zwei Experimenten systematisch abgedeckt. A und B: Temperatur/ Steigung des Gradienten, C und D: Temperatur/ Lösungsmittelzusammensetzung. Chromatographische Bedingungen: Stationäre Phase: Zorbax SB-CN 2,1 x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies), mobile Phase: A: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 4,3), B: Acetonitril, Flussrate: 0,5 mL/min, Injektionsvolumen: 40 µL, Detektion: UV/Vis (254 nm), Temperatur: 10/ 40 °C, Gradient: 0,5/ 1,5 % B/min, isokratisch: 25/ 30 % B. 37

Abbildung 12A: ^{1}D-Chromatogrammausschnitt einer frisch angesetzten Doxorubicin-Lösung mit eingezeichneten Heart-Cuts (farbige, gestrichelte Linien markieren jeweils den Anfang der Fraktionen). Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. B: ^{2}D-Chromatogrammausschnitte der farblich markierten Heart-Cuts. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden. 38

Abbildung 13: ^{2}D-Chromatogramme des gleichen Fraktionsschnitts einer frisch angesetzten gegenüber einer gealterten Doxorubicin-Lösung. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden. 40

Abbildung 14: ^{1}D-Chromatogramm von Doxorubicin- und Epirubicin-Lösungen verschiedener Hersteller nach Alterung. Die gestrichelten Linien markieren den Fraktionsschnitt, der per Heart-Cut in die zweite Dimension überführt wurde. Die ^{2}D-Chromatogramme der Fraktionsschnitte sind in Abbildung 15 dargestellt. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. 41

Abbildung 15: ^{2}D-Chromatogramme von Doxorubicin- und Epirubicin-Lösungen verschiedener Hersteller nach Alterung. Die Heart-Cuts der ersten Dimension sind in Abbildung 14 dargestellt. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden. 42

Abbildung 16 A: ^{2}D-Chromatogramm einer frisch angesetzten Doxorubicin-Lösung. Der Fraktionsschnitt stammt aus der vorderen Schulter des Wirkstoffpeaks in der

ersten Dimension. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden. B: UV-Absorptionsspektren am Maximum der drei Peaks bei 5,71 min, 5,97 min und 6,20 min im Chromatogramm der zweiten Dimension..... 43

Abbildung 17A: ^{1}D-Chromatogramm einer Doxorubicin-Lösung. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. B: ^{2}D-Chromatogramm nach Austausch des Phosphatpuffers gegen einen MS-kompatiblen Acetatpuffer. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 mit Einschränkung der mobilen Phase A entnommen werden. Diese wurde für den dargestellten Versuch gegen 10 mM Ammoniumacetat (pH 4,6) ausgetauscht. 44

Abbildung 18: Chromatogramm zur Eignungsprüfung der Methode auf Reinheit von Doxorubicinhydrochlorid. Es wurde eine Lösung mit einem Gemisch aus je 0,02 mg/mL Doxo- und Epirubicin injiziert. Die chromatographische Auflösung von 3,0 zwischen den beiden Substanzpeaks liegt über der geforderten minimalen Auflösung von 2,0. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. 45

Abbildung 19: Schematische Darstellung der verschiedenen Modifikationen der N-Glykosylierungsstruktur. Hier dargestellte Glykane setzen sich aus den Monosacchariden N-Acetylglucosamin, Mannose, sowie variierenden Anteilen von Fucose (F) und Galactose (G) zusammen..... 47

Abbildung 20: Überlagerte Chromatogramme von fünf monoklonalen Antikörpern im zellfreien Überstand eines Zellkulturmediums (ccs, grün, durchgehend) und als aufgereinigte Proben (pur, blau, gestrichelt). Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 4 entnommen werden.[11] 49

Abbildung 21: Dekonvulierte Massenspektren zu den Chromatogrammen des Antikörpers Adalimumab (Abbildung 20A) im zellfreien Überstand des Kulturmediums (ccs, grüne, durchgehende Linie) und als aufgereinigte Proben (pur, blaue, gestrichelte Linie).[11] 53

Abbildung 22: Schematische Darstellung der drei Ventile inklusive aller Kapillarwege zur Speicherung von einzelnen Fraktionen (Heart-Cuts). Die Darstellung wurde der Referenz[12] entnommen. 56

Abbildung 23: ^{2}D-Chromatogramme nach der Umsetzung des Peak-Parking Konzepts durch Anwendung eines Stop-Flow (Fluss deaktiviert) im Vergleich zu einem chromatographischen Lauf ohne Stop-Flow. Chromatographische Bedingungen: Stationäre Phase: Zorbax SB-CN 2,1 x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies), mobile Phase: A: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 4,3), B: Acetonitril (23 % B), Flussrate: 0 - 0,3 mL/min, Injektionsvolumen: 40 µL, Temperatur: 10°C, Detektion: UV/Vis (254 nm). 59

Abbildung 24: UV-Chromatogramm Naproxen im Vergleich Online vs. Low-Flow Konzept. Chromatographische Bedingungen: Stationäre Phase: Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm, 5 µm (Agilent Technologies), mobile Phase: A: Wasser (30 %), B: Acetonitril (70 %), Flussrate: Online: 0,5 mL/min, LowFlow: 0-3,6 min: 0,5 mL/min, 3,6-4,6 min: 0,05 mL/min, ab 4,6 min: 0,5 ml/min, Konzentration: 100 µg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Temperatur: 30°C, Detektion: UV/Vis (250 nm). 61

Abbildung 25: UV-Spektrum von Naproxen. 64

Abbildung 26: UV-Chromatogramm von Naproxen. Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 9. 66

Abbildung 27: UV-Chromatogramm Naproxen im Low-Flow-Betrieb. Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 9 mit 0-3,6 min: 0,5 mL/min, 3,6-4,6 min: 0,05 mL/min, ab 4,6 min: 0,5 ml/min. 67

Abbildung 28: Abschwächung der Raman-Signal-Intensität durch Absorption von Laserwellenlänge und Raman-Sreulicht. Flüssigkern-Lichtwellenleiter: 60 mm, Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 19 µJ, Frequenz: 20 Hz. 68

Abbildung 29: Raman-Spektren von Naproxen (rot) und Blankinjektion (schwarz) im Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach chromatographischer Trennung. Flüssigkern-Lichtwellenleiter: 60 mm, Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 19 µJ, Frequenz: 20 Hz. 69

Abbildung 30: Übersichts-Raman-Spektren; Konzentrationsreihe Naproxen zur Veranschaulichung der Absorption des Lasers am Beispiel der Raman-Bande von Wasser. Fließinjektion Naproxen in Wasser (100 %), Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz. 71

Abbildung 31: Konzentrationsreihe von Naproxen bei Fließinjektion in reinem Wasser. Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz. 72

Abbildung 32: Linearer Zusammenhang zwischen Signal-zu-Rauschverhältnis der Raman-Bande von Naproxen bei 1366 cm^{-1} und Konzentration. Abkürzungen: Nachweisgrenze (NG), Bestimmungsgrenze (BG). 73

Abbildung 33: UV-Resonanz-Ramanspektren von Naproxen (rot) und dem Blank (schwarz) bei chromatographischer Kopplung (mit Säule). Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 9 mit 0,1 mL/min im Low-Flow-Betrieb, Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 25 µJ, Frequenz: 20 Hz. 75

Abbildung 34: UV-Resonanz-Ramanspektren von Doxorubicin (rot), Epirubicin (blau) und mobiler Phase (schwarz) bei Fließinjektion (ohne Säule), Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 11, Belichtungszeit: 15 x 5 s (75 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz. 76

Abbildung 35: UV-Resonanz-Ramanspektren von Doxorubicin (rot), Epirubicin (blau) und mobiler Phase (schwarz) bei chromatographischer Kopplung (mit Säule). Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 11, Belichtungszeit: 10 x 5 s (50 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz. 78

Abbildung 36: Überlagerte und normierte Raman-Spektren von Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommen bei 248,6 nm (schwarz) und bei 532 nm (grün). Messbedingungen: UVRR Spektren: Fließinjektion ohne Säule in Aufbau 3, Konz. BSA: 20 mg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Fluss: 0,05 mL/min (100 % Wasser), Laserwellenlänge: 248,6 nm, Pulsleistung: 25 µJ, Frequenz: 20 Hz, Belichtungszeit: 5 s, Anzahl Akkumulationen: 20 scans; Nicht-resonante Raman Spektren: Online gekoppelte Größenausschlusschromatographie und Raman-Detektion mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter, Konz. BSA: 20 mg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Säule: AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies), Fluss: 0,35 mL/min, mob. Phase: 150 mM Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Laserwellenlänge: 532 nm, Laserleistung: 1 W, Belichtungszeit: 0,1 s, Anzahl gemittelte Spektren: 21 scans. Prozessierung der Daten: UV-Resonanz-Raman Spektren: Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate, Vis-Raman Spektren:

Blanksubtraktion, Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate. 79

Abbildung 37: Überlagerte und normierte Raman-Spektren des monoklonalen Antikörpers Daratumumab aufgenommen bei 248,6 nm (schwarz) und bei 532 nm (grün). Messbedingungen: UVRR Spektren: Fließinjektion ohne Säule in Aufbau 3, Konz. Daratumumab (aufgereinigt über Zentrifugenfiltration) in 150 mM PBS-Puffer: 20 mg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Fluss: 0,05 mL/min (100 % Wasser), Laserwellenlänge: 248,6 nm, Pulsleistung: 25 µJ, Frequenz: 20 Hz, Belichtungszeit: 5 s, Anzahl Akkumulationen: 20 scans; Nicht-resonante Raman Spektren: Online gekoppelte Größenausschlusschromatographie und Raman-Detektion mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter, Konz. Daratumumab (als Darzalex): 120 mg/mL, Injektionsvolumen: 10 µL, Säule: AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies), Fluss: 0,35 mL/min, mob. Phase: 150 mM Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Laserwellenlänge: 532 nm, Laserleistung: 1 W, Belichtungszeit: 0,1 s, Anzahl gemittelte Spektren: 21 scans. Prozessierung der Daten: UV-Resonanz-Raman Spektren: Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate, Vis-Raman Spektren: Blanksubtraktion, Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate. 81

Abbildung 38: UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Spektren von Naproxen und Doxorubicin..... 86

Abbildung 39: UV-Resonanz-Raman-Spektren von Doxorubicin bei Einsatz des 600 l/mm und 2400 l/mm Gitters..... 87

Abbildung 40: UV-Resonanz-Raman-Spektren von Naproxen und Doxorubicin nach chromatographischer Trennung im Vergleich. 89

Abbildung 41: Abhängigkeit der Pulsenergie von der Einsatzdauer (Pulsfrequenz: 20 Hz, Pulsbreite: 40 µs, Stromstärke: 20A)..... 92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chromatographische Bedingungen in der ersten Dimension nach der Prüfung auf Reinheit aus Monographie 0714 des Europäischen Arzneibuchs. 34

Tabelle 2: Kalibration einer Doxorubicin-Probe in Anlehnung an die Reinheitsbestimmung nach dem Europäischen Arzneibuch. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. 35

Tabelle 3: Auflistung der finalen chromatographischen Bedingungen der zweiten Dimension..... 38

Tabelle 4: Chromatographische Bedingungen für die Affinitätschromatographie in der ersten Dimension.[11] 48

Tabelle 5: Retentionszeiten und Standardabweichungen der einzelnen Peaks der FcR-Affinitätschromatographie. Aus den Chromatogrammen in Abbildung 20 können die Positionen der einzelnen Peaks entnommen werden. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt (n=3). Abkürzungen: zellfreier Überstand des Zellkulturmediums (ccs), aufgereinigte Probe (pur), Adalimumab (ADLM), Pertuzumab (PTZ), Ustekinumab (UTKM), Tocilizumab (TCLZ), Omalizumab (OMLZ).[11]..... 50

Tabelle 6: Peakflächen und Standardabweichungen der einzelnen Peaks der FcR-Affinitätschromatographie. Aus den Chromatogrammen in Abbildung 20 können die Positionen der einzelnen Peaks entnommen werden. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt (n=3). Abkürzungen: zellfreier Überstand des Zellkulturmediums (ccs), aufgereinigte Probe (pur), Adalimumab (ADLM), Pertuzumab (PTZ), Ustekinumab (UTKM), Tocilizumab (TCLZ), Omalizumab (OMLZ).[11]..... 51

Tabelle 7: Chromatographische Bedingungen in der zweiten Dimension.[11] 52

Tabelle 8: Zuordnung der unterschiedlichen Modifikationen der N-Glykosylierungsstruktur in Abhängigkeit von den Peaks der fünf Antikörper in der Affinitätschromatographie (Abbildung 20) der ersten Dimension. Abkürzungen: Detektierte Glykanmodifikation im Peak (D), Intensivste Glykanmodifikation im Peak (M), Peak, in dem die Glykanmodifikation am intensivsten ist (P), monoklonale

Antikörper (mAk), Adalimumab (ADLM), Pertuzumab (PTZ), Ustekinumab (UTKM), Tocilizumab (TCLZ), Omalizumab (OMLZ).[11] 54

Tabelle 9: Chromatographische Bedingungen für die Resonanz-Raman-Detektion von Naproxen. 65

Tabelle 10: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (SRV) des Raman-Signals von Naproxen bei 1366 cm^{-1} gemessen mit Aufbau 3; Signal: Basislinienkorrigierte Signalintensität in Counts, Rauschen: Standardabweichung des Untergrundrauschens zwischen 2000 und 2415 cm^{-1} (100 Pixel des CCD-Chips). 73

Tabelle 11: Chromatographische Bedingungen für die Resonanz-Raman-Detektion von Epi- und Doxorubicin. 77

Tabelle 12: Zuordnung der Schwingungsbanden (cm^{-1}) von Rinderserumalbumin (BSA) und Daratumumab bei den Anregungswellenlängen 248,6 nm und 532 nm.. 82

Tabelle 13: Spektrale Parameter der eingesetzten Gitter. 85

Tabelle 14: Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen. 101

Abkürzungsverzeichnis

^{1}D	erste Dimension der 2D-LC
^{2}D	zweite Dimension der 2D-LC
2D-LC	Two-Dimensional Liquid Chromatography (zweidimensionale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ACN	Acetonitril
BSA	Bovines Serum Albumin
CCD	Charge-Coupled Device
CHO	Chinese Hamster Ovary Cell (Ovarien des chinesischen Zwerghamsters)
cts	counts (Anzahl Signale)
cw(-Laser)	continuous wave laser (Dauerstrichlaser)
DAD	Dioden-Array-Detektor
DK	Durchflussküvette
DOE	Design of Experiments (statistische Versuchsplanung)
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln)
FA	Formic Acid (Ameisensäure)
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry (hochauflösende Massenspektrometrie)
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IPA	Isopropylalkohol
mAk	monoklonale Antikörper
MS	Massenspektrometrie

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SRV	Signal-zu-Rauschverhältnis
T	Transmission
TRR-FLD	Totalreflexions-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektor
Rel. cm^{-1}	relative Wellenzahl
UVRR	UV Resonanz-Raman

1 Einleitung und Zielsetzung des Projektes

Das Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines Totalreflexions-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors (TRR-FLD) für die Flüssigkeitschromatographie in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle.

Die Ansprüche an die Qualitätskontrolle in der pharmazeutischen Analytik werden vor dem Hintergrund einer zunehmenden Globalisierung immer größer. Durch die Verschiebung der Produktion von Ausgangsstoffen, Hilfsstoffen oder von Fertigarzneimitteln in Niedriglohnländer konnten die Produktionskosten deutlich gesenkt werden. Eine engmaschige Kontrolle der gesamten Wertschöpfungskette ist aufgrund der Ausweitung der Lieferketten und der sich ergebenden Vielzahl an Produktionsstätten und Vertriebswege derzeit nicht zu realisieren. Zusätzlich besteht das Risiko, dass die Reinheitsprüfungen nach Arzneibuchmonographie nicht ausreichen, da die Monographien in starker Abhängigkeit zum Herstellungsprozess stehen. Wird jedoch das Herstellungsverfahren modifiziert, entstehen Verunreinigungen, die im Rahmen einer routinemäßigen Untersuchung gemäß Europäischem Arzneibuch (Ph. Eur.) nicht zwingend aufgedeckt werden.

Heutzutage ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) in Kombination mit der UV/Vis-Spektroskopie das Standardverfahren zur Prüfung auf Verunreinigungen. Durch die strukturelle Ähnlichkeit vieler Verunreinigungen zur Hauptkomponente ist es in vielen Fällen nicht möglich, eine eindeutige Unterscheidung zwischen dem Zielmolekül und den Verunreinigungen vorzunehmen. Der Grund ist, dass sich die UV/Vis-Spektren nicht hinreichend voneinander unterscheiden. Die Raman-Spektroskopie stellt hierzu ein geeignetes Analysenverfahren dar. Durch molekulare Rotations- und Schwingungsprozesse kommt es zu Frequenzverschiebungen im Raman-Streulicht. Die Frequenzunterschiede sind substanzspezifisch und erlauben die Identifizierung der Moleküle. Dabei lassen sich in der Regel auch strukturell ähnliche Moleküle wie z. B. Strukturisomere unterscheiden.[1] Für eine zweifelsfreie Identifikation müssen die Analyten bei der Raman-spektroskopischen Messung allerdings möglichst rein vorliegen. Damit wird deutlich, dass als Voraussetzung für den Einsatz der Raman-Spektroskopie in der instrumentellen Analytik entweder eine zeit- und kostenintensive Probenvorbereitung oder die Kopplung mit orthogonalen Trenntechniken unabdingbar ist. Durch die Verwendung einer zweidimensionalen HPLC (Two-Dimensional Liquid

Chromatography, 2D-LC) kann erreicht werden, dass Qualitätskontrollen zunächst nach bestehenden Monographien durchgeführt (1. Dimension) und mit hoch selektiven bzw. orthogonalen Trennphasen kombiniert werden können (2. Dimension).

Vor diesem Hintergrund beabsichtigten die Forschungseinrichtungen Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. (IUTA) und das Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Heinrich-Heine-Universität (HHU) die Entwicklung eines strukturaufklärenden Raman-Detektors, welcher Online mit der 2D-LC gekoppelt werden kann, um die Defizite bestehender Methoden unter Berücksichtigung vorgeschriebener Prüfverfahren zu überwinden.

2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

2.1 Einleitung

Im Rahmen des Projektes sollte ein kombinierter UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektor (Demonsrator) für die Flüssigkeitschromatographie entwickelt werden. Die resonante Anregung im tiefen UV-Bereich verspricht bei Molekülen mit einer Resonanzstruktur einen Verstärkunseffekt um den Faktor 100. Dieser Effekt kann hingegen bei den gängigen Lösungsmitteln der HPLC (Wasser, Methanol, Acetonitril) nicht beobachtet werden, da aufgrund fehlender Chromophore keine resonante Anregung stattfindet.

Im Laufe der Entwicklungsarbeiten sind einige technische Schwierigkeiten zu berücksichtigen:

1. Begrenzter Anwendungsbereich: Die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie ist auf die Analyse von Verbindungen beschränkt, die bei einer bestimmten Wellenlänge im UV-Bereich absorbieren. Daher ist diese Technik nicht für alle Proben geeignet.

2. Anfälligkeit gegenüber Fluoreszenz: Fluoreszierende Verbindungen können das Signal überlagern und somit die Raman-Spektren stören, was zu einer geringeren Empfindlichkeit und Genauigkeit der Analyse führen kann. Dieses Problem kann durch den Einsatz von Laserwellenlängen < 250 nm gelöst werden, da die Fluoreszenz bei Anregung < 250 nm i. d. R. zu deutlich höheren Wellenlängen verschoben ist. Die Marktverfügbarkeit geeigneter Laserquellen ist zurzeit allerdings äußert gering.

3. Kostenintensiv: Die UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie erfordert spezielle Detektoren mit hoher Quantenausbeute im tiefen UV-Bereich, hochwertige Laser sowie geeignete optische Komponenten, die zurzeit noch sehr teuer sind. Für Laserwellenlängen < 250 nm sind einige optische Baugruppen, die in der klassichen Raman-Spektroskopie standardmäßig eingesetzt werden, noch nicht verfügbar (z. B. dichroitische Strahteiler). Zudem haben UV-Laser im Vergleich zu Lasern im sichtbaren und nahinfraroten Bereich deutlich reduzierte Lebenserwartungen, was sich neagtiv auf das Kosten-Nutzen-Verhältnis auswirken kann.

4. Zeitintensiv: Die Kalibrierung und Justage der Lichtwege ist im UV-Bereich deutlich erschwert. Zur Verfolgung des Laserstrahls muss auf Hilfmittel wie z. B. Fluoreszenzpapier zurückgegriffen werden.

Vor diesem Hintergrund wurde die Auswahl der Komponenten sorgfältig überlegt und verschiedene Konzepte der Lichtführung experimentell umgesetzt und getestet.

2.2 Experimenteller Aufbau des TRR-FLD

Im Rahmen der Projektarbeiten wurde ein UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektor zur Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie entwickelt. Als Basiskomponenten kamen ein UV-Laser, ein Spektrograph sowie eine CCD-Kamera zum Einsatz (siehe Abbildung 1).

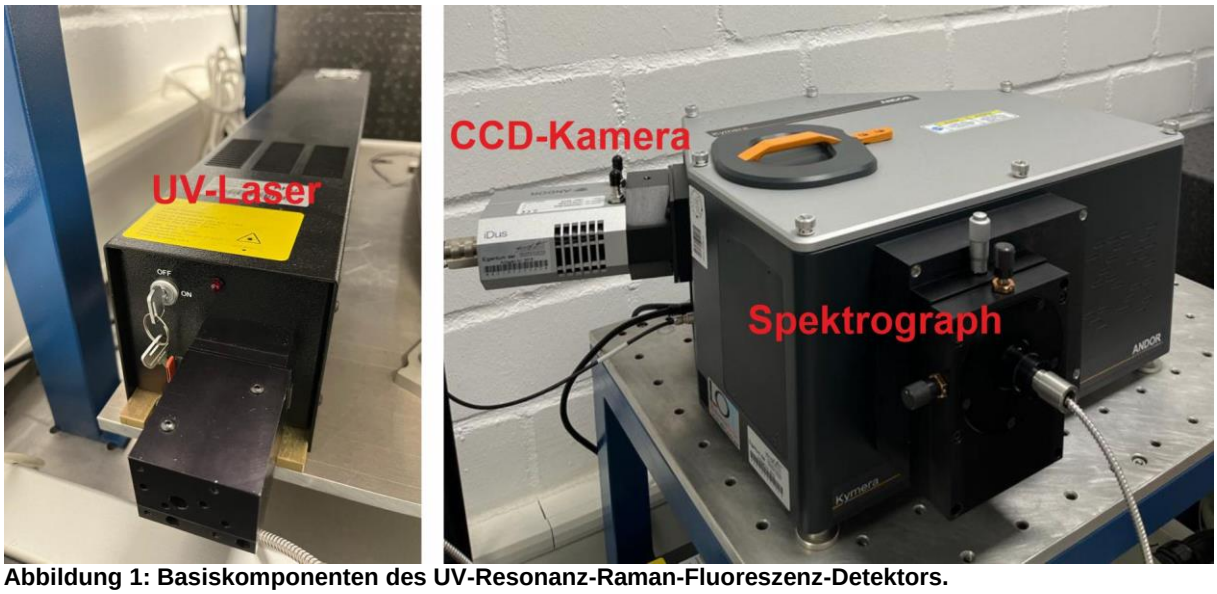

Abbildung 1: Basiskomponenten des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors.

Bei dem gepulsten Hohlkathodenlaser handelt es sich um das Modell NeCu 70-248SL der Firma Photon Systems Inc. (Covina, Kalifornien, USA) mit einer Emissionswellenlänge von 248,6 nm. Dieser arbeitet mit einer frei einstellbaren Frequenz von 1 – 20 Hz und einer Pulsbreite von 20 – 100 µs, welche ebenfalls frei eingestellt werden kann. Die Pulsenergie wird direkt über den Strom geregelt und wurde zwischen 25 und 33 Ampere eingestellt. Bei einer Frequenz von 20 Hz und einer Pulsbreite von 40 µs wurde bei einem Strom von 25 A eine Pulsenergie von ca.

20 µJ gemessen, bei 33 A waren es maximal 28,5 µJ. Rechnerisch ergibt sich daraus eine durchschnittliche Dauerstrichleistung von 400 µW bzw. 570 µW.

Da die Emission auf einer Gasentladung beruht, treten neben der Laserwellenlänge bei 246,8 nm weitere Plasmalinien im Spektralbereich des zu erwartenden Raman-Spektrums zwischen etwa 250 nm und 275 nm auf. Vor diesem Hintergrund ist der Laser mit einem speziell für die Raman-spektroskopische Anwendung entwickelten Plasmalinienfilter ausgestattet. Dabei werden zwei Kantenfilter so zueinander angeordnet, dass der Laserstrahl über eine Vierfachreflexion zwischen den beiden Kantenfiltern in Richtung des Laserausgangs geleitet wird. Alle Plasmalinien oberhalb von 250 nm werden hingegen nicht reflektiert und somit aus dem Laserstrahl entfernt.

Als Spektrograph kam das Modell Kymera 328i-B2 der Firma Andor Technology / Oxford Instruments plc (Abingdon, UK) zum Einsatz. Für die Messungen wurden zwei speziell für den UV-Bereich optimierte Gitter mit 2400 Linien/mm (hochauflösend) und 600 Linien/mm (niedrigauflösend) und optimierter Beugungseffizienz bei 300 nm ausgewählt. Zudem sind alle Spiegel innerhalb des Spektrographen aluminiumvergütet, um eine möglichst hohe Reflektivität im tiefen UV-Bereich > 90 % zu gewährleisten.

Für die Detektion des Raman-Streulichts wurde die Charge-Coupled Device (CCD)-Kamera iDus DV420A-BU2, ebenfalls von Andor Technology / Oxford Instruments plc (Abingdon, UK), verwendet. Für die Raman-Messungen wurde der CCD-Sensor der Kamera auf -55 °C gekühlt. Im relevanten Spektralbereich zwischen 250 nm und 300 nm zeigt die speziell für den tiefen UV-Bereich optimierte Kamera eine durchschnittliche Quantenausbeute (Umwandlungsrate Photonen zu Elektronen) von etwa 50 %. Zum Vergleich liegen typische Quantenausbeuten siliziumbasierter CCD-Chips in diesem Spektralbereich bei etwa 10-20 %.

Für die Strahlführung wurde auf Komponenten der Baureihe SYS40 der Firma OWIS GmbH (Staufen, DE) zurückgegriffen. Sonderanfertigungen wurden von der feinmechanischen Werkstatt der HHU hergestellt. Optische Elemente wie Spiegel, Linsen, Lichtfasern, Strahlteiler und Spektralfilter wurden von den Firmen Thorlabs, Inc. (Newton, New Jersey, USA), Edmund Optics Ltd. (York, UK) und Semrock / IDEX Health & Science (West Henrietta, New York, USA) bezogen.

Im Rahmen der Projektarbeiten wurden drei experimentelle Aufbauten realisiert, bei denen die Durchflusszelle sowie die geometrische Anordnung der Strahlführung angepasst wurden. Hintergrund für dieses Vorgehen waren iterative Entwicklungschritte, bei denen die Aufbauten immer weiter verbessert wurden (siehe auch Kapitel 2.9). Im Folgenden werden die experimentellen Aufbauten im Detail vorgestellt und im Anschluss deren Leistungsfähigkeit am Beispiel von orientierenden Raman-Messungen miteinander verglichen.

2.2.1 Aufbau 1: Turmaufbau mit Strahlteiler

Zunächst wurde ein vertikaler Turmaufbau konzipiert, um das Laserlicht senkrecht von oben an die Probe bzw. Durchflusszelle heranzuführen. Diese Form der Strahlführung hat sich in der Raman-Spektroskopie als Standard etabliert und wird in vielen Raman-Sonden und Raman-Mikroskopen verwendet. Ziel dieses Aufbaus war es, erste Vorversuche an Feststoffen und Lösungen in Quarzglasküvetten durchzuführen. Auch ein Flüssigkern-Lichtwellenleiter als Durchflusszelle für die HPLC kann prinzipiell senkrecht in den Turmaufbau adaptiert werden. Die Abbildung 2 zeigt eine schematische Zeichnung des Turmaufbaus.

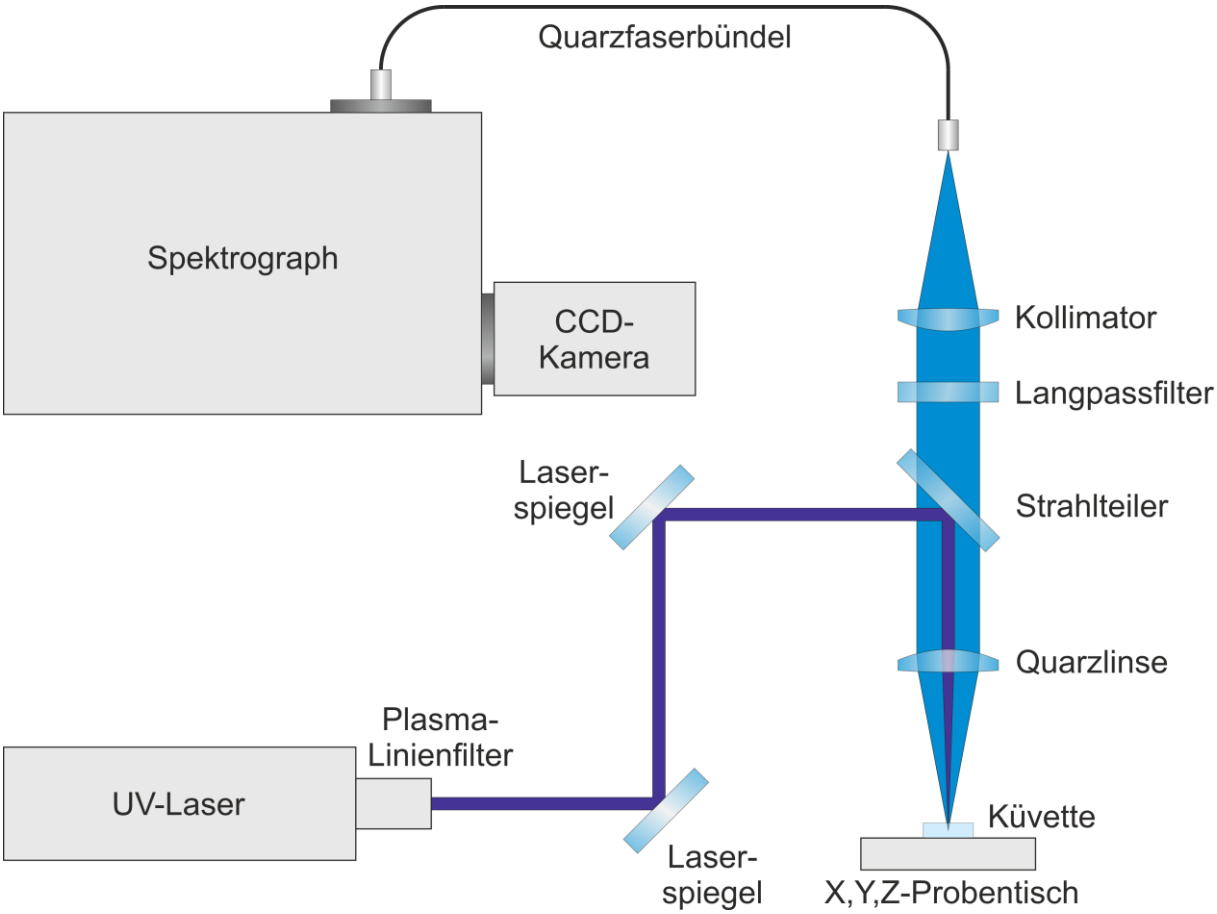

Abbildung 2: Vertikaler Turmaufbau des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors mit Strahlteiler in 180° rückwärtiger Streulichtanordnung.

Zur Ausrichtung des Laserstrahls wurden zwei justierbare Excimerlaserspiegel (Produkt-Nr.: 47-985, Edmund Optics) verwendet, die bei einer Wellenlänge von 248 nm über einen Reflexionswinkel von 45° eine Reflektivität > 99 % aufweisen. Über die Spiegel wurde der Laser zu einem 30:70 Strahlteiler (Produkt-Nr.: 65-924, Edmund Optics) geleitet, der 30 % des Laserlichts in Richtung Probe reflektiert. Mittels einer für den tiefen UV-Bereich ab 245 nm optisch vergüteten Quarzglaslinse (Produkt-Nr.: LA4647-UV-ML,Thorlabs) wurde das Laserlicht auf die Probe fokussiert. Das rückwärtsgerichtete Raman-Streulicht wurde mit derselben Linse gesammelt und passiert mit 70 % Transmission den Strahlteiler in Richtung eines Langpassfilters (Produkt-Nr.: LP02-248RS-25, Semrock), welcher die Rayleigh-Streuung bei 248,6 nm mit einer optischen Dichte OD > 6 blockiert. Das frequenzverschobene Raman-Streulicht passiert den Filter ab 251,1 nm (400 relative Wellenzahlen, rel. cm^{-1}) mit einer Transmission T = 50% und ab 256,8 nm (1285 rel. cm^{-1}) mit einer Transmission von T = 80 %. Über einen Faseroptikkollimator (Produkt-Nr.: 88-181, Edmund Optics)

wird das Raman-Streulicht in ein Round-to-Linear-Faserbündel mit sieben Fasern (Produkt-Nr.: BFL105HS02, Thorlabs) fokussiert und mit dem linear angeordneten Faserende in den auf 25 µm breit eingestellten Eingangsspalt des Spektrographen geleitet.

2.2.2 Aufbau 2: Flüssigkern-Lichtwellenleiter

Die Nutzung des Flüssigkern-Lichtwellenleiters als Durchflusszelle für die Flüssigkeitschromatographie erfolgte in einer Transmissionsanordnung, bei der das Laserlicht coaxial zur Raman-Streuung geführt wurde. Als Flüssigkern-Lichtwellenleiter wurden Teflon AF 2400 Kapillaren mit einer Länge von 60 mm getestet. Der Innendurchmesser der Kapillaren lag bei 200 µm, wodurch sich ein Kapillarvolumen von 1,9 µL ergab. Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zeigt Abbildung 3.

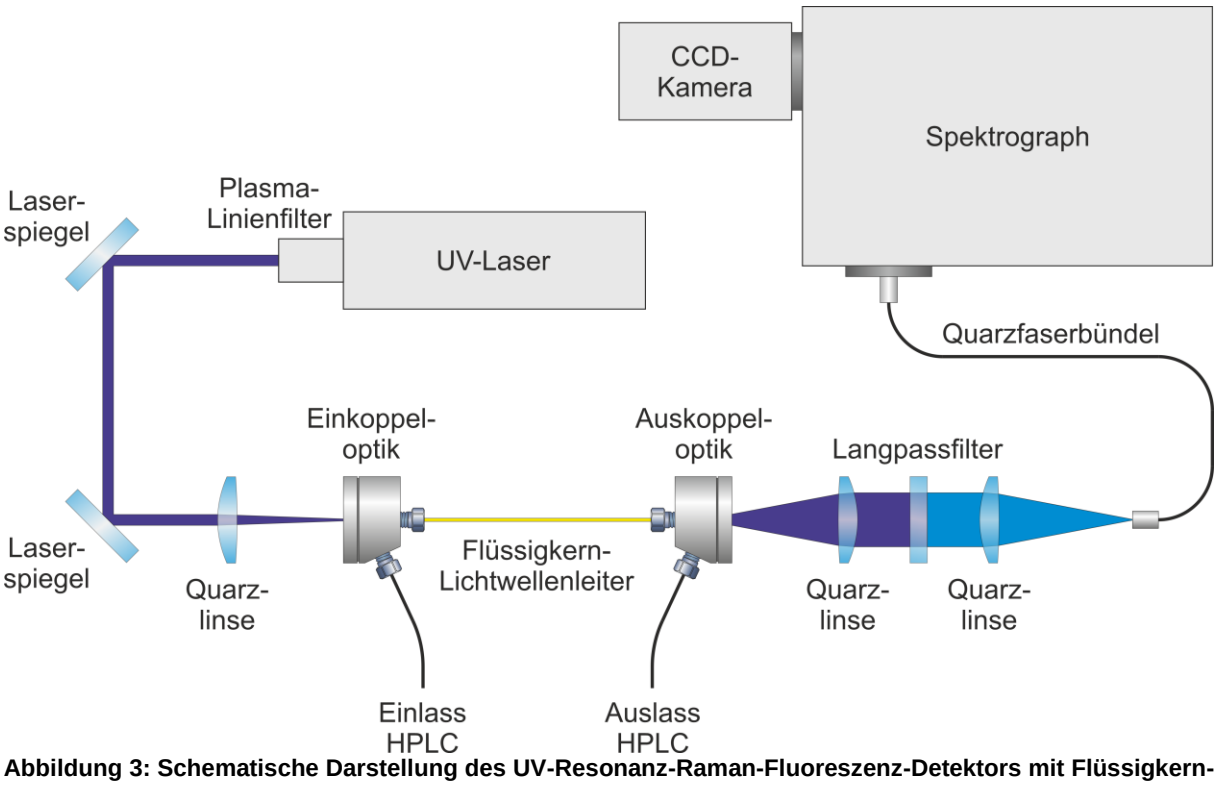

Abbildung 3: Schematische Darstellung des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter in coaxialer Transmissionsanordnung.

Das Laserlicht wurde direkt über die beiden Excimerlaserspiegel mittels Quarzlinse in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter fokussiert. Für die Lichtkopplung kam eine

optofluidische Einheit[2] zum Einsatz, die im Rahmen des IGF-Vorhabens Nr. 19681 N entwickelt worden ist und an dieser Stelle nicht weiterführend beschrieben werden soll.

Das Laserlicht wird über Totalreflexion durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter geleitet und induziert einen Raman-Effekt in der mobilen Phase. Das vorwärts gerichtete Raman-Streulicht wird coaxial zum Laserlicht ebenfalls unter Totalreflexion durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter geleitet. Auf der Austrittseite befindet sich eine zweite optofluidische Einheit, aus der das Licht divergent austritt. Mittels einer Quarzlinse (Produkt-Nr.: LA4052-UV, Thorlabs) wird das Licht parallelisiert und das Laserlicht sowie die Rayleigh-Streustrahlung vom Langpassfilter blockiert. Das Raman-Streulicht passiert hingegen den Filter und wird über eine weitere Quarzlinse (Produkt-Nr.: LA4148-UV, Thorlabs) in das Round-to-Linear-Faserbündel fokussiert und zur spektralen Verarbeitung in Richtung Spektrometer geführt.

2.2.3 Aufbau 3: Durchflussküvette

In dem dritten experimentellen Aufbau wurde eine Versuchsanordnung getestet, bei der die Streulichtabnahme in einem Winkel von 90° zum Anregungslaserstrahl ausgerichtet wurde. Der Aufbau ist in Abbildung 4 dargestellt.

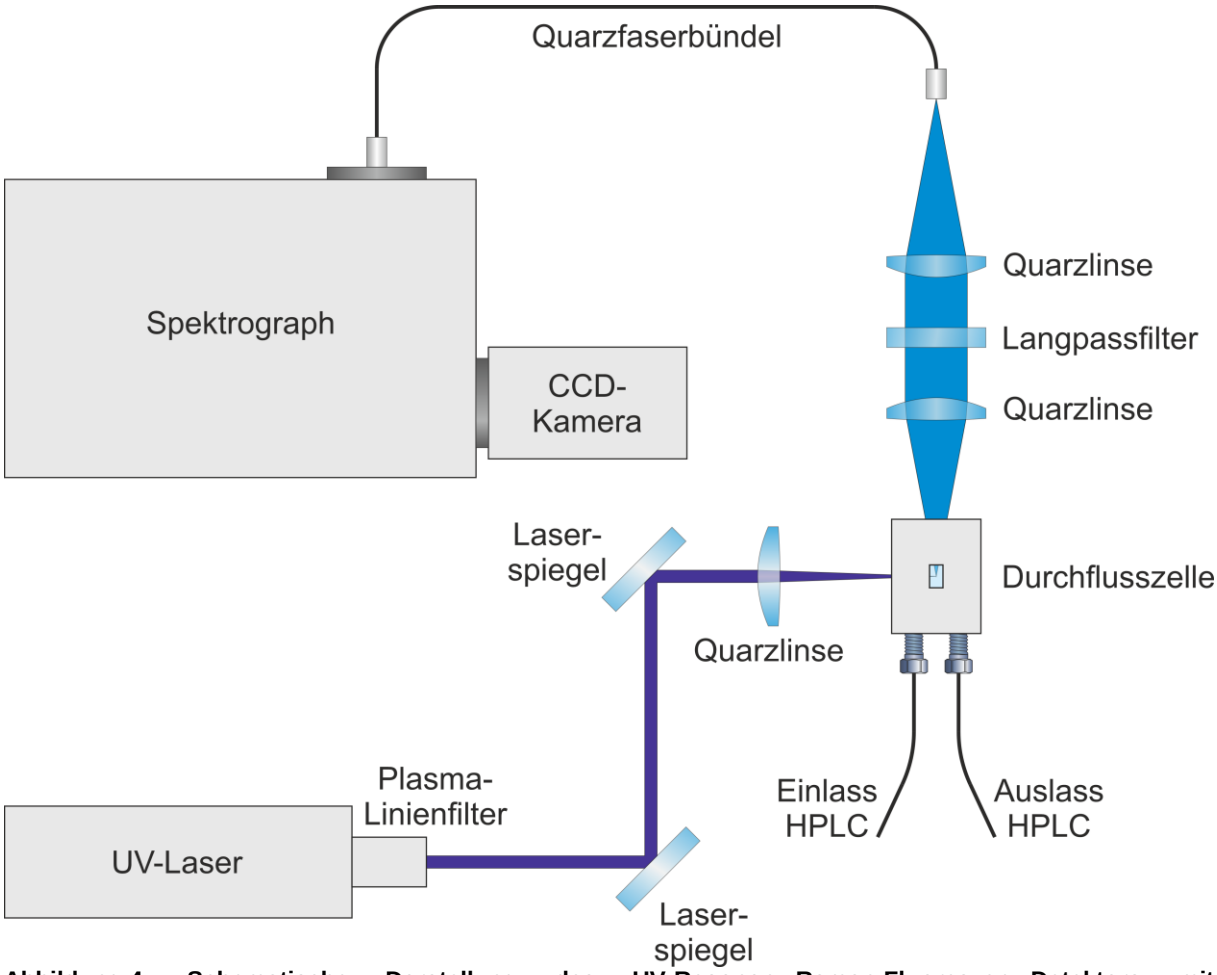

Abbildung 4: Schematische Darstellung des UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Detektors mit Durchflusszelle in 90° Streulichtanordnung.

Als Durchflusszelle wurde eine kommerzielle Zelle aus einem Fluoreszenz-Detektor (Thermo Scientific / Dionex RF 2000 Fluorescence Detector) mit einem Zellvolumen von 8 µL verwendet. Die optischen Bauteile zur Einkopplung des Laserlichts sowie zur Abnahme und Verarbeitung des Raman-Streulichts entsprachen denen des zweiten Aufbaus mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter (siehe Kapitel 2.2.2).

Um die Lichtstärke der drei Aufbauten zu vergleichen wurden Raman-Spektren von einem Acetonitril/Wasser-Gemisch im Verhältnis 70:30 (v/v) aufgenommen. Die Pulsenergie des Lasers lag bei 19,5 µJ und es wurde eine Frequenz von 20 Hz eingestellt. Dies entspricht umgerechnet einer durchschnittlichen kontinuierlichen Leistung von 390 µW. Die Belichtungszeit der CCD-Kamera wurde auf 10 s eingestellt. Abbildung 5 zeigt die Raman-Spektren im direkten Vergleich.

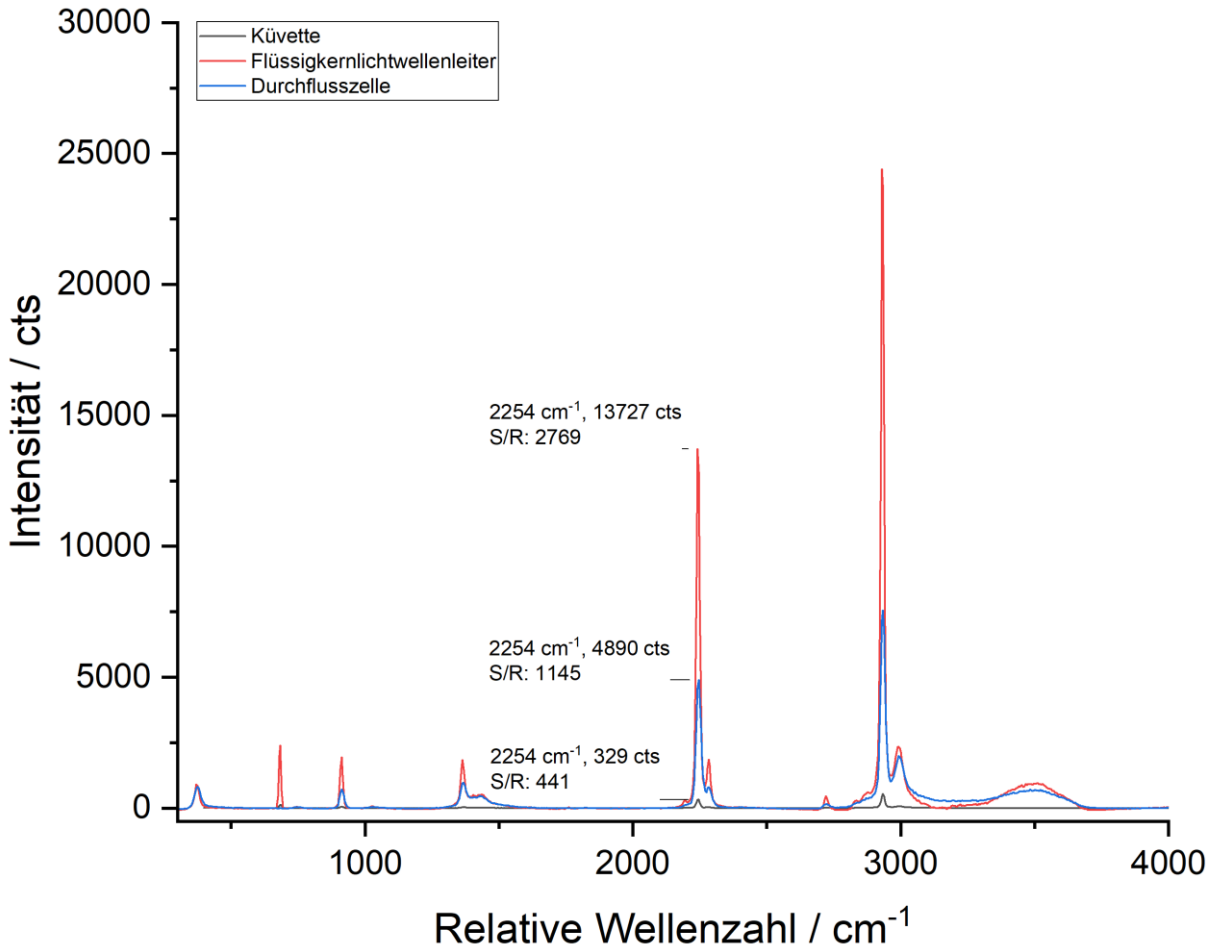

Abbildung 5: Vergleich der Lichtstärke der drei experimentellen Aufbauten am Beispiel eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (70:30 v/v). Pulsenergie: 19,5 µJ, Frequenz: 20 Hz, Belichtungszeit: 10 s.

Die Leistungstärke der drei experimentellen Aufbauten wurde anhand der Raman-Bande von Acetonitril bei 2254 cm^{-1} bewertet und miteinader verglichen. Der Aufbau 2 mit 60 mm langem Flüssigkern-Lichtwellenleiter (rotes Spektrum) zeigte mit 13.727 cts (counts) die höchste Signal-Intensität. Im Vergleich zu den Aufbauten 3 (blaues Spektrum) und 1 (schwarzes Spektrum) mit 4.890 cts bzw. 329 cts wurden Signalverstärkungen um den Faktor 2,8 bzw. 41,7 erreicht. Das Signal-zu-Rauschverhältnis (SRV) der Raman-Bande von Acetonitril lag für Aufbau 2 bei 2.769:1. Im Vergleich lagen die SRV bei den experimentellen Aufbauten 3 und 1 bei 1.145:1 bzw. 441:1. Durch den Einsatz des Flüssigkern-Lichtwellenleiters konnte demnach eine Verbesserung des SRV um den Faktor 2,4 bzw. 6,2 erreicht werden.

Die durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter erreichte Signalverstärkung im Vergleich von Aufbau 2 zu Aufbau 3 ist mit einem Faktor von lediglich 2,8 unerwartet niedrig. Aufgrund von Erfahrungswerten aus vorangegangenen Arbeiten (IGF Vorhaben Nr.

16120 N und Nr. 19681 N) wäre mit einer Signalverstärkung um den Faktor 10-50 zu rechnen gewesen. Die geringe Signalverstärkung kann anhand von zwei möglichen Effekten diskutiert werden. Eine Möglichkeit besteht in der Absorption der Laserwellenlänge bei 248,6 nm durch das Material des Flüssigkern-Lichtwellenleiters selbst. Das dazu verwendete Poylmer Teflon AF 2400 zeigt laut Literaturstudie eine hohe Transparenz bis in den tiefen UV-Bereich. So konnten Rothschild und Sedlacek[3] durch Teflon AF Schichtdicken zwischen 0,2 µm und 2,2 µm keine Absorption bei einer Transmissionswellenlänge von 193 nm messen. Vor diesem Hintergrund sollte eine Totalreflexion der Laserwellenlänge von 248,6 nm unter Ausbildung evaneszenter Wellen in das Polymer problemlos möglich sein. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass beim Herstellungsprozess der Teflon AF Kapillaren Verunreinigungen eingetragen werden, die zur einer Absorption der Laserwellenlänge führen und die Totalreflexion negativ beeinträchtigen würden. Probleme mit verunreinigten Teflon AF Kapillaren wurden von dem Projektkonsortium z. B. im ZIM Vorhaben KF 2524002ZG4 an Kapillaren eines alternativen Herstellers beobachtet, wodurch sich bei Anregung mit 532 nm eine deutlich erhöhte Untergrundfluoreszenz bemerkbar machte.

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer geringen Signalverstärkung bei Einsatz des Flüssigkern-Lichtwellenleiters führen kann, ist das vergleichweise schlechte Strahlprofil des eingesetzten Lasers. Für den Hohlkathoden-Laser wurde vom Hersteller eine Beugungsmaßzahl von $M^2 = 20$ angegeben. Bei einem Strahldurchmesser von 3 mm und der verwendeten Fokussierlinse mit einer Brennweite von 20 mm lässt sich ein theoretischer Fokusdurchmesser von ca. 42 µm berechnen.

$$w_0 = \frac{M^2 \cdot \lambda \cdot f}{\pi \cdot w_P}$$

Mit w_0: Fokusradius, M: Beugungsmaßzahl, λ: Wellenlänge, f: Linsenbrennweite, w_P: Strahlradius an der Linse.

Mit diesem Fokusdurchmesser sollte es prinzipiell möglich sein, den Laserstrahl ohne größere Verluste in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter mit einem Innendurchmesser von 200 µm einzukoppeln. Ob diese Werte allerdings erreicht wurden, konnte experimentell nicht bestimmt werden, da ein Messgerät zur Fokusdurchmesser- und Strahlprofilmessung für Wellenlängen kleiner 266 nm nicht zur Verfügung stand. Ein Indiz für eine schlechtere als vom Hersteller angegebene Strahlgüte lieferte die

Beobachtung, dass der Laser bei Bestrahlung von Fluoreszenzpapier eine erhöhte Intensität vor allem im Außenring des Laserspots zeigte, wärend die Fluoreszenz im Zentrum schwächer wirkte. Dies spricht in erster Näherung nicht für einen idealen Gaußstrahl und könnte zu einer Reduzierung der Kopplungseffizienz führen.

Der Aufbau 1 zeigte im Vergleich zu Aufbau 3 eine um den Faktor 14,8 niedrigere Signalintensität. Die reduzierte Signalintensität lässt sich einerseits mit dem Einsatz des Strahlteilers erklären. Hier gehen insgesamt etwa 75 % Laserlicht bzw. Raman-Streulicht verloren. In der Theorie ist die Strahlführung des Aufbaus 1 eigentlich der des Aufbaus 3 überlegen und hat sich in fast allen Bereichen der Raman-Spektroskopie durchgesetzt. Dies liegt vor allem an der einfachen Justierbarkeit, da für die Laserlichtanregung und die Abnahme des Raman-Streulichts dieselbe Linse verwendet werden kann. Auf diese Weise wird bei entsprechender Korrektur der chromatischen Abberation der Linse das Raman-Streulicht direkt aus dem Fokus des Laserlichts abgenommen, ohne dass z. B. zwei separate Linsen zueinader justiert werden müssen. Um dem Nachteil des klassischen Strahteilers entgegenzuwirken, können speziell für die Raman-Spektroskopie entwickelte dichroitische Strahlteiler verwendet werden. Diese weisen typischerweise über einen Winkel von 45° eine hohe Reflektivität für die verwendete Anregungswellenlänge von > 95 % und gewährleisten gleichzeitig eine Transmission des frequenzverschobenen Raman-Streulichts > 90 %. Die Verluste können auf diese Weise gering gehalten werden. Für die in diesem Projekt verwendete Laserwellenlänge von 248,6 nm sind allerdings zurzeit keine dichroitischen Strahlteiler kommerziell verfügbar. Daher mussten die Verluste eines herkömmlichen 30:70 Strahlteilers in Kauf genommen werden. Alleine der Einsatz des Strahlteilers erklärt aber noch nicht die große Diskrepanz der Signalintensitäten um den Faktor 14,8. Eine mögliche Erklärung könnte die bereits beschriebene Beobachtung liefern, dass der Laser sehr wahrscheinlich keine gaußförmige Intensitätsverteilung aufweist. In diesem Fall würde bei Aufbau 1 zu beobachten sein, dass die höchste Photonendichte des Lasers nicht zwangsläufig in der Fokusebene zur optischen Abnahme des Raman-Streulichts liegt. Bei Aufbau 3 konnte hingegen die Diskrepanz korrigiert werden, da zwei separate Linsen für Anregung und Abnahme zueinander ausgerichtet wurden.

Für die Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie wurden aufgrund der vorläufigen Ergebnisse nur die experimentellen Aufbauten 2 und 3 eingesetzt (siehe Kapitel 2.6.).

2.3 Identifizierung und Herstellung geeigneter Proben kleiner und großer Moleküle

2.3.1 Einleitung

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurden geeignete pharmazeutische und biopharmazeutische Proben ausgewählt, die mit Hilfe des zu entwickelnden Analyseverfahrens analysiert werden sollten. Verunreinigungen wie beispielsweise Neben-, Zwischen- oder Abbauprodukte sollten durch gezielte Manipulation bzw. Stressung der Proben erzeugt werden. Die Charakterisierung der Proben erfolgte zusätzlich über geeignete analytische Referenzverfahren, wie z. B. Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit UV/Vis-Detektion sowie einem hochauflösenden Massenspektrometer.

2.3.2 Niedermolekulare Wirkstoffe

Als niedermolekulare Modellsubstanzen konnten Doxo- und Epirubicin identifiziert werden. Die beiden Wirkstoffe werden zur antineoplastischen Therapie eingesetzt und gehören zur Stoffgruppe der Anthracycline. Abbildung 6 zeigt die Strukturformeln der beiden Substanzen.

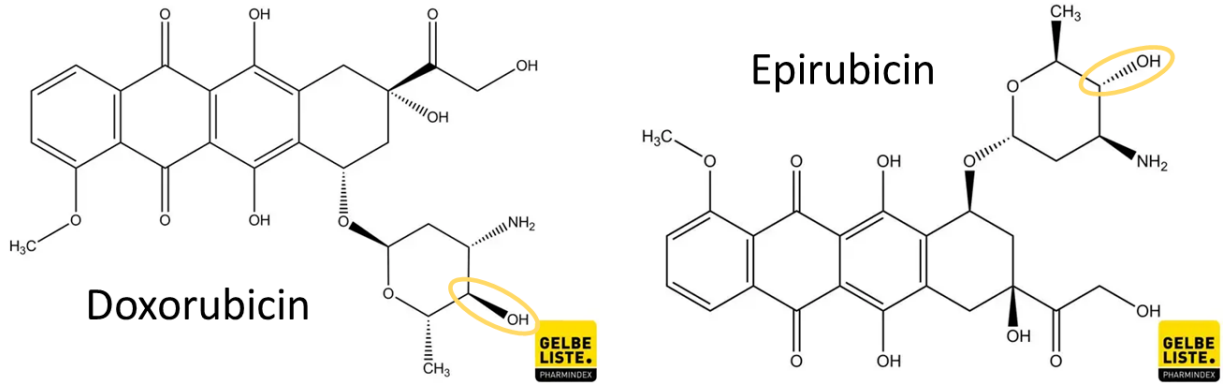

Abbildung 6: Strukturformeln von Doxo- und Epirubicin. Es handelt sich um Stereoisomere, die sich nur in der räumlichen Orientierung der gelb eingekreisten OH-Gruppe unterscheiden. Die Darstellungen wurden der Referenz[4] entnommen.

Doxo- und Epirubicin sind strukturell eng miteinander verwandt, es handelt sich um Epimere. In Abbildung 7 sind die UV-Absorptionsspektren von Doxo- und Epirubicin dargestellt.

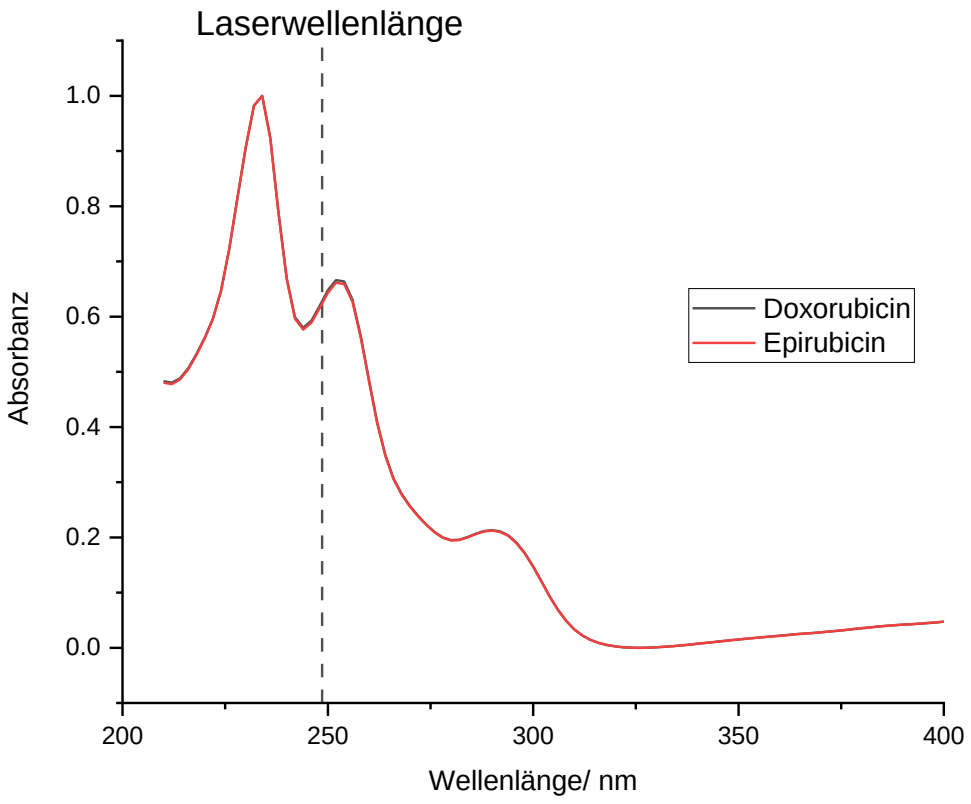

Abbildung 7: UV-Absorptionsspektren von Doxorubicin und Epirubicin mit eingezeichneter Laserwellenlänge. Die Absorptionsspektren sind identisch, weswegen beide Kurven überlagern.

Die UV/Vis-Spektroskopie ist in der Lage, elektronische Übergänge anhand von Banden im Absorptionsspektrum abzubilden. Resonante Anregung tritt bei der Raman-Spektroskopie nur auf, wenn die Frequenz des Lasers mit der Frequenz eines elektronischen Übergangs im Molekül übereinstimmt. Aus den UV-Absorptionsspektren in Abbildung 7 kann daher abgeleitet werden, dass für Doxo- und Epirubicin bei der verwendeten Laserwellenlänge von 248,6 nm ein Resonanz-Raman-Effekt zu beobachten ist.

Im Fokus des zweiten Arbeitspakets stand darüber hinaus die gezielte Manipulation (Stressung) von Proben, um reale Applikationsbeispiele zu generieren. Im Fall von Doxorubicin konnten Verunreinigungen durch Lagerung bei 4 – 8 °C erzeugt werden. In Abbildung 8 ist ein Ausschnitt der chromatographischen Trennung nach der Reinheitsbestimmung in Anlehnung an das Europäische Arzneibuch gezeigt. Die Alterung der Probe erfolgte über 8 Monate im abgedunkelten Kühlschrank. Für die

gealterte Probe lässt sich eine deutliche Zunahme der Verunreinigungen beobachten. Gleichzeitig konnte eine geringere Absorbanz des Wirkstoffpeaks aufgezeichnet werden. Folglich führt die Alterung der Probenlösung, wie zu erwarten, zu einem Abbau des Wirkstoffs Doxorubicin in der Lösung. Einige Verunreinigungen sind bereits in der frisch angesetzten Probelösung sichtbar, jedoch in geringerer Intensität als in der gealterten Lösung.

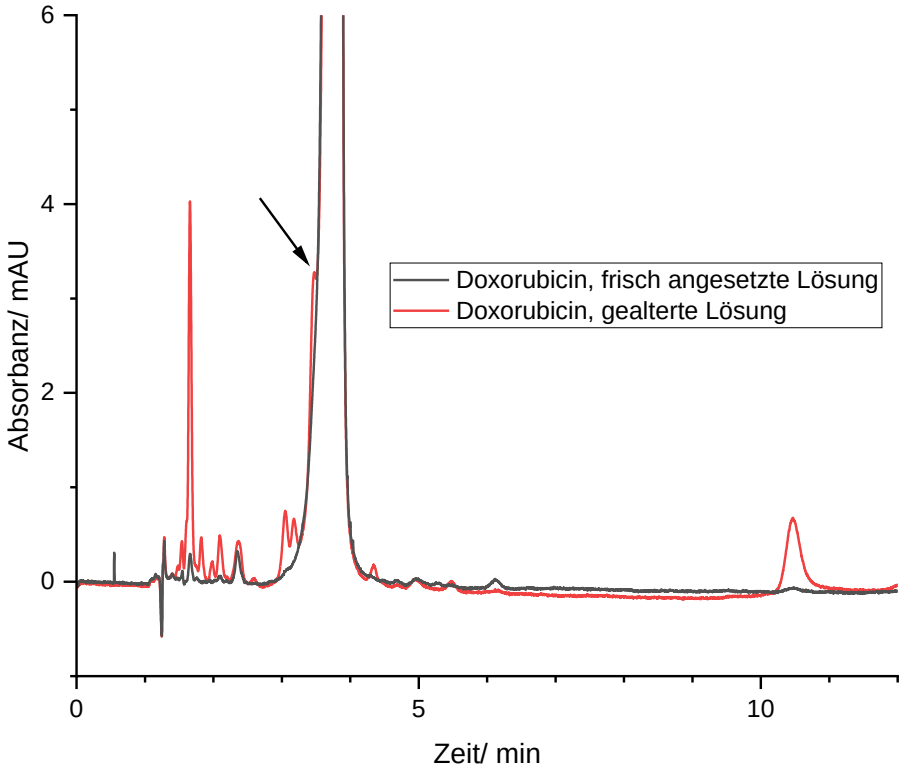

Abbildung 8: Vergrößerter Chromatogramm-Ausschnitt zur Reinheitsbestimmung nach Ph. Eur. von Doxorubicin-Lösungen. Bei der um 8 Monate gealterten Doxorubicin-Lösung (rot) zeigt sich eine deutliche Zunahme an Verunreinigungen gegenüber einer frisch angesetzten Lösung (schwarz). Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden.

Von besonderem Interesse sind Verunreinigungen, die sich in der ersten Dimension unter Anwendung der Methode zur Reinheitsbestimmung der Ph. Eur. nicht vollständig vom Wirkstoff trennen lassen. Der Pfeil in Abbildung 8 markiert eine solche Verunreinigung, die erst in der gealterten Probe als Schulter des Wirkstoffpeaks sichtbar wird. Das Peakprofil des Wirkstoffpeaks zeigt bei der frisch angesetzten Lösung keine Asymmetrie, sodass vermutet werden muss, dass keine Verunreinigung

vorliegt. Eine Zunahme der Verunreinigungen in der Probe konnte bereits nach 3 Monaten beobachtet werden. In Kapitel 2.4.3 erfolgt eine qualitative Bestimmung der Verunreinigungen anhand ihres Flächenanteils. Der Nachweis der Verunreinigungen wird in den Kapiteln 2.4.5 und 2.4.6 im Zuge der Methodenentwicklung unter Nutzung der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie detailliert beschrieben.

2.3.3 Biopharmazeutika

Als biopharmazeutische Modellsubstanzen wurden verschiedene therapeutische Antikörper ausgewählt. In Abbildung 9 ist beispielhaft das UV-Absorptionsspektrum des monoklonalen Antikörpers Rituximab gezeigt.

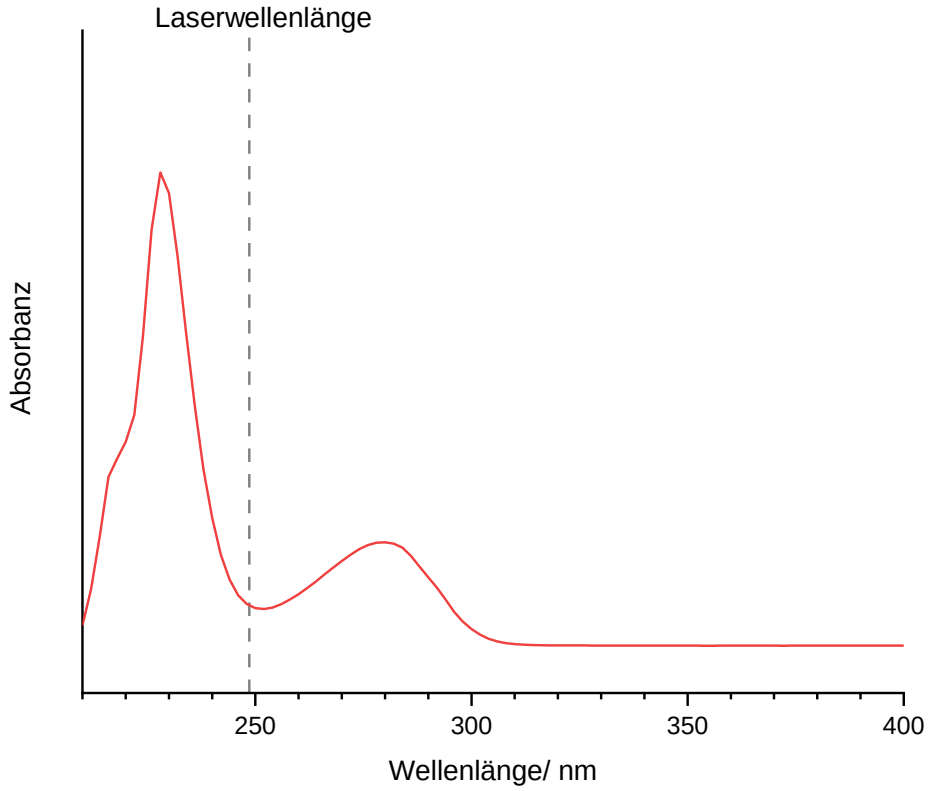

Abbildung 9: UV-Absorptionsspektren von Rituximab mit eingezeichneter Laserwellenlänge.

Im Gegensatz zu den niedermolekularen Wirkstoffen ist bei den therapeutischen Antikörpern nur eine geringe resonante Anregung bei der verwendeten Wellenlänge im UV-Bereich zu erwarten. Es wird ein freies Elektron des Sauerstoffs der Carbonsäureamid-Gruppe aus dem nichtbindenden Molekülorbital in das angeregte,

antibindende Molekülorbital π* angehoben, d. h. es wird die Peptidbindung in der abfallenden Absorptionsbande angeregt.

Eine Analyse, die im Rahmen der Qualitätskontrolle von Antikörpern durchzuführen ist, betrifft deren Glykosylierung. Antikörper werden biotechnologisch in Zellkulturen tierischen Ursprungs, wie beispielsweise in Zelllinien aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (CHO), hergestellt. Säugetierzellen erzeugen charakteristische Glykosylierungsmuster an den therapeutischen Proteinen, die einen direkten Einfluss auf die Wirksamkeit von Antikörpern, beispielsweise über den Mechanismus der Antikörper-abhängigen zellvermittelnden Zytotoxizität, haben.[5] Analytische Verfahren zur Bestimmung dieses Glykosylierungsmusters bedingen eine Aufreinigung der therapeutischen Proteine nach der Produktion, um Matrixbestandteile aus den Zellkulturen von den Antikörpern abzutrennen.[6] Im Zuge dieses Arbeitspakets wurde untersucht, welchen Einfluss die Matrix aus dem Überstand der produzierenden Zellkulturen auf die Analyse von verschiedenen Antikörpern hat (Ergebnisse in Kapitel 2.4.8.1). Das Ziel der Nutzung der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatographie ist darüber hinaus die Identifizierung verschiedener Glykosylierungsmuster in direkter Korrelation zur Bindungsaffinität der Antikörper an einen FcγIIIa-Rezeptor. Abbildung 10 zeigt eine illustrative Darstellung zu den Abläufen der Affinitätschromatographie.

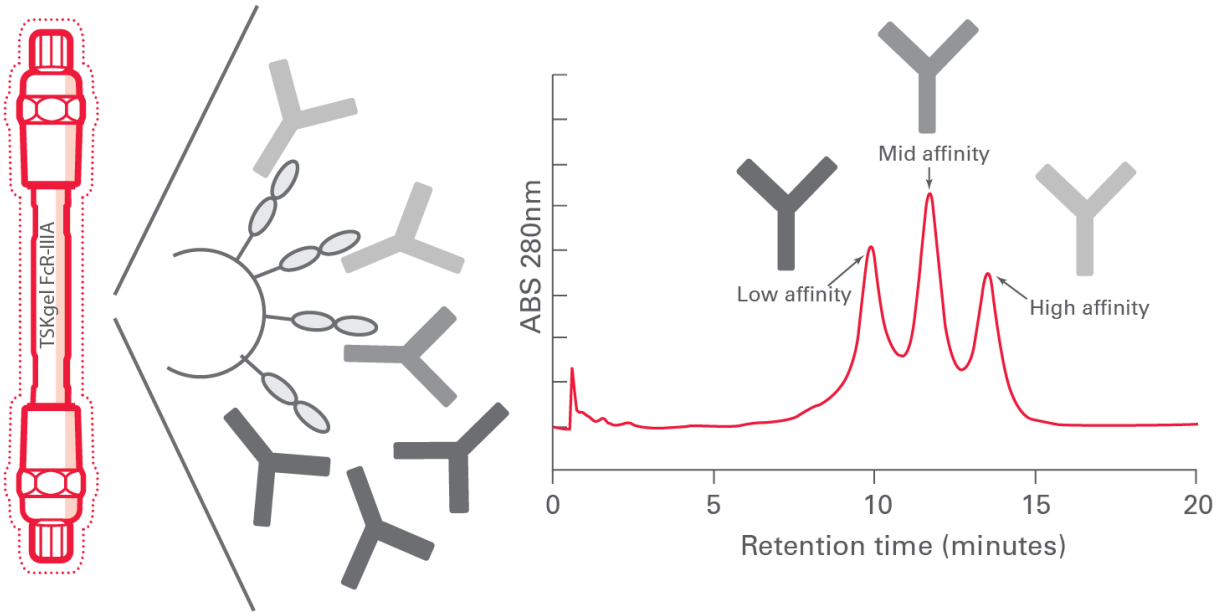

Abbildung 10: Darstellung zur Affinitätschromatographie. Verschiedene Antikörper werden durch ihre Bindungsaffinität zu den FcγIIIa-Rezeptoren der stationären Phase aufgetrennt. Je größer die Affinität der Antikörper zu den FcγIIIa-Rezeptoren ist, desto später eluieren sie von der chromatographischen Trennsäule. Die Darstellung wurde der Referenz[7] entnommen.

Die Ergebnisse der Untersuchung werden im Zuge der Methodenentwicklung in Kapitel 2.4.8.3 detailliert beschrieben.

2.4 Entwicklung eines Workflows für die pharmazeutische Analytik auf Basis der Heart-Cut-2D-LC

2.4.1 Einleitung

Im Fokus des Forschungsvorhabens stand die simultane Bestimmung von Gehalt, Reinheit und Identität einer Substanz. Die in Kapitel 2.3 ausgewählten Modellsubstanzen wurden hierzu mit Hilfe der zweidimensionalen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie umfangreich untersucht. Bei niedermolekularen Wirkstoffen ist die Bestimmung von Identität, Reinheit und Gehalt bereits in den einzelnen Monographien des Europäischen Arzneibuchs detailliert beschrieben. Im Projekt sollte die chromatographische Trennung in der ersten Dimension daher nach der Vorgabe in der Ph. Eur. erfolgen. In der zweiten Dimension sollte durch eine Variation der stationären Phase ein zusätzlicher Selektivitätsgewinn erreicht werden.

Für biopharmazeutische Produkte existieren keine individuellen Monographien im Europäischen Arzneibuch, jedoch steht mit 10.0/2031 eine allgemeine Monographie für monoklonale Antikörper für Menschen zur Verfügung. Hierin ist neben den Prüfungen auf Reinheit und Identität insbesondere die strukturelle Integrität der therapeutischen Antikörper von Interesse. Dies bedingt, dass die pharmazeutische Wirksamkeit abhängig von der räumlichen Struktur ist. Beeinflusst wird jene u. a. durch die Glykosylierung der Biopharmazeutika, wodurch in Folge wiederum die Affinität beeinflusst wird. Spezielle Verfahren auf Basis der Affinitätschromatographie ermöglichen, unter Beibehaltung der räumlichen Struktur des Antikörpers, die Bestimmung dieses Glykosilierungsmusters. In Hinblick auf die Kopplung von UV-Resonanz-Raman-Detektion und Affinitätschromatographie ergibt sich in Summe ein leistungsstarkes Analysenkonzept für die Bioanalytik.

2.4.2 Niedermolekulare Wirkstoffe

Die Methode der ersten Dimension entsprach der Prüfung auf Reinheit von Doxorubicinhydrochlorid nach Monographie 10.0/0714 des Europäischen Arzneibuchs. In Tabelle 1 sind die chromatographischen Bedingungen der ersten Dimension aufgelistet.

Tabelle 1: Chromatographische Bedingungen in der ersten Dimension nach der Prüfung auf Reinheit aus Monographie 0714 des Europäischen Arzneibuchs.

Parameter	Erste Dimension
Stationäre Phase	Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm, 5 µm (Agilent Technologies)
Mobile Phase	H_2O+SDS+H_3PO_4/ Acetonitril (50 %B)
Flussrate/ mL/min	1,0
Temperatur/ °C	25
Injektionsvolumen/ µL	5
Detektion	UV/Vis (254 nm)

2.4.3 Prüfung auf Reinheit

Die Prüfung auf Reinheit wurde mit einer um drei Monate gealterten Probe durchgeführt, um den Anteil der entstandenen Verunreinigungen in der Doxorubicin-Lösung zu bestimmen. Somit ließen sich der Zustand der Probe und die Effizienz der Alterungsmethode überprüfen. In Anlehnung an die Methode im Arzneibuch wurde

eine Kalibration mit drei Punkten durchgeführt, bei der jeweils die Peakfläche des Doxorubicin-Peaks in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt wurde. Die Ergebnisse der Kalibration sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Kalibration einer Doxorubicin-Probe in Anlehnung an die Reinheitsbestimmung nach dem Europäischen Arzneibuch. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden.

Konzentration/ µg/mL	Fläche
100	1.235
20	247
2	24

Aus der Kalibration ließ sich die Geradengleichung y= 12362,91x-0,912765 mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,999 ableiten. Für die 2D-LC Untersuchungen wurde hauptsächlich mit 0,1 mg/mL Doxorubicin-Lösungen gearbeitet, um eine Überladung der ^{2}D-Säule mit einer zu hoch konzentrierten Lösung zu vermeiden. Laut den Vorgaben des Arzneibuchs dürften Verunreinigungen maximal einen relativen Flächenanteil von 0,5 % zum Wirkstoffpeak aufweisen. Sofern Verunreinigungen mit einem größeren Flächenanteil in der Probe vorhanden sind, wäre diese für die vorgesehene Verwendung als Arzneimittel auszuschließen. Für Doxorubicin ergaben sich drei nicht zulässige Verunreinigungen bei 1,6 min, 3,4 min und 10,2 min mit relativen Flächenanteilen von jeweils 0,8 %, 1,6 % und 0,6 %. Die Alterung der Doxorubicin-Lösungen bei 4 – 8 °C war daher ausreichend, um Verunreinigungen in der Probe zu generieren.

2.4.4 Gehaltsbestimmung

Die Gehaltsbestimmung nach Ph. Eur. konnte mit derselben Methode durchgeführt werden. Dazu wurde eine Lösung des offiziellen Ph. Eur. Referenzstandard des Europäischen Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM) als Referenz gemessen und der Gehalt der Untersuchungslösung in Prozent berechnet. Somit ließ sich für eine Doxorubicin-Lösung eines kommerziellen Herstellers ein Gehalt von 102 % im Vergleich zum Referenzstandard des EDQM bestimmen. Dieser Wert liegt innerhalb der zu tolerierenden Messunsicherheit.

2.4.5 Zweite Dimension

Eines der Ziele des Forschungsvorhabens war, eine zusätzliche selektive Trennung in der zweiten Dimension zu realisieren. Dazu wurde eine Methode nach Camaggi *et al.*[8] als Grundlage für die zweidimensionale Methodenentwicklung ausgewählt und modifiziert. Diese Methode basiert auf der Umkehrphasenchromatographie mit einer Cyanopropyl-funktionalisierten stationären Phase. Nach Camaggi *et al.* wird ein Elutionsmittel aus einer Mischung von Kaliumdihydrogenphosphatlösung und Acetonitril eingesetzt. Dieses Elutionsmittel ist für den Einsatz in der zweiten Dimension der 2D-LC ungeeignet, da die Eluenten der ersten und zweiten Dimension in diesem Fall inkompatibel sind. In der ersten Dimension wurde das Ionenpaarreagenz Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) eingesetzt. In Kombination mit Kaliumsalzen fällt SDS jedoch als schwerlösliches Kaliumdodecylsulfat aus. Dies hätte in Folge zu Verstopfungen im System geführt. Daher wurde ausschließlich Natriumdihydrogensulfat verwendet.

Als Ausgangspunkt für die Methodenentwicklung in der zweiten Dimension wurde ein statistischer Versuchsplan (Design of Experiments, DoE) gewählt. Hierdurch konnten schnell und gezielt Informationen für die weitere Methodenentwicklung gewonnen werden. Die Ergebnisse der systematischen Methodenentwicklung sind in Abbildung 11 dargestellt.

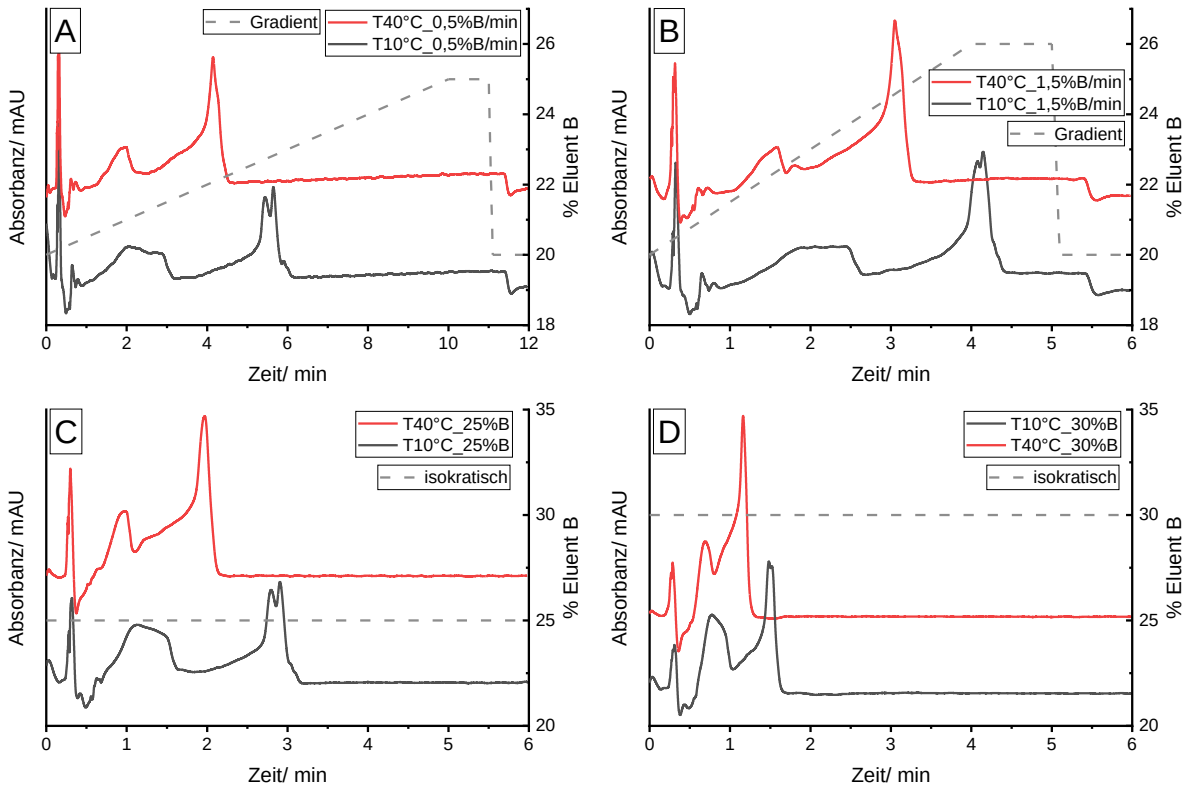

Abbildung 11: Chromatogramme zur systematischen Methodenentwicklung in der zweiten Dimension. Mit Hilfe einer statistischen Versuchsplanung (DoE) wurde der Versuchsraum in zwei Experimenten systematisch abgedeckt. A und B: Temperatur/ Steigung des Gradienten, C und D: Temperatur/ Lösungsmittelzusammensetzung. Chromatographische Bedingungen: Stationäre Phase: Zorbax SB-CN 2,1 x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies), mobile Phase: A: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 4,3), B: Acetonitril, Flussrate: 0,5 mL/min, Injektionsvolumen: 40 µL, Detektion: UV/Vis (254 nm), Temperatur: 10/ 40 °C, Gradient: 0,5/ 1,5 % B/min, isokratisch: 25/ 30 % B.

Anhand der in Abbildung 11 dargestellten Chromatogramme kann abgeleitet werden, dass sich in der zweiten Dimension bei einer Säulentemperatur von 10 °C jeweils zwei Peaks im Vergleich zu einem Peak bei 40 °C ausbilden. Die niedrigere Temperatur wirkt sich in diesem Fall positiv auf die Selektivität der chromatographischen Trennung aus. Doxorubicin weist bei einem Anteil von 25 % Acetonitril in der mobilen Phase eine höhere Retention und gleichzeitig eine höhere Auflösung auf, als bei einem Anteil von 30 % Acetonitril. Ein Elutionsgradient mit einer Steigung von 0,5 %B/min zwischen 20 – 25 %B verbessert die Auflösung zusätzlich. Mit den gewonnenen Erkenntnissen wurde die Methode weiterentwickelt. Die chromatographischen Bedingungen der Methode in der zweiten Dimension nach Optimierung sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der finalen chromatographischen Bedingungen der zweiten Dimension.

Parameter	Zweite Dimension
Stationäre Phase	Zorbax SB-CN 2,1 x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies)
Mobile Phase	A: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 4,3) B: Acetonitril
Gradient	20 – 25 %B in 10 min
Fluss/ mL/min	0,5
Temperatur/ °C	10
Injektionsvolumen/ µL	40
Detektion	UV/Vis (254 nm)

Mit der entwickelten zweidimensionalen Methode wurden mehrere Fraktionsschnitte aus dem Wirkstoffpeak von Doxorubicin in der ersten Dimension untersucht. In Abbildung 12 ist die 2D-LC Bestimmung im Heart-Cut-Modus einer frisch angesetzten Doxorubicin-Lösung gezeigt.

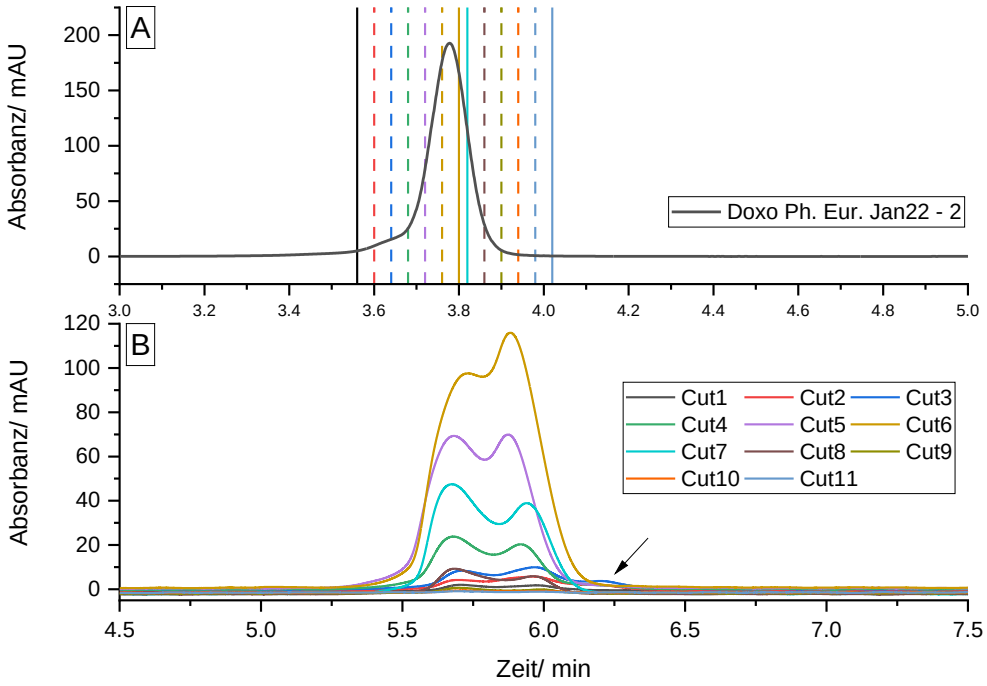

Abbildung 12A: [1]D-Chromatogrammausschnitt einer frisch angesetzten Doxorubicin-Lösung mit eingezeichneten Heart-Cuts (farbige, gestrichelte Linien markieren jeweils den Anfang der Fraktionen). Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. B: [2]D-Chromatogrammausschnitte der farblich markierten Heart-Cuts. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden.

Der Wirkstoffpeak wurde insgesamt in 11 Fraktionen unterteilt. Die eingezeichneten Linien markieren die einzelnen Fraktionsschnitte (Heart-Cuts, Abbildung 12A). In Abbildung 12B sind die farblich abgestimmten Chromatogrammausschnitte der zweiten Dimension der einzelnen sogenannten Heart-Cuts dargestellt. In Abhängigkeit von der Konzentration des Wirkstoffs in der ersten Dimension variiert die Absorbanz der Peaks in der zweiten Dimension. In den ^{2}D-Chromatogrammen der Fraktionen 2 – 9 sind jeweils zwei Peaks sichtbar, die nicht vollständig voneinander getrennt werden können (chromatographische Auflösung < 1,5). Sie besitzen in der zweiten Dimension Retentionszeiten von ca. 5,7 min und 5,9 min. Durch die Auftrennung mit unterschiedlicher Selektivität kann der Wirkstoff bzw. das Zielmolekül von einer weiteren Substanz getrennt werden. Darüber hinaus kann in den vorderen Fraktionsschnitten (Cuts 2 – 4) ein weiterer, wenig intensiver Peak mit einer Retentionszeit von etwa 6,2 min beobachtet werden. In Abbildung 12A zeigt sich eine wenig intensive Schulter unter den Heart-Cuts 2 – 4 des Wirkstoffpeaks. Die Verunreinigung lässt sich demnach bereits in der ersten Dimension nachweisen und in der zweiten Dimension ebenfalls vom Wirkstoff unterscheiden. In den ^{2}D-Chromatogrammen der Cuts 1, 10 und 11 sind keine Peaks zu beobachten. Die Konzentration des Wirkstoffs Doxorubicin wird in diesen Fraktionsschnitten für einen Nachweis in der zweiten Dimension zu gering gewesen sein, da sich die genannten Heart-Cuts jeweils im auslaufenden Peakprofil des Wirkstoffpeaks im ^{1}D-Chromatogramm befinden. Untersuchungen einer frisch angesetzten Doxorubicin-Lösung zeigten, entgegen vorherigen Erwartungen, ebenfalls eine Verunreinigung. Bei der Analyse bildeten sich zwei nicht vollständig aufgelöste Peaks in der zweiten Dimension. In Abbildung 13 sind ^{2}D-Chromatogramme des 3. Fraktionsschnitts jeweils einer frisch angesetzten Lösung gegenüber einer gealterten Lösung vergleichend dargestellt.

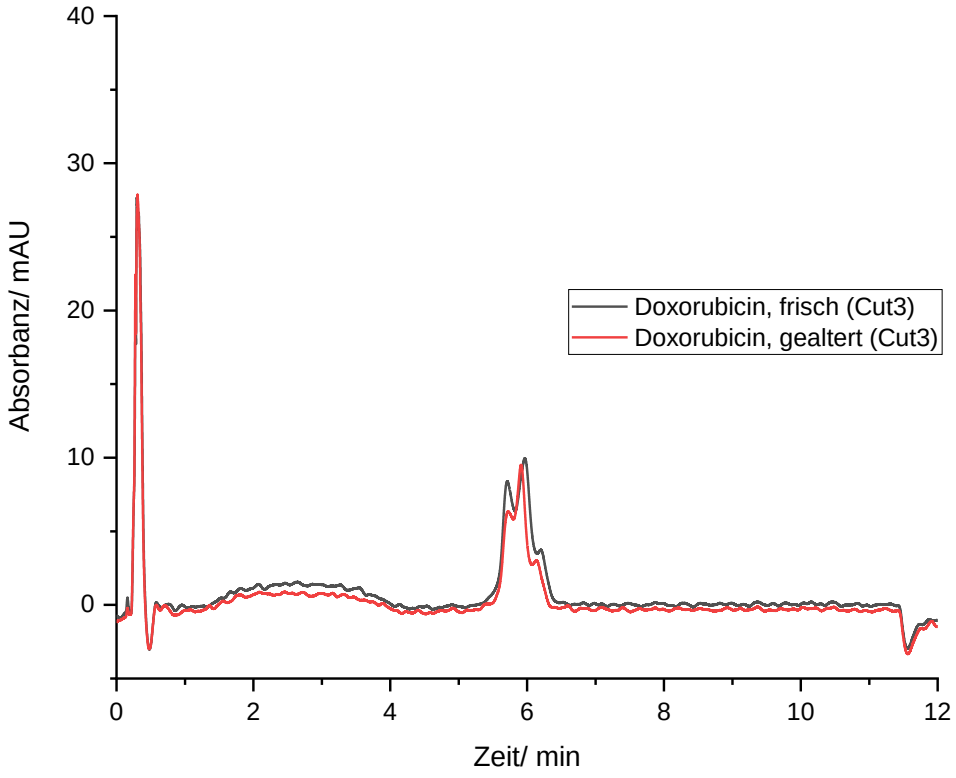

Abbildung 13: ^{2}D-Chromatogramme des gleichen Fraktionsschnitts einer frisch angesetzten gegenüber einer gealterten Doxorubicin-Lösung. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden.

Sowohl für die frisch angesetzte Lösung als auch für die gealterte Lösung ergeben sich je drei nicht vollständig aufgelöste Peaks. Die Absorbanz der einzelnen Peaks variiert leicht zwischen der frischen und der gealterten Probe. Zusätzlich schwanken die Retentionszeiten der Peaks bei der frischen und der gealterten Probe mit 5,7 min, 5,9 min und 6,1 min (gealtert) im Vergleich zu 5,7 min, 6,0 min und 6,2 min (frisch). Grundsätzlich ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proben. Es lässt sich festhalten, dass Doxorubicin unabhängig vom Alterungszustand der Stammlösung eine Verunreinigung besitzt, die erst in der 2. Dimension vom Wirkstoff getrennt werden kann. Zusätzlich lässt sich in Fraktionsschnitt 3 eine weitere Verunreinigung beobachten, die in der 1. Dimension bereits als Schulter im Peakprofil sichtbar wird.

Für die bisher gezeigten Untersuchungen wurde ausschließlich der offizielle Ph. Eur. Referenzstandard des EDQM für die Doxorubicin-Lösungen verwendet. Darüber hinaus wurden noch der Wirkstoff eines kommerziellen Herstellers, sowie der Ph. Eur.

Referenzstandard und ein kommerzielles Produkt des Wirkstoffs Epirubicinhydrochlorid auf Reinheit geprüft (Abbildung 14).

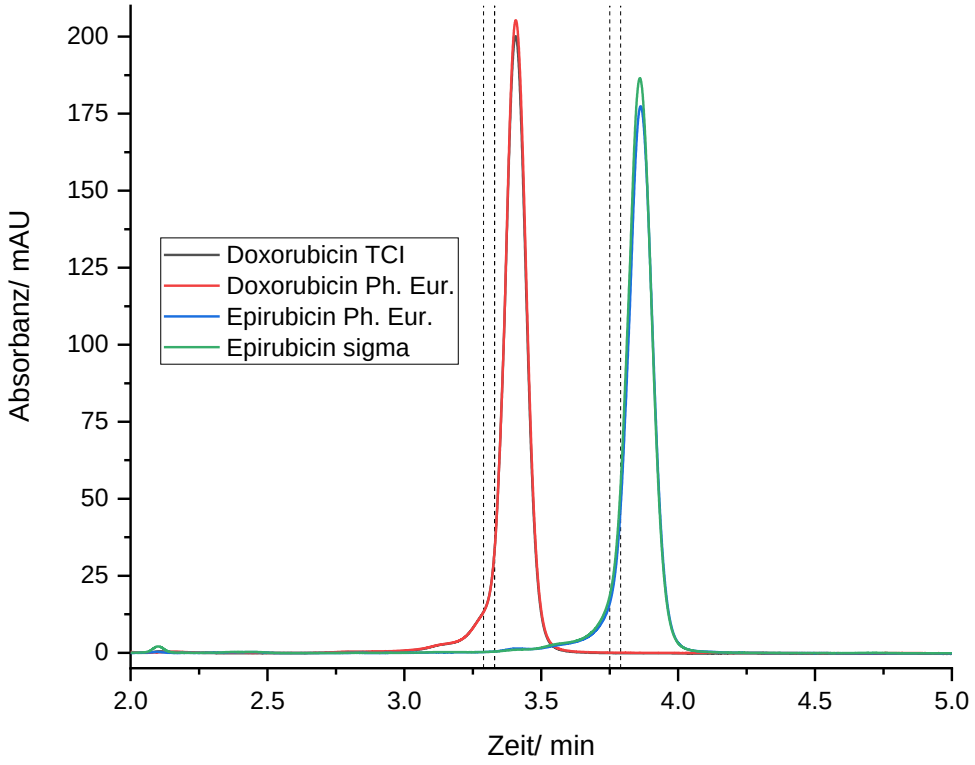

Abbildung 14: ^{1}D-Chromatogramm von Doxorubicin- und Epirubicin-Lösungen verschiedener Hersteller nach Alterung. Die gestrichelten Linien markieren den Fraktionsschnitt, der per Heart-Cut in die zweite Dimension überführt wurde. Die ^{2}D-Chromatogramme der Fraktionsschnitte sind in Abbildung 15 dargestellt. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden.

Das ^{1}D-Chromatogramm zeigt, dass Doxo- und Epirubicin nach der Reinheitsbestimmung in Anlehnung an die Monographie 10.0/0714 voneinander getrennt werden können. Für alle Proben wurde ein Heart-Cut der vorderen Peakflanke in die zweite Dimension überführt. Die Chromatogramme der 2. Dimension dieser Untersuchungen sind in Abbildung 15 dargestellt. In den ^{2}D-Chromatogrammen zeigen sich sowohl für Doxo- als auch für Epirubicin jeweils drei Peaks in beiden Proben. Doxorubicin lässt sich in der 2. Dimension eindeutig von Epirubicin anhand der Retentionszeit unterscheiden. Die Analyse der Chromatogramme für die Doxorubicin-Proben ergibt, dass Peaks bei einer Retentionszeit von 5,9 min, 6,1 min und 6,4 min erhalten werden, während in den Epirubicin-Proben Peaks mit

Retentionszeiten von 6,5 min, 6,9 min und 7,2 min detektiert werden. Es kann demnach ausgeschlossen werden, dass es sich bei den nachgewiesenen Verunreinigungen um Epirubicin handelt.

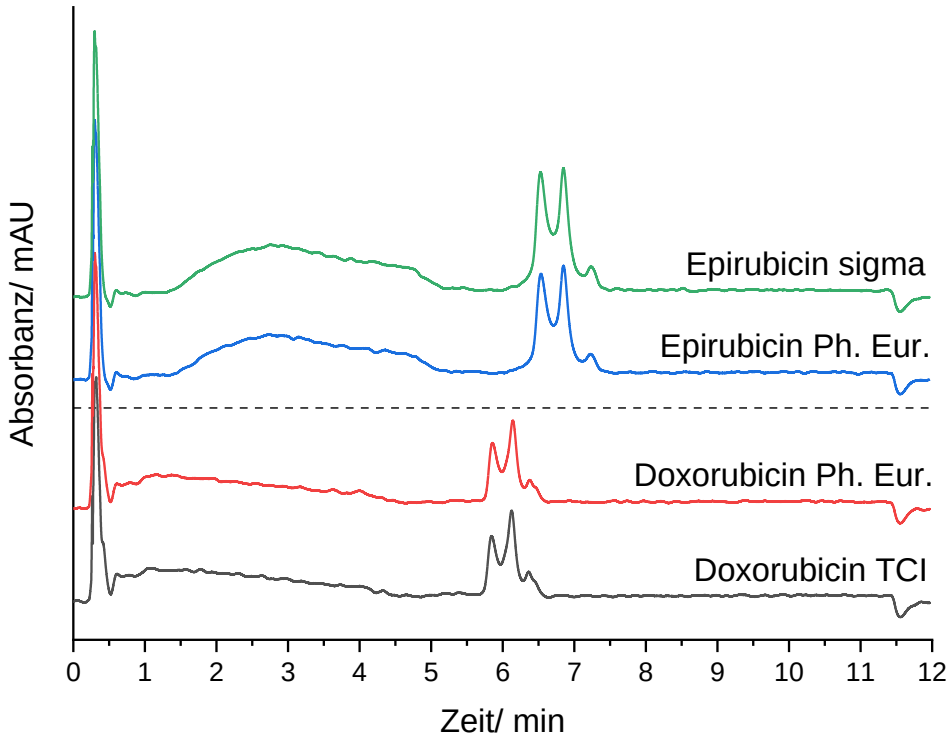

Abbildung 15: ^{2}D-Chromatogramme von Doxorubicin- und Epirubicin-Lösungen verschiedener Hersteller nach Alterung. Die Heart-Cuts der ersten Dimension sind in Abbildung 14 dargestellt. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden.

Die zweidimensionale Analyse impliziert, dass die detektierten Verunreinigungen unabhängig vom Hersteller entstehen. Die Peaks der Doxorubicin-Proben eluieren nach 5,9 min, 6,1 min und 6,4 min, während die Peaks der Epirubicin-Proben Retentionszeiten von ca. 6,5 min, 6,9 min und 7,2 min besitzen. Doxo- und Epirubicin lassen sich demnach in der 2. Dimension eindeutig voneinander trennen. Weiterhin kann Abbildung 15 entnommen werden, dass es sich um eine robuste Methode handelt, denn die Abweichung zwischen den Retentionszeiten der Proben unterschiedlicher Hersteller beträgt weniger als 1 s.

2.4.6 Identifizierung

Ein weiteres Ziel des Arbeitspakets war die Identifizierung der gebildeten Verunreinigungen. In Abbildung 16 sind die UV-Absorptionsspektren, aufgenommen an den Peakmaxima des ebenfalls gezeigten ^{2}D-Chromatogramms, dargestellt. Die UV-Absorptionsspektren aller drei Peaks sind identisch. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den Verunreinigungen um strukturverwandte Substanzen wie beispielsweise Stereoisomere handelt. Doxo- (S-Isomer) und Epirubicin (R-Isomer) unterscheiden sich an einem von insgesamt sechs Stereozentren.

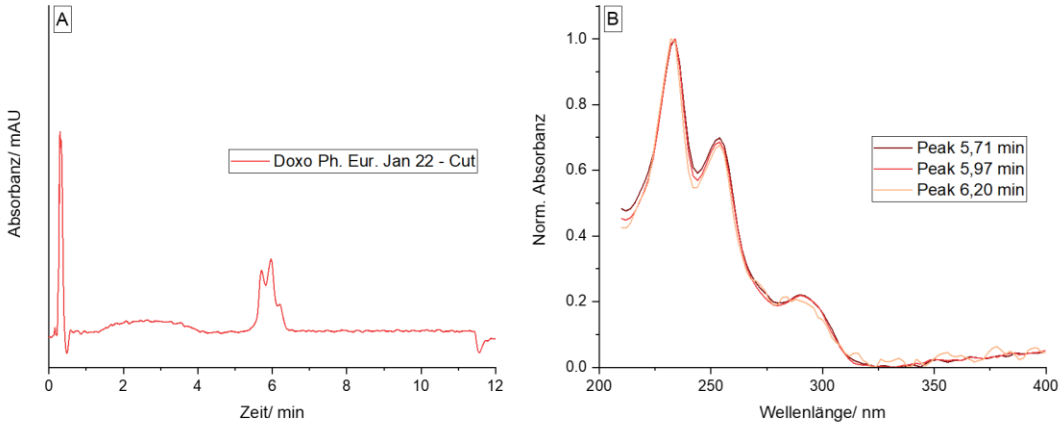

Abbildung 16 A: ^{2}D-Chromatogramm einer frisch angesetzten Doxorubicin-Lösung. Der Fraktionsschnitt stammt aus der vorderen Schulter des Wirkstoffpeaks in der ersten Dimension. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 entnommen werden. B: UV-Absorptionsspektren am Maximum der drei Peaks bei 5,71 min, 5,97 min und 6,20 min im Chromatogramm der zweiten Dimension.

Die Kopplung der 2D-LC mit einem Massenspektrometer könnte weitere Informationen zu den nachgewiesenen Verunreinigungen liefern. Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie lassen sich nur beim Einsatz von leicht-flüchtigen Elutionsmitteln in der HPLC miteinander koppeln. Daher war ein Austausch des nicht-flüchtigen Phosphatpuffers der zweiten Dimension notwendig. Der Austausch erfolgte gegen einen Ammoniumacetatpuffer, da dieser einen vergleichbaren Pufferbereich wie der Phosphatpuffer abdeckt. Somit sollten pH-Wert-abhängige Effekte auf die chromatographische Trennung reduziert werden. In Abbildung 17 sind das ^{1}D-Chromatogramm mit eingezeichneten Heart-Cuts und die dazugehörigen ^{2}D-Chromatogramme überlagert dargestellt. Den ^{2}D-Chromatogrammen lässt sich entnehmen, dass die Auflösung der Trennung in der 2. Dimension mit dem MS-kompatiblen Acetatpuffer (Abbildung 17) im Vergleich zur Trennung mit dem MS-

inkompatiblen Phosphatpuffer (Abbildung 12) deutlich abnimmt. Aufgrund der geringen Auflösung in der 2. Dimension war eine Kopplung mit einem Massenspektrometer für diese Analyse nicht sinnvoll.

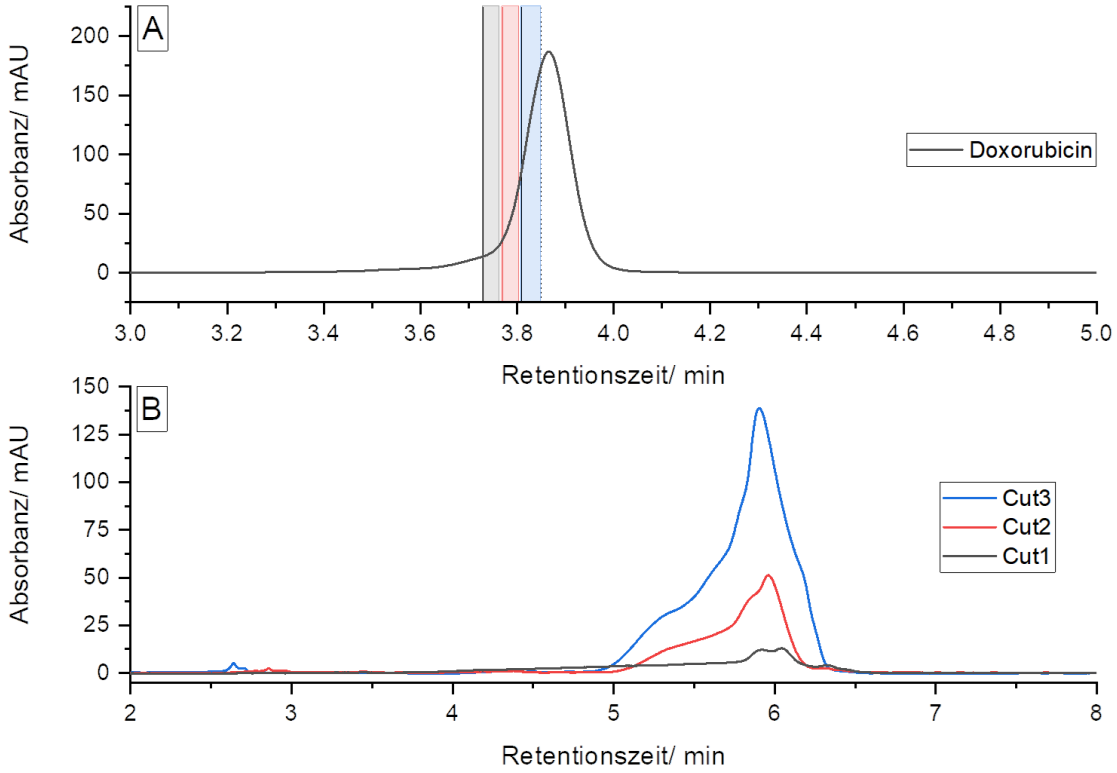

Abbildung 17A: [1]D-Chromatogramm einer Doxorubicin-Lösung. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden. B: [2]D-Chromatogramm nach Austausch des Phosphatpuffers gegen einen MS-kompatiblen Acetatpuffer. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 3 mit Einschränkung der mobilen Phase A entnommen werden. Diese wurde für den dargestellten Versuch gegen 10 mM Ammoniumacetat (pH 4,6) ausgetauscht.

An dieser Stelle ist die Kopplung mit dem UV-Resonanz-Raman-Detektor der Massenspektrometrie überlegen, da der Phosphatpuffer für den TRR-FLD keine Einschränkung bedeutet. Zusätzlich könnten die Raman-Spektren zur Identifizierung der Verunreinigungen und des Wirkstoffs beitragen.

2.4.7 Validierung

Ein Ziel des Arbeitspakets 2 war die Validierung der 2D-LC Methode nach Vorgabe des International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Bei der Methode in der 1. Dimension handelte

es sich um eine Reinheitsbestimmung aus einer Monographie des Europäischen Arzneibuchs. Die in den Monographien beschriebenen Methoden gelten bereits als valide, da sie umfangreich vor der Aufnahme ins Ph. Eur. geprüft wurden. Für die Anwendung dieser Methoden ist eine Verifizierung der Methode ausreichend. Dazu ist in der Arzneibuchmonographie eine Eignungsprüfung für die Methode beschrieben. Für den Wirkstoff Doxorubicinhydrochlorid ist eine chromatographische Auflösung von mindestens 2,0 zwischen den Peaks von Doxo- und Epirubicin für eine Referenzlösung mit einer Konzentration von je 0,02 mg/mL beider Analyten vorgeschrieben. In ist ein Chromatogramm zur Eignungsprüfung dargestellt.

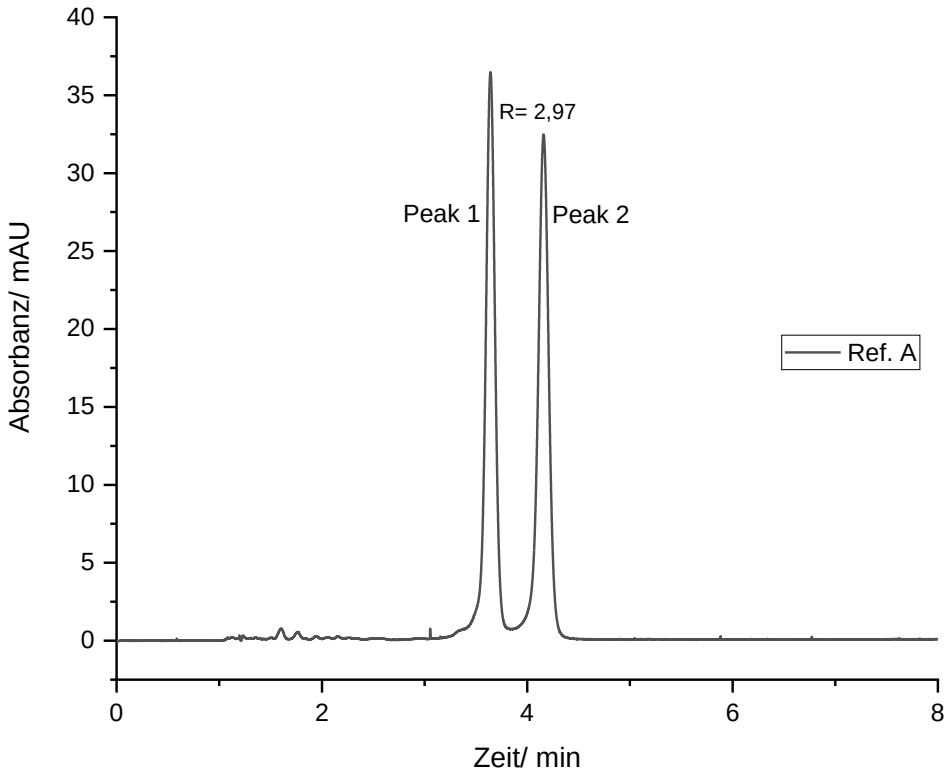

Abbildung 18: Chromatogramm zur Eignungsprüfung der Methode auf Reinheit von Doxorubicinhydrochlorid. Es wurde eine Lösung mit einem Gemisch aus je 0,02 mg/mL Doxo- und Epirubicin injiziert. Die chromatographische Auflösung von 3,0 zwischen den beiden Substanzpeaks liegt über der geforderten minimalen Auflösung von 2,0. Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 1 entnommen werden.

Dem in dargestellten Chromatogramm kann entnommen werden, dass die Auflösung zwischen den Substanzpeaks von Doxorubicin (Peak 1) und Epirubicin (Peak 2) 3,0 beträgt. Die Auflösung der angewandten Methode unter Nutzung der 2D-LC liegt damit eindeutig über der geforderten Mindestauflösung von 2,0. Die Methode in der ersten Dimension entsprach den Anforderungen der Ph. Eur., um eine Prüfung auf Reinheit durchzuführen.

Nach Vorgabe der ICH Q2 (R1) Richtlinie zur Validierung von analytischen Methoden werden die Parameter Spezifität, Linearität, Messbereich, Richtigkeit, Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze und Robustheit bewertet. Die Validierung der 2D-LC Methode scheiterte an der Spezifität der ^{2}D-Methode. In Kapitel 2.4.6 konnte nicht eindeutig identifiziert werden, bei welchem Peak es sich um den Wirkstoff sowie dessen Verunreinigungen handelt. Der Dioden-Array-Detektor der 2. Dimension besitzt keine ausreichende Spezifizität, um die Substanzen eindeutig identifizieren zu können.

2.4.8 Biopharmazeutika

Im Bereich der Biopharmazeutika ist neben der Reinheit und dem Gehalt besonders die strukturelle Integrität der therapeutischen Proteine von Interesse. Die Wirksamkeit von therapeutischen Proteinen ist stark abhängig von der räumlichen Struktur sowie vom Glykosylierungsmuster.

Die Wirkung der Therapeutika erfolgt u. a. über eine Antikörper-abhängige zellvermittelnde Zytotoxizität. Diese wird maßgeblich durch das Glykosylierungsmuster bestimmt, da es die Bindungsaffinität zum FcγRIIIa-Rezeptor beeinflusst.[5,9] Nicht-glykosylierte Antikörper besitzen keine Affinität zum genannten Fc-Rezeptor. Ein Glykan besteht aus N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Mannose, und einer variierenden Abfolge der Monosaccharide Fucose, Galactose und Sialinsäure.[10] Die Zusammensetzung des Glykosylierungsmusters (Abbildung 19) hat maßgeblichen Einfluss auf die Bindungsaffinität eines Antikörpers.[9]

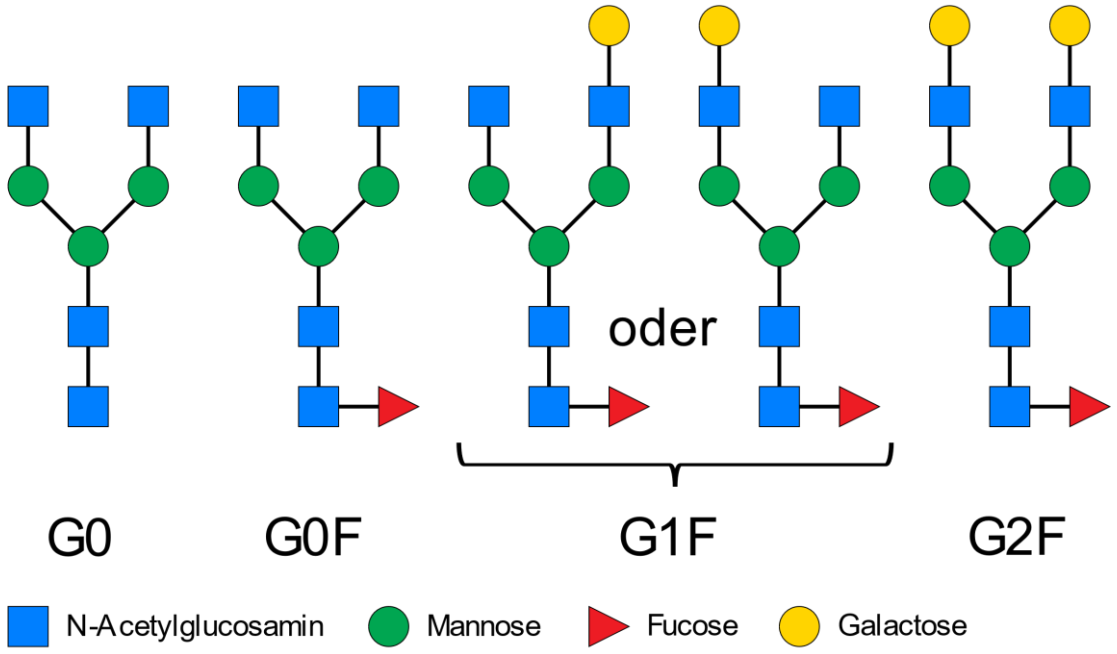

Abbildung 19: Schematische Darstellung der verschiedenen Modifikationen der N-Glykosylierungsstruktur. Hier dargestellte Glykane setzen sich aus den Monosacchariden N-Acetylglucosamin, Mannose, sowie variierenden Anteilen von Fucose (F) und Galactose (G) zusammen.

Im Zuge dieses Arbeitspakets wurde zunächst ein Applikationsbeispiel aus der Qualitätskontrolle adressiert. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Matrix aus dem zellfreien Überstand eines Zellkulturmediums auf die Analyse von monoklonalen Antikörpern unter Nutzung der Affinitätschromatographie besitzt. Dazu sollte in der ersten Dimension eine Affinitätschromatographie mit einer FcR-IIIa-Phase etabliert werden. In Tabelle 4 sind die chromatographischen Bedingungen der Methode in der ersten Dimension aufgelistet.

Tabelle 4: Chromatographische Bedingungen für die Affinitätschromatographie in der ersten Dimension.[11]

Parameter	Erste Dimension
Stationäre Phase	TSKgel FcR-IIIA-NPR 4,6 x 75 mm (Tosoh Bioscience GmbH)
Mobile Phase	50 mM $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ + 150 mM NaCl für A: pH 6,7, für B: pH 4,7
Gradient	0 - 10 min 1 - 1 % B; 10 - 55 min 1 - 99 % B; 55 - 65 min 99 - 99 % B; 65 - 65.5 min 99 - 1 % B; 65.5 - 75 min 1 - 1% B
Fluss/ mL/min	0,4
Temperatur/ °C	15
Injektionsvolumen/ µL	15
Detektion	UV/Vis (280 nm, ref. 390 nm)

2.4.8.1 Auswirkung der Matrix auf die Analyse

Die monoklonalen Antikörper Adalimumab, Pertuzumab, Omalizumab, Tocilizumab und Ustekinumab wurden vergleichend in aufgereinigter Form und im Überstand des zentrifugierten Zellkulturmediums untersucht. In Abbildung 20 sind die überlagerten Chromatogramme der fünf monoklonalen Antikörper im zellfreien Überstand des Zellkulturmediums und als aufgereinigte Probe dargestellt.

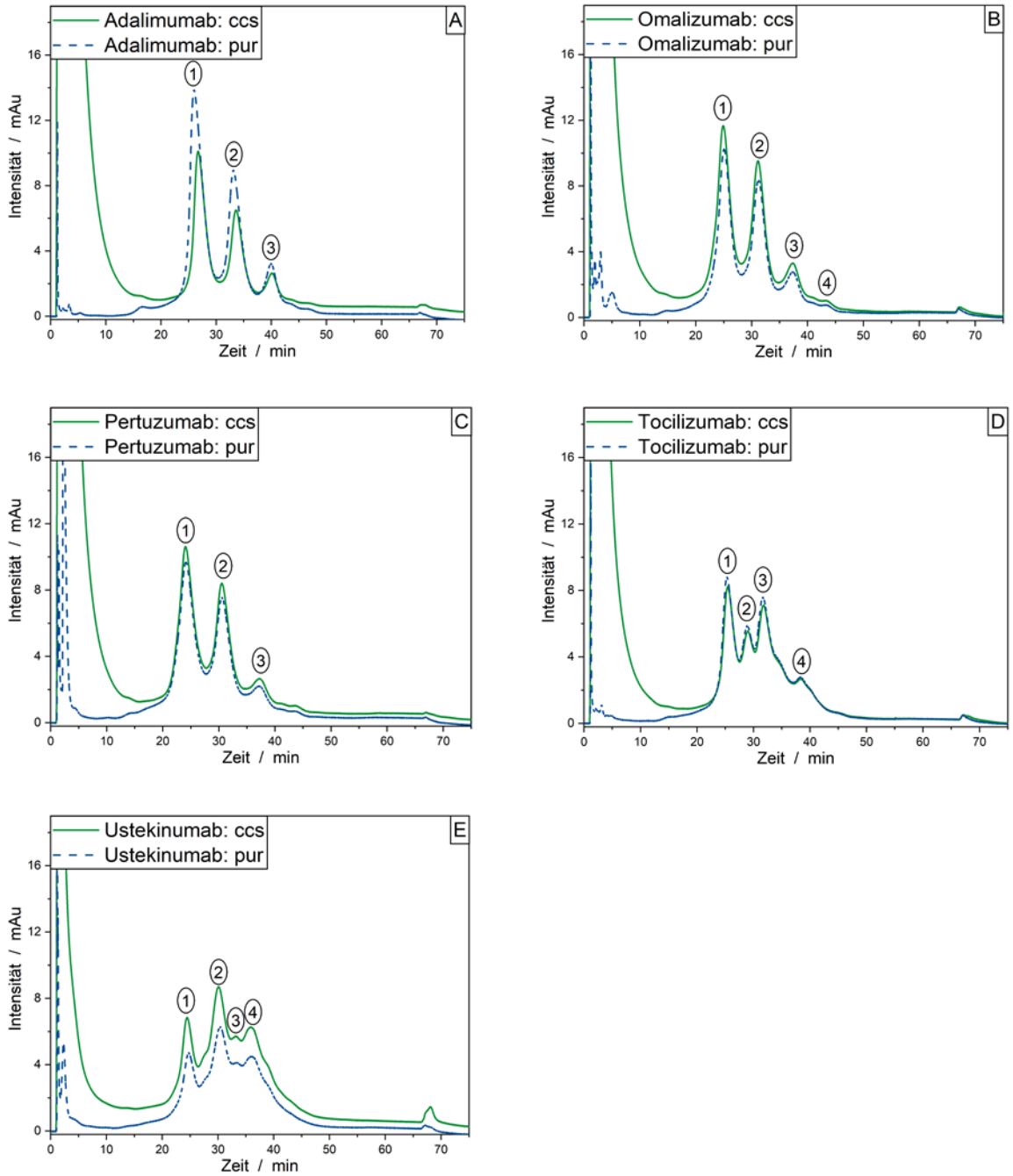

Abbildung 20: Überlagerte Chromatogramme von fünf monoklonalen Antikörpern im zellfreien Überstand eines Zellkulturmediums (ccs, grün, durchgehend) und als aufgereinigte Proben (pur, blau, gestrichelt). Die chromatographischen Bedingungen können Tabelle 4 entnommen werden.[11]

Anhand der Chromatogramme in Abbildung 20 kann abgeleitet werden, dass die Matrix des Zellkulturmediums im Bereich von etwa 0 – 15 min eluiert. Die Antikörper besitzen dagegen Retentionszeiten zwischen 20 – 45 min. Dies zeigt, dass alle fünf Antikörper eine Affinität zum immobilisierten Rezeptor besitzen. Die Entstehung mehrerer Peaks erlaubt die Annahme, dass in den Proben jeweils Antikörper mit

unterschiedlich zusammengesetzten Glykosylierungsmustern vorhanden sind.[6] Dies wird in Kapitel 2.4.8.2 zusammen mit den Ergebnissen der 2D-LC-HRMS Analyse näher erläutert.

Matrixeffekte können verschiedene Auswirkungen auf die chromatographische Trennung besitzen und die Analyse somit beeinträchtigen. Beispielsweise kann Matrix das Retentionsverhalten bzw. die Peakfläche eines Analyten beeinflussen. Somit können Matrixeffekte die qualitative Zuordnung des Analyten anhand der Retentionszeit erschweren und die Quantifizierung durch Veränderung der Peakfläche verfälschen. Um Matrixeffekte durch das Zellkulturmedium auszuschließen, wurden daher sowohl die Retentionszeiten (Tabelle 5) als auch die Peakflächen (Tabelle 6) der einzelnen Fraktionen genauer betrachtet.[6]

Tabelle 5: Retentionszeiten und Standardabweichungen der einzelnen Peaks der FcR-Affinitätschromatographie. Aus den Chromatogrammen in Abbildung 20 können die Positionen der einzelnen Peaks entnommen werden. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt (n=3). Abkürzungen: zellfreier Überstand des Zellkulturmediums (ccs), aufgereinigte Probe (pur), Adalimumab (ADLM), Pertuzumab (PTZ), Ustekinumab (UTKM), Tocilizumab (TCLZ), Omalizumab (OMLZ).[11]

	Peak Nr. 1 (min)	**Peak Nr. 2 (min)**	**Peak Nr. 3 (min)**	**Peak Nr. 4 (min)**
ADLM ccs	26,71 ± 0,04	33,59 ± 0,05	40,12 ± 0,07	n. d.
ADLM pur	25,97 ± 0,03	33,11 ± 0,01	39,94 ± 0,01	n. d.
PTZ ccs	24,00 ± 0,01	30,50 ± 0,04	37,39 ± 0,01	n. d.
PTZ pur	24,13 ± 0,02	30,57 ± 0,03	37,37 ± 0,09	n. d.
UTKM ccs	24,45 ± 0,04	30,09 ± 0,04	33,23 ± 0,03	36,13 ± 0,09
UTKM pur	24,75 ± 0,03	30,35 ± 0,10	33,47 ± 0,00	36,43 ± 0,09
TCLZ ccs	25,40 ± 0,05	28,99 ± 0,05	31,75 ± 0,09	38,51 ± 0,00
TCLZ pur	25,26 ± 0,01	28,87 ± 0,02	31,62 ± 0,03	38,39 ± 0,11
OMLZ ccs	24,89 ± 0,03	31,12 ± 0,04	37,42 ± 0,02	43,64 ± 0,06
OMLZ pur	25,04 ± 0,02	31,21 ± 0,01	37,39 ± 0,02	43,60 ± 0,06

Die Differenz zwischen den Retentionszeiten matrixbelasteter und matrixfreier Proben lag bei durchschnittlich 0,20 min im Intervall von 0,02 – 0,71 min. Somit konnte bei den Retentionszeiten ein geringer Einfluss durch den zellfreien Überstand des Zellkulturmediums (Matrix) bei den Analysen festgestellt werden.[6]

Tabelle 6: Peakflächen und Standardabweichungen der einzelnen Peaks der FcR-Affinitätschromatographie. Aus den Chromatogrammen in Abbildung 20 können die Positionen der einzelnen Peaks entnommen werden. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt (n=3). Abkürzungen: zellfreier Überstand des Zellkulturmediums (ccs), aufgereinigte Probe (pur), Adalimumab (ADLM), Pertuzumab (PTZ), Ustekinumab (UTKM), Tocilizumab (TCLZ), Omalizumab (OMLZ).[11]

	Peak Nr. 1 (Flächen %)	Peak Nr. 2 (Flächen %)	Peak Nr. 3 (Flächen %)	Peak Nr. 4 (Flächen %)
ADLM ccs	58,7 ± 0,2	32,2 ± 0,5	9,1 ± 0,4	n. d.
ADLM pur	59,8 ± 0,4	31,9 ± 0,3	8,3 ± 0,4	n. d.
PTZ ccs	57,9 ± 0,5	35,7 ± 0,4	6,4 ± 0,6	n. d.
PTZ pur	57,8 ± 0,3	36,0 ± 0,1	6,3 ± 0,2	n. d.
UTKM ccs	39,0 ± 0,1	41,8 ± 0,4	1,6 ± 0,3	17,6 ± 0,8
UTKM pur	38,8 ± 0,4	41,9 ± 0,9	1,1 ± 0,1	18,2 ± 0,1
TCLZ ccs	56,7 ± 1,0	11,4 ± 0,5	28,0 ± 0,1	3,9 ± 0,8
TCLZ pur	56,6 ± 0,5	11,6 ± 0,2	28,7 ± 0,4	3,1 ± 0,1
OMLZ ccs	53,5 ± 0,5	36,8 ± 0,8	8,7 ± 0,3	1,0 ± 0,1
OMLZ pur	52,3 ± 0,5	38,0 ± 0,5	8,7 ± 0,4	1,0 ± 0,3

Bei den Peakflächen ergab sich eine durchschnittliche Differenz von 0,4 % zwischen matrixbelasteten und matrixfreien Proben. Die Werte erreichten dabei einen Unterschied von 0,0 – 1,2 % in Abhängigkeit zur Matrix. Demnach konnte bei den Peakflächen ein sehr geringer Unterschied durch den zellfreien Überstand der Zellkultur bei der Analyse festgestellt werden.[6]

Zusammenfassend ließen sich weder anhand der Retentionszeit noch der Peakfläche signifikante Matrixeffekte durch den zellfreien Überstand des Zellkulturmediums bei den Analysen beobachten. Ein zusätzlicher Arbeitsschritt, der die Aufreinigung der monoklonalen Antikörper vorsieht, wäre demnach für die chromatographische Bestimmung der Bindungsaffinität an einen FcR-IIIa-Rezeptor nicht notwendig. Die Affinitätschromatographie in der ersten Dimension wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt, daher ergäbe sich an dieser Stelle die Möglichkeit der Kopplung mit dem TRR-FLD in rein wässrigem Milieu. Aufgrund des geringer eingeschätzten Resonanzeffekts bei der Analyse von Biomolekülen mittels Raman-Spektroskopie kann die Verwendung von organischen Lösemitteln das Signal-zu-Rausch-Verhältnis

negativ beeinflussen. Unter wässrigen Bedingungen ließe sich jedoch die strukturelle Integrität der Antikörper zusätzlich abbilden.[6]

2.4.8.2 Zweite Dimension

Die zweite Dimension diente u. a. dem Entsalzen der Fraktionsschnitte der ersten Dimension. Bei den Eluenten der ersten Dimension handelte es sich um nicht-flüchtige, salzgepufferte Eluenten, die für eine massenspektrometrische Analyse nicht geeignet sind. In Tabelle 7 sind die chromatographischen Bedingungen der zweiten Dimension aufgelistet.

Tabelle 7: Chromatographische Bedingungen in der zweiten Dimension.[11]

Parameter	Zweite Dimension
Stationäre Phase	TSKgel Protein C4-300 2 x 50 mm, 3 µm (Tosoh Bioscience GmbH)
Mobile Phase	A: H_2O + 0,1 % FA, B: IPA/ACN/H_2O (70:20:10 v/v/v) + 0,1 % FA
Gradient	0 - 1 min 5 – 5 % B; 1 - 1,1 min 5 – 40 % B; 1,1 - 4 min 40 – 40 % B; 4 - 4,1 min 40 – 5 % B; 4,1 - 6 min 5 - 5 % B
Fluss/ mL/min	0,3
Temperatur/ °C	50
Injektionsvolumen/ µL	40
Detektion	HRMS (Extended Mass range, High resolution)

2.4.8.3 2D-LC-HRMS Methode zur Analyse der Abhängigkeit zwischen dem Glykosylierungsmuster und der Bindungsaffinität an einen FcR-IIIa-Rezeptor

Das Ziel der 2D-LC-HRMS Methodenentwicklung war die gleichzeitige Untersuchung des Glykosylierungsmusters und der Affinität der FcR-IIIa-Bindestelle. In der ersten Dimension erfolgte die Affinitätschromatographie mit einem immobilisierten FcR-IIIa-Rezeptor auf der Oberfläche der stationären Phase. Die identifizierten Peaks der Antikörper-Proben wurden durch Heart-Cuts im Bereich der Peakmaxima in die zweite Dimension überführt, angereichert, entsalzt, und mittels Umkehrphasenchromatographie von weiteren Matrixbestandteilen abgetrennt, um anschließend mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie untersucht zu werden. In Abbildung 21 sind die dekonvulierten Massenspektren des monoklonalen

Antikörpers Adalimumab zu den entsprechenden Peaks der ^{1}D-Chromatogramme (Abbildung 20A) beispielhaft dargestellt.[6]

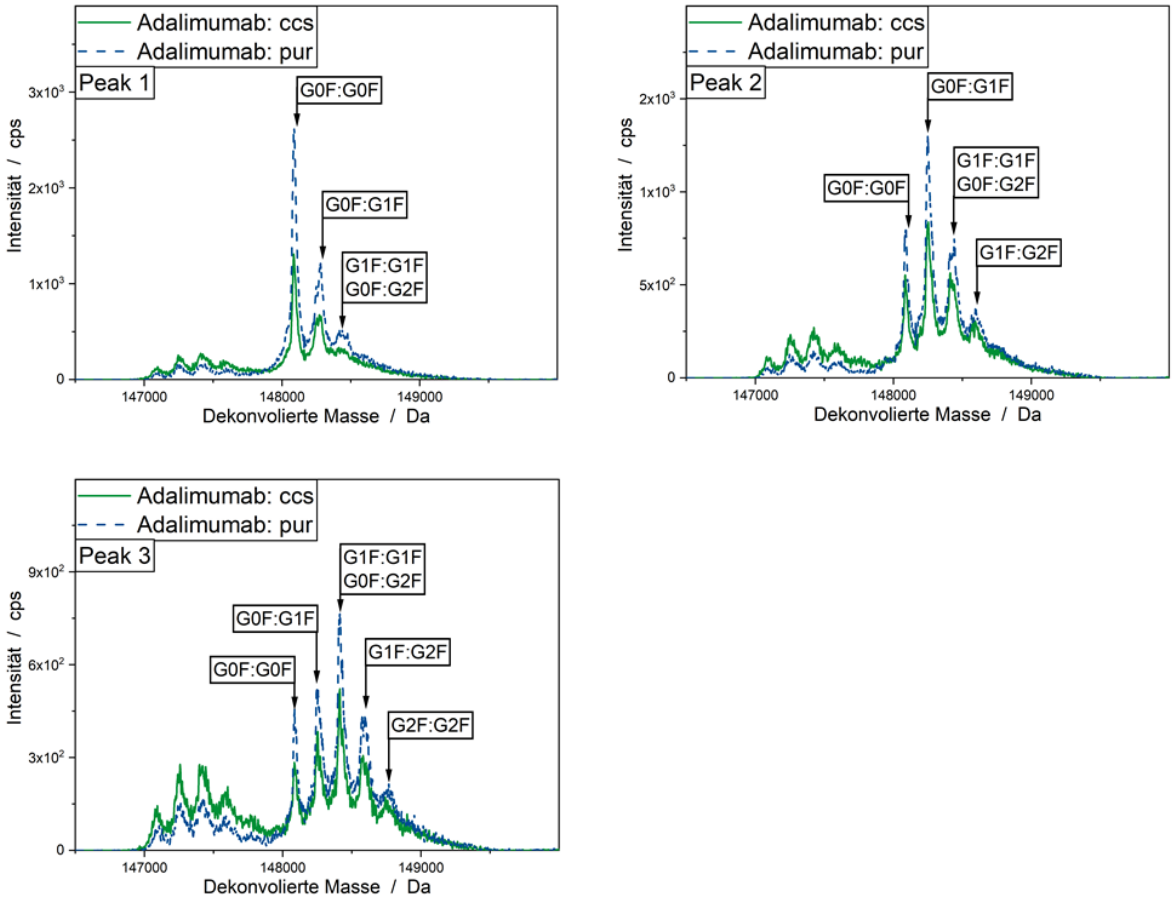

Abbildung 21: Dekonvulierte Massenspektren zu den Chromatogrammen des Antikörpers Adalimumab (Abbildung 20A) im zellfreien Überstand des Kulturmediums (ccs, grüne, durchgehende Linie) und als aufgereinigte Proben (pur, blaue, gestrichelte Linie).[11]

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse.

Tabelle 8: Zuordnung der unterschiedlichen Modifikationen der N-Glykosylierungsstruktur in Abhängigkeit von den Peaks der fünf Antikörper in der Affinitätschromatographie (Abbildung 20) der ersten Dimension. Abkürzungen: Detektierte Glykanmodifikation im Peak (D), Intensivste Glykanmodifikation im Peak (M), Peak, in dem die Glykanmodifikation am intensivsten ist (P), monoklonale Antikörper (mAk), Adalimumab (ADLM), Pertuzumab (PTZ), Ustekinumab (UTKM), Tocilizumab (TCLZ), Omalizumab (OMLZ).[11]

mAk	Peak Nr.	G0:G0F	G0F:G0F	G0F:G1F	G1F:G1F	G1F:G2F	G2F:G2F
ADLM	1	-	D, M, P	D	D	-	-
	2	-	D	D, M, P	D	D	-
	3	-	D	D	D, M, P	D, P	D, P
PTZ	1	-	D, M, P	D	D	-	-
	2	D, P	D	D, M, P	D, P	D, P	-
	3	D	D	D	D, M	D	-
UTKM	1	-	D, P	D, M, P	D, P	-	-
	2	-	D	D	D, M	-	-
	3	-	D	D	D, M	-	-
	4	-	D	D	D	D, M, P	-
TCLZ	1	-	D, P	D, M, P	D	-	-
	2	-	D	D, M	D	D	-
	3	-	D	D	D, M, P	D, P	-
	4	-	D	D	D	D, M	-
OMLZ	1	-	D, M, P	D, P	D, P	-	-
	2	D, P	D	D, M	D	-	-
	3	D	D	D	D, M	D, P	D, P
	4	D	D	D	D, M	D	D

Bei den 2D-LC-HRMS Untersuchungen konnten sechs verschiedene Modifikationen der N-Glykosylierungsstruktur identifiziert werden. Die einzelnen Modifikationen der N-Glykane sind in Abbildung 19 dargestellt. Anhand der Daten kann abgeleitet werden, dass in der ersten Dimension keine Basislinientrennung vorliegt, denn es zeigt sich für die verschiedenen Modifikationen in jedem Peak eine unterschiedlich intensive Verteilung der diversen Modifikationen. So ließ sich beispielsweise für Adalimumab die

Modifikation G0F:G0F, die im ersten Peak eindeutig am intensivsten war, auch noch im dritten Peak detektieren. Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass Modifikationen mit einem hohen Galactose-Anteil, wie beispielsweise G2F:G2F, später eluieren als Modifikationen ohne Galactose (z. B. G0F:G0F). Daraus lässt sich ableiten, dass die Affinität zum FcR-IIIa-Rezeptor bei erhöhtem Galactose-Anteil verstärkt wird. Bei den beiden Antikörpern Pertuzumab und Omalizumab konnte die Modifikation G0:G0F, bei der lediglich ein Glykan mit Fucose-Anteil vorliegt, erst ab der zweiten Fraktion nachgewiesen werden. Daher kann für Fucose eine geringere Verstärkung der Affinität gegenüber dem Fc-Rezeptor angenommen werden. Hieraus ergibt sich eine geeignete Methode für die Qualitätskontrolle, um die Affinität von Nachahmerprodukten (Biosimilars) im Vergleich zum ursprünglichen biologischen Arzneimittel (Originator) sowie unterschiedlicher Chargen miteinander zu vergleichen. Dies erlaubt eine Aussage über die Effektivität bei einer Antikörper-abhängigen zellvermittelnden Zytotoxizität, jedoch ohne dass die Affinität der Fab-Region zum eigentlichen Target berücksichtigt wird.[6]

Zusammenfassend eignet sich die entwickelte 2D-LC-HRMS Methode, um die Bindungsaffinität und das Glykosylierungsmuster in einer einzigen, Online gekoppelten Analyse zu untersuchen. Es können darüber hinaus Rückschlüsse hinsichtlich der Zusammensetzung der Glykane auf die Bindungsaffinität getroffen werden.[6] Das Konzept konnte durch eine Kopplung mit dem TRR-FLD um eine Analyse der strukturellen Integrität der Antikörper erweitert werden (siehe Kapitel 2.7.3.5).

2.5 Entwicklung eines Schalt- und Ventilkonzepts zur zeitunabhängigen Erfassung relevanter Zielanalyten

2.5.1 Einleitung

Im Fokus dieses Arbeitspakets stand die Entwicklung eines Schalt- und Ventilkonzepts, das eine zeitunabhängige Erfassung (Peak-Parking) relevanter Zielanalyten in der Detektionszelle des TRR-FLD erlaubt.

Das Peak-Parking Konzept kann auf unterschiedlichen Lösungswegen umgesetzt werden und ist abhängig von der wissenschaftlichen Fragestellung, die beantwortet

werden soll. Im Folgenden sollen zunächst die theoretischen Überlegungen erläutert werden, bevor die Ergebnisse der experimentellen Umsetzung dargestellt werden.

2.5.2 Theoretische Überlegungen zum Peak-Parking Konzept

Bei einer Kopplung des TRR-FLD nach der ersten Dimension der 2D-LC ist die Speicherung von bis zu 10 Fraktionen (Heart-Cuts) gleichzeitig möglich. Hierzu werden drei Ventile softwaregebunden angesteuert. Abbildung 22 zeigt den schematischen Aufbau der drei Ventile mit ihren Kapillarwegen.

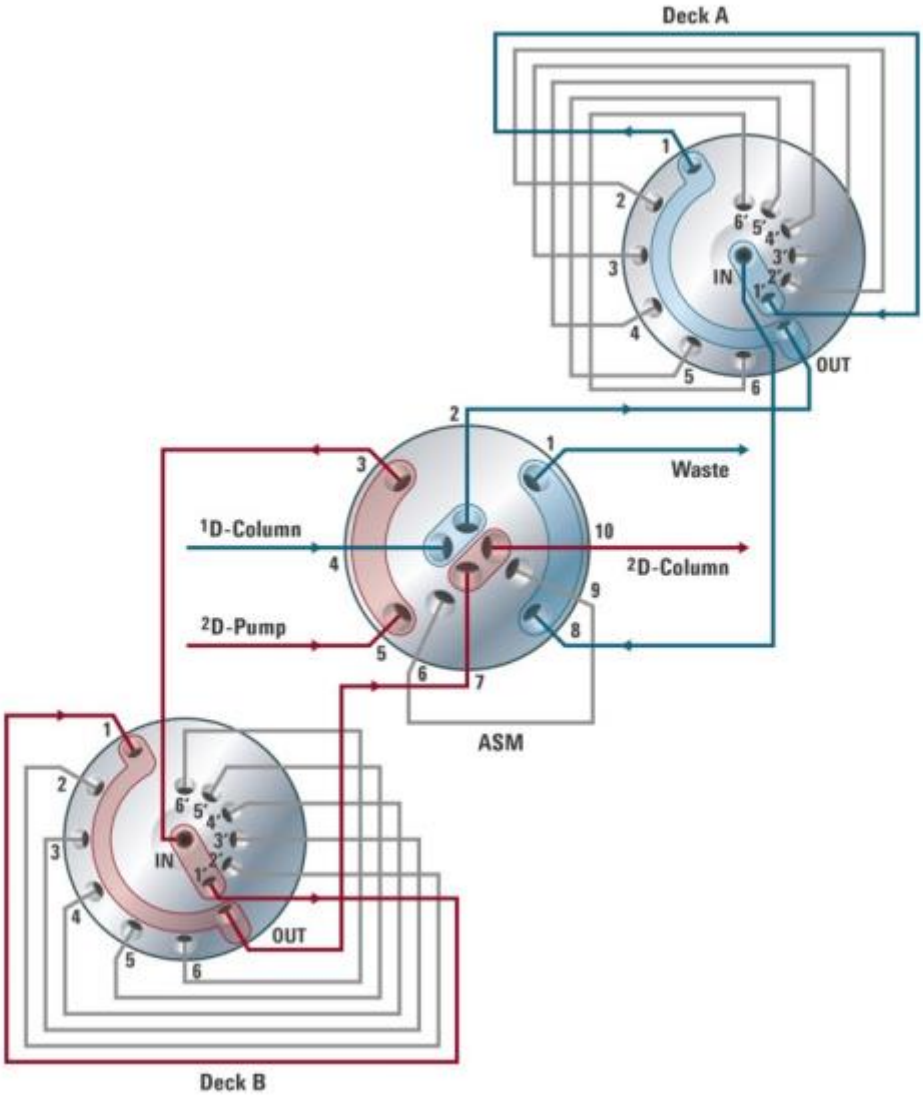

Abbildung 22: Schematische Darstellung der drei Ventile inklusive aller Kapillarwege zur Speicherung von einzelnen Fraktionen (Heart-Cuts). Die Darstellung wurde der Referenz[12] entnommen.

In der Mitte befindet sich das sogenannte ASM 2D-LC Ventil, das die erste und zweite Dimension miteinander verbindet, sowie die beiden anderen Ventile (Deck A und Deck B). Deck A und B besitzen jeweils 6 Kapillaren, wobei jeweils eine der Kapillaren stetig im Fluss der 2D-LC verbleibt. Somit können insgesamt 10 Kapillaren zur Speicherung von Heart-Cuts genutzt werden, die dann nacheinander in der zweiten Dimension analysiert werden (Abbildung 22).

Bei einer Kopplung mit dem TRR-FLD nach der ersten Dimension werden die einzelnen Fraktionsschnitte mit Hilfe der ^{2}D-Pumpe in die Detektionszelle des TRR-FLD gespült. Die ^{2}D-Pumpe ist dabei unabhängig von der ersten Dimension und kann Flussraten zwischen 0,01 – 5,00 mL/min fördern. Die Flussrate kann darüber hinaus in Abhängigkeit von der Zeit variiert werden, sodass beispielsweise der Fraktionsschnitt in der Probenschleife mit 0,3 mL/min in die Detektorzelle gespült wird. Sobald die Zelle mit dem Fraktionsschnitt befüllt ist, kann der Fluss gestoppt werden und die Aufnahme von Raman-Spektren zeitlich flexibel erfolgen. Im Anschluss kann die Flussrate der ^{2}D-Pumpe wieder initiiert und der Fraktionsschnitt aus der Detektorzelle gespült werden. Das beschriebene Vorgehen entspricht einem sog. Stop-Flow-Verfahren. Die entsprechenden Zeitintervalle der Methode können dabei abhängig von der benötigten Akkumulationszeit des TRR-FLD angepasst werden.

Bei einer Kopplung des TRR-FLD nach der zweiten Dimension kann erst die volle Leistungsfähigkeit der 2D-LC mit zwei in ihrer Selektivität möglichst unterschiedlichen Trennmechanismen ausgeschöpft werden. Der zuvor beschriebene Ansatz ermöglicht nur eine Trennung in der ersten Dimension. Das beschriebene Stop-Flow Verfahren kann jedoch ohne zusätzlichen Aufwand auch nach einer Trennung in der zweiten Dimension angewandt werden. In Kapitel 2.5.3 wird die experimentelle Umsetzung eines Stop-Flows nach ^{2}D-Trennung dargestellt.

Neben der Option des Stop-Flows besteht noch die Möglichkeit, den Fluss der ^{2}D-Pumpe auf einen beliebigen Wert innerhalb des spezifizierten Bereichs zu reduzieren. Dieses Low-Flow Konzept kann vorteilhaft für die Kopplung mit dem TRR-FLD sein, da die Probe durch die langsame Bewegung der Flüssigkeit über einen kürzeren Zeitraum der energiereichen UV-Strahlung ausgesetzt ist und somit das Risiko der Degradation, aber auch der Absorption von Probenmaterial an der Detektorzelle, minimiert werden kann. Die experimentelle Umsetzung wird in Kapitel 2.5.4 beschrieben.

2.5.3 Experimentelle Umsetzung des Stop-Flow Konzepts

Für die experimentelle Umsetzung des Stop-Flow Konzepts wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Trennung bewertet. Dies erfolgte anhand der Retentionszeiten der beiden intensivsten Peaks der Doxorubicin-Lösungen in der 2. Dimension (siehe Abbildung 12). Dazu wurden insgesamt 27 Messungen berücksichtigt. Für die beiden Peaks ergaben sich Retentionszeiten von 5,69 ± 0,02 min und 5,93 ± 0,04 min. Die Methode besaß demnach eine hohe Reproduzierbarkeit, die eine automatisierte, softwaregebundene Implementierung des Stop-Flows ermöglichte. Somit konnte die Deaktivierung des ^{2}D-Pumpenflusses automatisiert über die Software der 2D-LC durchgeführt werden. Bei fehlender Reproduzierbarkeit wäre nur eine Implementierung des Stop-Flows über die manuelle Deaktivierung des Pumpenflusses möglich gewesen.

In der entwickelten Methode (Kapitel 2.4.5, Tabelle 3) wurde eine Gradientensteigung mit 0,5 %B/min zwischen 20 – 25 %B angewandt. Bei der Implementierung des Peak-Parking Konzepts wurde eine Reduktion des organischen Lösungsmittels angestrebt. Daher wurde bei der experimentellen Umsetzung des Peak-Parking Konzepts ein isokratischer Anteil von 23 %B an organischem Lösungsmittel bevorzugt. Des Weiteren wurde die Flussrate gegenüber der Methode in Kapitel 2.4.5 auf 0,3 mL/min reduziert. In Abbildung 23 ist das ^{2}D-Chromatogramm unter den angepassten Bedingungen dargestellt. Zusätzlich sind drei Chromatogramme nach Anwendung des Stop-Flow abgebildet.

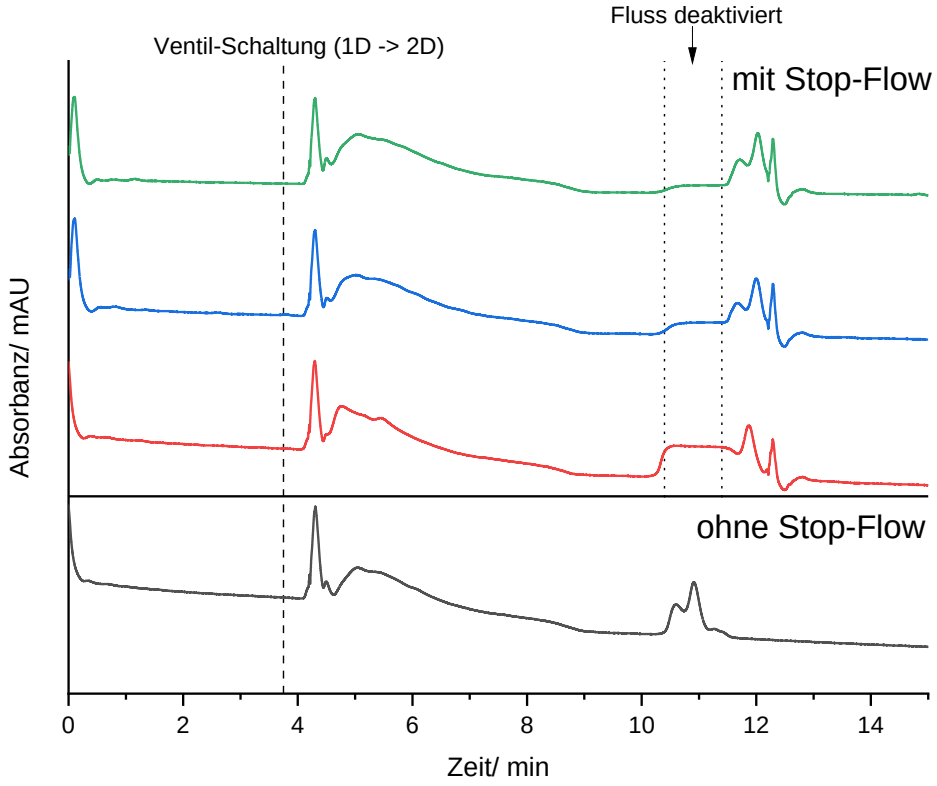

Abbildung 23: ^{2}D-Chromatogramme nach der Umsetzung des Peak-Parking Konzepts durch Anwendung eines Stop-Flow (Fluss deaktiviert) im Vergleich zu einem chromatographischen Lauf ohne Stop-Flow. Chromatographische Bedingungen: Stationäre Phase: Zorbax SB-CN 2,1 x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies), mobile Phase: A: 10 mM NaH_2PO_4 (pH 4,3), B: Acetonitril (23 % B), Flussrate: 0 - 0,3 mL/min, Injektionsvolumen: 40 µL, Temperatur: 10°C, Detektion: UV/Vis (254 nm).

Das Ziel des Versuchs war eine Erhöhung der Zeit für die Spektrenakkumulation bei der Detektion. Die Versuche wurden mit einem Dioden-Array-Detektor durchgeführt. Die Umsetzung erfolgte über die Deaktivierung der ^{2}D-Pumpe für den gewählten Zeitraum (markiert durch gepunktete Linien in Abbildung 23) von einer Minute. Dazu wurde die Flussrate von 0,3 mL/min zu Beginn der Aufnahmezeit auf 0,0 mL/min herabgesetzt, der Fluss demnach deaktiviert. Aus den in Abbildung 23 dargestellten Chromatogrammen geht hervor, dass sich bei allen drei Messungen nach kurzer Zeit ein Plateau für den Aufnahmebereich ausbildet. Am Ende des durch die zweite gepunktete Linie markierten Bereichs wurde die Pumpe aktiviert und die Flussrate wieder auf 0,3 mL/min eingestellt. Bei allen drei Chromatogrammen bildet sich ein nicht vollständig aufgelöster Doppelpeak, gefolgt von einem weiteren zusätzlichen Peak aus. Der schnelle Druckanstieg, der durch die unmittelbare Initialisierung der ^{2}D-Pumpe resultiert, könnte ein Grund für die Entstehung des zusätzlichen Peaks sein.

Die Chromatogramme zeigen, dass die chromatographische Trennung durch den Stop-Flow beeinflusst wird. Die Halbwertsbreite des zweiten Peaks beträgt 0,24 min bei der Messung ohne Stop-Flow. Durch den Stop-Flow im Bereich des ersten Peaks ergibt sich aufgrund von Diffusionseffekten in longitudinaler Richtung eine Peakverbreiterung für den zweiten Peak mit einer durchschnittlichen Halbwertsbreite von 0,31 ± 0,01 min. Dies entspricht einer Zunahme der Halbwertsbreite von etwa 25 % durch Anwendung des Stop-Flows im Zeitraum von einer Minute.

2.5.4 Experimentelle Umsetzung des Low-Flow Konzepts

Ein Kompromiss zwischen der Online- und Stop-Flow-Messung stellt die Raman-Messung in einem Low-Flow-Betrieb dar. Auf der einen Seite kann durch eine Reduzierung der Flussrate der mobilen Phase zusätzliche Messzeit generiert werden, wenn der Analyt über ein verlängertes Zeitfenster nur langsam durch die Messzelle fließt. Auf der anderen Seite wird die Probe vor möglicher Degradation geschützt, da der Analyt mit der mobilen Phase durch die Messzelle transportiert und nur kurz der energiereichen UV-Stahlung des Lasers ausgesetzt wird. Mögliche Zersetzungsprodukte werden reduziert und damit auch die Messzelle vor möglichen Verunreinigungen durch z. B. Ablagerung oder Adsorption bewahrt.

In Abbildung 24 ist die Umsetzung des Low-Flow-Konzepts am Beispiel des Chromatogramms von Naproxen dargestellt. Das schwarze Chromatogramm zeigt einen Online-Messung von Naproxen bei einer konstanten Flussrate von 0,5 mL/min. Die Halbwertbreite des chromatographischen Peaks liegt bei etwa 8 s. Im Online-Messbetrieb ist es sinnvoll mit der halben Halbwertsbreite Raman-Messungen aufzunehmen, um mindestens ein Spektrum im Bereich des Peakmaximums zu generieren. In dem hier gezeigten Beispiel würde die maximal zur Verfügung stehende Messzeit also 4 s betragen.

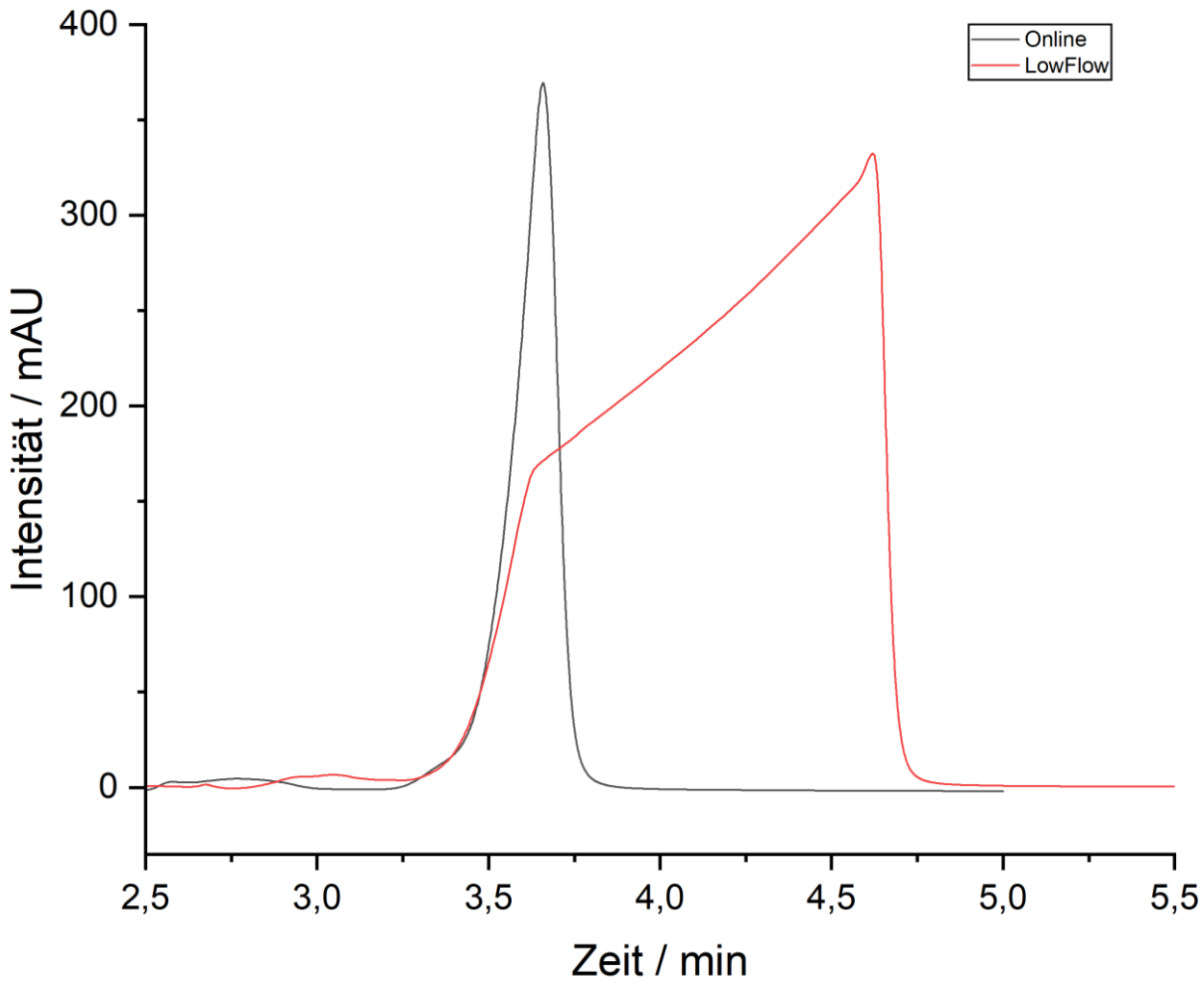

Abbildung 24: UV-Chromatogramm Naproxen im Vergleich Online- vs. Low-Flow-Konzept. Chromatographische Bedingungen: Stationäre Phase: Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm, 5 µm (Agilent Technologies), mobile Phase: A: Wasser (30 %), B: Acetonitril (70 %), Flussrate: Online: 0,5 mL/min, LowFlow: 0-3,6 min: 0,5 mL/min, 3,6-4,6 min: 0,05 mL/min, ab 4,6 min: 0,5 mL/min, Konzentration: 100 µg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Temperatur: 30°C, Detektion: UV/Vis (250 nm).

Im Falle des rot dargestellten Chromatogramms wurde hingegen ein Low-Flow-Ansatz gewählt. Dazu wurde die Chromtographie zunächst unter gleichen Bedingungen wie die Online-Messung mit einer Flussrate von 0,5 mL/min gestartet. In der aufsteigenden Flanke des Naproxen-Peaks wurde beim Erreichen der halben Maximal-Peak-Intensität der Fluss abrupt um den Faktor 10 auf 0,05 mL/min reduziert. Auf diese Weise kann der Zeitraum, in dem eine hohe Analytkonzentration durch die Messzelle bewegt wird, deutlich erhöht werden. In diesem Beispiel wurde der Fluss nach 60 s wieder auf 0,5 mL/min erhöht. Da Raman-Messung und Flussreduktion sehr genau aufeinander abgestimmt werden können, kann für die Raman-Messung das volle

Zeitfenster von 60 s ausgeschöpft werden. Im Vergleich zur Online-Messung konnte in diesem Beispiel eine Verlängerung der Messzeit um den Faktor 15 erreicht werden.

2.6 Kopplung von 2D-LC mit TRR-FLD

2.6.1 Einleitung

Die experimentellen Aufbauten 2 und 3 (siehe Kapitel 2.2.2 und 2.2.3) wurden mit einer eindimensionalen HPLC gekoppelt. Anhand des Raman-Spektrums der mobilen Phase wurde die Signalstabilität bei unterschiedlichen Flussraten und Lösungsmittelzusammensetzungen von Acetonitril und Wasser überprüft. Dabei wurde die Flussrate zwischen 0,05 und 1,0 mL/min variiert sowie Lösungsmittelgradienten zwischen 5 – 95 % Acetonitril getestet.

2.6.2 Zeitfenster für eine Raman-Messung

Das Zeitfenster für eine stabile Laserleistung wurde nach der in Kapitel 2.9.2.2 beschriebenen Methode auf 8 min bestimmt. Für eine Online-Messung ist dieses Zeitfenster zwar mehr als ausreichend, allerdings sollte die Raman-Messung nur auf ein einzelnes Zeitfenster beschränkt werden, in dem die zu messenden Substanzen erwartet werden. Die Lebensdauer des hier verwendeten Pulslasers ist direkt von der Anzahl seiner geleisteten Pulse abhängig. Vom Hersteller wird für den Laser bei einer Pulsrate von 20 Hz eine mittlere Lebenserwartung von 150 Stunden angegeben. Vor diesem Hintergrund sollte die Raman-Messung nur über wenige Minuten erfolgen. Komplette Chromatogramme können mit dieser Technologie nicht erfasst werden, da dies unrentabel wäre.

Für die nach Kapitel 2.5.4 entwickelte Methode des Low-Flow-Konzepts wurde das Zeitfenster für eine Raman-Messung daher auf 1 – 2 Minuten begrenzt.

2.7 Einsatz der 2D-LC-TRR-FLD-Kopplung zur Messung kleiner und großer Moleküle

2.7.1 Einleitung

Stellvertretend für kleine Moleküle wurden aus der Wirkstoffklasse der Schmerzmittel die Substanz Naproxen verwendet. Die Substanz ist in der Literatur hinsichtlich eines UV-Resonanz-Raman-Effekts bei Anregung mit 248,6 nm beschrieben.[13] Zudem stellt sie arbeitsschutzrechtlich keine bedenkliche Substanz dar. Daher wurde die technische Entwicklung der Versuchsaufbauten zunächst anhand dieses Moleküls bewertet. Mit dem finalen Versuchsaufbau wurden schließlich die beiden Zytostatika Doxorubicin und Epirubicin gemessen. Stellvertretend für große Moleküle wurden Bovines Serumalbumin (BSA) und der monoklonale Antikörper Daratumumab analysiert.

2.7.2 Messungen mit Aufbau 2: Flüssigkern-Lichtwellenleiter

Als Testsubstanz wurde Naproxen mit einem Absorptionsmaximum von 230 nm verwendet (siehe Abbildung 25). Das Absorptionsmaximum ist zur Anregungswellenlänge des Lasers (248,6 nm) um 18,6 nm nach links verschoben. Dies hat den Vorteil, dass die zur Anregungswellenlänge rot verschobene Raman-Streuung weniger von Naproxren reabsorbiert wird. Allerdings ist natürlich auch der Resonanz-Raman-Effekt vergleichweise schwächer ausgeprägt, als es bei Anregung im Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 230 nm der Fall wäre.

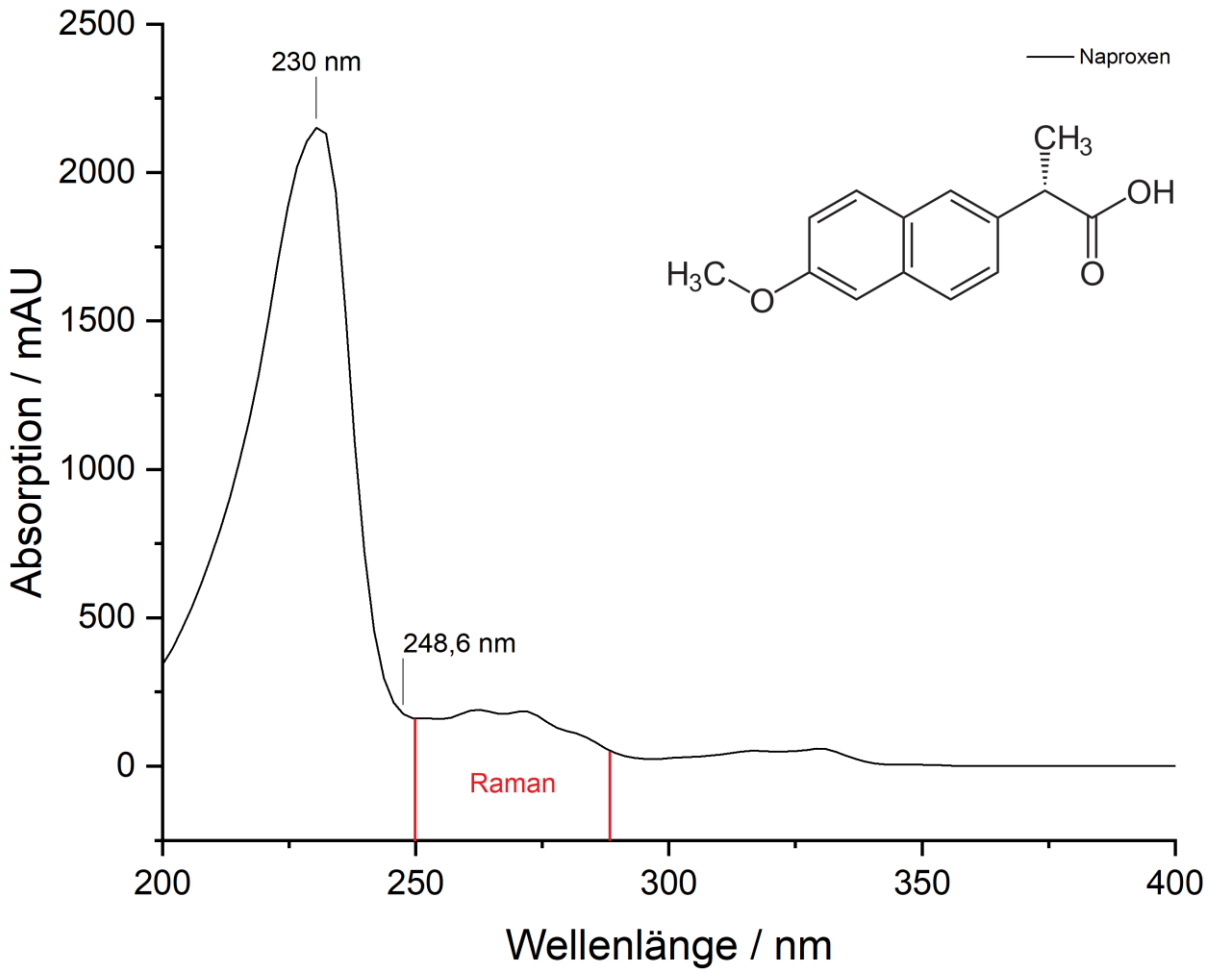

Abbildung 25: UV-Spektrum von Naproxen.

2.7.2.1 Messung von Naproxen mit Säule (LCW, Online-Messung)

Zunächst wurde eine Online-Messung nach chromatographischer Trennung durchgeführt. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Chromatographische Bedingungen für die Resonanz-Raman-Detektion von Naproxen.

Parameter	Erste Dimension
Stationäre Phase	Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm, 5 µm (Agilent Technologies)
Mobile Phase	A: Wasser (30 %), B: Acetonitril (70 %)
Flussrate/ mL/min	Online: 0,5 mL/min, Low-Flow: 0,05 oder 0,1 mL/min
Temperatur/ °C	30
Injektionsvolumen/ µL	20
Konzentration/ µg/mL	100
Detektion	UV/Vis (250 nm)

Anhand des UV-Chromatogramms (siehe Abbildung 26) wurde das Zeitfenster für die Raman-Messung festgelegt. Naproxen eluiert bei 3,66 min mit einer Halbwertsbreite von 8 s von der Säule. Zur Raman-spektroskopischen Detektion wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 2.5.4 eine Belichtungszeit von 4 s (halbe Halbwertsbreite) eingestellt, um mindestens ein Spektrum im Peakmaximum bei höchster Substanzkonzentration zu erhalten.

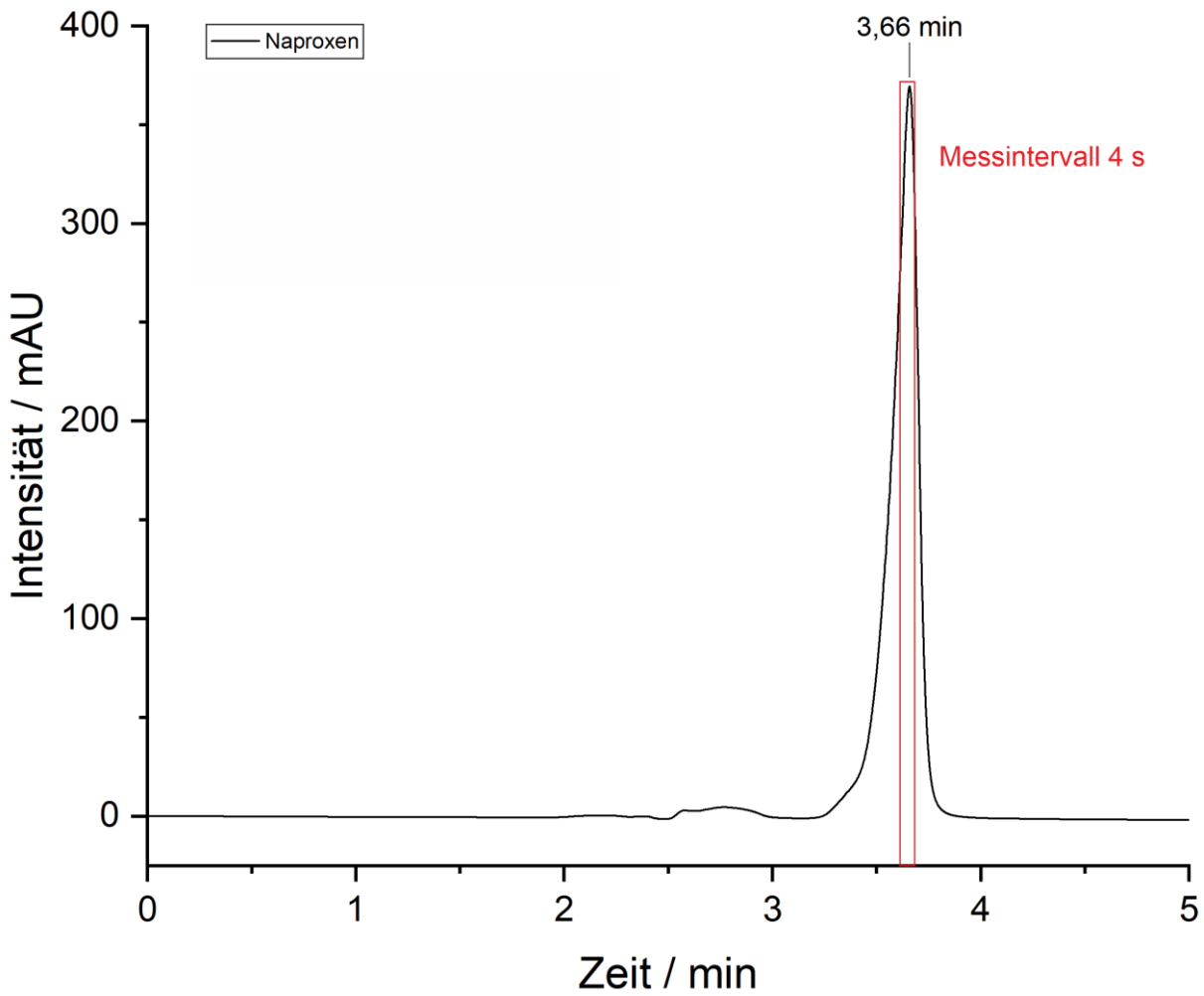

Abbildung 26: UV-Chromatogramm von Naproxen. Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 9.

Bei den Online-Messungen konnten keine Resonanz-Raman-Signale von Naproxen identifiziert werden. Eine vertiefte Literaturrecherche ergab, dass für die Aufnahme von UV-Resonanz-Raman-Spektren zumeist deutlich längere Belichtungszeiten zwischen 60 s und 240 s verwendet wurden.[14] Vor diesem Hintergrund wurden die Versuche mit dem Low-Flow-Konzept wiederholt.

2.7.2.2 Messung von Naproxen mit Säule (LCW, Low-Flow-Messung)

Die Low-Flow-Messung wurde entsprechend den Ausführungen in Kapitel 2.5.4 umgesetzt. Die Abbildung 27 zeigt das UV-Chromatogramm von Naproxen. Durch die Reduktion der Flussrate auf 0,05 mL/min wurde das Zeitfenster für die Raman-Messung auf 60 s erhöht. Damit das dominierende Messsignal von Acetonitril nicht zu einer Sättigung der CCD-Kamera führt, wurden 12 Spektren á 5 s akkumuliert.

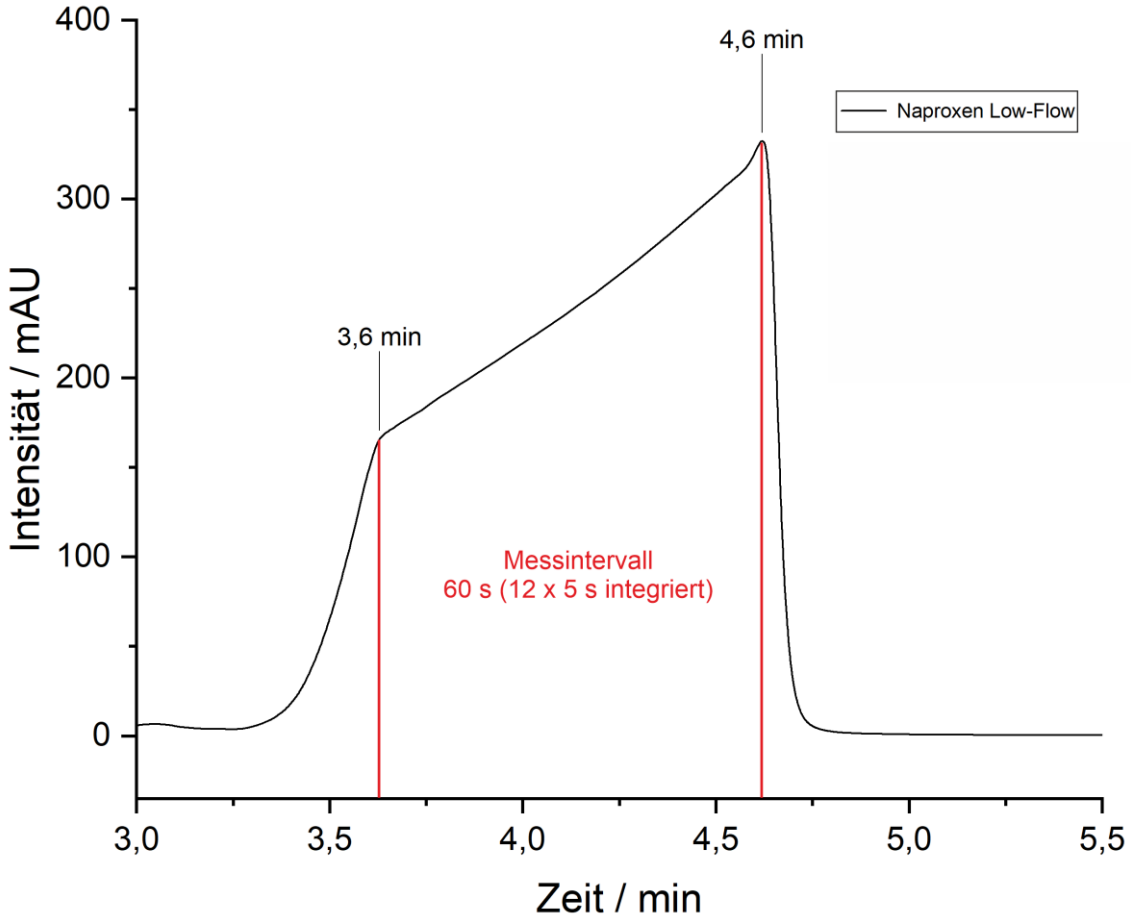

Abbildung 27: UV-Chromatogramm Naproxen im Low-Flow-Betrieb. Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 9 mit 0-3,6 min: 0,5 mL/min, 3,6-4,6 min: 0,05 mL/min, ab 4,6 min: 0,5 ml/min.

Die Abbildung 28 zeigt einen Ausschnitt des Raman-Spektrums von Acetonitril zwischen 2.000 cm^{-1} und 3.200 cm^{-1}. Das schwarze Spektrum bei reiner mobiler Phase von Acetonitril und Wasser (70/30) zeigt bei 2.254 cm^{-1} eine Signalintensität von 112.439 cts. Bei Anwesenheit von Naproxen reduziert sich die Signalintensität auf 8.945 cts. Durch die Absorption von Naproxen im relevanten Spektralbereich reduziert sich demnach die messbare Raman-Signal-Intensität um den Faktor 12,5.

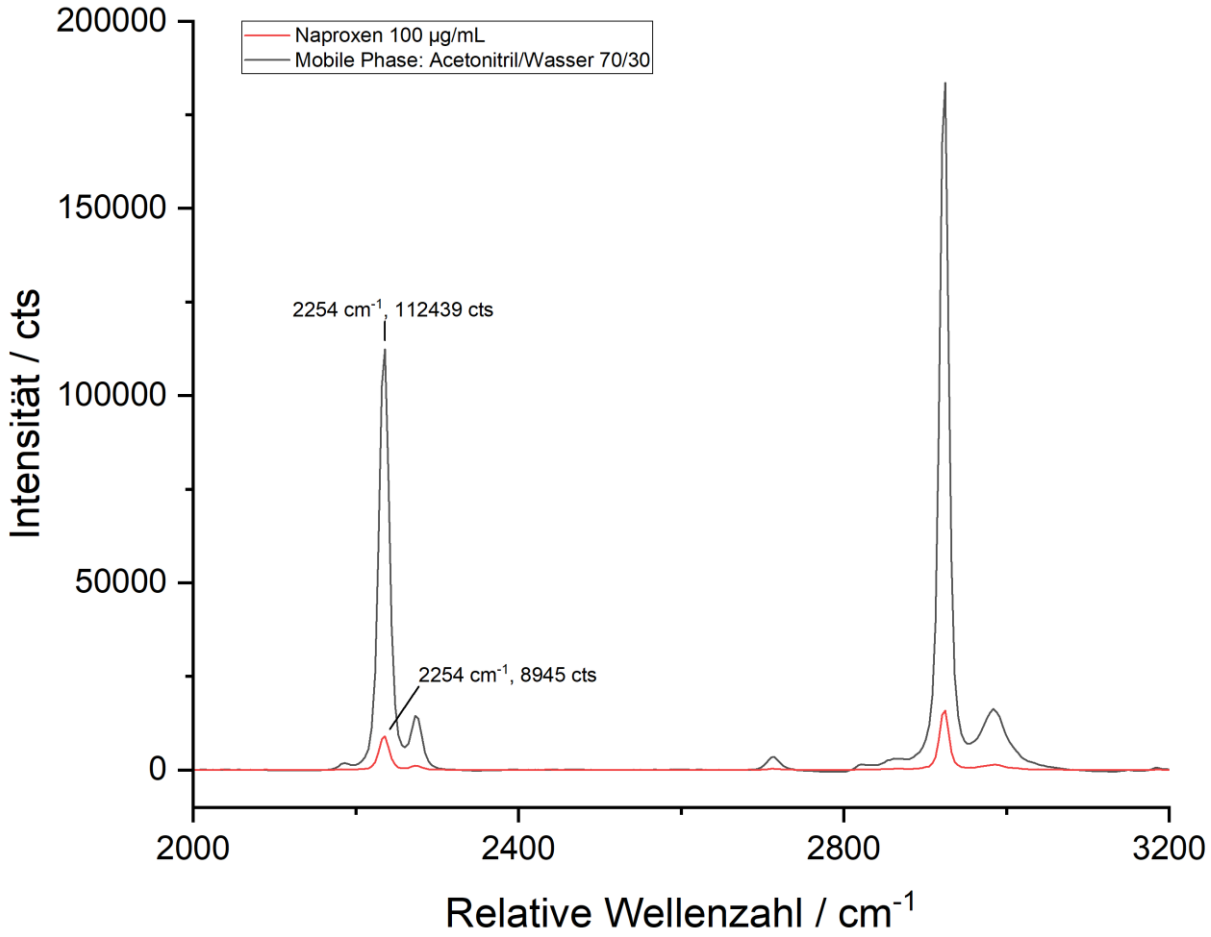

Abbildung 28: Abschwächung der Raman-Signal-Intensität durch Absorption von Laserwellenlänge und Raman-Sreulicht. Flüssigkern-Lichtwellenleiter: 60 mm, Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 19 µJ, Frequenz: 20 Hz.

In der Abbildung 29 sind die beiden Raman-Spektren in einem vergrößerten Ausschnitt zwischen 1.300 cm^{-1} und 1.700 cm^{-1} dargestellt. Bei dem roten Raman-Spektrum können unter Anwesenheit von Naproxen einige zusätzliche Signale bei 1.396, 1.427, 1.465, 1.509, 1.560 und 1.611 cm^{-1} beobachtet werden. Nach Abgleich mit Literaturwerten[13] können allerdings nur die Signale bei 1.465, 1.560 und 1.611 cm^{-1} Naproxen eindeutig zugeordnet werden. Die Bande im schwarz dargestellten Spektrum der reinen mobilen Phase bei 1.607 cm^{-1} kann einer Plasmalinie des Lasers zugeordnet werden. Trotz des Einsatzes des Plasmalinienfilters können die Plasmalinien nicht vollständig aus den Spektren eliminiert werden.

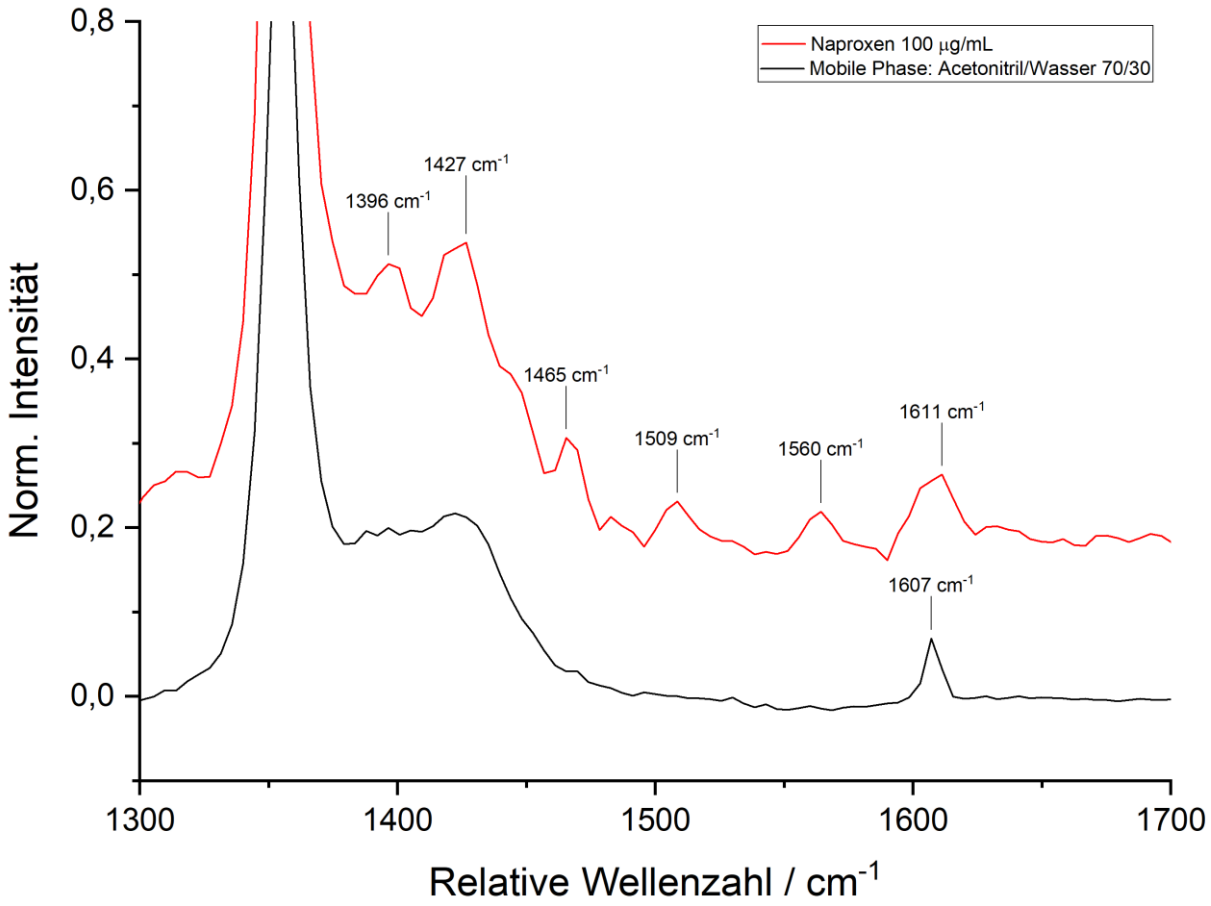

Abbildung 29: Raman-Spektren von Naproxen (rot) und Blankinjektion (schwarz) im Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach chromatographischer Trennung. Flüssigkern-Lichtwellenleiter: 60 mm, Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 19 µJ, Frequenz: 20 Hz.

Die Signal-zu-Rauschverhältnisse der drei Raman-Banden von Naproxen liegen im Bereich der Nachweisgrenze von etwa 3:1 bis 6:1, obwohl mit 100 µg/mL bereits eine verhältnismäßig hohe Konzentration injiziert wurde. Die orientierenden Versuche mit Naproxen haben gezeigt, dass ein experimenteller Aufbau mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter in Transmissionsanordnung nicht zielführend erscheint. Die Absorption der Substanzen dominiert gegenüber der resonanten Raman-Streuung aufgrund der langen Wegstrecke von ≥ 60 mm. Kürzere Wegstrecken wären vermutlich besser geeignet, sind aufgrund der Bauform der optofluidischen Kopplungseinheiten allerding technisch nicht umsetzbar. Weitere Versuche wurden daher mit der Durchflusszelle nach Aufbau 3 (Kapitel 2.2.3) durchgeführt.

2.7.3 Messungen mit Aufbau 3: Durchflussküvette

Für die mit der Durchflussküvette (DK) nach Aufbau 3 (Kapitel 2.2.3) durchgeführten Versuche wurden die Substanzen Naproxen, Doxorubicin und Epirubicin verwendet. Für die Messungen nach chromatographischer Trennung und bei Anwesenheit von Acetonitril wurde ausschließlich die Low-Flow-Methode nach Kapitel 2.7.2.2 verwendet. Einige Versuche wurden zudem auch ohne chromatographische Trennung durchgeführt (Fließinjektion). Dazu wurden die Substanzen direkt in die mobile Phase injiziert und mit 0,1 mL/min durch die Messzelle geleitet. Auf diese Weise konnten viele Messungen in kurzen Zeitabständen durchgeführt werden. Zudem erlaubt die Fließinjektion Messungen bei rein wässriger mobiler Phase, wodurch das dominante Raman-Signal von Acetonitril ausgeschlossen werden kann.

2.7.3.1 Messung von Naproxen ohne Säule (DK, Fließinjektion)

Um die in Kapitel 2.7.2.2 erzeugten Raman-Signale von Naproxen zu bestätigen, wurden zunächst Messungen in rein wässrigem Fließmittel durchgeführt. Dazu wurde die chromatographische Säule aus dem experimentellen Aufbau entfernt. Die Substanz wurde bei einer Flussrate von 0,1 mL/min durch die Raman-Durchflusszelle geleitet. Zudem wurde anhand einer Konzentrationsreihe zwischen 10 µg/mL und 200 µg/mL überprüft, ob sich der UV-Resonanz-Raman-Effekt linear zur Konzentration verhält und eine Quantifizierung des Analyten anhand der Raman-Banden möglich ist.

Die Abbildung 30 zeigt die Raman-Spektren einer Konzentrationsreihe von Naproxen bei Fließinjektion. Dazu wurden jeweils 20 µL der Lösung in den Fluss injiziert. Analog zu den Versuchen mit dem Flüssigkern-Lichtwellenleiter (Kapitel 2.7.2.2) kann mit steigender Konzentration eine Reduktion der Raman-Intensität anhand der Wasser-Bande zwischen 3.000 cm^{-1} und 3.800 cm^{-1} beobachtet werden. Allerdings ist dieser Effekt bei dem Aufbau mit Durchflussküvette deutlich schwächer ausgeprägt. Dies kann mit der im Vergleich zum Flüssigkern-Lichtwellenleiter vergleichsweise kurzen Wegstrecke durch die Messzelle erklärt werden.

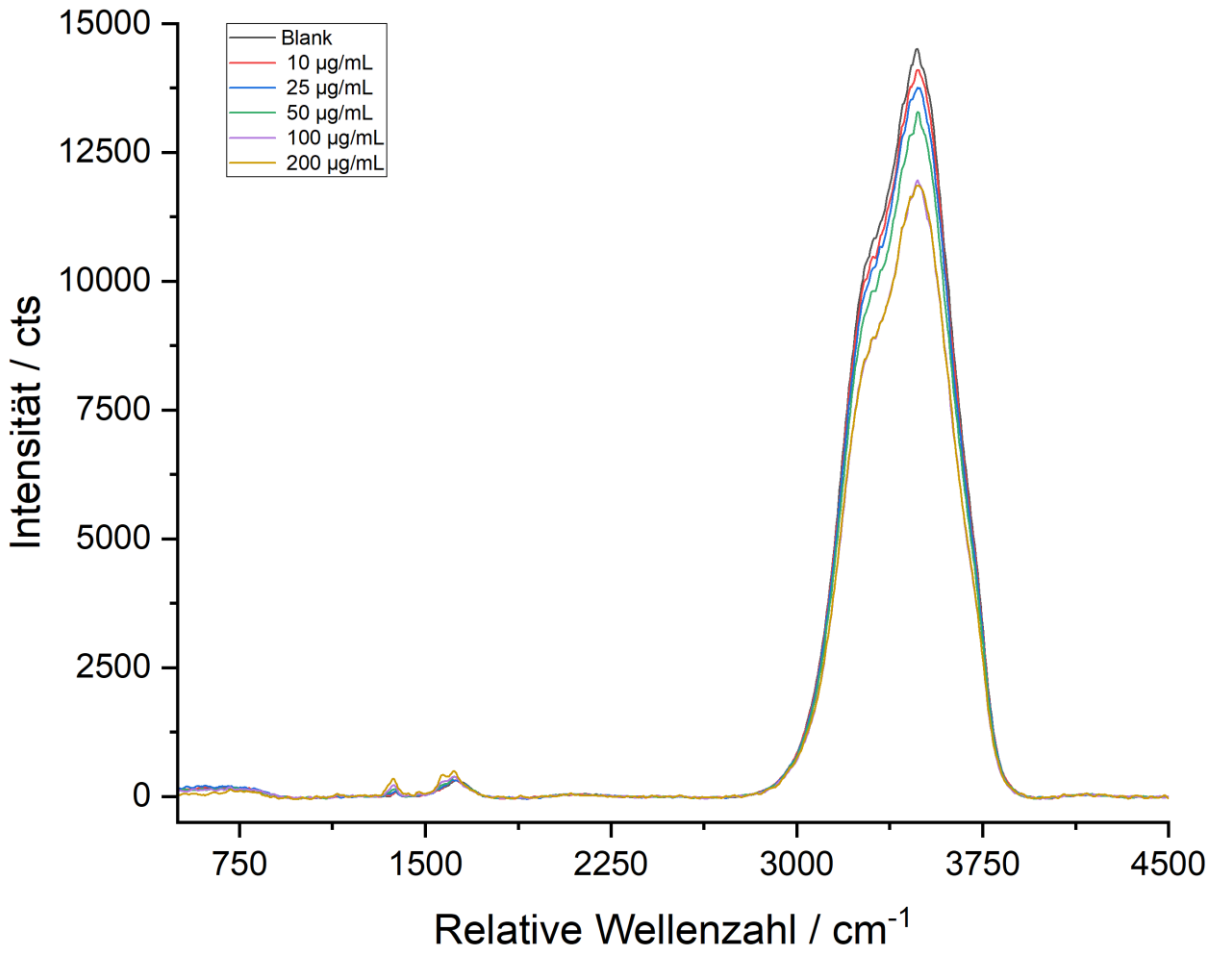

Abbildung 30: Übersichts-Raman-Spektren; Konzentrationsreihe Naproxen zur Veranschaulichung der Absorption des Lasers am Beispiel der Raman-Bande von Wasser. Fließinjektion Naproxen in Wasser (100 %), Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz.

Die Abbildung 31 zeigt die Raman-Signale von Naproxen in einem vergößerten Ausschnitt im Spektralbereich zwischen 985 cm^{-1} und 1.750 cm^{-1}. Alle fünf Signale bei 1.151, 1.366, 1.465, 1.560 und 1.611 cm^{-1} können eindeutig Naproxen zugeordnet werden.

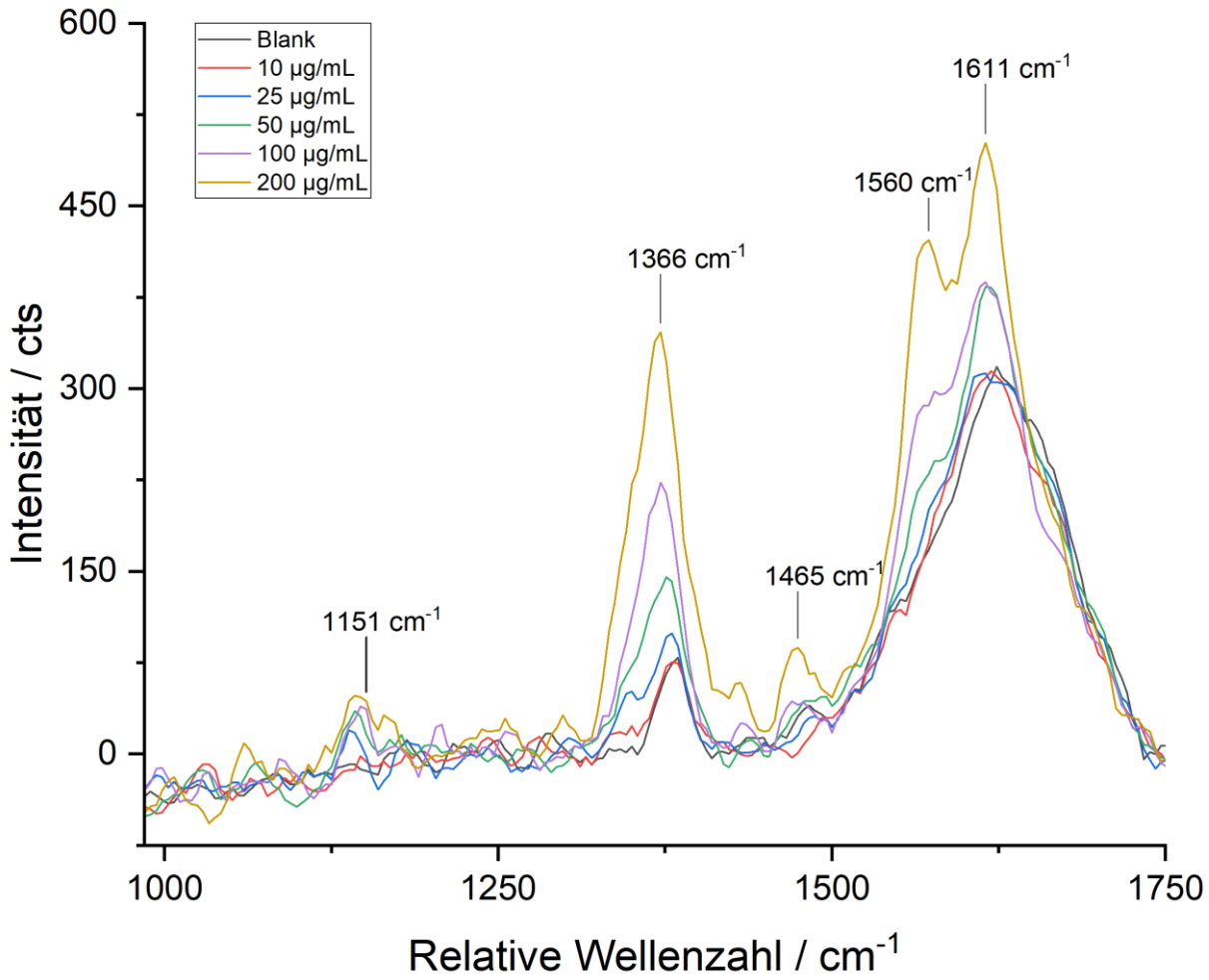

Abbildung 31: Konzentrationsreihe von Naproxen bei Fließinjektion in reinem Wasser. Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz.

Da bei 1.634 cm^{-1} eine Raman-Bande von Wasser im Untergrund vorliegt, wurde die Kalibrierung anhand der Raman-Bande bei 1.366 cm^{-1} durchgeführt. Die schwache Bande bei 1.390 cm^{-1} im Blank resultiert aus einem Pixelfehler der CCD-Kamera, welche hier ein erhöhtes Untergrundsignal liefert. Die Spektren wurden zunächst geglättet (Savitzky-Golay-Filter, 8 Punkte) und gegen das Spektrum der mobilen Phase (Blank) untergrundkorrigiert. Die konzentrationsabhängigen Signal-zu-Rauschverhältnisse der Naproxen-Bande bei 1.366 cm^{-1} sind in der Tabelle 10 zusammengefasst. Die Injektion einer Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/mL wurde dabei nicht berücksichtigt, da in diesem Spektrum kein Unterschied zum Blank zu beobachten war.

Tabelle 10: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (SRV) des Raman-Signals von Naproxen bei 1.366 cm^{-1} gemessen mit Aufbau 3; Signal: Basislinienkorrigierte Signalintensität in Counts, Rauschen: Standardabweichung des Untergrundrauschens zwischen 2.000 und 2.415 cm^{-1} (100 Pixel des CCD-Chips).

	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
SRV:	**1,1**	**3,6**	**7,9**	**14,6**
Signal:	20	66	144	267
Rauschen:	17,9	18,2	18,3	18,3

Die Abbildung 32 zeigt die Auftragung der entsprechenden Signalintensitäten gegen die Konzentration.

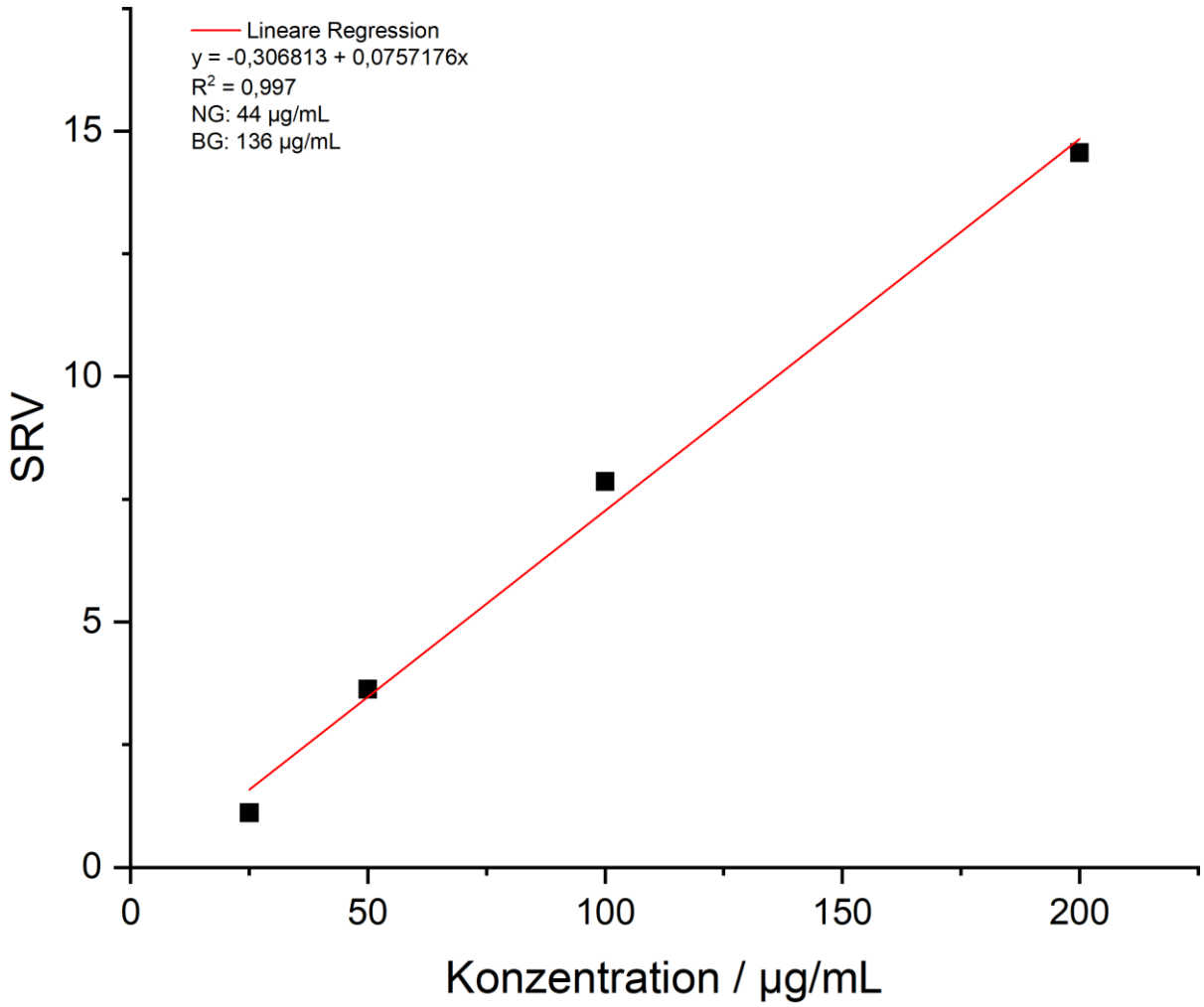

Abbildung 32: Linearer Zusammenhang zwischen Signal-zu-Rauschverhältnis der Raman-Bande von Naproxen bei 1.366 cm^{-1} und Konzentration. Abkürzungen: Nachweisgrenze (NG), Bestimmungsgrenze (BG).

Anhand der Daten kann ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und SRV abgeleitet werden. Das Bestimmtheitsmaß der Trendlinie liegt bei $R^2 = 0{,}997$. Für

Naproxen wurde eine Nachweisgrenze von 44 µg/mL und eine Bestimmungsgrenze von 136 µg/mL ermittelt.

2.7.3.2 Messung von Naproxen mit Säule (DK, Low-Flow-Messung)

Nach erfolgreicher Messung von Naproxen mittels Fließinjketion in rein wässrigem Milieu wurden die Experimente bei Kopplung mit der HPLC und unter Anwesenheit von Acetonitril im Laufmittel durchgeführt.

Um genügend Belichtungszeit für die Raman-Signale zu generieren, wurden die Raman-spektroskopischen Messungen im Low-Flow-Betrieb durchgeführt. Die Flussrate wurde hierbei über das Peak-Maximum von 0,5 mL/min auf 0,1 mL/min reduziert. Die Messzeit betrug 60 s, wobei 12 Raman-Spektren von je 5 s akkumuliert wurden. Ein vergrößerter Ausschitt des UV-Resonanz-Raman-Spektrums von Naproxen in mobiler Phase ist in der Abbildung 33 dargestellt.

Die Raman-Bande bei ca. 1.050 cm^{-1} kann Acetonitril zugeordnet werden. Es ist eine leichte Abschwächung der Bande bei Anwesenheit von Naproxen zu beobachten, bedingt durch die Absorption der Laserwellenlänge. Insgesamt können drei Raman-Signale Naproxen bei 1.151, 1.560 und 1.611 cm^{-1} zugeordnet werden. Die in rein wässiger mobiler Phase detektierten Banden bei 1.366 cm^{-1} und 1.465 cm^{-1} (siehe Kapitel 2.7.3.1) werden von dem dominanten Acetonitril-Signal zwischen 1.300 cm^{-1} und 1.500 cm^{-1} überlagert.

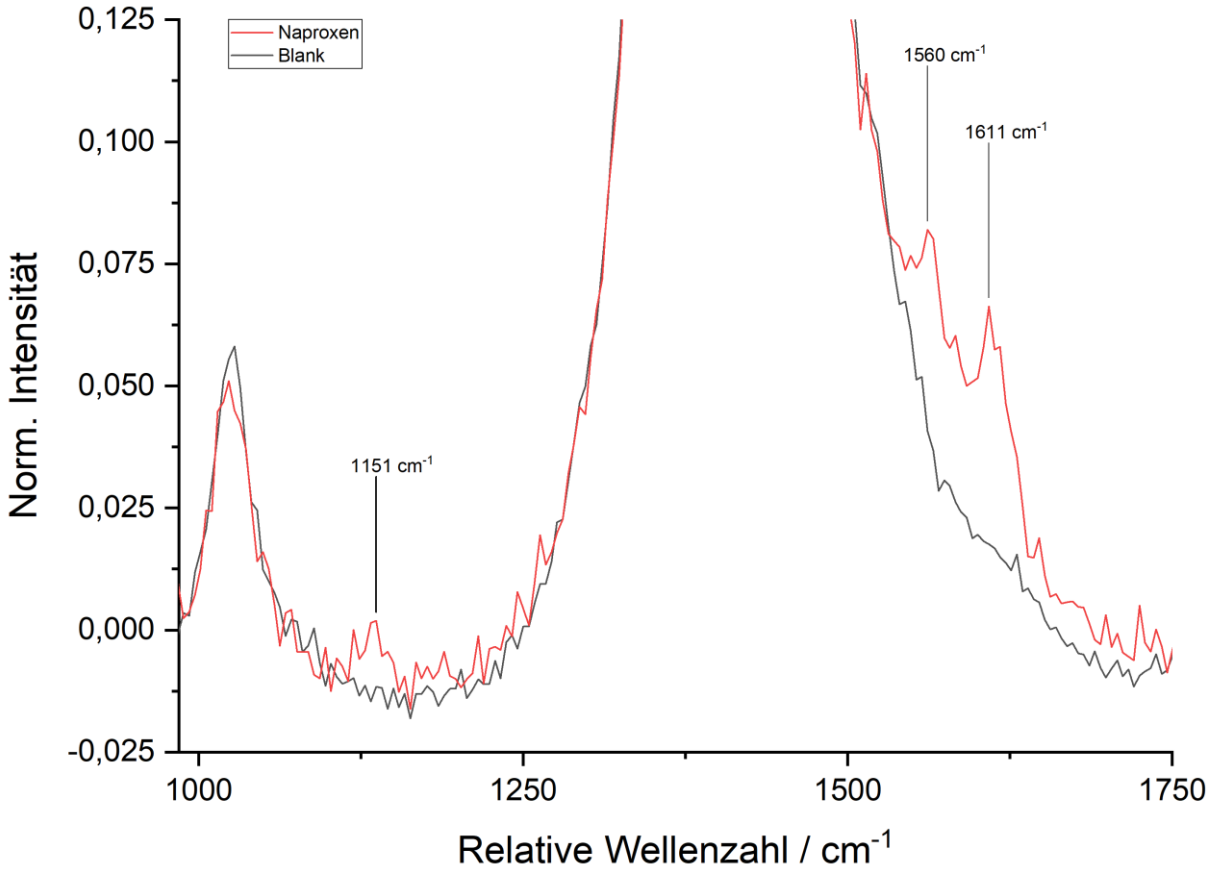

Abbildung 33: UV-Resonanz-Ramanspektren von Naproxen (rot) und dem Blank (schwarz) bei chromatographischer Kopplung (mit Säule). Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 9 mit 0,1 mL/min im Low-Flow-Betrieb, Belichtungszeit: 12 x 5 s (60 s), Pulsenergie: 25 µJ, Frequenz: 20 Hz.

Das SRV des Signals bei 1.151 cm^{-1} liegt mit ca 4:1 über der Nachweisgrenze und kann zur Identifizierung genutzt werden. Die Signale bei 1.560 cm^{-1} und 1.611 cm^{-1} liegen mit einem SRV von 14:1 und 16:1 über der Bestimmungsgrenze.

2.7.3.3 Messung von Doxo- und Epirubicin ohne Säule (DK, Fließinjektion)

Die beiden Zytostatika Doxo- und Epirubicin wurden zunächst mittels Fließinjektion gemessen. Zur Vorbereitung auf die Kopplung mit der HPLC wurden diese in eine mobile Phase aus 50:50 Acetonitril/Wasser injiziert. Dabei wurden 20 µL einer 100 µg/mL Lösung verwendet. Die Flussrate betrug 0,1 mL/min und die Belichtungszeit des Raman-Detektors lag bei 15 x 5 s. Die Resonanz-Raman-Spektren sind in der Abbildung 34 dargestellt. Die enstpechenden UV-Spektren der beiden Substanzen können der Abbildung 7 (Kapitel 2.3.2) entnommen werden.

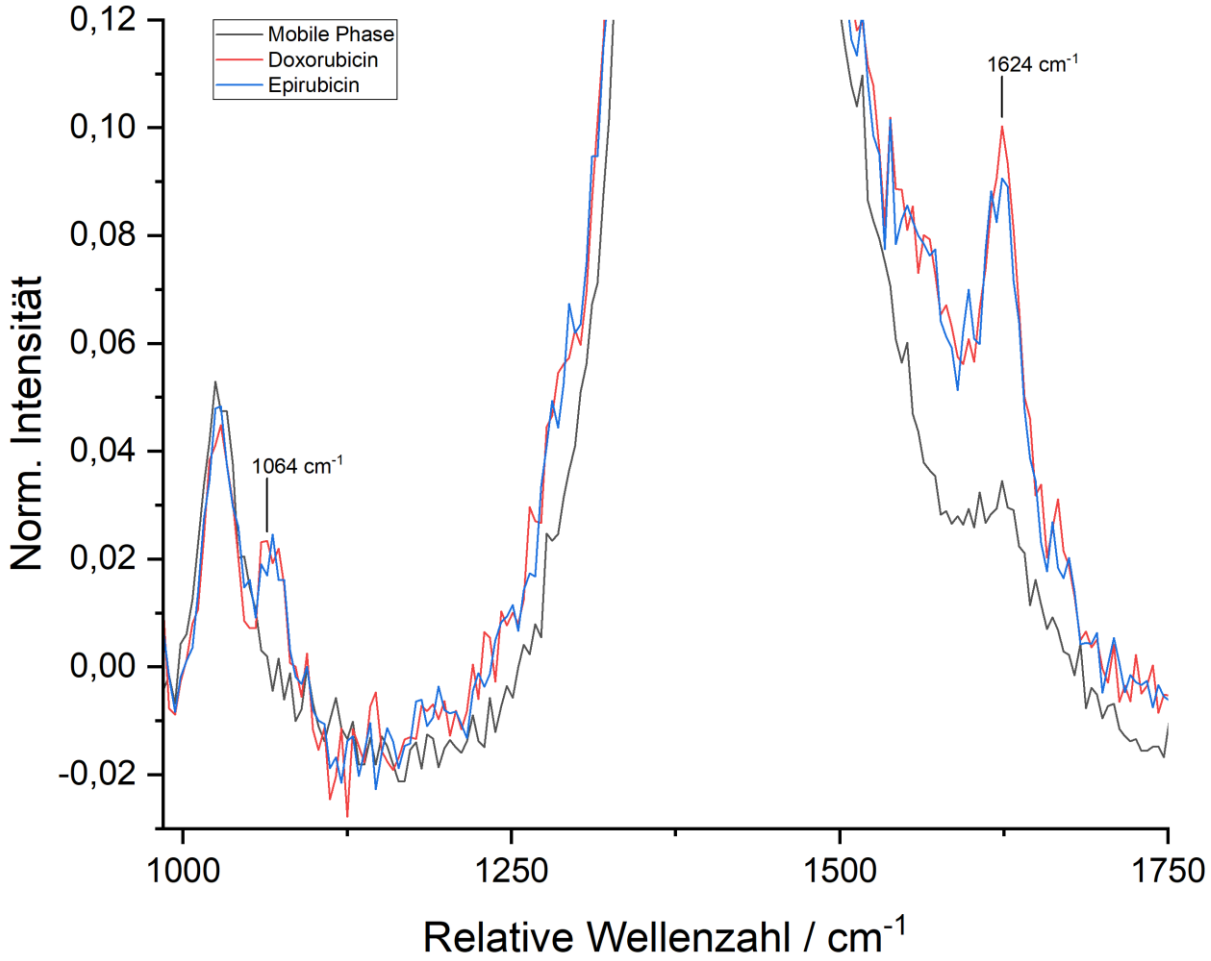

Abbildung 34: UV-Resonanz-Ramanspektren von Doxorubicin (rot), Epirubicin (blau) und mobiler Phase (schwarz) bei Fließinjektion (ohne Säule), Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 11, Belichtungszeit: 15 x 5 s (75 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz.

Die Raman-Bande von Acetonitril dominiert das Spektrum im Spektralbereich zwischen etwa 1.300 cm^{-1} und 1.500 cm^{-1}. Vor diesem Hintergrund können nur zwei Raman-Signale bei 1.064 cm^{-1} und 1.624 cm^{-1} identifiziert werden, die Doxo- bzw. Epirubicin zuzuordnen sind. Die SRV der beiden Signale bei 1.064 cm^{-1} liegen bei etwa 4,5:1, die Signale bei 1.624 cm^{-1} bei 12:1. Eine Unterscheidung des Enantiomerenpaares ist allerdings nicht möglich. Der Spektralbereich vor 1.000 cm^{-1} wurde in der Darstellung ausgeblendet, da hier keine weiteren Raman-Signale der beiden Zytostatika identifiziert werden konnten.

2.7.3.4 Messung von Doxo- und Epirubicin mit Säule (DK, Low-Flow-Messung)

Im Anschluss wurde das Experiment mit HPLC-Säule bei chromatographischer Trennung wiederholt. Die Messeinstellungen sind in der Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Chromatographische Bedingungen für die Resonanz-Raman-Detektion von Epi- und Doxorubicin.

Parameter	Erste Dimension
Stationäre Phase	Zorbax SB-C18 4,6 x 150 mm, 5 µm (Agilent Technologies)
Mobile Phase	H_2O+SDS+H_3PO_4/ Acetonitril (50 %B)
Flussrate/ mL/min	1,0 mL/min, 0,1 mL/min Low-Flow
Temperatur/ °C	30
Injektionsvolumen/ µL	20
Konzentration/ µg/mL	100

Die Raman-spektroskopischen Messungen erfolgten im Low-Flow-Betrieb. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Naproxen lag die Flussrate aufgrund der verwendeten chromatographischen Methode nach Arzneibuch zu Beginn doppelt so hoch. Zu Beginn der Messung betrug die Flussrate 1,0 mL/min. Während der Messung wurde die Flussrate über das Peak-Maximum auf 0,1 mL/min reduziert. Als optimale Messzeit konnten 50 s bestimmt werden. Wegen des hohen Acetonitril-Anteils wurde 10 x 5 s akkumuliert.

Die UV-Resonanz-Raman-Spektren bei chromtographischer Kopplung sind in der Abbildung 35 dargestellt. Im Vergleich zur Fließinjektion (Abbildung 34) sind die Raman-Signale von Doxo- und Epirubicin um ca. Faktor 2 schwächer ausgeprägt. Das Signal bei 1.064 cm^{-1} liegt unterhalb der Nachweisgrenze. Die Signale bei 1.624 cm^{-1} zeigen ein SRV von etwa 14:1 und eignen sich damit prinzipiell für eine Quantifizierung.

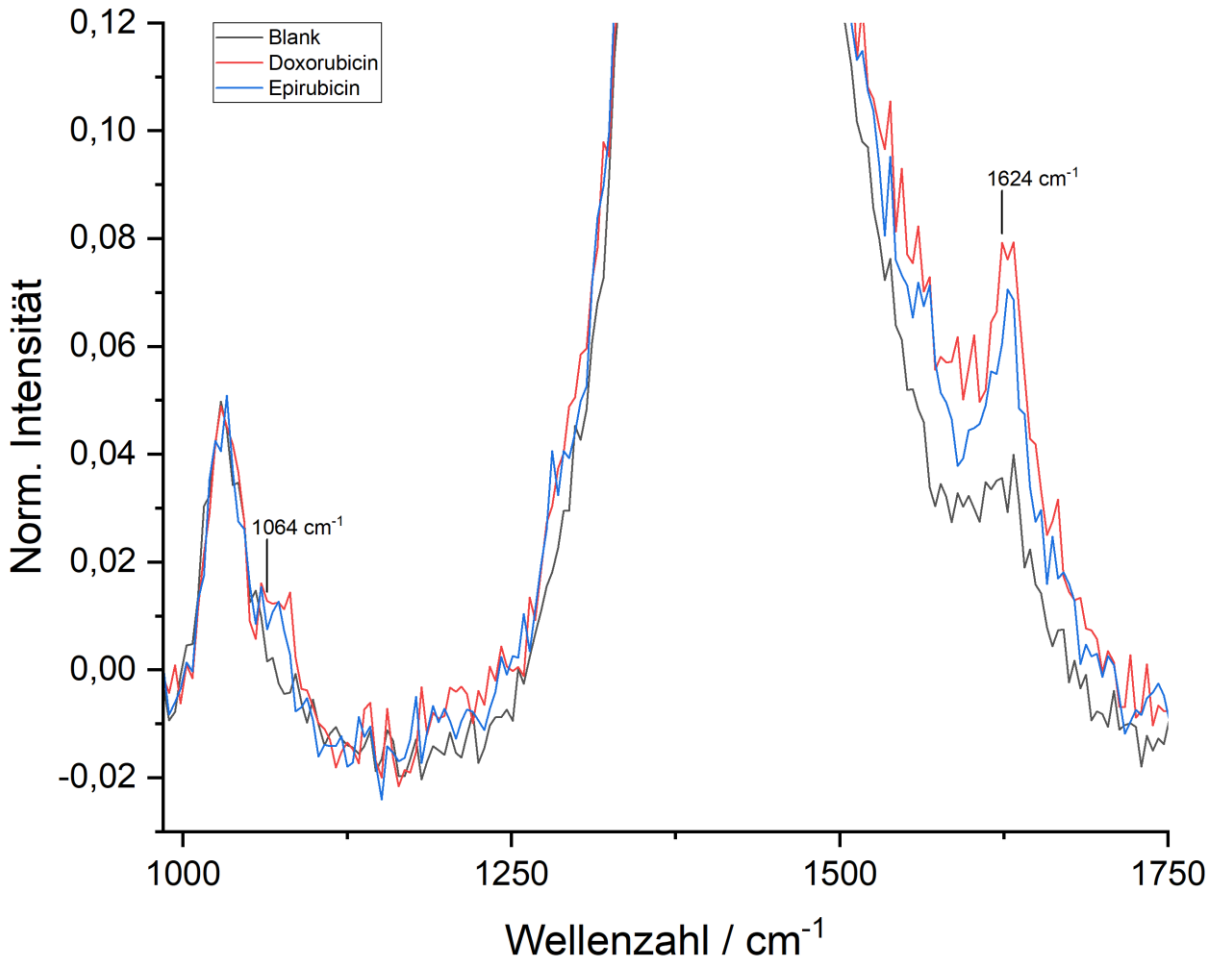

Abbildung 35: UV-Resonanz-Ramanspektren von Doxorubicin (rot), Epirubicin (blau) und mobiler Phase (schwarz) bei chromatographischer Kopplung (mit Säule). Chromatographische Bedingungen siehe Tabelle 11, Belichtungszeit: 10 x 5 s (50 s), Pulsenergie: 27 µJ, Frequenz: 20 Hz.

2.7.3.5 Messung von BSA und Daratumumab ohne Säule (DK, Fließinjektion)

Zusätzlich zu den niedrigmolekularen Wirkstoffen Naproxen, Doxo- und Epirubicin wurden ebenfalls Versuche mit proteinogenen Substanzen durchgeführt. Das Protein Rinderserumalbumin (BSA) und der monoklonale Antikörper Daratumumab wurden per Fließinjektion ohne Säule mit Aufbau 3 untersucht. Abbildung 36 (BSA) und

Abbildung 37 (Daratumumab) zeigen jeweils das aufgearbeitete UV-Resonanz-Raman-Spektrum (UVRR) bei Fließinjektion im Vergleich zum Online aufgezeichneten Raman-Spektrum im Flüssigkern-Lichtwellenleiter bei der Anregungswellenlänge 532 nm nach Größenausschlusschromatographie.

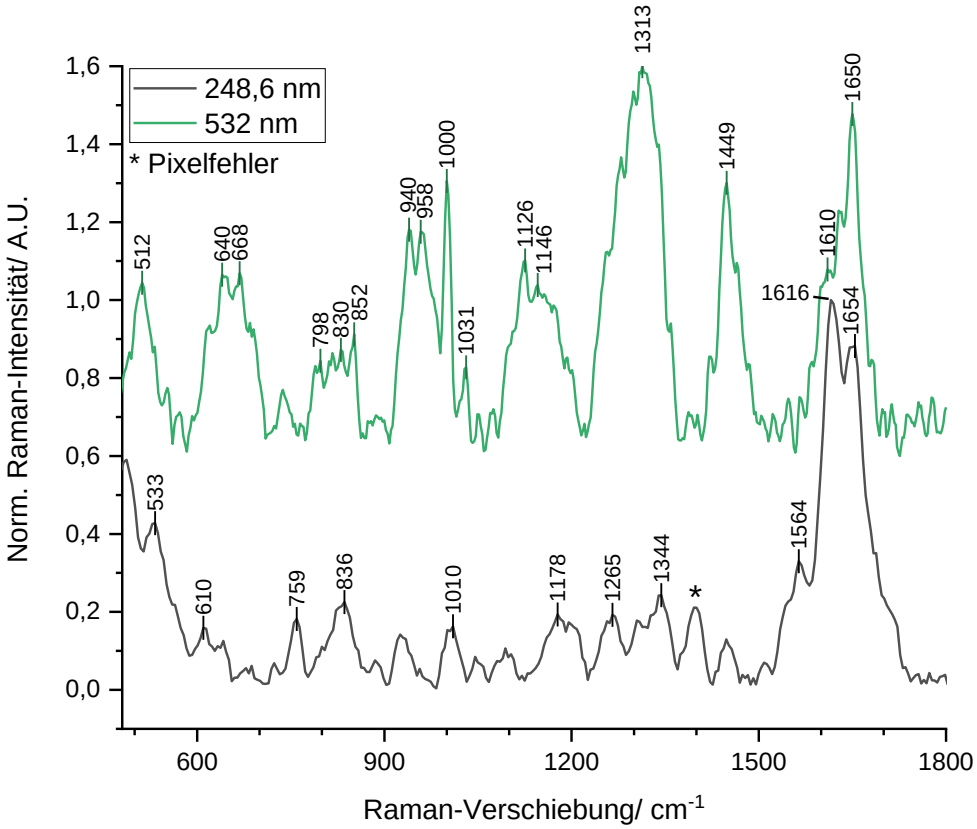

Abbildung 36: Überlagerte und normierte Raman-Spektren von Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommen bei 248,6 nm (schwarz) und bei 532 nm (grün). Messbedingungen: UVRR Spektren: Fließinjektion ohne Säule in Aufbau 3, Konzentration BSA: 20 mg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Fluss: 0,05 mL/min (100 % Wasser), Laserwellenlänge: 248,6 nm, Pulsleistung: 25 µJ, Frequenz: 20 Hz, Belichtungszeit: 5 s, Anzahl Akkumulationen: 20 scans; Nicht-resonante Raman-Spektren: Online gekoppelte Größenausschlusschromatographie und Raman-Detektion mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter, Konzentration BSA: 20 mg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Säule: AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies), Fluss: 0,35 mL/min, mobile Phase: 150 mM Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Laserwellenlänge: 532 nm, Laserleistung: 1 W, Belichtungszeit: 0,1 s, Anzahl gemittelte Spektren: 21 scans. Prozessierung der Daten: UV-Resonanz-Raman-Spektren: Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate, Vis-Raman Spektren: Blanksubtraktion, Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate.

Zwischen den beiden Raman Spektren, die unter resonanter (248,6 nm) und nicht-resonanter Anregung (532 nm) aufgezeichnet wurden, zeigen sich deutliche Unterschiede in den Intensitäten verschiedener Schwingungsbanden. Die intensivste Bande im UV-Resonanz-Raman Spektrum bei ~1.616 cm^{-1} lässt sich auf Schwingungen der aromatischen Aminosäureseitenketten von Tyrosin und

Tryptophan zurückführen.[15,16] Im nicht-resonanten Spektrum besitzt dieselbe Schwingungsbande (~1.610 cm^{-1}) im Vergleich zu anderen Banden nur eine mäßig starke Intensität. Das Maximum der Amid-I-Bande bei etwa 1.654 cm^{-1} (UVRR) bzw. 1.650 cm^{-1} (nicht-resonant) ist hingegen in beiden Spektren eine der intensivsten Banden. Im UVRR-Spektrum lassen sich nur die Banden bei 1.265 cm^{-1} (Amid-III-Bande) und die Amid-I-Bande auf Schwingungen des Peptidrückgrats zurückführen. Die restlichen Banden sind auf Schwingungen der aromatischen Aminosäureseitenketten von Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin, sowie auf Schwingungen der Disulfidbrücken (~533 cm^{-1}) zurückzuführen.[15] Im UVRR-Spektrum ist ein zusätzliches Signal bei ca. 1.390 cm^{-1} zu beobachten, das aus dem Pixelfehler der CCD-Kamera resultiert (siehe Kapitel 2.7.3.1). Das Signal konnte ebenfalls im Blank beobachtet werden.

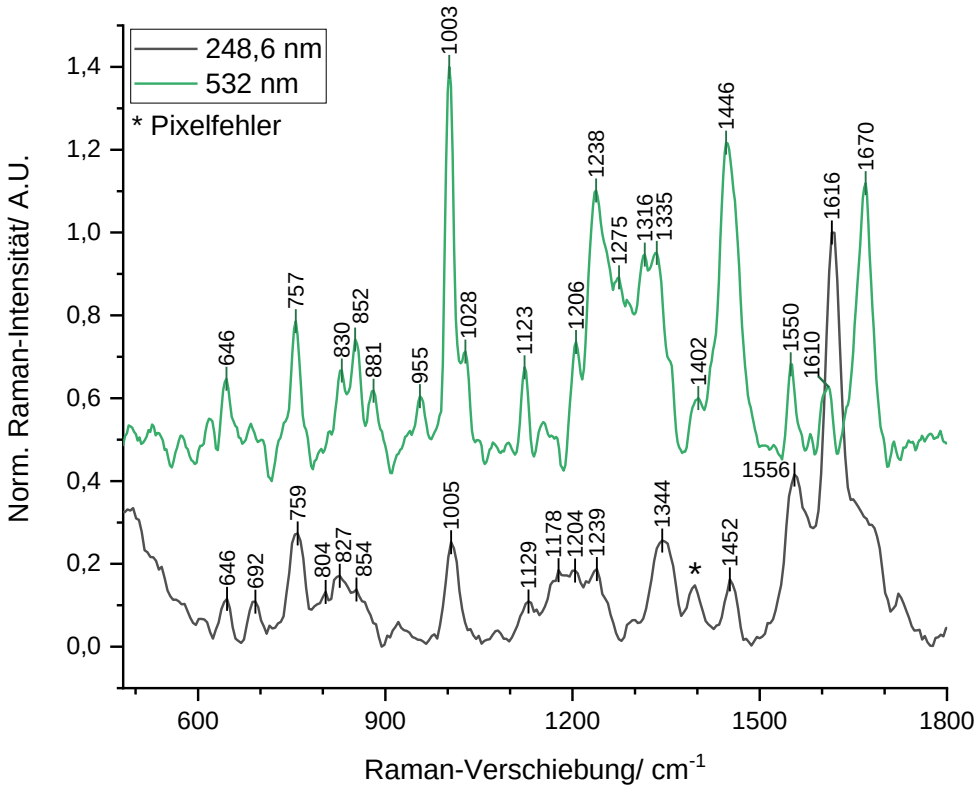

Abbildung 37: Überlagerte und normierte Raman-Spektren des monoklonalen Antikörpers Daratumumab aufgenommen bei 248,6 nm (schwarz) und bei 532 nm (grün). Messbedingungen: UVRR-Spektren: Fließinjektion ohne Säule in Aufbau 3, Konzentration Daratumumab (aufgereinigt über Zentrifugenfiltration) in 150 mM PBS-Puffer: 20 mg/mL, Injektionsvolumen: 20 µL, Fluss: 0,05 mL/min (100 % Wasser), Laserwellenlänge: 248,6 nm, Pulsleistung: 25 µJ, Frequenz: 20 Hz, Belichtungszeit: 5 s, Anzahl Akkumulationen: 20 scans; Nicht-resonante Raman-Spektren: Online gekoppelte Größenausschlusschromatographie und Raman-Detektion mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter, Konzentration Daratumumab (als Darzalex): 120 mg/mL, Injektionsvolumen: 10 µL, Säule: AdvanceBio SEC 300 Å, 4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies), Fluss: 0,35 mL/min, mobile Phase: 150 mM Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Laserwellenlänge: 532 nm, Laserleistung: 1 W, Belichtungszeit: 0,1 s, Anzahl gemittelte Spektren: 21 scans. Prozessierung der Daten: UV-Resonanz-Raman-Spektren: Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate, Vis-Raman Spektren: Blanksubtraktion, Glätten der Daten: 8-Punkte Savitzky-Golay Glättung, Basislinienkorrektur: Asymmetrische Glättung der kleinsten Quadrate.

Zwischen dem UV-Resonanz-Raman-Spektrum und dem nicht-resonanten Raman-Spektrum von Daratumumab lassen sich wie beim Rinderserumalbumin deutliche Unterschiede in den Intensitäten einzelner Schwingungsbanden erkennen. Insbesondere Schwingungsbanden, die mit dem Peptidrückgrat assoziiert sind, wie

beispielsweise die Amid-I-Bande (~1.670 cm^{-1}) oder die Amid-III-Bande (~1.239 cm^{-1}), sind im UVRR-Spektrum deutlich weniger ausgeprägt als im nicht-resonanten Raman-Spektrum. Wie bereits im UVRR-Spektrum von BSA, ist im UVRR-Spektrum von Daratumumab die Schwingung bei ~1.616 cm^{-1} von Tryptophan/ Tyrosin[15,16] die intensivste Bande im Spektrum. Tabelle 12 zeigt eine Zuordnung aller Schwingungsbanden von BSA und Daratumumab.

Tabelle 12: Zuordnung der Schwingungsbanden (cm^{-1}) von Rinderserumalbumin (BSA) und Daratumumab bei den Anregungswellenlängen 248,6 nm und 532 nm.

BSA		Daratumumab		Literatur	
248,6 nm	532 nm	248,6 nm	532 nm	cm^{-1}	Zuordnung
-	512	-	-	508 - 512	v(S-S)[15]
533	-	-	-	523 - 528	v(S-S)[15]
610	-	-	-	-	-
-	640	646	646	-	-
-	668	-	-	-	-
-	-	692	-	-	-
759	-	759	757	757 - 763	Tryptophan[15,17]
-	798	804	-	-	-
836	830	827	830	830/ 850	Tyrosin Fermi Dublett[15–18]
-	852	854	852		
-	-	-	881	880	Tryptophan[15,16]
-	940	-	-	930 - 950	v(N-C_α-C)[15]
-	958	-	955		
1.010	1.000	1.005	1.003	1.000 - 1.005	Phenylalanin[15–18]
-	1.031	-	1.028	1.030	Phenylalanin[15,16]
-	1.126	1.129	1.123	1.131	Trypthophan[15]
-	1.146	-	-	-	
1.178	-	1.178	-	1.177	Tyrosin[15]
-	-	1.204	1.206	1.203 - 1.209	Phenylalanin/ Tyrosin[15,16]
-	-	1.239	1.238	1.225 - 1.250	Amid-III-Bande, β-Faltblatt[15,16,18–20]
1.265	-	-	1.275	1.230 - 1.300	Amid-III-Bande, α-Helix[19,20]
-	1.313	-	1.316	-	-

BSA		Daratumumab		Literatur	
248,6 nm	**532 nm**	**248,6 nm**	**532 nm**	**cm^{-1}**	**Zuordnung**
1.344	-	1.344	1.335	1.340/ 1.360	Tryptophan Fermi Dublett[15–17]
-	-	-	1.402		
-	1.449	1.452	1.446	1.442 - 1.456	$\delta_{deformation}(CH_n)$, $\delta_{scissoring}(CH_n)$[16]
1.564	-	1.556	1.550	1.550 - 1.556	Tryptophan[15,16,18]
1.616	1.610	1.616	1.610	1.610 - 1.618	Tyrosin/ Tryptophan[15,16]
1.654	1.650	-	-	1.645 - 1.655	Amid-I-Bande, α-Helix[19]
-	-	-	1.670	1.665 - 1.675	Amid-I-Bande, β-Faltblatt[19]

2.8 Entwicklung einer Auswertungsmethodik für die kombinierte UV-Resonanz Raman- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Durch die resonante Anregung bei einer Wellenlänge von 248,6 nm zeigen die meisten Moleküle neben dem Resonanz-Raman-Effekt eine ausgeprägte Fluoreszenz. Diese liegt in der Regel über 300 nm und lässt sich spektral gut von den Raman-Signalen zwischen etwa 250 nm und 275 nm abgrenzen. In diesem Vorhaben wurde mit zwei für den tiefen UV-Bereich optimierten spektralen Gittern gearbeitet (Blaze-Wellenlänge 300 nm). Für die Aufnahme der Raman-Spektren wurde standardmäßig ein hochauflösendes Gitter mit 2.400 Linien/mm verwendet. Damit konnte (rechnerisch) eine durchschnittliche spektrale Auflösung von 0,07 nm bei zeitgleicher Erfassung eines Spektralbereichs zwischen 250 nm und 279 nm erreicht werden. Für die Messung größerer Spektralbereiche wurde zudem ein Gitter mit 600 Linien/mm verwendet. Die

Tabelle 13 fasst die spektralen Parameter der beiden Gitter zusammen. Dabei wurde der Eingangsspalt des Spektrographen auf 25 µm eingestellt.

Tabelle 13: Spektrale Parameter der eingesetzten Gitter.

	2400 l/mm	**600 l/mm**
Durchschnittliche spektrale Auflösung/ nm	0,07	0,29
Durchschnittliche spektrale Auflösung/ cm^{-1}	10	29
Spektralbereich/ nm	250 – 279	250 – 379
Spektralbereich/ rel. cm^{-1}	171 – 4.382	171 – 1.3864

Für die zeitgleiche Erfassung von Raman- und Fluoreszenz-Signal konnte nur das Gitter mit 600 l/mm verwendet werden. Die Abbildung 38 zeigt die kombinierten UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Spektren von Naproxen und Doxorubicin im Vergleich. Im vorderen Spektralbereich zwischen 250 nm und 275 nm sind die Raman-Signale von Acetonitril sichtbar. Naproxen zeigt ein stark ausgeprägtes Fluoreszenz-Signal zwischen 325 nm und > 380 nm mit einem Emissionsmaximum bei 351 nm. Doxorubicin lässt sich anahnd des Fluoreszenzprofils gut von Naproxen unterscheiden. Die Fluoreszenz emittiert ab 285 nm und > 380 nm und zeigt zwei charakteristische Peakmaxima bei 293 nm und 306 nm, sowie eine Schulter in der abfallenden Flanke bei 316 nm.

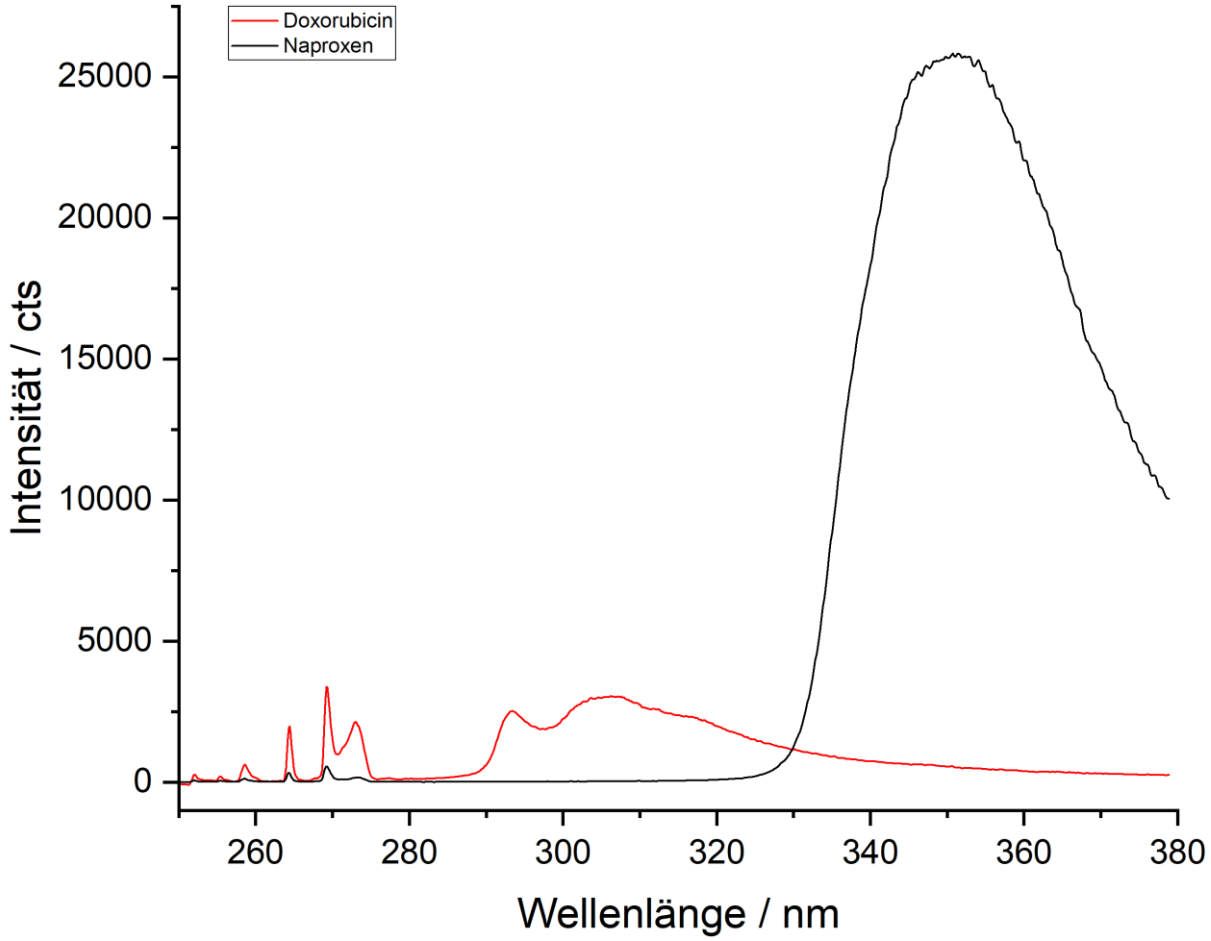

Abbildung 38: UV-Resonanz-Raman-Fluoreszenz-Spektren von Naproxen und Doxorubicin.

Naproxen zeigt bei der Anregungswellenlänge von 248,6 nm eine im Vergleich zu Doxorubicin um den Faktor 8,5 höhere Fluoreszenzintensität. Die erhöhte Fluoreszenz basiert mitunter auf einer erhöhten Absorption der Laserwellenlänge. Diese Beobachtung passt auch zu den im Vergleich zu Doxorubicin deutlich schwächer ausgeprägten Raman-Signalen der mobilen Phase um den etwa Faktor 6,2.

Die Detektion der UV-Resonanz-Raman-Signale der Analyten war allerdings beim Einsatz des 600 l/mm Gitters aufgrund der geringen spektralen Auflösung von ca. 29 cm^{-1} nicht möglich, da sich die Substanz-Signale nicht von den Signalen des Acetonitrils aus der mobilen Phase abgrenzen ließen. Die Abbildung 39 zeigt exemplarisch die UV-Resonanz-Raman-Signale von Doxorubicin bei Verwendung der beiden Gitter.

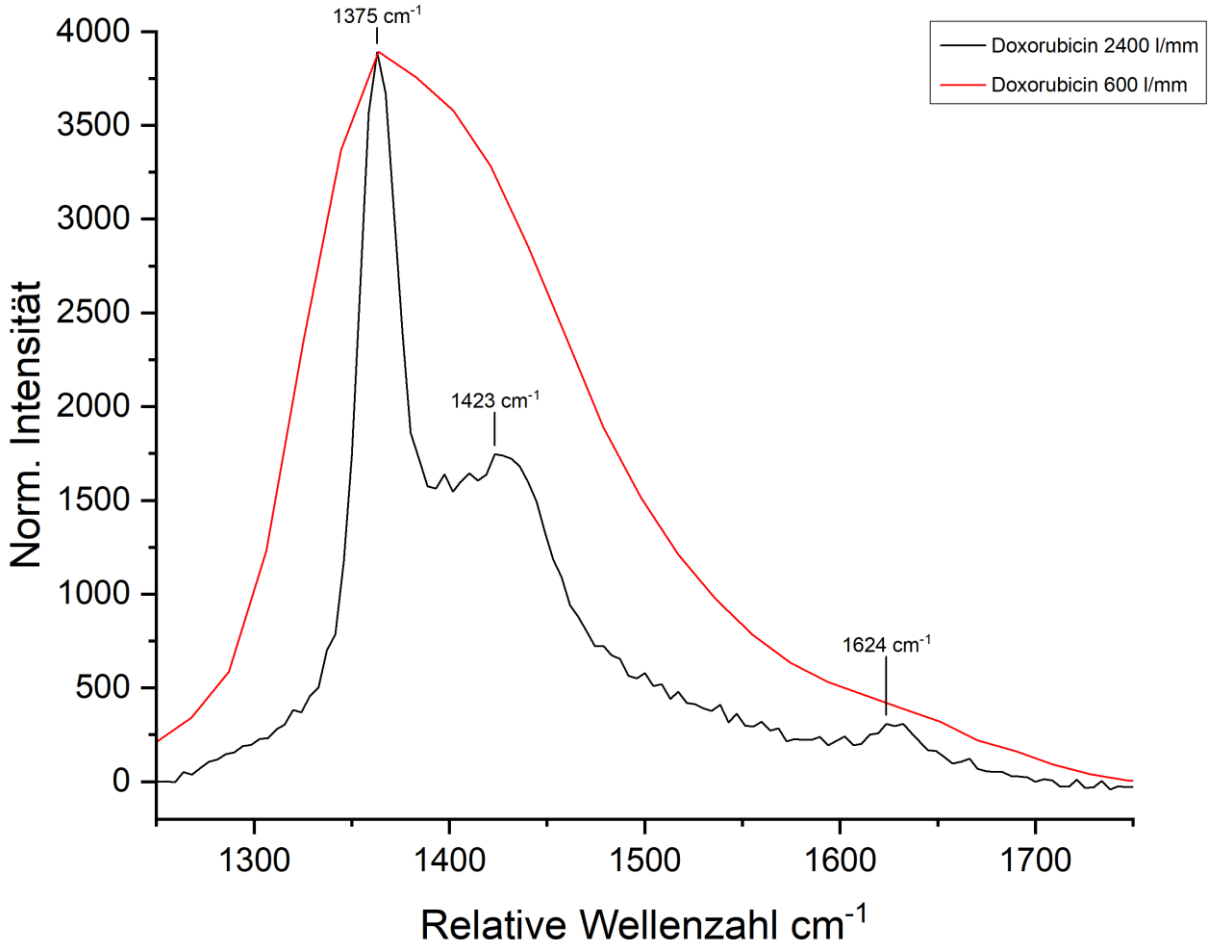

Abbildung 39: UV-Resonanz-Raman-Spektren von Doxorubicin bei Einsatz des 600 l/mm und 2400 l/mm Gitters.

Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt zwischen 1.250 cm^{-1} und 1.750 cm^{-1}. Mit dem hochauflösenden Gitter (2.400 l/mm, schwarzes Spektrum) kann das Raman-Signal des Acetonitrils der mobilen Phase deutlich besser aufgelöst werden. Es können zwei Raman-Übergänge bei 1.375 cm^{-1} und 1.423 cm^{-1} beobachtet werden. Bei Einsatz des niedriger auflösenden Gitters (600 l/mm, rotes Spektrum) können die beiden Übergänge hingegen nicht mehr voneinander getrennt werden. Zudem ist eine generelle Bandenverbreiterung zu beobachten. Das Signal von Doxorubicin bei 1.624 cm^{-1} kann nur mit dem 2.400 l/mm Gitter herausgearbeitet werden.

Für die Erfassung von Raman- und Fluoreszenz-Signalen müssen demnach beide Gitter eingesetzt werden. Die besten Ergebnisse lassen sich mit zwei separaten chromatographischen Läufen erreichen. Im ersten Lauf sollte ein Übersichtssprektrum mit dem 600 l/mm Gitter durchgeführt werden. Hierbei liegt der Fokus auf der Erfassung der Fluoreszenz. Dazu kann die Belichtungszeit der CCD-Kamera deutlich

herabgesetzt werden, da die Fluoreszenz im Vergleich zu den Raman-Signalen stark ausgeprägt ist. In den Versuchen hat sich eine Belichtungszeit von 0,5 - 1 s als praktikabel erwiesen. Neben einem ausgeprägten Fluoreszenz-Signal im Peak-Maximum bietet eine Ausleserate von 0,5 - 1 s ausreichend Messpunkte, um den chromatographischen Peak zeitaufgelöst darzustellen und den genauen Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem sich die höchste Analyt-Konzentration in der Raman-Messzelle befindet. Diese Information kann im zweiten chromatographischen Lauf genutzt werden, um den richtigen Zeitpunkt für die Herabsetzung der Flussrate für eine Low-Flow-Messung zu bestimmen. Für den zweiten Lauf wird dann das 2.400 l/mm Gitter verwendet, um die Raman-Signale mit ausreichend hoher spektraler Auflösung und Belichtungsdauer zu erfassen.

Eine zeitgleiche Erfassung beider Spektralbereiche wäre nur durch den Einsatz eines zweiten separaten Detektors zu realisieren. Dazu könnte das Raman-Signal über den 90° Winkel und das Fluoreszenz-Signal in 180° Transmission abgenommen werden. Als Detektor für das Fluoreszenz-Signal könnte ggf. ein UV-Spektrometer oder Diodenarray-Detektor (DAD) verwendet werden.

Aufgrund der dominanten Raman-Signale des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase konnten nur wenige Raman-Signale der Analyten identifiziert werden, da durch Banden-Überlagerung einige Spektralbereiche nicht zugänglich waren. Im Falle des hier verwendeten Acetonitrils ist vor allem der Frequenzbereich zwischen 1.300 cm^{-1} und 1.500 cm^{-1} nicht zugänglich.

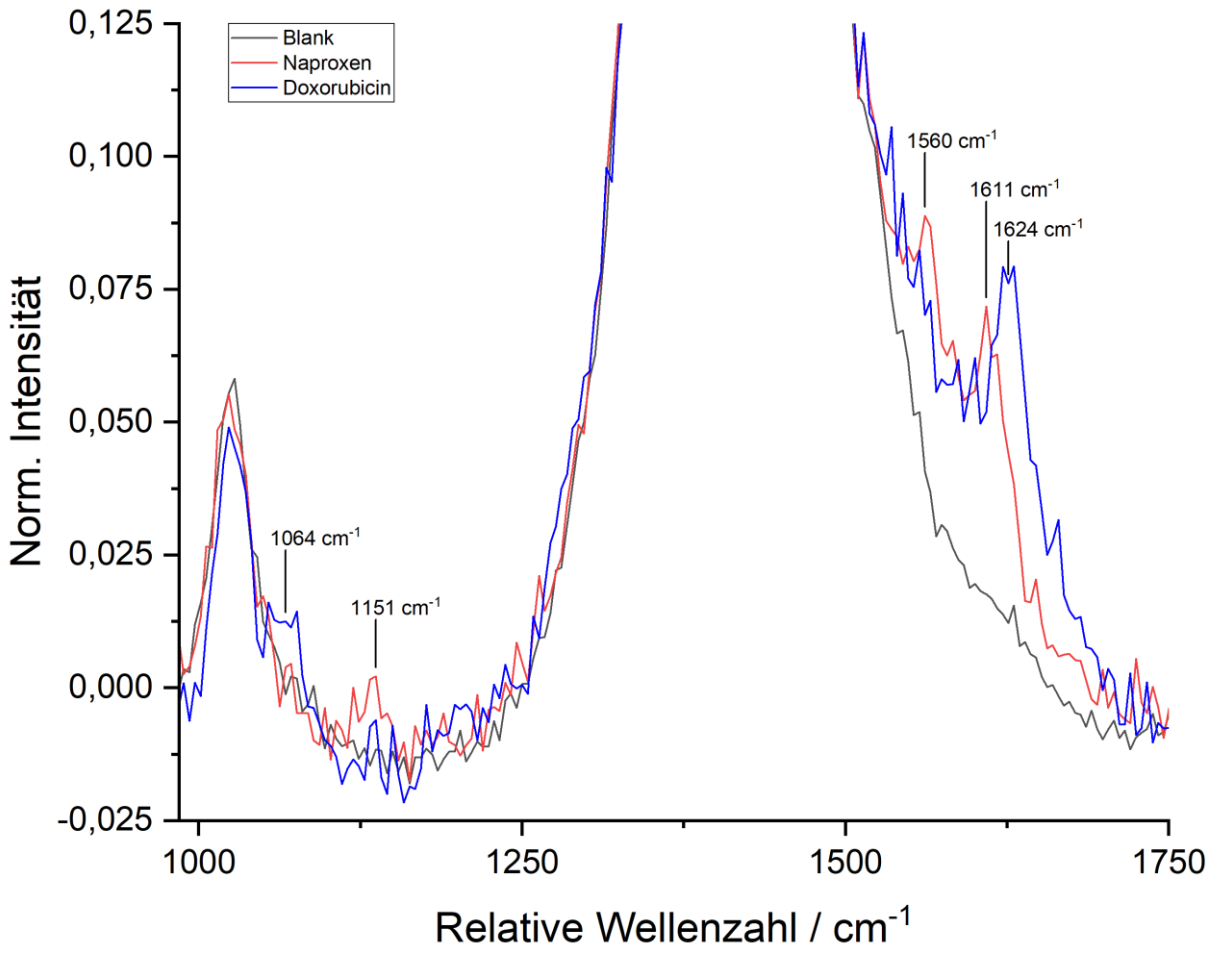

Abbildung 40: Vergleich der UV-Resonanz-Raman-Spektren von Naproxen und Doxorubicin nach chromatographischer Trennung.

Die Abbildung 40 zeigt die UV-Resonanz-Raman-Spektren von Doxorubicin und Naproxen im Vergleich. Anhand der herausgearbeiteten Raman-Signale ist eine Unterscheidung möglich. Die spektralen Informationen der Fluoreszenz (siehe Abbildung 38) liefern komplementäre Informationen, um eine eindeutige Zuordnung bzw. Identifikation von Substanzen mittels Datenbankvergleich zu ermöglichen. Hier zeigt sich ein großer Vorteil der Anregung im tiefen UV-Bereich < 250 nm. Da die Raman-Signale nicht von der Fluoreszenzemission überlagert werden, können die Signale ohne größere Spektrenbearbeitung identifiziert werden. Eine aufwendige Basislinienkorrektur, wie es häufig bei Anregung im sichtbaren Bereich nötig ist, entfällt vollständig.

2.9 Bewertung der Messdaten zur Optimierung des experimentellen Aufbaus und der Messparameter

2.9.1 Einleitung

Dieses Arbeitspaket wurde begleitend zu den Arbeitspakten 2.2, 2.5, 2.6 und 2.8 über die gesamte Projektlaufzeit durchgeführt. Für ein besseres Verständnis wurden die Optimierungsschritte zumeist innerhalb der einzelnen Arbeitspakte beschreiben. So wurden auf Grundlage der Messergebnisse die experimentellen Aufbauten schrittweise verbessert. Insgesamt wurden drei Aufbauten realisiert und getestet (siehe Kapitel 2.2). Die chromatographischen Bedingungen wurden optimiert und eine Low-Flow-Methode so angepasst, dass ausreichend Messzeit für die Aufnahme der UV-Resonanz-Raman-Spektren zur Verfügung stand (siehe Kapitel 2.5). Für die Messung der Raman- und Fluoreszenz-Spektren wurden zwei spektrale Gitter eingesetzt und bewertet (siehe Kapitel 2.8). Zudem wurde im Rahmen von Kapitel 2.6 eine Betriebsroutine entwickelt, bei der die Leistungsstabiliät des Lasers für etwa 8 min aufrecht erhalten werden kann, um genügend Laserleistung (> 95 % der Maximalleistung) für einen Messzyklus zu gewährleisten.

2.9.2 Entwicklung einer Betriebsroutine für stabile Raman-Messungen

2.9.2.1 Belichtungszeit CCD-Kamera

Aufgrund der eingesetzten Laserpulsbreite von 40 µs bei einer Wiederholungsrate von 20 Hz, musste für die CCD-Kamera eine Mindestbelichtungszeit von 0,5 s eingestellt werden, um eine vertretbar stabile Raman-Signalintensität zu erhalten. In diesem Fall erfasste der Detektor Raman-Signale, die im Mittel durch 10 Laserpulse erzeugt wurden. Da Laser und Detektor asynchron liefen, kam es alle 10 Spektren zu einer Abschwächung bzw. Erhöhung der Signalintensität um ca. 10 %, wenn z. B. nur 9 bzw. im Folgespektrum 11 Laserpulse zu einem Raman-Spektrum beigetragen haben. In den späteren Messungen von Proben hat sich eine Belichtungszeit von 5 s pro Spektrum etabliert. In diesem Zeitraum trugen im Durchschnitt 100 Laserpulse zu dem Raman-Signal bei, sodass die Abweichung der zum Raman-Signal beitragenden Laserintensität rechnerisch bei maximal ± 1 % (99 bzw. 101 Pulse) lag. In der Praxis ist diese Abweichung allerdings nicht mehr zu bestimmen gewesen, da andere Effekte

dominierten, die zu weitaus stärkeren Schwankungen der Signalstabilität beigetragen haben.

2.9.2.2 Laserstabilität

Es konnte beobachtet werden, dass die Pulsenergie des Lasers mit der Betriebszeit starken Schwankungen unterliegt. In der Abbildung 41 ist der zeitliche Verlauf der Laserleistung graphisch dargestellt. Nach Inbetriebnahme benötigt der Laser bei einer Frequenz von 20 Hz eine Aufwärmphase von etwa 5,9 min, um eine maximale Pulsenergie von 20,6 µJ zu erreichen. Hierbei handelt es sich um ein Peakmaximum, d. h. im weiteren Betrieb nimmt die Pulsenergie wieder ab. Als Grenzwert für eine ausreichende Laserintensität wurde 95 % der maximalen Pulsenergie als akzeptabel festgelegt. Daraus ergibt sich ein Zeitfenster von 8 min, in dem Raman-Messungen durchgeführt werden können.

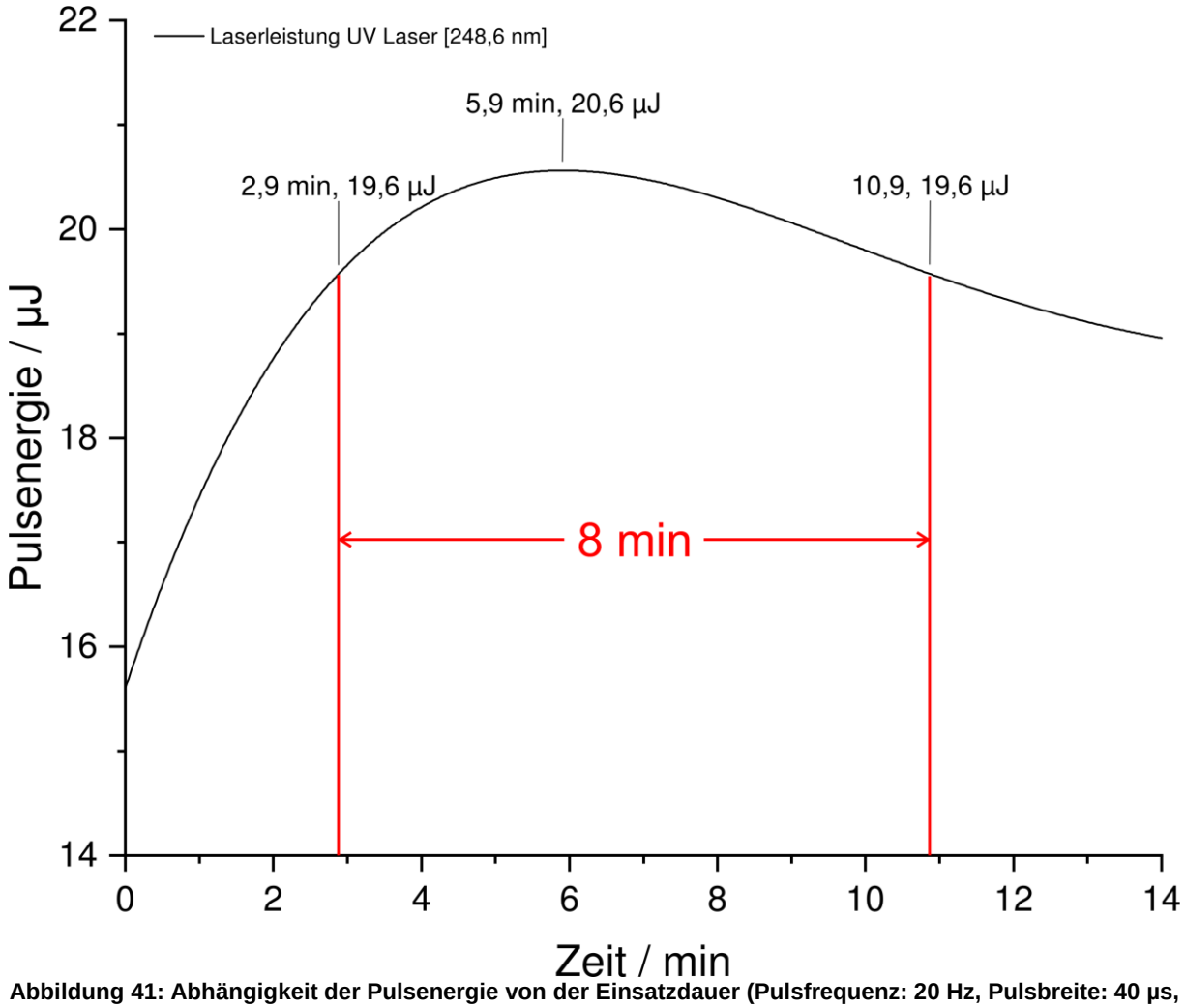

Abbildung 41: Abhängigkeit der Pulsenergie von der Einsatzdauer (Pulsfrequenz: 20 Hz, Pulsbreite: 40 µs, Stromstärke: 20A).

Wird der Laser nach Ablauf der 8-minütigen Messphase für ca. 5 Minuten ausgeschaltet, erreicht er nach erneuter Aufwärmphase von 4 - 6 Minuten wieder die ursprüngliche maximale Peakleistung von 20,6 µJ. Es scheint hier also einen regenerativen Effekt zu geben. Um die Dauer der Aufwärmphase zu reduzieren, wurde eine Methode entwickelt, bei der der Laser nach erfolgter Raman-Messung in einen „Ruhemodus“ gesetzt wird, d. h. der Laser läuft mit einer niedrigen Frequenz weiter. Es wurden 3 Hz als optimale Frequenz bestimmt. Bei dieser Pulsrate kann der Laser regenerieren und nach erneuter Frequenzerhöhung auf 20 Hz beträgt die Aufwärmphase nur 5 - 10 Sekunden, um wieder mindestens 95 % der maximalen Laserleistung zu erreichen.

3 Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

3.1 Entwicklung eines kombinierten UV-Resonanz-Raman- und Fluoreszenz-Detektors (TRR-FLD)

Im Rahmen der Projektarbeiten konnte ein kombinierter UV-Resonanz-Raman- und Fluoreszenz-Detektor technisch realisiert werden. Das im Projektantrag vorgegebene Ziel, den Aufbau mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter (FK-LWL) in einer Transmissionsanordnung zu realisieren, ist aufgrund zu starker Absorptionseffekte nicht umsetzbar. Die Reduzierung der Wegstrecke im FK-LWL auf wenige Millimeter bis Zentimeter konnte technisch aufgrund der Bauart der optofluidischen Kopplungseinheiten ebenfalls nicht realisiert werden. Alternativ wurde der Aufbau in einer 90° Anordnung mittels Durchflussküvette umgesetzt. Es konnten nach chromatographischer Trennung sowohl UV-Resonanz-Raman- als auch Fluoreszenz-Spektren von kleinen Wirkstoffmolekülen erhalten werden. Dazu wurde eine Low-Flow Methode erfolgreich entwickelt und angewendet, um ausreichend Messzeit für die Aufnahme spektraler Daten zur Verfügung zu stellen. Die eindeutige Identifikation und Unterscheidung der Substanzen Naproxen und Doxorubicin mittels der kombinierten UV-Resonanz-Raman- und Fluoreszenz-Signale war erfolgreich. Eine Unterscheidung des Enantiomerenpaares Doxo- und Epirubicin konnte hingegen nicht erreicht werden. Stellvertretend für große Moleküle konnten UV-Resonanz-Raman-Spektren von den Proteinen BSA und Daratumab in wässriger Fließinjektion aufgenommen werden. Eine spektrale Bandenanalyse und Vergleich mit nicht-resonanten Raman-Spektren bei Anregung mit einer Wellenlänge von 532 nm konnte erfolgreich durchgeführt werden. Am Beispiel von Naproxen konnten in rein wässiger mobiler Phase die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit 44 µg/mL bzw. 136 µg/mL ermittelt werden. Diese Werte liegen etwa in dem Konzentrationsbereich von nicht-resonanten Raman-Messungen, die in dem IGF-Forschungsvorhaben 16120 N erzielt wurden. Im genannten Projekt wurden allerdings die Experimente in einem Flüssigkern-Lichtwellenleiter bei Einsatz eines 2000 mW starken Lasers mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm durchgeführt. In Hinblick auf die in diesem Projekt vewendete Laserleistung von nur etwa 500 µW (quasi-cw) und unter Berücksichtigung der erhöhten Streulichtintensität

bei niedrigerer Anregungswellenlänge, sowie des nicht eingesetzten Flüssigkern-Lichtwellenleiters, kann die alleine durch den UV-Resonanz-Raman-Effekt erzielte Verstärkung auf den Faktor 200 bis 500 abgeschätzt werden. Vor diesem Hintergrund ist auch erklärbar, dass, trotz der allgemein niedrigen Empfindlichkeit, die Raman-Signale von Naproxen, Doxo- und Epirubicin nach chromatographischer Trennung in der mobilen Phase bei hohem Acetonitrilgehalt von 50 % bis 70 % detektiert werden konnten. Während die Analyten einen starken Resonanz-Raman-Effekt aufwiesen, zeigten sich die Raman-Spektren der mobilen Phase zwar dominant, aber nicht resonanzverstärkt. Auf diese Weise konnte das Verhältnis der Raman-Intensitäten in Richtung der Analytmoleküle verschoben werden. Dies stellt einen enormen Vorteil im Vergleich zur nicht-resonanten Raman-Spektroskopie dar. Anhand der erzielten Ergebnisse konnten in diesem Projekt erstmalig Raman-Spektren nach einer chromatographischen Trennung bei Verwendung eines organischen Lösungsmittels beobachtet werden. Das Projekt liefert damit einen essentiellen Beitrag für die technische Weiterentwicklung eines Raman-Detektors für die Flüssigkeitschromatographie.

3.2 Entwicklung einer 2D-LC Methode zur umfassenden Charakterisierung von (bio-)pharmazeutischen Formulierungen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnte gezeigt werden, dass die zweidimensionale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bei der Untersuchung von pharmazeutischen und biopharmazeutischen Formulierungen ein leistungsfähiges Analyseverfahren darstellt.

Im Bereich der niedermolekularen Wirkstoffe sollte ein Analysekonzept entwickelt werden, das zum einen den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs in Hinblick auf die Bestimmung von Reinheit, Gehalt oder Identität eines Wirkstoffs genügt, zum anderen die Kopplung potenziell orthogonaler Trenntechniken ermöglicht, um tiefergreifendere Analysen des Wirkstoffs an sich zu ermöglichen. Im Rahmen des Projektes konnte eine Methode auf Basis der 2D-LC entwickelt werden, die den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs zur Bestimmung der Reinheit und des Gehalts eines niedermolekularen Wirkstoffs in vollem Umfang gerecht wird. Eine

gleichzeitige Bestimmung der Identität konnte durch die Kopplung mit dem TRR-FLD vorgenommen werden.

Weiterhin konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die zweidimensionale HPLC ein leistungsstarkes Konzept für eine umfassende Untersuchung auf Verunreinigungen darstellt. Anhand des Wirkstoffs Doxorubicinhydrochlorid konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff Verunreinigungen enthält, die nicht in ausreichendem Maß durch die Reinheitsbestimmung nach Ph. Eur. abgetrennt werden können. In der zweiten Dimension konnten mehrere Peaks detektiert werden, die folglich auf zusätzliche Verunreinigungen hindeuten. Die Verunreinigungen konnten sowohl im offiziellen Ph. Eur. Referenzstandard des EDQM, als auch in Chargen eines kommerziellen Produktes nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten vergleichbare Verunreinigungen für Epirubicinhydrochlorid ermittelt werden. Eine Identifizierung des Wirkstoffs und der Verunreinigungen konnte nur anhand der UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt werden und führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, da die Absorptionsspektren identisch waren. Die sich daraus ergebende fehlende Spezifität der 2D-LC Methode war der Grund, warum eine Validierung nach den Vorgaben der ICH nicht durchgeführt werden konnte. Die Kopplung mit einem strukturaufklärenden Verfahren wie dem TRR-FLD konnte im Rahmen des Projektes zwar umgesetzt werden, lieferte allerdings nur Informationen zur Identität der Wirkstoffe. Eine Abgrenzung zu den Verunreinigungen war aufgrund mangelnder Empfindlichkeit des TRR-FLD nicht möglich.

Im Bereich der Biopharmazeutika konnte ein reales Anwendungsbeispiel aus dem Bereich der Qualitätskontrolle mit Hilfe einer 2D-LC Methode adressiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bestimmung der Bindungsaffinität an einen Fc-Rezeptor als auch die Analyse der Glykosylierungsstruktur direkt aus dem zellfreien Überstand eines Zellkulturmediums möglich ist. Der Einsatz der entwickelten 2D-LC Methode erspart darüber hinaus eine arbeits- und kostenintensive manuelle Aufreinigung der therapeutischen Proteine. Damit qualifiziert sich die Methode ebenso für einen Einsatz in den frühen Stufen der pharmazeutischen Entwicklung neuer Biotherapeutika, wenn geeignete Wirkstoffkandidaten in den Zellkulturen gesucht werden (Screening) oder eine Optimierung der Kandidaten hin zu einer erhöhten Rezeptoraffinität im Fokus steht.

Eine direkte Kopplung von 2D-LC und TRR-FLD konnte im Bereich der Biopharmazeutika nicht realisiert werden. Jedoch konnte anhand von Fließinjektionen des Proteins Rinderserumalbumin und des monoklonalen Antikörpers Daratumumab gezeigt werden, dass der TRR-FLD umfassende Informationen zur Protein-Strukturaufklärung liefern kann. Darüber hinaus ließen sich spektrale Unterschiede zwischen nicht-resonanter und resonanter Anregung in den Spektren der Proteine beobachten.

Zusammenfassend konnte im Rahmen des geförderten Forschungsvorhabens die Leistungsfähigkeit der 2D-LC anhand von realen Beispielen demonstriert werden. Die Entwicklung eines Verfahrens zur simultanen und umfassenden Bestimmung von Reinheit und Gehalt eines Arzneistoffs konnte erfolgreich umgesetzt werden. Eine zusätzliche Identifizierung niedermolekularer Wirkstoffe konnte durch die Kopplung zwischen HPLC und TRR-FLD erreicht werden. Darüber hinaus war es möglich, UV-Resonanz-Raman Spektren verschiedener Proteine im Durchfluss aufzuzeichnen.

3.3 Entwicklung eines Peak-Parking Konzepts zur Kopplung der 2D-LC mit dem TRR-FLD

Ein Ziel des geförderten Vorhabens war die Entwicklung eines Peak-Parking Konzeptes, um die zeitunabhängige Aufnahme von UV-Resonanz-Raman Spektren bei der Kopplung mit der zweidimensionalen HPLC zu ermöglichen. Das theoretische Konzept wurde in Form eines Stop-Flows und eines Low-Flows erfolgreich in der Praxis umgesetzt. Im Verlauf des Projektes erwies sich insbesondere das entwickelte Low-Flow Konzept als optimale Lösung. Es ermöglichte eine Erhöhung der Messzeit bei einem gleichzeitig geringeren Risiko der Bildung von Zersetzungprodukten infolge einer Bestrahlung der Probe mit harter UV-Strahlung.

Darüber hinaus erlaubte die 2D-LC eine Speicherung von bis zu 10 Fraktionsschnitten eines Analysenlaufs für eine zeitunabhängige Analyse.

4 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Im Rahmen dieses Forschungvorhabens konnte die Kopplung eines UV-Raman-Systems mit der Flüssigkeitschromatographie erfolgreich umgesetzt werden. Die größte technische Herausforderung bestand dabei im experimentellen Aufbau des TRR-FLD. Entgegen der Erwartungen konnte eine Signalabnahme in Transmission nicht realisiert werden. Aufgrund Ermangelung technischer Komponenten, wie z. B. einem dichroitischen Strahlteiler, konnte rückwärtsgerichtetes Raman-Streulicht nicht ohne erhebliche Intensitätsverluste detektiert werden. Die Kopplung gelang jedoch innerhalb eines weiteren experimentellen Aufbaus unter Zuhilfenahme einer Durchflussküvette und einer Streulichtabnahme im 90° Winkel. Mit diesem Aufbau konnten die UV-Raman-Spektren ausgesuchter chemischer Substanzen erstmals Online nach chromatographischem Lauf detektiert werden. Im direkten Vergleich zu Verfahren auf Basis längerwelliger Laser wurde die Aufnahme einzelner Raman-Banden auch in Gegenwart intensiver Schwingungsbanden der hochkonzentrierten organischen Lösungsmittel erzielt. Gegenwärtig erlaubt dies eine enigeschränkte Substanzzuordnung. Besonders interessant erscheint jedoch die Anwendung dieses Verfahrens im Bereich der Analyse von Biopharmazeutika, wie hier am Beispiel des Immuntherapeutikums Daratuzumab demonstriert werden konnte. Trotz der bisweilen sehr geringen UV-Laserleistung von ca. 0,5 mW konnten deutliche Raman-Spektren aufgenommen werden. Die Mehrzahl der Signale wurde den entsprechenden Schwingungsmodi zugeordnet. Eine eindeutige Unterscheidung zweier proteinoger Substanzen wurde erzielt. Durch die niedrige Laserwellenlänge werden vor allem aromatische Aminosäuren resonant angeregt, deren Schwingungen auch die Raman-Spektren dominieren. Gerade in diesem Applikationsfeld sehen die beteiligten Forschungseinrichtungen einen hohen wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzen. Durch die Online-Kopplung mit der Größenausschlusschromatographie (SEC) kann im Bereich der Qualitätskontrolle die Analyse komplexer Biopharmazeutika verbessert werden. Ein einfaches Analyseverfahren, das die Unterscheidung verschiedener Biologika ermöglicht und

darüber hinaus wichtige Informationen über die dreidimensionale Struktur unter nativen Bedingungen erlaubt, ist nach Kenntnisstand der beteiligten Forschungseinrichtungen nicht auf dem Markt erhältlich. Bisweilen erfolgt die Charakterisierung der dreidimensionalen Struktur für Biologika über die Kombination verschiedener spektroskopischer Verfahren (UV/Vis-, Circulardichroismus-, Fluoreszenz-Spektroskopie). Die Affinität wird über spezifische Bindungsassays bestimmt. Eine Identifizierung erfolgt entweder auf Peptid-Level (Sequence-Mapping) oder unter denaturierenden Bedingungen auf Proteinebene, beide Male unter Verwendung kostenintensiver massenspektrometrischer Detektoren. Hier könnte der UVRR-Detektor einen echten Mehrwert generieren. Über die SEC können Formulierungsstoffe abgetrennt, der Analyt identifiziert und dessen Unversehrtheit unter nativen Bedingungen untersucht werden. Gegenüber anderen Raman-Systemen, die bereits in vorangegangenen IGF-Vorhaben (Nr. 17497 N) entwickelt und mit der HPLC gekoppelt wurden, bietet die resonante Anregung einzelner Aminosäuren unter Verwendung eines UV-Lasers einen deutlichen Empfindlichkeitsgewinn. Es wäre anzunehmen, dass die Schwingungsbanden einzelner Aminosäuren im Vergleich zu Gruppenschwingungen, wie bespielsweise der Amid-Banden I und III, eine untergeordnete Rolle spielen. Jedoch können die Raman-Spektren der Aminosäuren nicht isoliert betrachtet werden. Die unmittelbare Umgebung nimmt Einfluss auf Lage und Intensität der Banden, sodass Konformationsänderungen auch über Einzelbanden aromatischer Aminosäuren identifiziert werden können.

Eine mittelfristige wirtschaftliche Nutzung des technischen Demonstrators bei konsequenter Umsetzung der hier getroffenen wissenschaftlich-technischen Erkenntnisse ist aus Sicht der beteiligten Forschungseinrichtungen möglich. Eine kurzfristige Umsetzung des technischen Konzeptes scheitert gegenwärtig an der Lebensdauer und Leistung der verfügbaren UV-Lasersysteme. So beträgt die Lebensdauer eines UV-Pulslasers bei hoch eingestellter Leistung, wie sie für die Online-Kopplung benötigt wird, gerade einmal 150 Stunden. Trotzdem liegt die maximale Laserleistung bei nur 0,5 mW (cw). Sollte sich die Entwicklung zu leistungstärkeren UV-Laser-Systemen von 5 mW (cw) bei einer adäquaten Lebensdauer kurz- bis mittelfristig ergeben, so räumen die Forschungsbeteiligten dem LC-UVRR-Verfahren realistische Chancen ein, im Rahmen einer weiteren

Forschungkooperation mit Industriebeteiligung zu einem Prototypen und darüber hinaus zur Marktreife weiterentwickelt zu werden.

Abschließend soll festgehalten werden, dass die hier erzielten Ergebnisse, insbesondere wegen der Verwendung eines leistungsschwachen UV-Pulslaser, das Potential des Verfahrens deutlich hervorheben.

Aufbauend auf den Ergebnissen des Projektes ist es gelungen, zusammen mit einem Industriepartner ein ZIM-Projekt zu akquirieren, das die Entwicklung einer innovativen Softwarelösung zum Ziel hat, um eine zielgerichtete Datenauswertung und -analyse der sehr komplexen Raman-Spektren durchzuführen. Neben den rein technisch basierten Herausforderungen gibt es aktuell keine für die Kopplung mit der Chromatographie geeignete Software, die eine effiziente Datenaufbereitung der Raman-Spektren sowie eine Datenfusion zwischen unterschiedlichen Detektionsverfahren (Spektroskopie und Massenspektrometrie) erlaubt.

5 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

5.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Mehrheit der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Mitglieder sind den kleinen und mittelständischen Unternehmen zuzurechnen. Die aufgeführten Unternehmen entstammen vorwiegend den Branchen der Analysen- und Labortechnik. Dies gewährleistet, dass nach Ende des Projektes mittel- bis langfristig eine Umsetzung des in diesem Projekt entwickelten Analysverfahrens auf Basis der LC-TRR-Kopplung möglich ist. Während der Projektlaufzeit wurden drei Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt, um technische Harausforderungen zeitnah zu diskutieren und um neue technische Lösungsansätze umzusetzen.

5.2 Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen

Die Vorstellung der Ergebnisse während der Projektlaufzeit erfolgte vorwiegend in Form von Vorträgen auf spezifischen deutschsprachigen Fachtagungen. Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen auch über die Projektlaufzeit hinaus können der Tabelle 14 aufgeführten Auflistung entnommen werden.

5.3 Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Die Auflistung der durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen kann der Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 14: Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.

Bereits umgesetzte Maßnahmen	Ziel	Rahmen	Zeitraum
Vortrag	Vorstellung des Projektes	ZIM-Netzwerk LocaSenz/ online	24.09.20
Aus- und Weiterbildung	Zwei wissenschaftliche Mitarbeiter wurden mit dem Ziel der Promotion eingestellt.	Projektbearbeitung	Gesamte Laufzeit
PA-Sitzung	Die Forschungsergebnisse werden fortlaufend im PA diskutiert und die weitere Vorgehensweise abgestimmt.	PA1 - Projektvorstellung und Diskussion zu den geplanten Arbeiten.	05.10.21
PA-Sitzung	Die Forschungsergebnisse werden fortlaufend im PA diskutiert und die weitere Vorgehensweise abgestimmt.	PA2 - Darstellung der Ergebnisse, Diskussion zum weiteren Vorgehen.	26.04.22
PA-Sitzung	Die Forschungsergebnisse werden fortlaufend im PA diskutiert und die weitere Vorgehensweise abgestimmt.	PA3 - Darstellung der Ergebnisse, Diskussion zum weiteren Vorgehen.	27.09.22
Vortrag	Transfer in die Wirtschaft durch Vorstellung vor einem breiten Fachpublikum	IUTA-AnalytikTag 2022	10.11.22
Publikation in einer Fachzeitschrift	Ergebnistransfer in Wirtschaft und Wissenschaft	Publikation ausgewählter Ergebnisse im Peer-Review Journal Chromatographia (DOI:10.1007/s10337-022-04228-x)	12.12.22
Maßnahmen nach Projektende	**Ziel**	**Rahmen**	**Zeitraum**
Mindestens zwei Publikationen in einer Fachzeitschrift	Ergebnistransfer in Wirtschaft und Wissenschaft	Publikationen ausgewählter Ergebnisse im Peer-Review Journal Analytical Chemistry	II.+III. Quartal 2023
Präsentation der Ergebnisse in Form von Postern und Vorträgen	Ergebnistransfer in die Wissenschaft	ANAKON 2023	11.04. – 14.04.23
Präsentation der Ergebnisse in Form von Postern und Vorträgen	Ergebnistransfer in die Wissenschaft	HPLC 2023	18.06. – 22.06.23
Beratung von KMU	Schnelle Verbreitung des Standes der Projektbearbeitung.	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend durchgeführt.	Fort-laufend

5.4 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurden die Transfermaßnahmen benannt. Hieraus geht hervor, dass seitens der Forschungseinrichtungen zahlreiche Maßnahmen unternommen wurden und auch zukünftig unternommen werden, um eine breite Öffentlichkeit zu erreichen.

Das Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. verfügt über ein großes interdisziplinäres wissenschaftliches Netzwerk und arbeitet im Rahmen von Innovationsprogrammen als auch der Normungstätigkeit im DIN eng mit kleinen und mittleren Unternehmen zusammen.

Aufgrund der teils langjährigen Erfahrungen und Arbeiten in Kooperation mit KMU besteht auch hier ein ausgezeichnetes Industrie-Netzwerk, das einen optimalen Wissenstransfer in die Wirtschaft ermöglicht. Es wird angestrebt, im Rahmen einer weiteren FuE-Maßnahme über das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand die technische Entwicklung des Demonstrators zu einem Prototypen zu forcieren. Die Weiterentwicklung der vertieften Datenauswertung und -analyse erfolgt in einem aktuell laufenden ZIM-Projekt.

Abschließend ist zu konstatieren, dass das ursprüngliche Transferkonzept in weiten Teilen entsprechend der im ursprünglichen Forschungsantrag dargelegten Strategie umgesetzt werden konnte und weiterhin wie geplant realisiert werden kann.

6 Verwendung der Zuwendung

6.1 Forschungsstelle (IUTA e. V.)

6.1.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurde wissenschaftlich-technisches Personal insgesamt über 33,2 Personenmonate eingesetzt. Die Überschreitung zu den bewilligten 28,25 Personenmonate wurde rechtzeitig angezeigt.

6.1.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

entfällt

6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

entfällt

6.2 Forschungsstelle (HHU)

6.2.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurden die im Antrag vorgesehenen Einsatzzeiten erbracht. Im Einzelnen erfolgten die Arbeiten des Angestellten mit wiss. Ausbildung (HPA-A) über 27 Personenmonate (bewilligt 27 Personenmonate).

6.2.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Im Berichtszeitraum wurden 1 Stück NeCu Deep UV-Laser 250 mW (22.843,88 €) nach Einzelansatz B des Finanzierungsplans von der HHU angeschafft (bewilligt: 26.260,00 €). Diese Geräte waren für die Bearbeitung der AP 1, 5 und 6 notwendig.

6.2.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

Entfällt

7 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag, d. h. die geleisteten Arbeiten waren für den Projekterfolg notwendig und angemessen.

8 Literaturverzeichnis

(1) Vedad, J.; Reilly, L.; Desamero, R. Z. B.; Mojica, E.-R. E. Quantitative Analysis of Xylene Mixtures Using a Handheld Raman Spectrometer. In *Raman Spectroscopy in the Undergraduate Curriculum*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 2018; Vol. 1305, pp 129–152. https://doi.org/doi:10.1021/bk-2018-1305.ch008.

(2) Kottke, D.; Burckhardt, B. B.; Breitkreutz, J.; Fischer, B. Application and Validation of a Coaxial Liquid Core Waveguide Fluorescence Detector for the Permeation Analysis of Desmopressin Acetate. *Talanta* **2021**, *226* (January). https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122145.

(3) Rothschild, M.; Sedlacek, J. H. C. Laser-Induced Damage in Pellicles at 193 Nm. *Optical Engineering* **1993**, *32* (10), 2421. https://doi.org/10.1117/12.146852.

(4) *Gelbe Liste*. https://www.gelbe-liste.de.

(5) Reinders, L. M. H.; Klassen, M. D.; Teutenberg, T.; Jaeger, M.; Schmidt, T. C. Comparison of Originator and Biosimilar Monoclonal Antibodies Using HRMS, Fc Affinity Chromatography, and 2D-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2022**, *414* (23), 6761–6769. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04236-8.

(6) Reinders, L. M. H.; Klassen, M. D.; Endres, P.; Krumm, A.; Jaeger, M.; Schmidt, T. C.; Teutenberg, T. Development of a Two-Dimensional Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry Method for the Characterization of Monoclonal Antibodies in Cell-Free Culture Supernatant via FcR Affinity Chromatography. *Chromatographia* **2022**. https://doi.org/10.1007/s10337-022-04228-x.

(7) HPLC-Säule Zur Auftrennung von Antikörpern. *Produkt Nachricht*. 2021.

(8) Camaggi, C. M.; Comparsi, R.; Strocchi, E.; Testoni, F.; Pannuti, F. HPLC Analysis of Doxorubicin, Epirubicin and Fluorescent Metabolites in Biological Fluids. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1988**, *21* (3), 216–220. https://doi.org/10.1007/BF00262773.

(9) Ferrara, C.; Grau, S.; Jaǧer, C.; Sondermann, P.; Bruñker, P.; Waldhauer, I.; Hennig, M.; Ruf, A.; Rufer, A. C.; Stihle, M.; Umanã, P.; Benz, J. Unique Carbohydrate-Carbohydrate Interactions Are Required for High Affinity Binding between FcγRIII and Antibodies Lacking Core Fucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (31), 12669–12674. https://doi.org/10.1073/pnas.1108455108.

(10) Dekkers, G.; Plomp, R.; Koeleman, C. A. M.; Visser, R.; Von Horsten, H. H.; Sandig, V.; Rispens, T.; Wuhrer, M.; Vidarsson, G. Multi-Level Glyco-Engineering Techniques to Generate IgG with Defined Fc-Glycans. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 1–12. https://doi.org/10.1038/srep36964.

(11) Reinders, L. M. H.; Klassen, M. D.; Endres, P.; Krumm, A.; Jaeger, M.; Schmidt, T. C.; Teutenberg, T. Development of a Two-Dimensional Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry Method for the Characterization of Monoclonal Antibodies in Cell-Free Culture Supernatant via FcR Affinity Chromatography. *Chromatographia* **2022**. https://doi.org/10.1007/s10337-022-04228-x.

(12) Agilent Technologies. Agilent InfinityLab 2D-LC Solutions. In *Quick Installation Guide*; 2018; p 22.

(13) Post, C.; Brülisauer, S.; Waldschläger, K.; Hug, W.; Grüneis, L.; Heyden, N.; Schmor, S.; Förderer, A.; Reid, R.; Reid, M.; Bhartia, R.; Nguyen, Q.; Schüttrumpf, H.; Amann, F. Application of Laser-Induced, Deep UV Raman Spectroscopy and Artificial Intelligence in Real-Time Environmental Monitoring—Solutions and First Results. *Sensors*. 2021. https://doi.org/10.3390/s21113911.

(14) Thorley, F. C.; Baldwin, K. J.; Lee, D. C.; Batchelder, D. N. Dependence of the Raman Spectra of Drug Substances upon Laser Excitation Wavelength. *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, *37* (1–3), 335–341. https://doi.org/10.1002/jrs.1446.

(15) Wen, Z.-Q. Raman Spectroscopy of Protein Pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences* **2007**, *96* (11), 2861–2878.

(16) Dolui, S.; Mondal, A.; Roy, A.; Pal, U.; Das, S.; Saha, A.; Maiti, N. C. Order, Disorder, and Reorder State of Lysozyme: Aggregation Mechanism by Raman

Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2020**, *124* (1), 50–60. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b09139.

(17) Xing, L.; Fan, W.; Chen, N.; Li, M.; Zhou, X.; Liu, S. Amyloid Formation Kinetics of Hen Egg White Lysozyme under Heat and Acidic Conditions Revealed by Raman Spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **2019**, *50* (5), 629–640. https://doi.org/10.1002/jrs.5567.

(18) Ettah, I.; Ashton, L. Engaging with Raman Spectroscopy to Investigate Antibody Aggregation. *Antibodies* **2018**, *7* (3), 24. https://doi.org/10.3390/antib7030024.

(19) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, Ltd., 2001.

(20) Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K. M.; Kaczor, A.; Pilarczyk, M.; Baranska, M. Raman Spectroscopy of Proteins: A Review. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44* (8), 1061–1076. https://doi.org/10.1002/jrs.4335.