



forschen.  
vernetzen.  
anwenden.

# Innovationsreport 2023

Industrielle Gemeinschaftsforschung

IGF-Forschungsvorhaben 21309 N

## Entwicklung eines umfassenden Non-Target-Screening Verfahrens durch Kopplung von Flüssigkeits- und Gaschromatografie zur Aufklärung unbekannter chemischer Verbindungen – ComScreen (Comprehensive Screening)

**Laufzeit:**

01.08.2020 – 31.07.2023

**Beteiligte Forschungsstelle(n):**

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

# Schlussbericht vom 04.01.2024

---

zu IGF-Vorhaben Nr. 21309 N

## Thema

Entwicklung eines umfassenden Non-Target-Screening-Verfahrens durch Kopplung von Flüssigkeits- und Gaschromatografie zur Aufklärung unbekannter chemischer Verbindungen

## Berichtszeitraum

01.08.2020 - 31.07.2023

## Forschungsvereinigung

Umweltechnik

## Forschungseinrichtung(en)

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

Gefördert durch:

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
1 Einleitung und Zielsetzung des Projektes .....	11
2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse .....	12
2.1 Einleitung .....	12
2.2 Entwicklung der Ventilschaltung für den LC-ESI-MS Modus .....	13
2.3 Methodenentwicklung und Flusswegeoptimierung zur Restwasserabtrennung für die GC-MS Analyse .....	29
2.4 Kopplung von LC und GC auf ein hochauflösendes Massenspektrometer zur Non-Target Analytik .....	32
2.5 Integration der Ionenmobilität als weitere Trennstufe .....	36
2.6 Datahandling und Reduktion von Informationen durch automatisierte Softwareskripte zur zielgerichteten Identifikation unbekannter chemischer Verbindungen .....	40
3 Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele .....	48
3.1 Entwicklung der Ventilschaltung für den LC-ESI-MS-Modus .....	48
3.2 Methodenentwicklung und -optimierung zur Restwasserabtrennung für die GC-MS Analyse .....	48
3.3 Kopplung von LC und GC und Übertrag der Methodik auf ein hochauflösendes Massenspektrometer zur Non-Target Analytik .....	48
3.4 Integration der Ionenmobilität als weitere Trennstufe .....	49
3.5 Datahandling und Reduktion von Informationen durch automatisierte Softwareskripte zur zielgerichteten Identifikation unbekannter chemischer Verbindungen .....	50

4	Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten .....	51
5	Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft .....	53
5.1	Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses .....	53
5.2	Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen .....	53
5.3	Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen .....	53
5.4	Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts .....	55
6	Verwendung der Zuwendung .....	56
6.1	Forschungseinrichtung (IUTA e. V.) .....	56
6.1.1	Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) .....	56
6.1.2	Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans) .....	56
6.1.3	Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans).....	56
7	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit .....	57

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chromatogramme des Leitmixes. Mobile Phase: (A) Wasser + 0,1% FA, (B) Acetonitril + 0,1% FA; Analytkonzentration: 0,001 mg mL<sup>-1</sup> in A:B 80:20; Stationäre Phase: Zorbax Eclipse Plus C18 [50 x 2,1 mm, 1,8 µm (vollporöser Partikel)], Raptor ARC-18 [50 x 2,1 mm, 2,7 µm (Core-Shell Partikel)]; Ionisation: ESI positiv, Detektion: MSD im TIC *m/z* 100 – 850. .... 14

Abbildung 2: Simulierte Chromatogramme für die unpolaren Analyten auf der (1) Raptor-Säule (Core-Shell) und der (2) Zorbax-Säule (vollporöse Partikel). Der dargestellte, simulierte Gradient beginnt mit einer 25-minütigen wässrigen isokratischen Anreicherungsphase und einem anschließenden fünfminütigen Gradienten auf 80% Anteil organischen Lösemittels. Die Simulation wurde für eine Flussrate von 0,5 mL min<sup>-1</sup> durchgeführt und ergibt somit ein theoretisches Anreicherungsvolumen von 12,5 mL. .... 16

Abbildung 3: Chromatogramme der polaren Fraktion zur Bestimmung des Anteils des organischen Lösemittels bei der Anreicherung der polaren Analyten auf der HLB-Säule (oben) und auf der PGC-Säule (unten). Mobile Phase: (A) Wasser + 0,1% FA, (B) Acetonitril + 0,1% FA; Analytkonzentration: 0,01 mg mL<sup>-1</sup> in A:B 80:20; Stationäre Phase: HLB-Säule (30 x 2,1 mm; 20 µm), PGC-Säule (50 x 2,1 mm; 3 µm); Ionisation: ESI positiv, Detektion: MSD im TIC *m/z* 100 – 850. .... 17

Abbildung 4: Foto des Gesamtaufbaus der Säulenschaltung mit Beschriftung der Module. Der weiße Kreis stellt den Bereich dar, der in Abbildung 5 noch einmal vergrößert aufgenommen wurde. .... 18

Abbildung 5: Vergleich des modifizierten Ventils (links, Foto) mit der geplanten Schaltung (rechts, Skizze). Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgt die Zuordnung der einzelnen Ausgänge der Ventile anhand einer Nummerierung..... 19

Abbildung 6: Darstellung des modifizierten Konzeptes zur Vereinigung der Kapillarwege vor dem Massenspektrometer im Säulenauswahlventil des zweiten Säulenofens. Hierzu wurde der Waste-Ausgang (Port 1 ASM Ventil mit Port 3\* 2D-MCT-Ventil) und der RP-Ausgang (Port 7 ASM Ventil mit Port 2\* 2D-MCT-Ventil) mit dem Säulenauswahlventil, an dem bereits die HILIC-Säule angeschlossen war, verbunden. BPR beschreibt den Gegendruckregulator (Back Pressure Regulator). 20

Abbildung 7: Darstellung der Gradientenprogramme mit den entsprechenden Ventilstellungen und Kapillarwegen.....	20
Abbildung 8: Vergleich der Standardinjektion (10 µL, orange) mit der großvolumigen Injektion (900 µL, blau) für den Referenzmix. Der Gradient ist mit der grauen gepunkteten Linie und dem entsprechenden Anteil organischen Lösungsmittels auf der rechten y-Achse dargestellt. Die vier Phasen der generischen Säulenschaltung sind: I Anreicherung, II Trennung auf der RP-Phase, III Trennung und anschließende Äquilibration auf der HILIC-Phase und IV Äquilibration von RP- und PGC-Phase. Die Substanzen im Referenzmix können wie folgt zugeordnet werden: 1 Iohexol, 2 Cefazolin, 3 Clindamycin, 4 Prednisolon, 5 Clarithromycin, 6 Candesartan, 7 Tamoxifen, 8 Allopurinol, 9 Thioguanin, 10 Ioversol.....	22
Abbildung 9: Vergleich des Einflusses der Bypass-Verdünnung auf die HILIC-Fraktion für Allopurinol (1), Thioguanin (2) und Ioversol (3) bei Verwendung der PGC-Kartusche zur Anreicherung. Deaktivierter Bypass ohne Verdünnung (orange) und aktivierter Bypass mit Verdünnung (blau) wurden verglichen. ....	23
Abbildung 10: Konfiguration der Säulenschaltung mit der Nummerierung der Anschlüsse. Die Nummerierung der Ventilanschlüsse erfolgte nach Angaben des Herstellers. P 1, P 2 und P 3 bezeichnen die binären Pumpen 1, 2 und 3. ....	24
Abbildung 11: Vergleich der Auswirkungen der Verdünnung durch eine zusätzliche Pumpe im Verhältnis 1:1, 2:1 und 1:2 (Pumpe 2:Pumpe 3) für die HILIC-Fraktion für Allopurinol, Thioguanin und Ioversol bei Verwendung der PGC-Kartusche für die Anreicherung. Verglichen wurden 1:1-Verdünnung (orange), 2:1-Verdünnung (blau) und 1:2-Verdünnung (grün). ....	25
Abbildung 12: Erkannte Features in den drei Phasen der Säulenschaltung Anreicherung, RP-Trennung und HILIC-Trennung in Abhängigkeit der Ionisation mit Angabe der Abweichung innerhalb der Messungen (n=3).....	26
Abbildung 13: MetFrag-Kandidaten für Features mit mindestens zwei korrekt zugeordneten MS <sup>2</sup> -Spuren und einem MetFrag-Score über 0,5 aus der PubChem-Bibliothek für die RP- (II) und HILIC- (III) Phasen. Die Anzahl der berücksichtigten Kandidaten betrug 192 bzw. 41 für die RP im positiven bzw. negativen Modus und 93 bzw. 27 für die 47 HILIC im positiven bzw. negativen Modus.....	27

Abbildung 14: Punktdiagramm der nachgewiesenen Non-Target Features in der Abwasserprobe. Grau sind Features, die im positiven Ionisierungsmodus detektiert wurden, grün sind Features, die im negativen Ionisierungsmodus bestimmt wurden. Die Linien auf jedem Punkt beschreiben die Peakbreite. Die Phasen sind durch vertikale Linien in I Anreicherung, II RP-Trennung und III HILIC-Trennung unterteilt. ....	28
Abbildung 15: Restwasseranteil in den verschiedenen Fraktionen in Abhängigkeit der Säulenschaltung. Für weitere Details, siehe Text. ....	29
Abbildung 16: Vergleich zwischen den Chromatogrammen der extrahierten Tamoxifem-Ziel-Ionen aus GC-MS- (oben links) und LC-MS-Datensätzen (unten links) sowie den jeweiligen Fragmentierungsprodukten der MS <sup>1</sup> -Daten für die GC-Trennung (oben rechts) und der MS <sup>2</sup> -Daten für die LC-Trennung (unten rechts). ....	34
Abbildung 17: Vergleich der Ähnlichkeit zwischen GC-MS- und LC-MS-Daten auf der Grundlage der <i>m/z</i> -Werte in der Feature-Liste der gleichen Abwasserprobe, die in beiden Konfigurationen gemessen wurde. ....	35
Abbildung 18: Spektren eines Gemischs chemischer Standards, gemessen mit Ionenmobilität im alternierende Frames-Modus (d. h. keine Kollisionsenergie für MS <sup>1</sup> -Daten in grau und Kollisionsenergie von 20 eV für MS <sup>2</sup> -Daten in grün). ....	36
Abbildung 19: Spektren für die Drifftrennung von Sotalol ( <i>m/z</i> 273 und Driftzeit von 20 Millisekunden) und dem dehydrierten Sotalol ( <i>m/z</i> 255 und Driftzeit von 19 Millisekunden). Beide Verbindungen haben die gleiche chromatografische Retentionszeit. ....	38
Abbildung 20: Spektren mit Drifftrennung der chemischen Standards, dargestellt durch das jeweilige <i>m/z</i> (links), die für die Kalibrierung der Kollisionsquerschnittswerte (CCS) entsprechend der Driftzeit (rechts) verwendet werden. ....	39
Abbildung 21: Schema der wichtigsten grundlegenden und fortgeschrittenen Workflow-Schritte für die MS-Datenverarbeitung im Non-Target-Screening. ....	40
Abbildung 22: Schema der Rahmen- und Klassenstruktur, die in dem entwickelten R-Paket verwendet wird. ....	42

Abbildung 23: Workflow-Konzept für das Klassenobjekt msData im R-Paket ntsIUTA. .....	44
Abbildung 24: a) Überblick über die Anzahl der Feature-Gruppen direkt nach der Feature-Gruppierung und nach Anwendung der Basisfilter; (b) Übersicht über die Anzahl der Feature-Gruppen für jeden Behandlungsschritt.....	45
Abbildung 25: a) Kontinuierliche Kontrolle der Datenqualität mit Hilfe der internen Standards (IS), die bei allen Analysen aufgestockt werden. Wiederfindung von aufgestocktem Diclofenac-d4 für jede Probenwiederholungsgruppe während der Probenahmekampagne. B) Massenabweichung (in ppm) des berechneten Features <i>m/z</i> für jeden internen Standard während der Probenahmekampagne. ....	46
Abbildung 26: Darstellung der im Rahmen von streamFind aktiv geförderten sowie der assoziierten (Netzwerk-)Partner. ....	52

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Leitsubstanzen mit breitem Polaritätsspektrum.....	13
Tabelle 2: Auflistung der Retentionsfaktoren $k$ der Analyten des Leitmixes auf den RP-Säulen. ....	14
Tabelle 3: Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen. ....	54

# Abkürzungsverzeichnis

## Abkürzung Beschreibung

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
ASM	Active Solvent Modulation (Aktive Lösemittel Modulierung)
BPR	Back-pressure Regulator (Gegendruckregulator)
CCS	Collision Cross Section (Wirkungsquerschnitt)
CE	Collision Energy (Kollisionsenergie)
DAD	Diodenarraydetektor
DBDI	Dielectric Barrier Discharge Ionisation (Dielektrische Barriere-Entladungsisolation)
DDA	Data Dependent Acquisition (Datenabhängige Erfassung)
DIA	Data Independent Acquisition (Datenunabhängige Erfassung)
EI	Elektronenionisation
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FA	Formic Acid (Ameisensäure)
GB	Gigabyte
GC	Gaschromatografie
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance (Hydrophil Lipophil Balance)
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (Hochauflösende Massenspektrometrie)
IM	Ionenmobilität
k	Retentionsfaktor

L	Liter
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatografie)
LVI	Large Volume Injection (Großvolumige Direktinjektion)
m/z	Masse zu Ladung
MCT	Multi Column Thermostat (Säulenofen)
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometer
MSD	Massenselektiver Detektor
NTS	Non-Target Screening
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PEC	Polar Enrichment Column (Polare Anreicherungssäule)
PGC	Porous Graphitic Carbon (Poröser Graphitisierter Kohlenstoff)
ppm	Parts per Million
REACH	Regulation concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
SFC	Supercritical Fluid Chromatography (Überkritische Fluidchromatografie)
TIC	Total Ion Current (Totalionenstrom)
TPs	Transformation Products (Transformationsprodukte)
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett

# 1 Einleitung und Zielsetzung des Projektes

Das Ziel des Projektes bestand in der Entwicklung einer umfassenden Non-Target Analyseverfahren auf Basis der Flüssigkeitschromatografie (LC), Gaschromatografie (GC) und Ionenmobilität (IM) sowie der Detektion mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) zur zielgerichteten Identifizierung von unbekannt Substanzen in Wasserproben mittels großvolumiger Direktinjektion (LVI, Large Volume Injection).

Die Aufklärung von unbekannt chemischen Verbindungen, insbesondere von Nebenprodukten, ist in vielen Bereichen der chemischen Industrie, Umwelt- und Lebenswissenschaften von großer Bedeutung. Als Nebenprodukte und Metaboliten werden Substanzen bezeichnet, welche durch abiotische oder biologische Prozesse in neue, meist unbekannt, Produkte umgewandelt werden. Daher werden diese häufig auch als Transformationsprodukte (TPs) bezeichnet.

TPs können beispielsweise bei der (Ab-)Wasseraufbereitung durch natürliche biologische Prozesse als auch durch den gezielten Einsatz von chemischen Behandlungsverfahren (z. B. Chlorung, Ozonung, UV-Desinfektion) gebildet werden. Im Falle der Wasseraufbereitung ist das Ziel solcher Verfahren, Substanzen mit einem unerwünschten toxischen Effekt zu eliminieren. Dabei ist es jedoch möglich, dass durch den Aufbereitungsprozess gebildete TPs auch eine höhere Toxizität aufweisen als ihre Ausgangsprodukte.

Neben den TPs gibt es zudem viele weitere unter REACH registrierte Stoffe, die zu Effekten in der Umwelt führen können. Hierbei handelt es sich u. a. um Pestizide, Azo-Farbstoffe, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), polychlorierte Biphenyle (PCBs) sowie Schmerzmittel wie Diclofenac und Industriechemikalien wie Nonylphenole oder Bisphenol A. Zur Identifizierung von chemischen Verbindungen sowie TPs, die bei der Wasseraufbereitung erzeugt werden, wird aktuell eine Vielzahl unterschiedlicher Analysetechniken und Verfahren für die Probenvorbereitung eingesetzt. Hieraus ergibt sich der große Nachteil, dass kein homogener und in sich geschlossener Datensatz erzeugt wird, sodass keine umfassende und auf einem einheitlichen Standard beruhende Datenauswertung möglich ist. Des Weiteren ist der personelle und instrumentelle Aufwand sehr groß, da verschiedene Verfahren zur Probenvorbereitung mit unterschiedlichen Analysetechniken kombiniert werden.

Genau an diesem Punkt setzt das vom Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. bearbeitete Forschungsvorhaben an, das auf die Entwicklung einer umfassenden und generischen Analysenstrategie abzielt, die die Einzelschritte der Probenvorbereitung, der Trennung mittels Flüssigkeitschromatografie, Gaschromatografie und Ionenmobilität sowie der Detektion mittels hochauflösender Massenspektrometrie umfasst.

## **2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse**

### **2.1 Einleitung**

Um das Projektziel zu erreichen, wurde das Forschungsvorhaben in drei Projektphasen unterteilt. In der ersten Projektphase lag der Fokus auf der Entwicklung einer instrumentell-analytischen Methode, die eine Direktanalyse einer wässrigen Probe mittels Flüssigkeitschromatografie und Gaschromatografie erlaubt. Dazu wurde eine Säulenschaltung mit einer Umkehrphase (RP, Reversed Phase) und einer Grafitphase (PGC, Porous Graphitic Carbon) entwickelt, um polare und unpolare Verbindungen in einem einzigen Analysenlauf zu erfassen. Zusätzlich wurde eine Ventilschaltung entwickelt, um das im System verbliebene Restwasser vor dem Transfer der angereicherten Probe in den GC zu entfernen.

Für die Non-Target Analytik wurde in der zweiten Projektphase die Kopplung mit einem HRMS mit integrierter Ionenmobilität realisiert, sodass beide chromatografischen Systeme mit demselben massenspektrometrischen Detektor verbunden sind.

In der dritten Projektphase erfolgte die Entwicklung einer Auswertestrategie. Die Prozessierung der Rohdaten zur strukturierten Datenerfassung ließ sich durch die Implementierung eines Skriptes in R vollständig automatisieren. Die Datensätze der HRMS-Kopplung konnten im Anschluss durch entsprechende Peak-Picking-Algorithmen generisch ausgewertet werden.

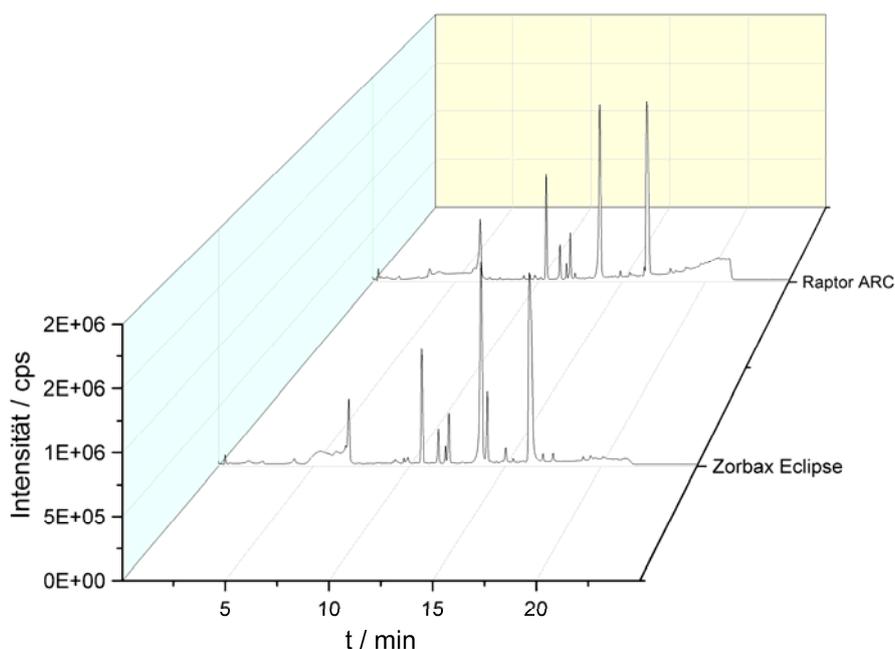
## 2.2 Entwicklung der Ventilschaltung für den LC-ESI-MS Modus

Für die Realisierung der Ventilschaltung wurden Leitsubstanzen ausgewählt, die ein möglichst breites Polaritätsspektrum (mit einem logP-Wert Bereich von -4 bis +6) abdecken und eine entsprechende Gewässerrelevanz besitzen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Leitsubstanzen mit breitem Polaritätsspektrum.

Nr	Chemikalie	logP-Wert	Verwendung	m/z	Zuordnung Fraktion
1	Ioversol	-4,01	Röntgenkontrastmittel	807,8	polar
2	Amoxicillin	-3,06	Antibiotikum	731,2	polar
3	Iohexol	-1,89	Röntgenkontrastmittel	821,8	polar
4	Cefazolin	-0,92	Antibiotikum	477,0	polar
5	Atenolol	0,10	Betablocker	267,1	polar
6	Prednisolon	1,02	Antiallergikum	743,3	unpolar
7	Clindamycin	2,00	Antibiotikum	425,2	unpolar
8	Clarithromycin	3,16	Antibiotikum	748,5	unpolar
9	Candesartan	4,03	Antihypertonikum	441,1	unpolar
10	Tamoxifen	6,34	Estrogenrezeptormodulator	372,2	unpolar

Des Weiteren erfolgte die Zuordnung der Analyten zur polaren bzw. unpolaren Fraktion anhand des Retentionsfaktors  $k$ . Hierfür wurde unter Verwendung einer Umkehrphase bei einer Flussrate von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  rein wässrig eluiert. Anschließend wurde über einen Gradienten von 15 Minuten auf 80% organisches Lösemittel umgespült, um die Analyten zu eluieren. Nach einer isokratischen Stufe von einer Minute wurde für fünf Minuten auf die initialen Bedingungen zurück gespült. Als RP-Säule wurde eine Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD mit vollporösen Partikeln und eine Restek Raptor ARC 18 mit Core-Shell Partikeln genutzt. Die resultierenden Chromatogramme des Leitmixes sind in Abbildung 1 wiedergegeben. Analyten, die bei rein wässriger Elution einen Retentionsfaktor von  $k > 20$  aufwiesen, wurden der unpolaren Fraktion zugeordnet. Einzige Ausnahme bildete Atenolol, da es mit  $k = 20,6$  auf der Zorbax-Säule eigentlich zu den unpolaren Substanzen zählen würde. Da es jedoch nur knapp außerhalb des definierten Bereichs lag und auf der Raptor-Säule eindeutig der polaren Fraktion zugeordnet werden konnte, fand hier eine Umgruppierung zu den polaren Substanzen statt.



**Abbildung 1: Chromatogramme des Leitmixes. Mobile Phase: (A) Wasser + 0,1% FA, (B) Acetonitril + 0,1% FA; Analytkonzentration: 0,001 mg mL<sup>-1</sup> in A:B 80:20; Stationäre Phase: Zorbax Eclipse Plus C18 [50 x 2,1 mm, 1,8 µm (vollporöser Partikel)], Raptor ARC-18 [50 x 2,1 mm, 2,7 µm (Core-Shell Partikel)]; Ionisation: ESI positiv, Detektion: MSD im TIC *m/z* 100 – 850.**

In Tabelle 2 sind die Analyten mit den entsprechenden Retentionsfaktoren aus Abbildung 1 bei unterschiedlichen Anteilen des organischen Lösungsmittels aufgelistet.

**Tabelle 2: Auflistung der Retentionsfaktoren *k* der Analyten des Leitmixes auf den RP-Säulen.**

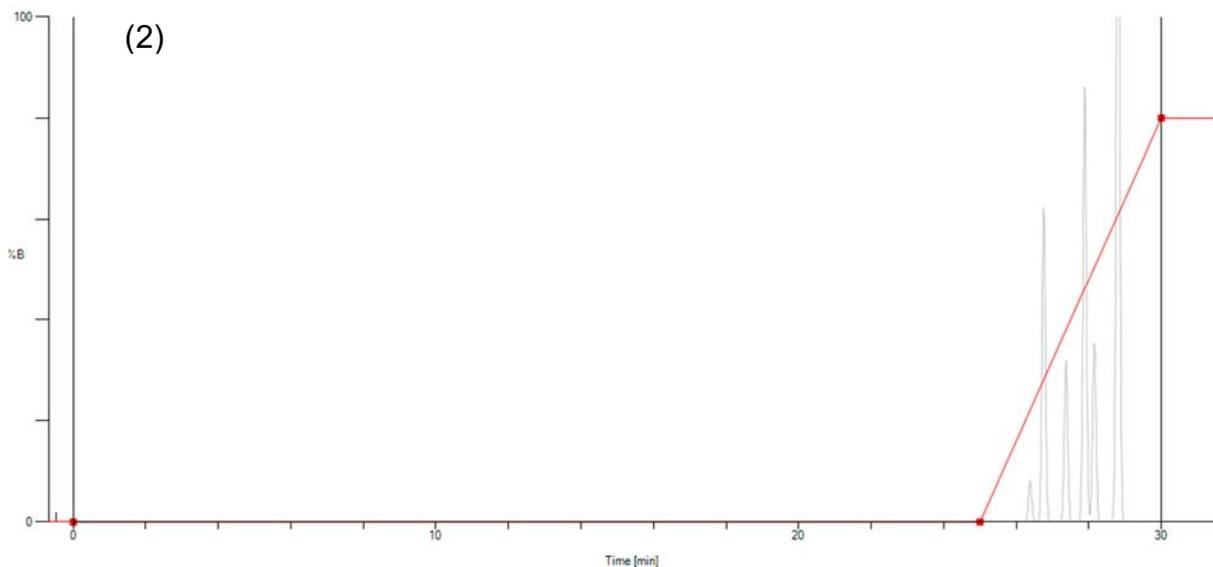
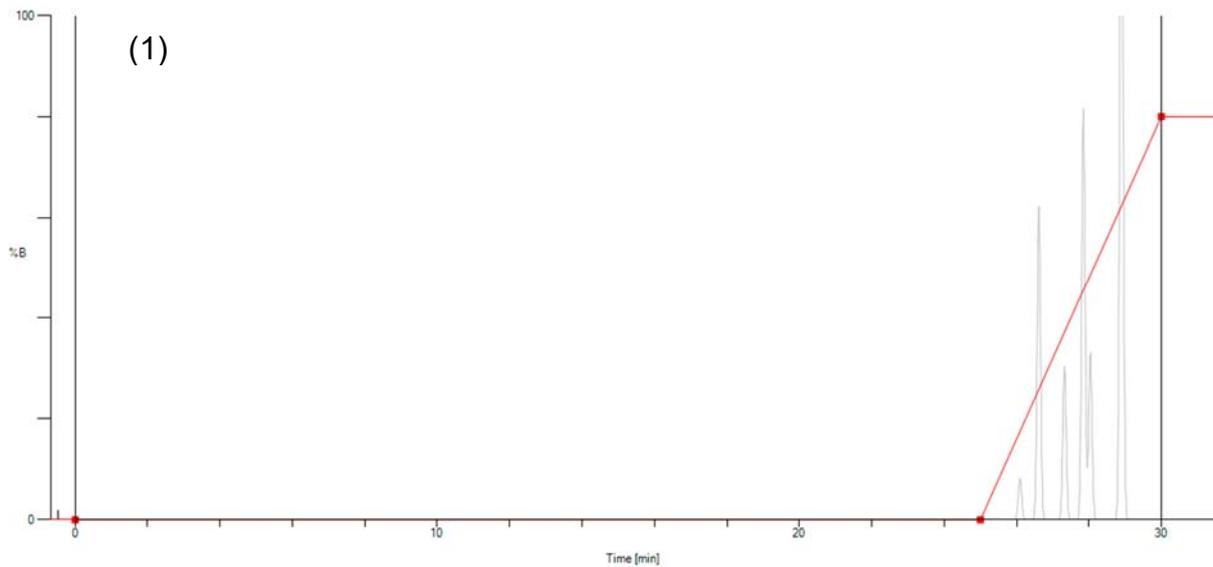
Analyten	<i>k</i> (Raptor ARC 18)	<i>k</i> (Zorbax Eclipse Plus C 18)
loversol	0,4	0,3
Amoxicillin	4,6	10,5
Iohexol	0,4	11,1
Cefazolin	32,3	29,3
Atenolol	18,3	20,6
Prednisolon	42,4	38,5
Clindamycin	37,3	33,7
Clarithromycin	48,4	44,4
Candersatan	49,6	44,3
Tamoxifen	57,5	53,8

Aus Tabelle 2 ergibt sich, dass Ioversol, Amoxicillin, Iohexol und Atenolol den polaren Mix bilden und Cefazolin, Prednisolon, Clindamycin, Clarithromycin, Candertan und Tamoxifen den unpolaren Mix.

Die Bestimmung des möglichen Anreicherungsolumens für die unpolaren Analyten erfolgte unter Nutzung der Chromatografie-Simulationssoftware DryLab. Anhand der simulierten Chromatogramme, die in Abbildung 2 dargestellt sind, wird deutlich, dass die unpolaren Analyten nicht mit einer rein wässrigen mobilen Phase eluiert werden können. Bei einer Flussrate von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  und einer 25-minütigen Anreicherungsphase ergibt sich demzufolge ein theoretisches Anreicherungsolumen von 12,5 mL. Sowohl für die Raptor-Säule als auch für die Zorbax-Säule wies die erste eluierende Substanz, Cefazolin, einen theoretischen Retentionsfaktor von  $k > 95$  auf.

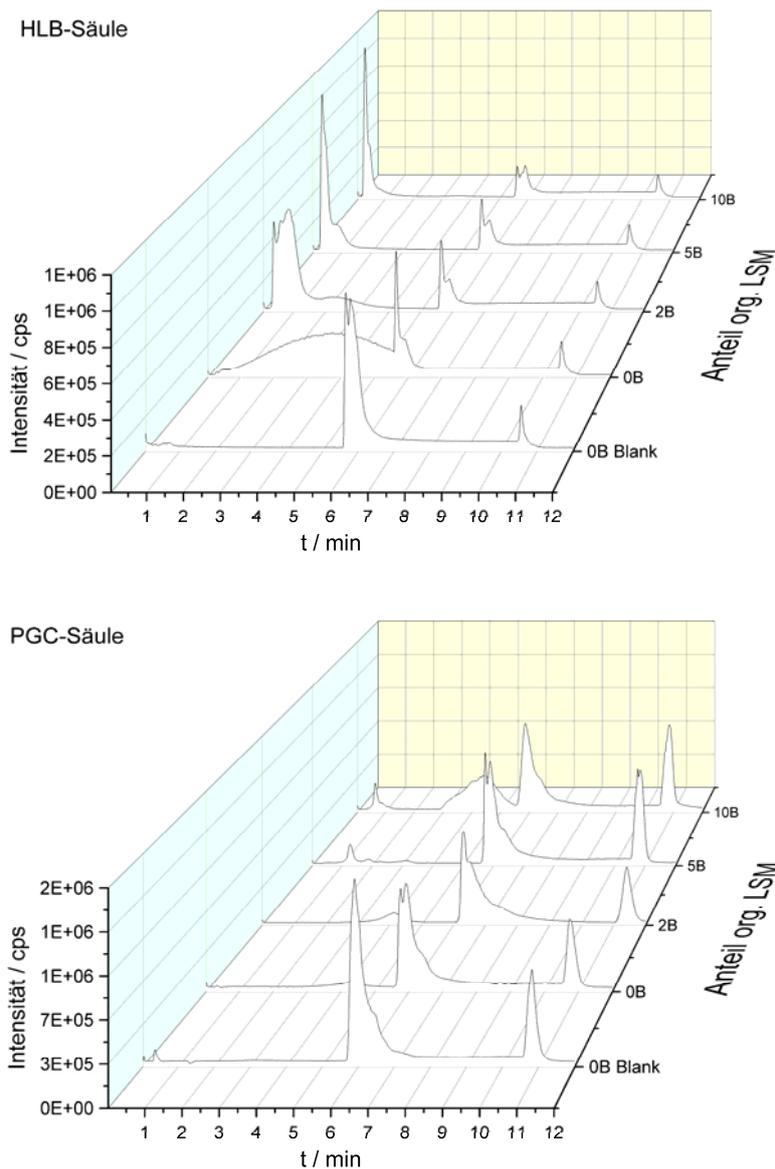
Beide RP-Säulen sind für die adressierte Fragestellung in Bezug auf die chromatografische Effizienz gleichermaßen geeignet. Die Auswahl der RP-Trennsäule erfolgte anhand der Partikelbeschaffenheit. Da im Verlauf des Projektes eine großvolumige Direktinjektion realisiert werden sollte, muss eine Säule mit hoher Beladbarkeit gewählt werden. Diese Voraussetzung wird von der Zorbax-Säule mit vollporösen Partikeln und somit größerer Oberfläche erfüllt.

Für die Messungen zur Ermittlung des initialen Anteils des organischen Lösemittels auf der polaren Anreicherungsäule (PEC, Polar Enrichment Column) wurde ein Stufengradient genutzt. Der Begriff PEC wird hier neu eingeführt und beschreibt die Säulen, die zur Anreicherung der polaren Analyten vorgesehen sind. Hierfür konnte zum einen eine Phase mit porösem, graphitisiertem Kohlenstoff, zum anderen eine Phase mit hydrophiler und lipophiler Modifikation (HLB, Hydrophilic-Lipophilic Balance) verwendet werden.



**Abbildung 2: Simulierte Chromatogramme für die unpolaren Analyten auf der (1) Raptor-Säule (Core-Shell) und der (2) Zorbax-Säule (vollporöse Partikel). Der dargestellte, simulierte Gradient beginnt mit einer 25-minütigen wässrigen isokratischen Anreicherungsphase und einem anschließenden fünfminütigen Gradienten auf 80% Anteil organischen Lösemittels. Die Simulation wurde für eine Flussrate von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  durchgeführt und ergibt somit ein theoretisches Anreichervolumen von 12,5 mL.**

Nach Injektion der Probe wurde für fünf Minuten mit dem initialen Anteil organischen Lösemittels eluiert. Hierbei wurde der initiale Anteil des organischen Lösemittels variiert und auf 0%, 2%, 5% und 10% eingestellt. Anschließend wurde direkt auf 100% organisches Lösemittel umgespült und zehn Minuten das isokratische Plateau gehalten. Danach wurde für zehn Minuten auf die Ausgangsbedingungen zurück gespült. Die resultierenden Chromatogramme sind in Abbildung 3 vergleichend dargestellt.



**Abbildung 3: Chromatogramme der polaren Fraktion zur Bestimmung des Anteils des organischen Lösemittels bei der Anreicherung der polaren Analyten auf der HLB-Säule (oben) und auf der PGC-Säule (unten). Mobile Phase: (A) Wasser + 0,1% FA, (B) Acetonitril + 0,1% FA; Analytkonzentration: 0,01 mg mL<sup>-1</sup> in A:B 80:20; Stationäre Phase: HLB-Säule (30 x 2,1 mm; 20 µm), PGC-Säule (50 x 2,1 mm; 3 µm); Ionisation: ESI positiv, Detektion: MSD im TIC  $m/z$  100 – 850.**

Für die Anreicherung der polaren Analyten auf der HLB-Säule sollte kein organisches Lösemittel zugesetzt werden, da bereits ein Anteil von 2% ausreichend ist, um Amoxicillin, Ioversol und Iohexol zu eluieren. Atenolol kann jedoch auch rein wässrig nicht retardiert werden. Bei Verwendung der PGC-Säule kann der initiale Anteil des organischen Lösemittels maximal 2% betragen, ohne dass eine Elution der polaren Verbindungen erfolgt. Ab einem Anteil von 5% des organischen Lösungsmittels kann nur noch Atenolol retardiert werden.

Als Säule für die Anreicherung der polaren Analyten wurde für alle nachfolgenden Experimente die PGC-Säule verwendet, da zum einen Atenolol angereichert werden kann und zum anderen bei 2% organischem Anteil die Analyten noch ausreichend retardiert werden.

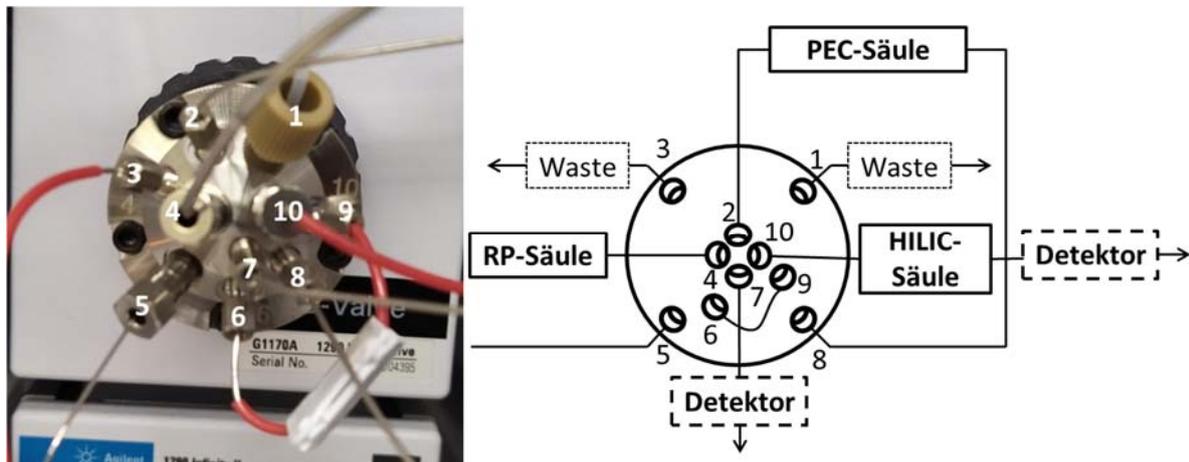
Im weiteren Projektverlauf wurde die Säulenschaltung entwickelt und getestet. Hierfür wurden zunächst die passenden Anschlüsse an den Ventilen und den anderen Bauteilen der Säulenschaltung identifiziert. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung und Optimierung der Kapillarwege und der Kapillarlänge, um das Totvolumen und somit die Bandenverbreiterung zu minimieren.

In Abbildung 4 ist der Gesamtaufbau der Säulenschaltung auf Basis eines 2D-HPLC-Systems der Firma Agilent dargestellt. Dies entspricht dem Aufbau, wie er im Antrag schematisch dargestellt wurde. Es wurde bewusst ein großer Teil der Schaltung in den Säulenöfen integriert, um eine konstante Temperierung aller Kapillaren zu gewährleisten und somit äußere Einflussfaktoren, die zu einer geringeren Robustheit des Verfahrens führen, zu minimieren.



Abbildung 4: Foto des Gesamtaufbaus der Säulenschaltung mit Beschriftung der Module. Der weiße Kreis stellt den Bereich dar, der in Abbildung 5 noch einmal vergrößert aufgenommen wurde.

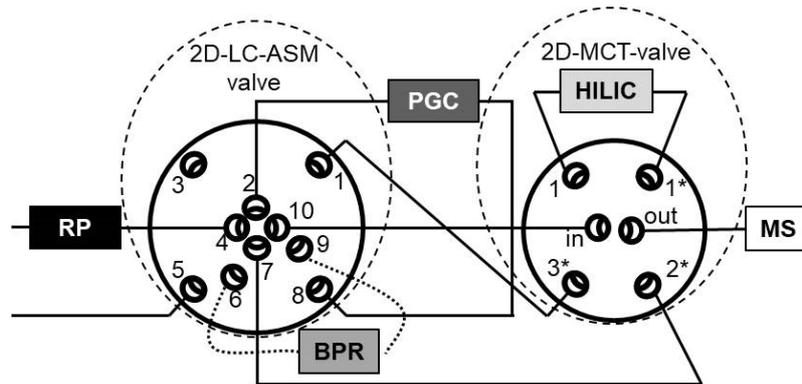
In Abbildung 5 ist der weiß markierte Bereich aus Abbildung 4 vergrößert dargestellt. Neben der Ansicht des Ventils wurde eine Prinzipskizze vergleichend gegenübergestellt, um die Flusswege des Gesamtsystems zu visualisieren.



**Abbildung 5: Vergleich des modifizierten Ventils (links, Foto) mit der geplanten Schaltung (rechts, Skizze). Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgt die Zuordnung der einzelnen Ausgänge der Ventile anhand einer Nummerierung.**

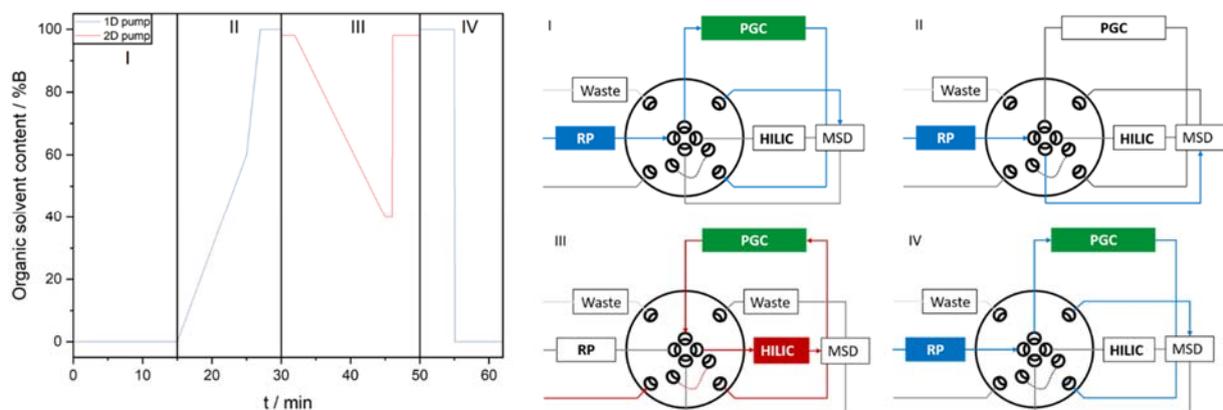
Das von der Firma Agilent entwickelte Konzept des ASM-Ventils (Active Solvent Modulation) konnte für die im Antrag spezifizierten Zielparameter in Bezug auf die großvolumige Direktinjektion einer wässrigen Realprobe nicht ohne eine weitere technische Modifikation verwendet werden. Vor diesem Hintergrund wurde zunächst der Säulenofen direkt an das Ventil angeschlossen. Zuvor war zwischen Säulenofen und Ventil der Diodenarraydetektor (DAD) eingebaut. Dieser wurde aus dem System entfernt, weil aufgrund des durch die PEC-Säule verursachten hohen Gegendrucks (> 60 bar) nicht auszuschließen war, dass die Durchflusszelle beschädigt wird. Anschließend musste die PEC-Säule an die Ports zwei und acht des ASM-Ventils angeschlossen werden. Hierbei ergab sich die Schwierigkeit, dass Anschlüsse mit unterschiedlichem Gewinde, metrisch und zöllisch, zu verbinden waren. Darüber hinaus war die Implementierung des Bypasses zwischen den Ports sechs und neun notwendig, um unterschiedliche Gegendruckregulatoren einzubauen. Nach Optimierung der Säulenschaltung wurden Dichtigkeits- und Schalttests durchgeführt. Alle Flusswege waren bis zu 1.000 bar druckstabil und auch das Schalten des Ventils bei 1.000 bar war problemlos möglich.

Um mit einem Massenspektrometer in einem Analysendurchlauf sowohl polare als auch unpolare Analyten detektieren zu können, wurde die Schaltung, wie in Abbildung 6 dargestellt, modifiziert. Hierzu wurden die Kapillaren aus der RP- und HILIC-Säule sowie dem Waste-Ausgang an Port 1 mit dem Säulenauswahlventil im Säulenofen 2 verbunden. Hierdurch war zusätzlich zur Detektion der HILIC- und RP-Trennung auch die Detektion der Anreicherungs- und Äquilibrierungsphase möglich.



**Abbildung 6:** Darstellung des modifizierten Konzeptes zur Vereinigung der Kapillarwege vor dem Massenspektrometer im Säulenauswahlventil des zweiten Säulenofens. Hierzu wurde der Waste-Ausgang (Port 1 ASM Ventil mit Port 3\* 2D-MCT-Ventil) und der RP-Ausgang (Port 7 ASM Ventil mit Port 2\* 2D-MCT-Ventil) mit dem Säulenauswahlventil, an dem bereits die HILIC-Säule angeschlossen war, verbunden. BPR beschreibt den Gegendruckregulator (Back Pressure Regulator).

Die Schaltzeitpunkte und die Kapillarwege der Säulenschaltung sind in Abbildung 7 dargestellt, wobei in Position I die Anreicherung, in Position II die Trennung der unpolaren Substanzen, in Position III die Trennung der polaren Substanzen und Äquilibrierung der HILIC-Säule und in Position IV die Äquilibrierung der RP- und PGC-Säule stattfindet.

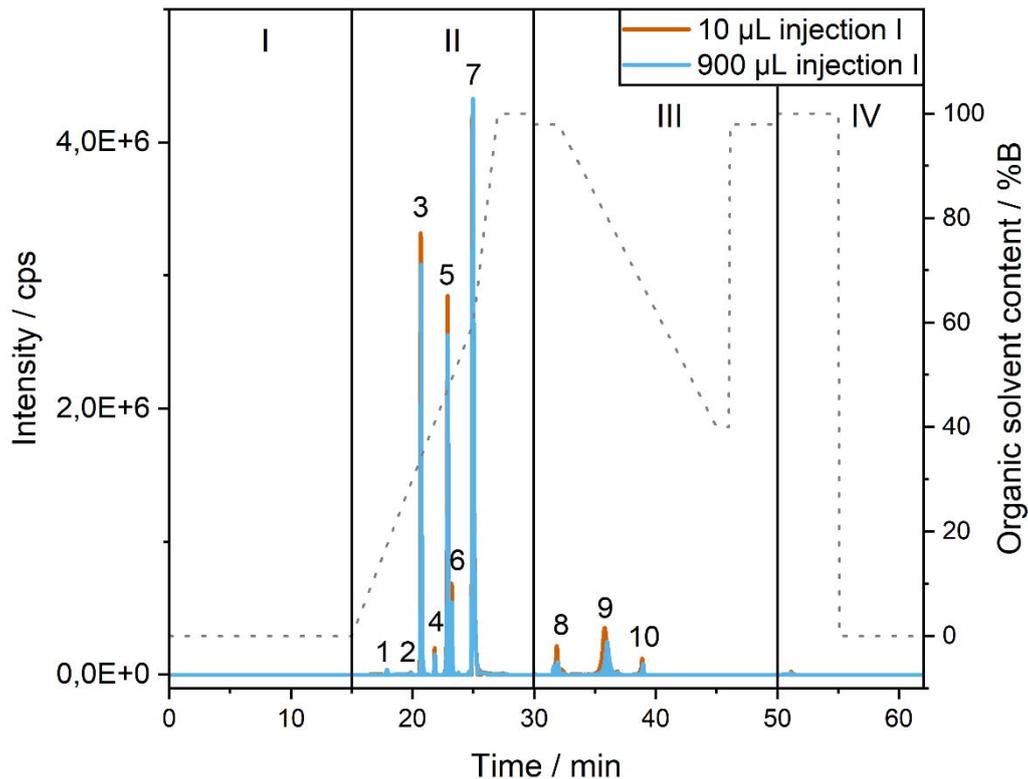


**Abbildung 7:** Darstellung der Gradientenprogramme mit den entsprechenden Ventilstellungen und Kapillarwegen.

Die Säulenschaltung ist das Schlüsselement für eine effektive Kopplung von RPLC und HILIC. In Abbildung 8 sind die Säulenschalt- und Gradientenprogramme sowie die resultierende Trennung der Referenzverbindungen dargestellt. Nach Injektion von 10  $\mu\text{L}$  der Zielreferenzmischung (Tabelle 2 zuzüglich Thioguanin und Allopurinol mit einer Konzentration von  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und Spülen mit 4,5 mL wässriger mobiler Phase bei  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  wurde kein Durchbruch der Analyten beobachtet. Dieses Experiment bestätigte die Anreicherungs- und Fokussierungsfähigkeiten der RP- und PGC-Phase für alle ausgewählten Verbindungen. Ein Analyt, der in keiner der beiden Phasen zurückgehalten wird, eluiert während der Anreicherungsphase, d. h. innerhalb der ersten fünfzehn Minuten des Gesamtlaufs. Ioversol, Allopurinol und Thioguanin wurden nicht auf der RP-Säule zurückgehalten, sondern auf der PGC-Kartusche angereichert, was aufgrund ihrer hohen Polarität zu erwarten war.

Um die Anreicherung mittels LVI zu demonstrieren, wurden 900  $\mu\text{L}$  (mit einer Konzentration von  $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$  für jeden Zielanalyten) injiziert. Die Anpassung der Konzentration war notwendig, um die injizierte Masse für jeden Zielanalyten auf der Säule auf  $0,1 \mu\text{g}$  einzustellen und eine Massenüberladung bei Erhöhung des Injektionsvolumens zu vermeiden. Die Injektion bei einer Flussrate von  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  dauerte drei Minuten. Die restlichen 12 Minuten dienen zum Spülen des Injektors und zum Transport des Probenpfropfens durch das System. Das Injektionsvolumen von 900  $\mu\text{L}$  führte zu einer Volumenüberladung von 140% des effektiven Säulenleervolumens für die RP-Phase. Bei der PGC-Kartusche führte das Injektionsvolumen von 900  $\mu\text{L}$  zu einer Volumenüberladung von 2.600% des effektiven Säulenvolumens.

Im Falle der LVI konnte während der Anreicherung oder Äquilibration keine Elution eines Zielanalyten beobachtet werden. Dabei wurden Iohexol, Cefazolin, Prednisolon, Clindamycin, Clarithromycin, Candesartan und Tamoxifen auf der RP-Säule angereichert. Ioversol, Allopurinol und Thioguanin konnten auf der PGC-Phase angereichert und anschließend auf der HILIC-Säule getrennt werden.



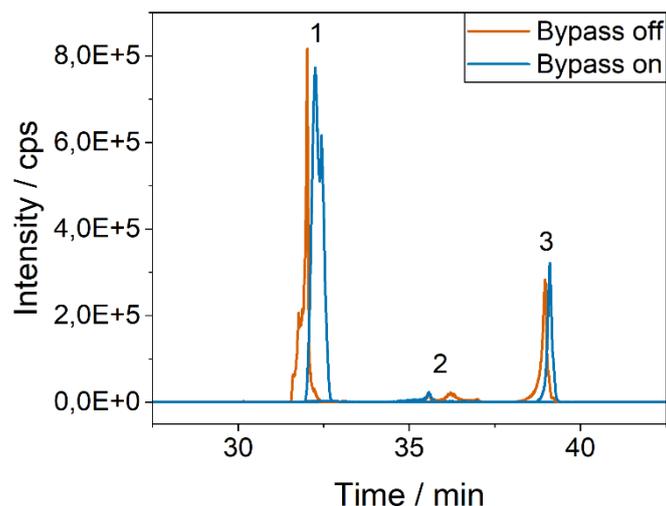
**Abbildung 8:** Vergleich der Standardinjektion (10 µL, orange) mit der großvolumigen Injektion (900 µL, blau) für den Referenzmix. Der Gradient ist mit der grauen gepunkteten Linie und dem entsprechenden Anteil organischen Lösungsmittels auf der rechten y-Achse dargestellt. Die vier Phasen der generischen Säulenschaltung sind: I Anreicherung, II Trennung auf der RP-Phase, III Trennung und anschließende Äquilibration auf der HILIC-Phase und IV Äquilibration von RP- und PGC-Phase. Die Substanzen im Referenzmix können wie folgt zugeordnet werden: 1 Iohexol, 2 Cefazolin, 3 Clindamycin, 4 Prednisolon, 5 Clarithromycin, 6 Candesartan, 7 Tamoxifen, 8 Allopurinol, 9 Thioguanin, 10 Ioversol.

Die Retentionszeitabweichung lag für alle Referenzsubstanzen unter 0,4%. Beim Vergleich der Peakform wurde beobachtet, dass eine größere Abweichung für alle Verbindungen resultiert, die auf der HILIC-Säule eluieren, wenn das Injektionsvolumen von 10 µL auf 900 µL erhöht wird. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die polaren Substanzen, die nicht auf der RP-Phase zurückgehalten werden, auf der PGC-Phase angereichert und nach der Ventilschaltung mit einem organischen Pfropfen eluiert werden. Das in der PGC-Phase enthaltene Restwasser aus der Anreicherungsphase kann dabei nicht vollständig eliminiert werden. Durch den Transfer der Elutionsbande, die die polare Zielfraktion enthält, wird eine Änderung in der Zusammensetzung der mobilen Phase für die HILIC-Trennung induziert. Kleine Änderungen in Bezug auf den Wassergehalt haben einen großen Einfluss auf das Verteilungsgleichgewicht zwischen

der mobilen Phase, die sich in direktem Kontakt zur stationären Phase befindet, was zur Peakverbreiterung führt. Daher musste die Säulenschaltung optimiert werden.

Um die Trennung und die Peakform der polaren Substanzen in der HILIC-Phase zu verbessern, muss das Restwasser, das noch in der PGC-Phase enthalten ist und von der organischen Injektionsfront ausgespült wird, verdünnt werden. Dies wurde erreicht, indem das organische Lösungsmittel über einen Bypass parallel zur PGC-Phase direkt vor die HILIC-Säule dosiert wurde. Die HILIC-Trennung wurde anschließend mit aktiviertem und deaktiviertem Bypass verglichen.

In Abbildung 9 ist anhand der korrespondierenden Chromatogramme (Bypass off versus Bypass on) zu erkennen, dass die Intensität für Allopurinol bei aktivierter und deaktivierter Verdünnung vergleichbar ist. Bei der permanenten Verdünnung kam es jedoch zur Bildung eines Doppelpeaks, der wahrscheinlich auf eine unzureichende Durchmischung der mobilen Phase zurückzuführen ist. Die Verdünnung wirkte sich nachteilig auf Thioguanin aus, das früher eluierte und einen breiteren und weniger intensiven Peak ausbildet. Bei loversol führte die Verdünnung über den Bypass zu einer Verbesserung der Intensität und des Tailing-Faktors sowie zu einer Erhöhung der Retention. Als später eluierende Substanz wird loversol nicht so stark durch den Wasserpfropfen beeinträchtigt.



**Abbildung 9:** Vergleich des Einflusses der Bypass-Verdünnung auf die HILIC-Fraktion für Allopurinol (1), Thioguanin (2) und loversol (3) bei Verwendung der PGC-Kartusche zur Anreicherung. Deaktivierter Bypass ohne Verdünnung (orange) und aktivierter Bypass mit Verdünnung (blau) wurden verglichen.

Eine Einschränkung bei der Verwendung eines Bypasses zur Verdünnung ist, dass das effektive Verdünnungsverhältnis nicht präzise geregelt bzw. kontrolliert werden kann, da sich der Gegendruck der Säule im Verhältnis zur Kapillare nicht genau einstellen lässt. Darüber hinaus kann die Bypass-Kapillare nicht gezielt konditioniert werden. Vor diesem Hintergrund wurde die Säulenschaltung nochmals modifiziert und eine zusätzliche Pumpe zur Verdünnung verwendet, wie in Abbildung 10 dargestellt.

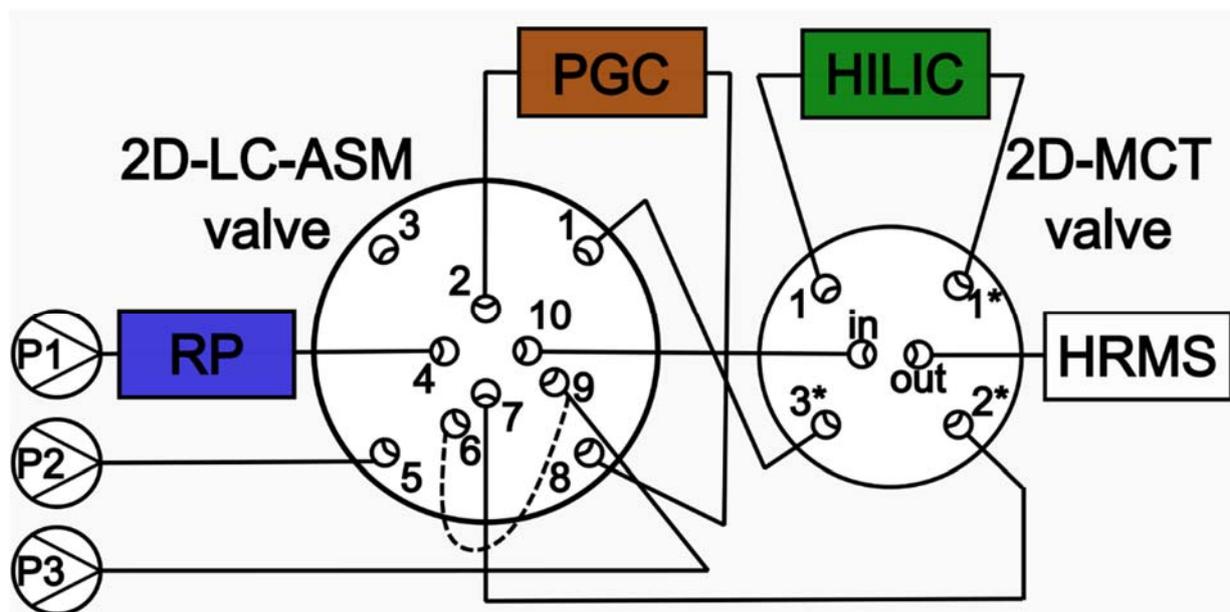
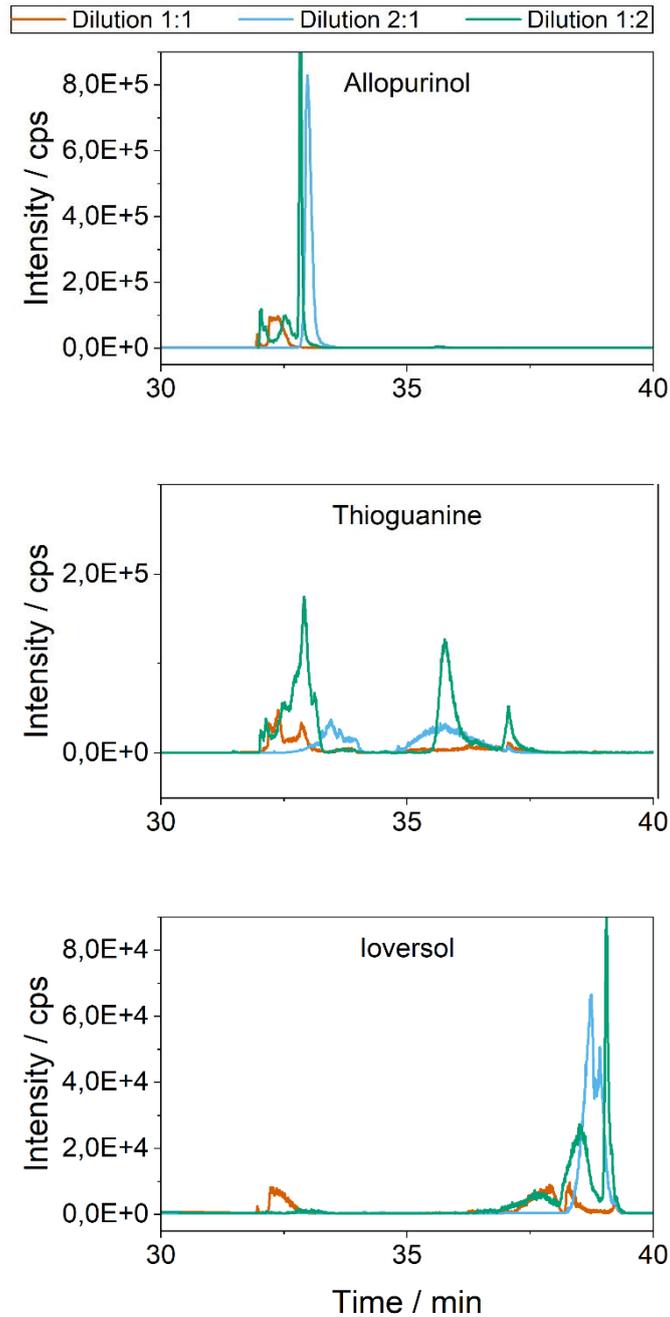


Abbildung 10: Konfiguration der Säulenschaltung mit der Nummerierung der Anschlüsse. Die Nummerierung der Ventilanschlüsse erfolgte nach Angaben des Herstellers. P 1, P 2 und P 3 bezeichnen die binären Pumpen 1, 2 und 3.

Die in Abbildung 11 dargestellten Chromatogramme zeigen, dass das Verdünnungsverhältnis bei Verwendung einer zusätzlichen Pumpe und einer PGC-Kartusche mit einem Verdünnungsverhältnis von 1:2 und 2:1 einen starken Einfluss hat.



**Abbildung 11: Vergleich der Auswirkungen der Verdünnung durch eine zusätzliche Pumpe im Verhältnis 1:1, 2:1 und 1:2 (Pumpe 2:Pumpe 3) für die HILIC-Fraktion für Allopurinol, Thioguanin und loversol bei Verwendung der PGC-Kartusche für die Anreicherung. Verglichen wurden 1:1-Verdünnung (orange), 2:1-Verdünnung (blau) und 1:2-Verdünnung (grün).**

Die 1:1-Verdünnung führt bei allen Analyten zu den schlechtesten Ergebnissen, da die Substanzen als breite, multiple Peaks eluieren und keine oder nur eine geringe Trennung von der Totzeit möglich ist. Dagegen zeigen die Verdünnungsverhältnisse 1:2 und 2:1 eine Verbesserung der Peakform und der Trennung von der

Durchflusszeit. Aus den Daten lässt sich ableiten, dass ein Verdünnungsverhältnis von 1:2 hinsichtlich Peakform und -intensität für alle polaren Referenzverbindungen vorteilhafter ist. Der erhöhte Gehalt an organischem Lösungsmittel reduziert den hohen Wasseranteil des wässrigen Pfropfens und die Verdünnung erfolgt über einen längeren Zeitraum. Daher wurde für alle weiteren Experimente die LVI auf einer PGC-Kartusche mit Verdünnung über eine dritte Pumpe bei einem Verhältnis von 1:2 durchgeführt.

Im Anschluss daran erfolgte eine Target-Analyse mit einem Konzentrationsgradienten der Referenzsubstanzen von 0,1 bis 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Für alle Referenzsubstanzen lag die Retentionszeitabweichung zwischen den Proben für alle Substanzen unter 10 Sekunden. Es ist jedoch anzumerken, dass die Retentionszeitabweichung von der Peakhöhe und -breite beeinflusst wird.

Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde abschließend durch ein Non-Target-Screening (NTS) von Abwasserproben bewertet. Die Messungen wurden im positiven und negativen Ionisierungsmodus durchgeführt. Zur Subtraktion des Hintergrunds wurden Blindproben gemessen. Die Anzahl der relevanten Features für jede Phase nach Elimination der nicht relevanten Features ist in Abbildung 12 für die Abwasserproben dargestellt.

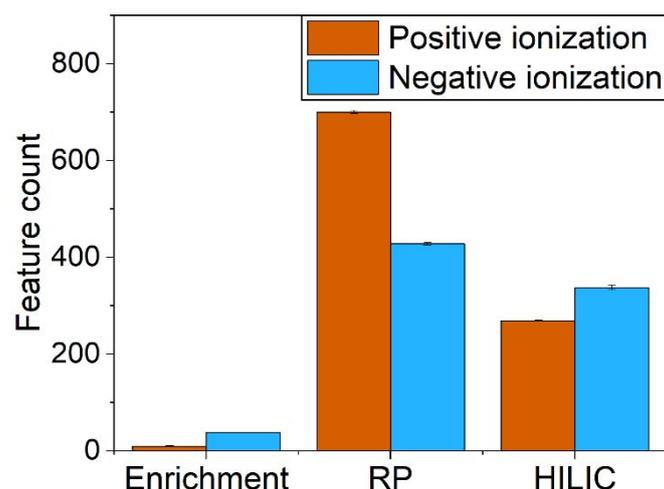
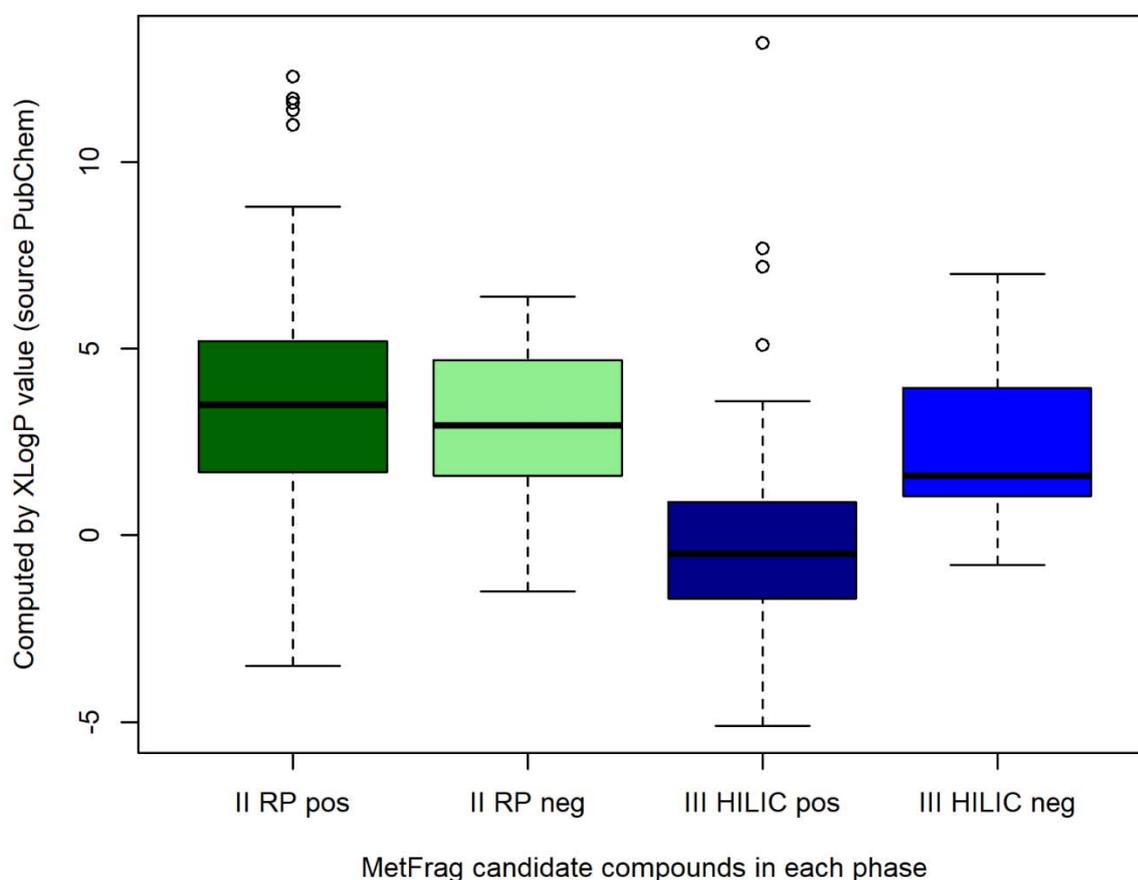


Abbildung 12: Erkannte Features in den drei Phasen der Säulenschaltung Anreicherung, RP-Trennung und HILIC-Trennung in Abhängigkeit der Ionisation mit Angabe der Abweichung innerhalb der Messungen (n=3).

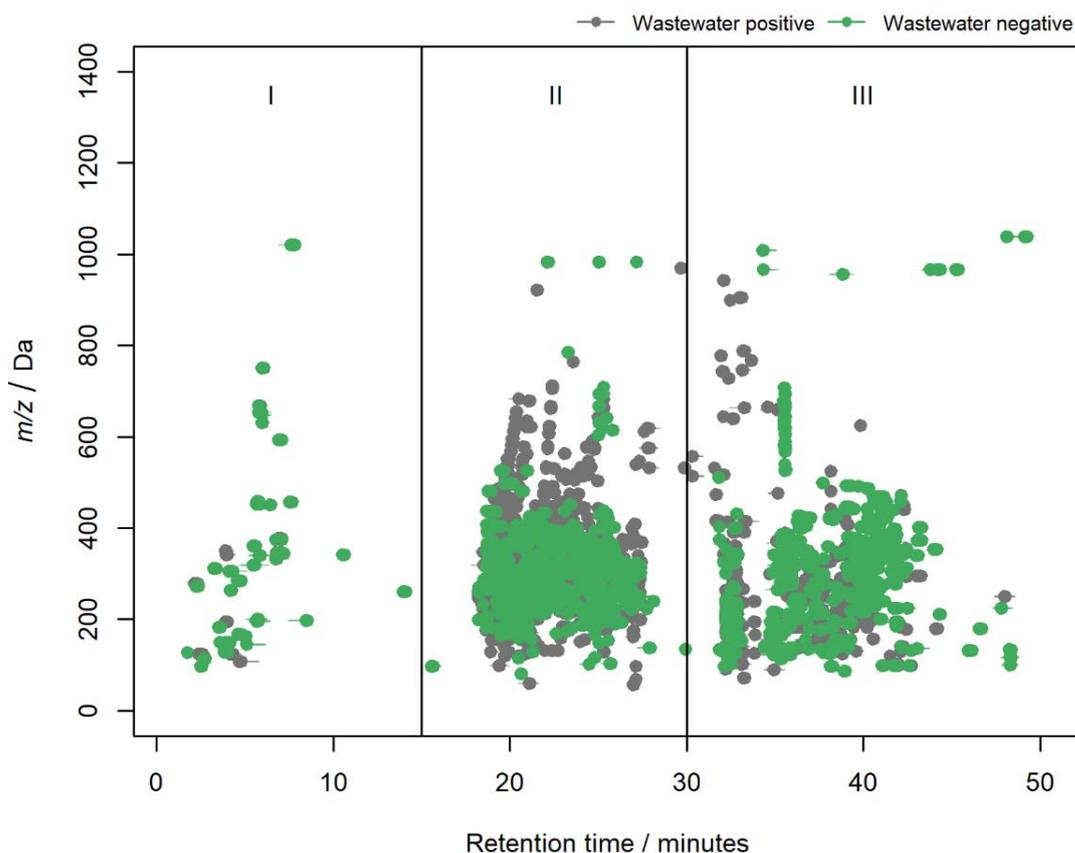
Es konnten insgesamt 269 bzw. 337 Feature in der HILIC-Phase (Phase III in Abbildung 14) im positiven bzw. negativen Ionisierungsmodus nachgewiesen werden. Bei Anwendung der MetFrag-Verbindungssuche unter Verwendung der PubChem-Bibliothek auf die Features mit MS<sup>2</sup>-Spektren aus der RP-Phase (Phase II) und HILIC-Phase (Phase III) wurden für die HILIC-Features im Vergleich zu den RP-Features ein niedrigerer berechneter XlogP-Mittelwert festgestellt (Abbildung 13). Dies ist ein eindeutiges Indiz für die Polarität der in der HILIC-Phase eluierenden Features.



**Abbildung 13: MetFrag-Kandidaten für Features mit mindestens zwei korrekt zugeordneten MS<sup>2</sup>-Spuren und einem MetFrag-Score über 0,5 aus der PubChem-Bibliothek für die RP- (II) und HILIC- (III) Phasen. Die Anzahl der berücksichtigten Kandidaten betrug 192 bzw. 41 für die RP im positiven bzw. negativen Modus und 93 bzw. 27 für die 47 HILIC im positiven bzw. negativen Modus.**

Eine Direktinjektion der wässrigen Probe auf eine HILIC-Säule ist nicht möglich. Würde lediglich eine LVI auf einer RP-Phase durchgeführt, so würden alle Verbindungen, die mit der hier entwickelten Säulenschaltung in der HILIC-Phase erfasst werden, in der

Trotz der RP-Phase als breite Elutionsbanden eluieren. Die deutlich ausgeprägtere Breite der Features in Phase I lässt sich durch den geringeren Fokussierungseffekt im Vergleich zu den Features erklären, die entweder auf der RP- oder PGC-Säule angereichert werden können. Im Gegensatz dazu hatten die in der RP-Phase (Phase II) und HILIC-Phase (Phase III) detektierten Features eine durchschnittliche Breite von  $21 \pm 9$  bzw.  $25 \pm 12$  Sekunden. Trotz der größeren Peakbreite konnten die Features in der Anreicherungsphase mit dem Algorithmus zur Feature-Identifikation aus dem Datensatz extrahiert werden. Ein Screening der Features aus Phase I anhand des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses wurde sowohl bei der RP- (Phase II) als auch bei der HILIC-Trennung (Phase III) durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass kein Austrag von Verbindungen durch eine Volumen- oder Massenüberladung der RP- oder PGC-Säulen erfolgt (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Punktdiagramm der nachgewiesenen Non-Target Features in der Abwasserprobe. Grau sind Features, die im positiven Ionisierungsmodus detektiert wurden, grün sind Features, die im negativen Ionisierungsmodus bestimmt wurden. Die Linien auf jedem Punkt beschreiben die Peakbreite. Die Phasen sind durch vertikale Linien in I Anreicherung, II RP-Trennung und III HILIC-Trennung unterteilt.

## 2.3 Methodenentwicklung und Flusswegeoptimierung zur Restwasserabtrennung für die GC-MS Analyse

Der Restwassergehalt ist ein kritischer Parameter für die Online-Kopplung mit der Gaschromatografie. Dieser Anteil muss so gering wie möglich gehalten werden, um das System vor Schäden zu schützen. Die genaue Bestimmung des Restwasseranteils erfolgte mittels Karl-Fischer-Titration. Dazu wurde die in Abschnitt 2.2 beschriebene Säulenschaltung verwendet und das Eluat fraktioniert gesammelt. Als Titriermittel für die Karl-Fischer-Titration wurde ein Zweikomponentenreagenz mit einer Konzentration von  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet. Die Proben wurden mit einer Spritze direkt aus dem Eluat der LC-Säulenschaltung in den Titrator gegeben und anschließend zurückgewogen. Um die Restwasserabtrennung durch die Flusswegeoptimierung zu untersuchen, wurden fraktionierte Eluate mittel Karl-Fischer-Titration analysiert.

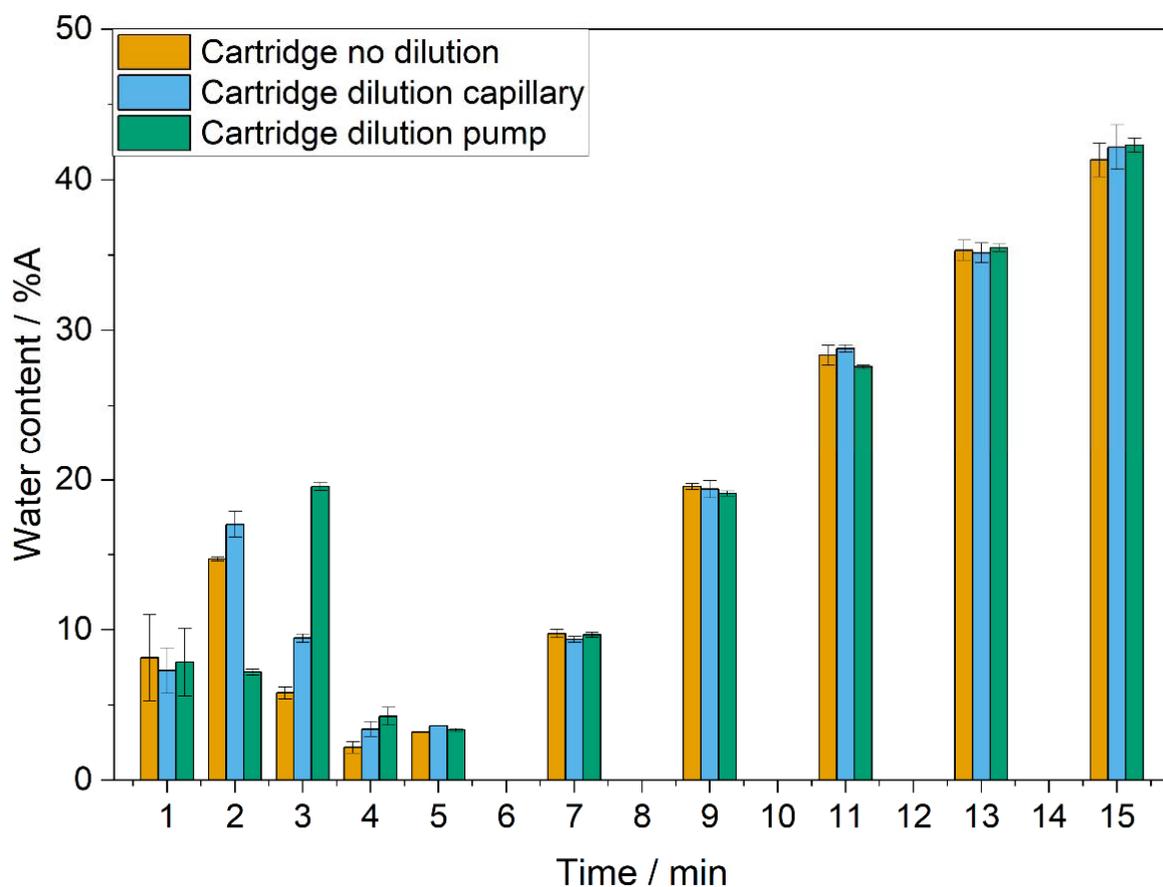


Abbildung 15: Restwasseranteil in den verschiedenen Fraktionen in Abhängigkeit der Säulenschaltung. Für weitere Details, siehe Text.

Zunächst wurde der Restwasseranteil ohne Verdünnung durch das organische Lösungsmittel bestimmt.  
 Diese Messungen mit deaktiviertem Bypass (in Abbildung 15

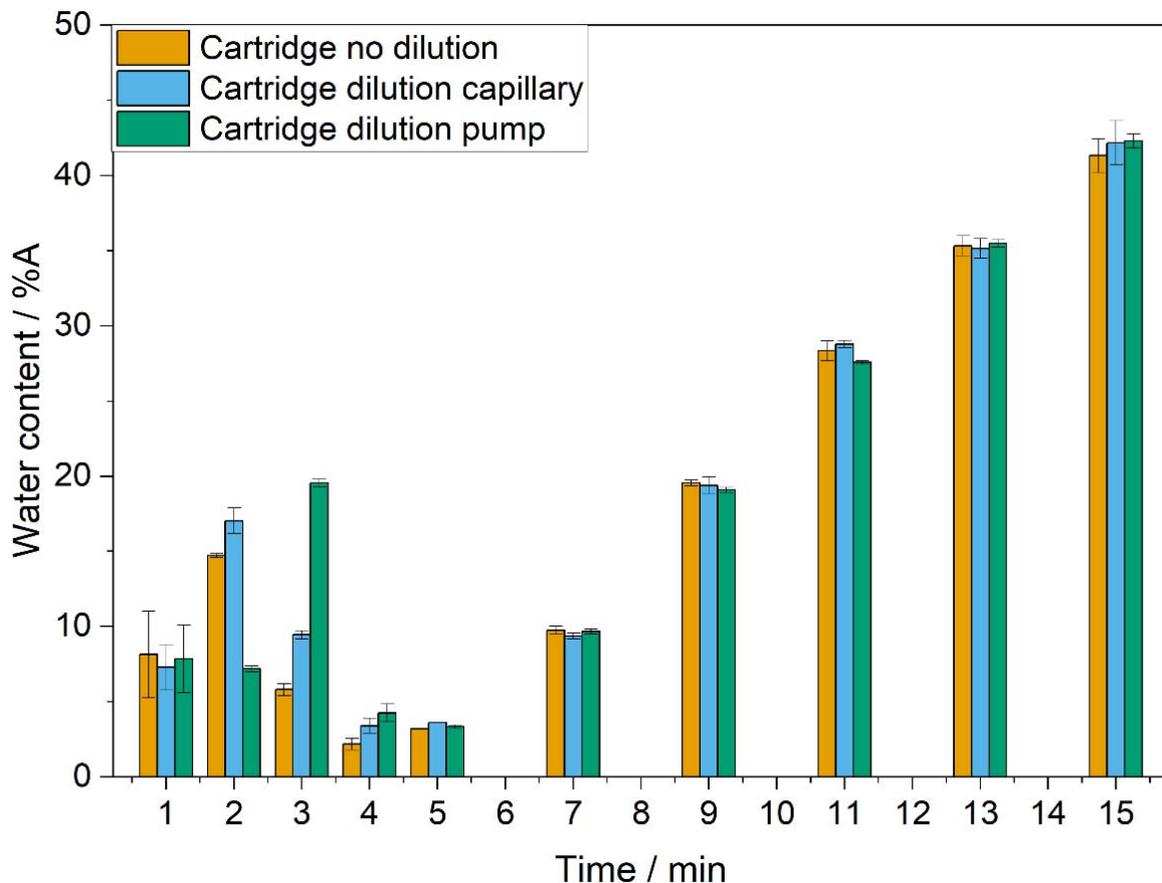


Abbildung 15 orange gekennzeichnet) stellen die Referenz dar, von der aus eine Reduktion des Wasseranteils angestrebt wurde. Hierzu wurde zunächst die Verdünnung über den Bypass, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, getestet (Abbildung 15, blau). Die Verdünnung mit Bypass führte in den Fraktionen zwei bis fünf immer zu einem geringfügig höheren Wasseranteil. Dies konnte auf Restwasser in der Kapillare des Bypasses zurückgeführt werden. Diese Kapillare kann aus technischen Gründen nicht separat mit organischem Lösungsmittel konditioniert werden.

Daher wurde die Säulenschaltung optimiert. Anstelle einer Verdünnung über eine Bypass-Kapillare wurde mit Hilfe einer dritten Pumpe Lösemittel direkt über das Ventil zudosiert. Hierdurch war es möglich, das Verdünnungsverhältnis präzise einzustellen. Für die Verdünnung mittels Pumpe konnte ein deutlich geringer Wasseranteil in der zweiten Fraktion und dafür ein erhöhter Wasseranteil in der dritten Fraktion erfasst werden (Abbildung 15, grün). Hier ergab sich ein maximaler Restwasseranteil von etwa 60  $\mu\text{L}$ . Eine Reduktion des Restwasseranteils auf unter 10  $\mu\text{L}$  konnte somit mit keinem der Ansätze erreicht werden, sodass eine Online-Kopplung zur GC nicht

realisiert werden konnte. Dieses Ergebnis hatte direkte Auswirkung auf den weiteren Projektverlauf, da die LC- und GC-Trennung nun getrennt betrachtet werden mussten. Vor diesem Hintergrund war es notwendig, zwei unterschiedliche Probenaufbereitungsschritte durchzuführen.

## 2.4 Kopplung von LC und GC auf ein hochauflösendes Massenspektrometer zur Non-Target Analytik

Die Kopplung von LC und GC hat den potenziellen Vorteil, das Polaritätsfenster zu erweitern. Aufgrund des zu hohen absoluten Restwasseranteils konnte eine Online-Kopplung zwischen LC und GC nicht wie geplant umgesetzt werden. Vor diesem Hintergrund mussten beide Trenndimensionen zunächst isoliert betrachtet werden. Für eine effektive GC-Trennung muss die Probe in einem organischen Lösungsmittel gelöst werden, während die Probe für die LC-Trennung wässrig injiziert werden kann. Eine vielversprechende Lösung, um beide Trenntechniken mit einem einzigen MS-System zu koppeln, ist die dielektrische Barriere-Entladungsisolation (Dielectric Barrier Discharge Ionisation, DBDI), eine auf kaltem Plasma basierende Ionisation bei Atmosphärendruck. Ein kommerziell verfügbares Produkt ist die neuartige SICRIT-Quelle der Firma Plasmion. Eine Studie<sup>1</sup>, bei der die SICRIT-Quelle zur Kombination von GC, LC und überkritischer Fluidchromatografie (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) verwendet wurde, zeigte, dass die drei Verfahren nach technischen Modifikationen mit demselben MS-System gekoppelt werden können. Für die experimentellen Untersuchungen wurden separate GC- und LC-MS-Datensätze erzeugt. Während für Target-Analysen eine einfache visuelle Inspektion und automatisierte Integration der extrahierten Ionenchromatogramme ausreicht, gilt dies nicht für das Non-Target-Screening, bei dem eine Priorisierung der Daten erforderlich ist, um die relevanten Features aus einem Datensatz zu extrahieren. Vor diesem Hintergrund wurde ein R-Paket entwickelt, das mehrere Open-Source-Tools und selbst erstellte Verarbeitungsfunktionen kombiniert, um die Bewertung und Korrelation von GC- und LC-MS-Daten zu unterstützen.

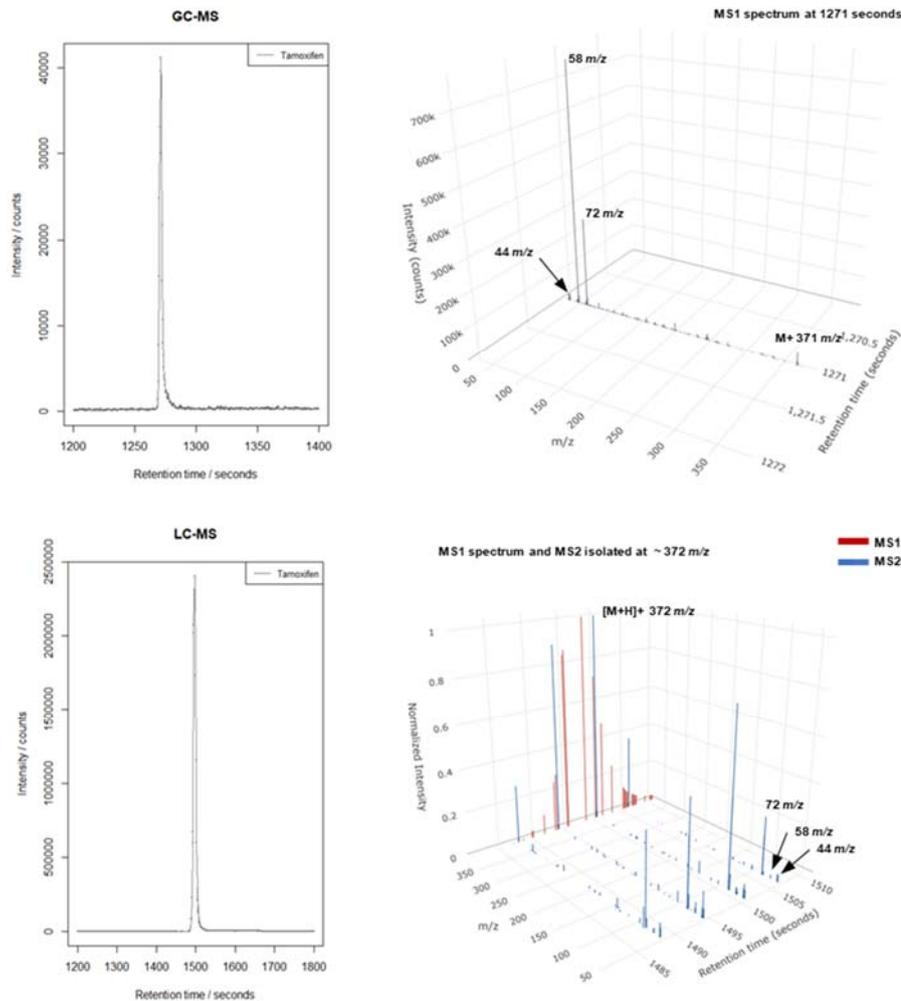
Hierzu wurden Target- und Non-Target-Messungen von chemischen Standards und realen Abwasserproben durchgeführt. Die resultierenden Datensätze konnten auf diese Weise nach der Datenvorverarbeitung (d. h. chromatografische Peakfindung, Peak-Alignment und Gruppierung) zusammengeführt werden. Für die LC-MS-Messungen wurde ein Umkehrphasen-Chromatografieverfahren mit Acetonitril und

---

<sup>1</sup>Bieber S. and Letzel T. (2021): Dielectric barrier discharge ionization (DBDI) as a universal atmospheric pressure ion source (API) for the hyphenation of gas chromatographic, liquid chromatographic and supercritical fluid chromatographic separations with the same time-of-flight mass spectrometer, AFIN-TS Forum; March (5): 1-16.

Wasser (beide mit 0,1% Ameisensäure versetzt) und Elektrospray-Ionisierung (ESI) im positiven Modus verwendet. Die Datenakquisition erfolgte im Tandemmodus (Data Dependent Acquisition, DDA), was die Erfassung spezifischer Fragmentierungsmuster ( $MS^2$ ) zur Unterstützung der Identifizierung der chromatografischen  $MS^1$ -Peaks ermöglichte. Alle Proben wurden zur Entfernung partikulärer Bestandteile vor der Injektion mit einem 0,45  $\mu m$ -Filter gefiltert. Für die GC-MS-Messungen wurde eine Zebtron ZB-5MSi (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu m$ ) Säule und Elektronenionisation (EI) verwendet. Es wurden nur  $MS^1$ -Daten erfasst. Die Abwasserproben wurden vor der Injektion einer Flüssig-Flüssig-Extraktion unterworfen. Hierzu wurden 30 mL Dichlormethan und 30 mL Toluol verwendet. Zum Trocknen diente Natriumsulfat. Die chemischen Standards wurden direkt in Methanol gelöst. Die Datenverarbeitung erfolgte mit dem entwickelten und in Kapitel 2.6 beschriebenen R-Paket, das einen Vergleich der resultierenden Datensätze ermöglicht. Die angewandten Algorithmen zur Peakfindung und Gruppierung stammen aus dem XCMS R-Paket. Die Korrelation zwischen den beiden Datensätzen wurde anhand der Ähnlichkeit der resultierenden  $m/z$ -Werte der extrahierten und gruppierten Peaks (d. h. der relevanten Features) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Blindwertkorrektur angewendet.

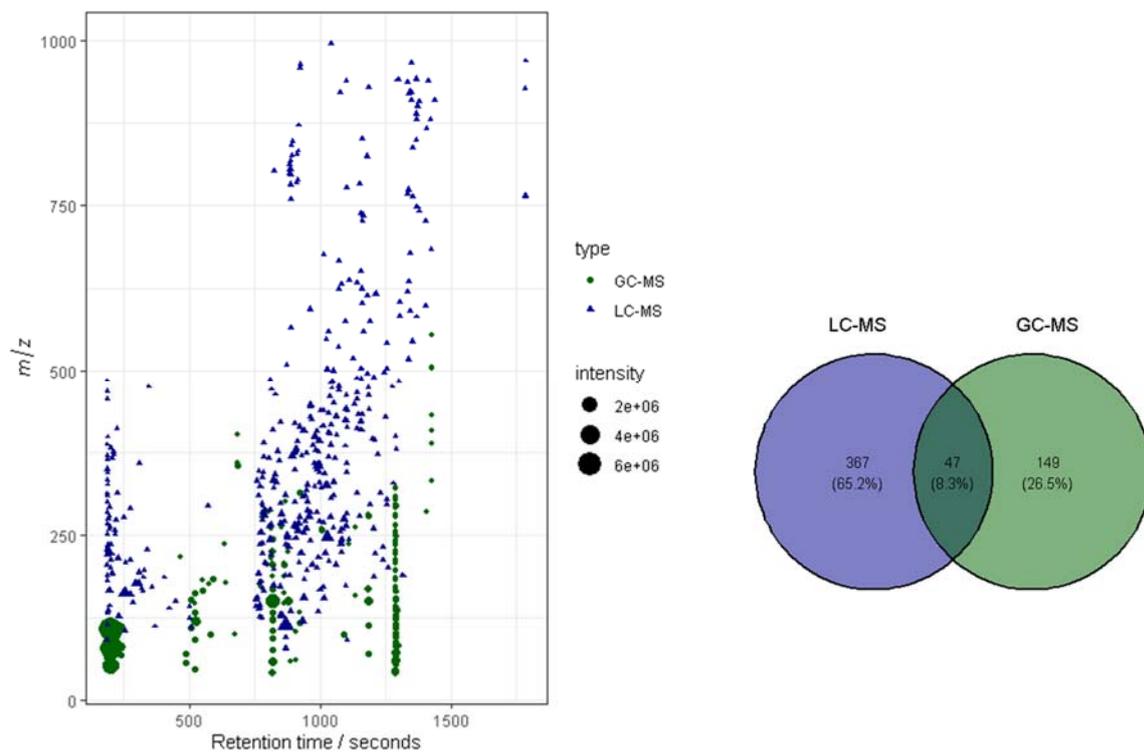
Ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal in Bezug auf die mittels LC-MS und GC-MS akquirierten Messdaten ist die Ionisierung. Während für die meisten Substanzen bei der Elektrospray-Ionisation das Molekülion vorhanden ist, wird dieses bei der Elektronenionisation in der Quelle in kleinere Produkt-Ionen fragmentiert. So konnte beispielsweise das Molekülion von Tamoxifen sowohl mittels LC-ESI-MS als  $[M+H]^+$  mit einem  $m/z$  von 372 als auch mittels GC-EI-MS als  $M^+$  mit einem  $m/z$  von 371 nachgewiesen werden (Abbildung 16). Während jedoch Tamoxifen durch die EI-Ionisierung direkt fragmentiert wird ( $MS^1$ -Fragmentierung), erfolgt die Fragmentierung durch ESI nach der Isolierung des Vorläufer-Ions und dem anschließenden Nachweis der Produkt-Ionen als  $MS^2$ -Spektren. Die  $MS^2$ -Fragmentierung ist daher spezifischer. Darüber hinaus wirkt sich die Ionisierung auch auf den direkten Nachweis einer Verbindung aus. So konnte beispielsweise Clarithromycin mit GC-EI-MS nicht nachgewiesen werden, wohl aber mit LC-ESI-MS. Andererseits lassen sich flüchtige Verbindungen, wie z. B. N-Nitrosodimethylamin, mit GC-EI-MS leichter ionisieren und nachweisen.



**Abbildung 16:** Vergleich zwischen den Chromatogrammen der extrahierten Tamoxifen-Ziel-Ionen aus GC-MS- (oben links) und LC-MS-Datensätzen (unten links) sowie den jeweiligen Fragmentierungsprodukten der MS<sup>1</sup>-Daten für die GC-Trennung (oben rechts) und der MS<sup>2</sup>-Daten für die LC-Trennung (unten rechts).

Beim Vergleich der  $m/z$ -Peakwerte aus den LC-MS- und GC-MS-Datensätzen, die von derselben Abwasserprobe stammen, ist bei den GC-MS-Messungen im Vergleich zu den LC-MS-Messungen eine größere Häufigkeit von niedrigeren Massen zu erkennen (Abbildung 17). Während bei der LC-MS-Messung die detektierten Peaks über das gesamte Retentionszeitfenster verteilt sind, wird bei der GC-MS-Messung eine höhere Peakdichte (Clustering) bei einzelnen Retentionszeiten beobachtet. Dieser Effekt lässt sich vermutlich auf die Fragmentierung in der EI-Quelle zurückführen. Folglich wird das Vorläufer-Ion in kleinere Produkt-Ionen mit der gleichen Retentionszeit fragmentiert (Abbildung 16 oben rechts). Auch die geringere Anzahl von Peaks in den GC-MS-Datensätzen hängt wahrscheinlich mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion

zusammen, die zu einem Verlust von Analyten bei der Probenaufbereitung geführt haben könnte. Bei der LC-MS-Analyse wurden die Proben vor der Injektion lediglich gefiltert. Dies zeigt, dass Unterschiede in der erforderlichen Probenvorbereitung für die separate Analyse mittels LC-MS und GC-MS nachteilig sind. Die direkte Kopplung von LC und GC, wie in der Vorhabensbeschreibung postuliert und geplant, würde dieses Problem lösen. Dennoch wurden nur 8,3% der  $m/z$ -Werte in beiden Datensätzen gefunden, was die Komplementarität beider Analyseverfahren unterstreicht und damit die generelle Arbeitshypothese stützt (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Vergleich der Ähnlichkeit zwischen GC-MS- und LC-MS-Daten auf der Grundlage der  $m/z$ -Werte in der Feature-Liste der gleichen Abwasserprobe, die in beiden Konfigurationen gemessen wurde.**

Die Kombination von GC und LC vergrößert daher den Nachweisbereich, was für Anwendungen wie das Non-Target-Screening unerlässlich ist. Obwohl im Rahmen des Projektes die Online-Kopplung von GC und LC aufgrund des hohen Restwasseranteils nicht erreicht werden konnte, wurde eine Datenauswerte-Strategie entwickelt, die die kombinierte Bewertung und Korrelation von MS-Daten aus jeweils separaten GC- und LC-Chromatogrammen ermöglicht (siehe hierzu die Ausführungen in Kapitel 2.6). Dies unterstützt die Automatisierung für den Einsatz von GC- und LC-basiertem Non-Target-Screening und Qualitätskontrollstudien, bei denen die Orthogonalität und Komplementarität zwischen LC und GC erforderlich ist.

## 2.5 Integration der Ionenmobilität als weitere Trennstufe

Die Integration der Ionenmobilität (IM) als zusätzliche Trenndimension wurde mit einem Agilent IM-Q-TOF 6560 realisiert. Das Gerät kann in zwei verschiedenen Modi betrieben werden (nur MS bzw. MS-only und "alternierende Frames"), die sich signifikant auf die Datenstruktur und -verarbeitung auswirken. Der Modus MS-only ist eine konventionelle Trennung nach Driftzeit und Erfassung von MS<sup>1</sup>-Daten. Bei alternierenden Frames kann die Kollisionsenergie (CE, Collision Energy) im Wechsel zwischen niedrigen und hohen Werten variiert werden, um sowohl MS<sup>1</sup>- als auch MS<sup>2</sup>-Daten (d. h. Fragmentierungsdaten) zu erfassen. Beide Messmodi wurden mit Standards getestet. Darauf aufbauend wurde die Datenverarbeitung entwickelt und in das selbst erstellte R-Paket integriert (Abbildung 18). Durch die Nutzung der Ionenmobilität als zusätzliche Trennstufe können spezifische Informationen zur Charakterisierung und Identifizierung von unbekanntem Substanzen erhalten werden.

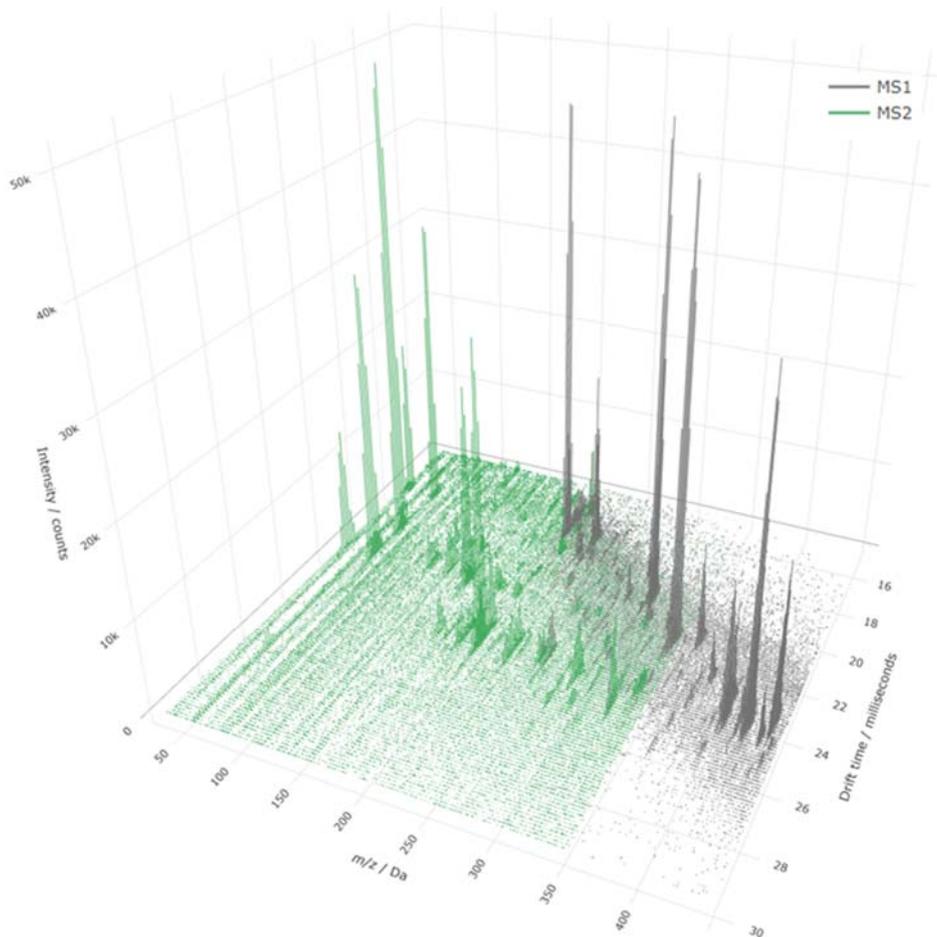


Abbildung 18: Spektren eines Gemischs chemischer Standards, gemessen mit Ionenmobilität im alternierende Frames-Modus (d. h. keine Kollisionsenergie für MS<sup>1</sup>-Daten in grau und Kollisionsenergie von 20 eV für MS<sup>2</sup>-Daten in grün).

Eine wesentliche Auswirkung der Einbeziehung von IM-Daten in die Datenverarbeitung ist die resultierende Größe der Datensätze. Während eine LC-HRMS-Messung im Tandemmodus zu einem Datensatz mit durchschnittlich 10 Millionen Spuren führt, erhöht sich die Größe des Datensatzes durch die Einbeziehung der Driftzeit auf etwa 60 Millionen Spuren. Folglich erhöht sich auch die erforderliche Rechenleistung zur Verarbeitung der Datensätze. Die Integration des Driftzeitparameters in den Datenverarbeitungs-Workflow des selbst entwickelten R-Pakets war möglich, indem die Rohdateien in das Open-Source-Format mzML konvertiert wurden und über das xml2 R-Paket die Driftzeit ermittelt wurde. Bei großen Dateien (d. h. ~ 5 GB) war diese Methode jedoch sehr zeitaufwändig. Daher wurde eine Alternativlösung implementiert, die auf dem mzR R-Paket von Bioconductor basiert, das optimiertes C++ verwendet. Der Vergleich der beiden Algorithmen ergab, dass jeweils ein identischer Datensatz erhalten wurde. Während das Einlesen aller Spektren in einer einzigen mzML-Datei mit ~ 5 GB mit dem xml2-Paket in R etwa 3 Stunden dauerte, benötigte das mzR-Paket in C++ nur ~ 1,1 Minuten für die Prozessierung der gleichen Datei. Das effizientere Parsen der Spektraldaten ist entscheidend für die zukünftige Nutzbarkeit der Ionenmobilität in einer späteren Routineanwendung, da die Datenverarbeitung schneller erfolgen muss als die Datenakquisition.

Der zusätzliche Nutzen der Integration der Ionenmobilität in Bezug auf die Substanz-Identifizierung wird am Beispiel von Sotalol exemplarisch beschrieben (Abbildung 19). Beim Betrieb des LC-IM-HRMS im Modus "alternierende Frames" war es möglich, die dehydrierte Form mit einem  $m/z$  255 und einer Driftzeit von 19 Millisekunden als sog. In-Source-Fragmentierung in der Quelle zu identifizieren, die im Vergleich zum Molekülion von Sotalol mit einem  $m/z$  273 und einer Driftzeit von 20 Millisekunden eine geringere Driftzeit hat. Bei Frames, die mit höherer Kollisionsenergie (20 eV) aufgenommen wurden, konnten die Fragmentierungsmuster von Sotalol und dehydriertem Sotalol getrennt werden. Dies ist insofern von Bedeutung, als Modifikationen an der ESI-Quelle für ein bestimmtes Molekülion zur Bildung von Produkt-Ionen führen können, die die Identifizierung durch Hinzufügen von Fremdspuren zu den MS<sup>1</sup>- und MS<sup>2</sup>-Spektren erschweren.

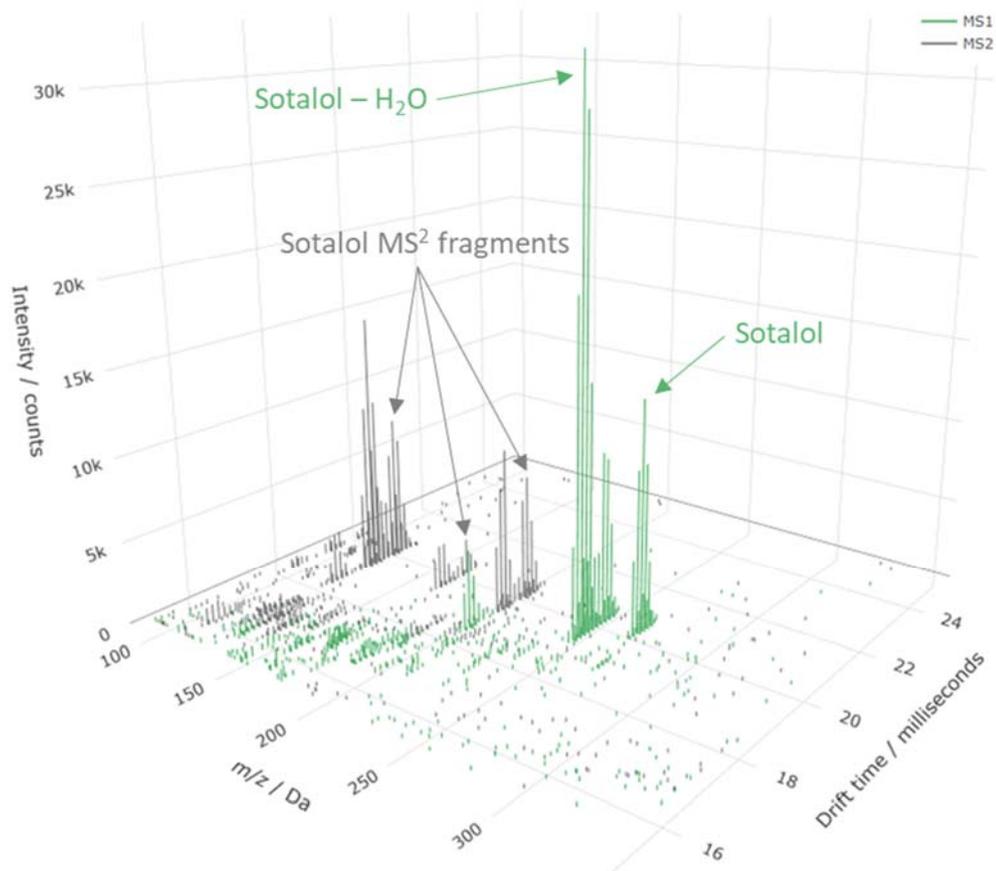
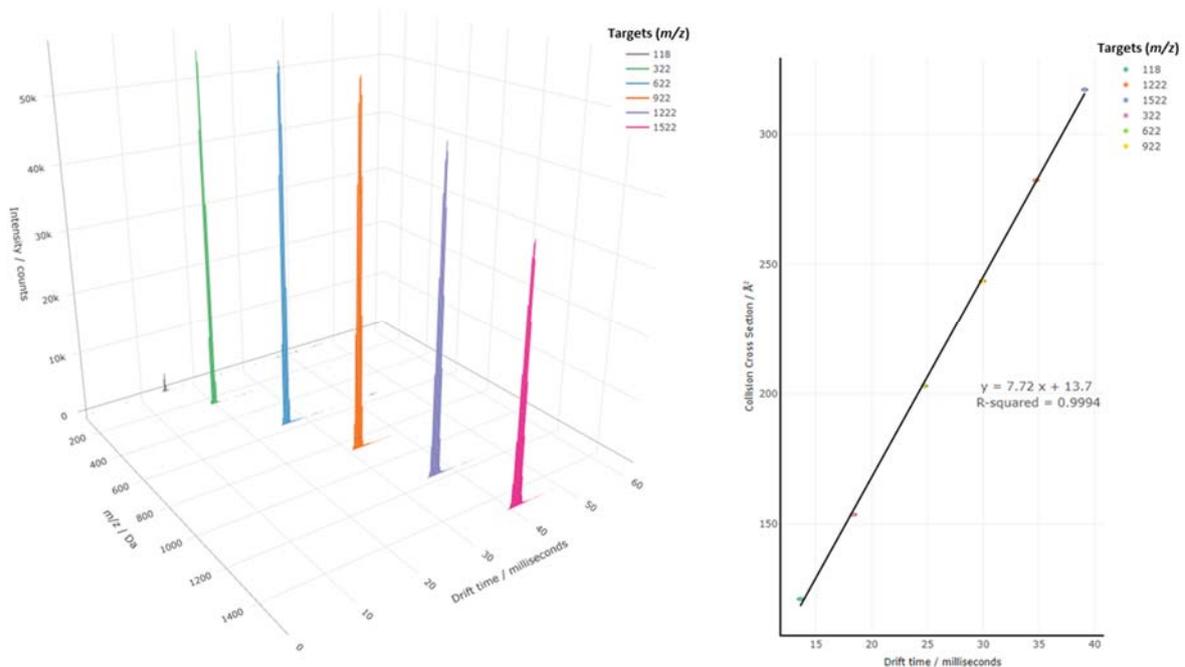


Abbildung 19: Spektren für die Drifttrennung von Sotalol ( $m/z$  273 und Driftzeit von 20 Millisekunden) und dem dehydrierten Sotalol ( $m/z$  255 und Driftzeit von 19 Millisekunden). Beide Verbindungen haben die gleiche chromatografische Retentionszeit.

Um die Ionenmobilität für die Identifizierung zu nutzen, ist eine Umrechnung der Driftzeit in den Kollisionsquerschnitt (CCS, Collisional Cross Section) erforderlich. Die Umrechnung hängt sehr stark vom verwendeten Analysensystem und den spezifischen Parametern ab (z. B. Driftgas und Länge der Driftröhre). Das für dieses Projekt zur Verfügung stehende Gerät, ein Agilent Ion-Mobility Q-TOF 6560, verwendet spezifische chemische Standards mit bekannten CCS-Werten, die kontinuierlich injiziert werden, um eine Kalibrierungskurve zu erstellen (siehe Abbildung 20). Die Kalibrierungskurve wird anhand des durchschnittlichen Driftzeitwerts der  $m/z$ -Werte aus mindestens drei Retentionszeitabschnitten von mindestens 10 Sekunden Dauer (d. h. +/- 10 Spektren) bei unterschiedlichen Retentionszeiten berechnet. Anschließend wird dieses Modell verwendet, um die Driftzeit eines bestimmten Features in einen CCS-Wert umzurechnen. Es gibt mehrere

frei zugängliche Datenbanken, wie z. B. CCSCOMPEND<sup>2</sup> und UJICCSLIB<sup>3</sup>, die beide im NORMAN Suspect List Exchange<sup>4</sup> aufgeführt sind und tabellierte CCS-Werte für die Substanz-Identifizierung enthalten. Dieser Verarbeitungsschritt wurde in das entwickelte R-Paket integriert. Eine verbleibende Herausforderung ist jedoch die korrekte Zuweisung von Features, d. h. die Dekonvolution, und die Gruppierung, die nach wie vor nur über die Software des Geräte-Anbieters möglich ist. Dies liegt daran, dass die verfügbare Open-Source-Software für die Dekonvolution von MS-Spektren nur die  $m/z$  und die Retentionszeit berücksichtigt. Das bedeutet, dass die Feature-Liste manuell aus der Software des Anbieters exportiert und in das entwickelte R-Paket integriert werden muss, was die Automatisierung der Datenverarbeitung und die Implementierung zusätzlicher Verarbeitungsschritte stark einschränkt.



**Abbildung 20: Spektren mit Drifttrennung der chemischen Standards, dargestellt durch das jeweilige  $m/z$  (links), die für die Kalibrierung der Kollisionsquerschnittswerte (CCS) entsprechend der Driftzeit (rechts) verwendet werden.**

Die Automatisierung der Datenverarbeitung soll in weiteren Forschungsprojekten realisiert werden, wir verweisen an dieser Stelle auf die Ausführungen in Kapitel 3.4.

<sup>2</sup>CCSCOMPEND | The Unified Collision Cross Section (CCS) Compendium. 10.5281/zenodo.2658162

<sup>3</sup>UJICCSLIB | Collision Cross Section (CCS) Library from UJI. 10.5281/zenodo.3549476

<sup>4</sup><https://www.norman-network.com/nds/SLE/>

## 2.6 Datahandling und Reduktion von Informationen durch automatisierte Softwareskripte zur zielgerichteten Identifikation unbekannter chemischer Verbindungen

Im Rahmen des Projektes wurde eine Open-Source-Softwarelösung für die Verarbeitung multidimensionaler MS-Daten entwickelt. Das Hauptziel dieser Softwarelösung war die herstellerunabhängige Integration von Open-Source-Tools für die kombinierte Verarbeitung von Daten aus LC-MS, GC-MS und IM-MS. Ziel ist die flexible Zusammenstellung von Datenverarbeitungs-Workflows für das automatisierte Non-Target-Screening. Wichtige Open-Source-Tools, die MS-Daten verarbeiten können, sind teilweise bereits in R<sup>5</sup> verfügbar oder lassen sich in R integrieren. Daher wurde die Softwarelösung in R geschrieben und als Paket mit dem Namen ntsIUTA bereitgestellt.

Die Schritte für die MS-Datenverarbeitung beim Non-Target-Screening lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: grundlegende und erweiterte Arbeitsschritte. Die wichtigsten grundlegenden Arbeitsschritte sind in der linken Spalte von Abbildung 21 zusammengefasst.

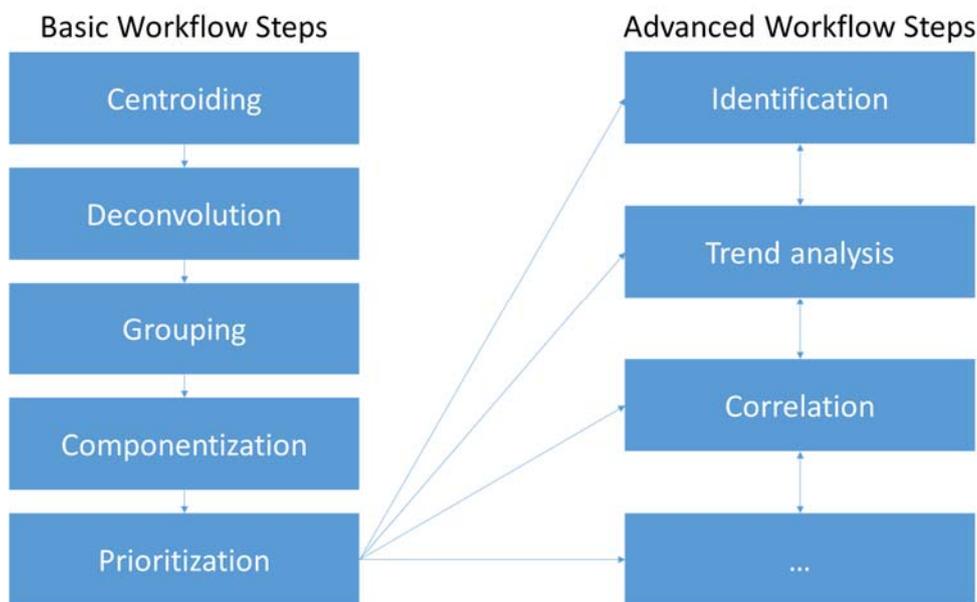


Abbildung 21: Schema der wichtigsten grundlegenden und fortgeschrittenen Workflow-Schritte für die MS-Datenverarbeitung im Non-Target-Screening.

---

<sup>5</sup><https://cran.r-project.org/>

Der erste Schritt eines herkömmlichen grundlegenden MS-Verarbeitungsprozesses ist die Zentrierung von Rohprofil-Spektren. Dabei werden die Spuren in einem gegebenen Spektrum auf das gemittelte  $m/z$  eines entsprechenden Profilpeaks reduziert, was die weitere Dekonvolution erleichtert. Zu nennen sind hier Algorithmen für die Entfaltung bzw. Dekonvolution, wie z. B. SAFD (Self Adjusting Feature Detection) von Samanipour et al. (2019)<sup>6</sup>, die MS-Profilspektren benötigen. Die Mehrzahl der Algorithmen verwenden zentrierte MS-Spektren<sup>7,8,9</sup>.

Einige MS-Geräte, wie das in diesem Projekt genutzte Agilent Ion-Mobility Q-TOF-System, ermöglichen bereits die direkte Zentrierung von MS-Spektren während der Datenerfassung über die vom Hersteller bereit gestellte Datenauswerte-Software. Eine weitere Voraussetzung für grundlegende MS-Verarbeitungsabläufe ist das MS-Dateiformat. Die Mehrzahl der Open-Source-Programme unterstützen das Format mzML<sup>10</sup>, das die Kopplung von Ionenmobilität und MS erlaubt. Im R-Paket werden sowohl die Konvertierung des Dateiformats des Herstellers in mzML als auch die Zentrierung von MS-Spektren bei Bedarf über die Kommandozeile von msConvert<sup>11</sup> aus ProteoWizard durchgeführt. Die Workflow-Schritte Dekonvolution (oder Feature-Finding), Gruppierung, Komponentisierung und Priorisierung wurden durch die Übernahme der Open-Source-Bibliothek patRoön<sup>12</sup> integriert, wodurch die Verwendung verschiedener Open-Source-Algorithmen für die MS-Datenverarbeitung ermöglicht wird. Für die fortgeschrittenen Prozess-Workflows (Abbildung 21 rechte

---

<sup>6</sup>Saer Samanipour, Jake W. O'Brien, Malcolm J. Reid, and Kevin V. Thomas. Self Adjusting Algorithm for the Nontargeted Feature Detection of High Resolution Mass Spectrometry Coupled with Liquid Chromatography Profile Data. *Analytical Chemistry* 2019 91 (16), 10800-10807. 10.1021/acs.analchem.9b02422

<sup>7</sup>Colin A. Smith, Elizabeth J. Want, Grace O'Maille, Ruben Abagyan, and Gary Siuzdak. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry* 2006 78 (3), 779-787. 10.1021/ac051437y

<sup>8</sup>Röst, H., Sachsenberg, T., Aiche, S. et al.; OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. *Nat Methods* 13, 741–748 (2016). 10.1038/nmeth.3959

<sup>9</sup>Hongchao Ji, Fanjuan Zeng, Yamei Xu, Hongmei Lu, and Zhimin Zhang. KPIC2: An Effective Framework for Mass Spectrometry-Based Metabolomics Using Pure Ion Chromatograms. *Analytical Chemistry* 2017 89 (14), 7631-7640. 10.1021/acs.analchem.7b01547

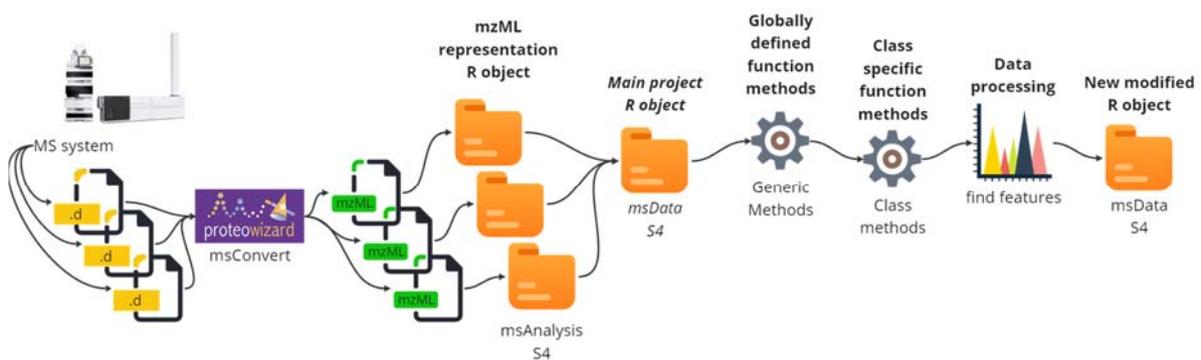
<sup>10</sup>Martens L, Chambers M, Sturm M, et al. mzML--a community standard for mass spectrometry data. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Jan;10(1):R110.000133. 10.1074/mcp.R110.000133

<sup>11</sup>Chambers, M., Maclean, B., Burke, R. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 30, 918–920 (2012). <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>

<sup>12</sup>Helmus, R., ter Laak, T.L., van Wezel, A.P. et al. patRoön: open source software platform for environmental mass spectrometry based non-target screening. *J Cheminform* 13, 1 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00477-w>

Spalte) wurden sowohl selbst erstellte Funktionen als auch patRoom-Funktionen in das ntsIUTA R-Paket integriert.

Neben den Algorithmen für die Datenverarbeitung war ein weiterer Aspekt, der im ntsIUTA R-Paket berücksichtigt wurde, die Automatisierung der Datenprozessierung für das Non-Target Screening bei gleichzeitiger Sicherung der Qualität der Datenerfassung und -verarbeitung. Vor diesem Hintergrund wurde ein Workflow definiert und entwickelt, der in Abbildung 22 schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 22: Schema der Rahmen- und Klassenstruktur, die in dem entwickelten R-Paket verwendet wird.**

Zunächst werden hierbei die herstellerspezifischen MS-Dateien konvertiert, zentriert und als Objekte der Klasse S4 mit der Bezeichnung *msAnalysis* strukturiert. Das *msAnalysis*-Objekt ist von entscheidender Bedeutung um sicherzustellen, dass beim Lesen von MS-Rohdateien immer eine standardisierte Datenstruktur zurückgegeben wird, unabhängig von den für die Datenerfassung verwendeten Bedingungen, wie z. B. nur MS<sup>1</sup>, MS<sup>1</sup> und MS<sup>2</sup>, oder MS/MS, Ionenmobilität in Kombination mit MS<sup>1</sup> sowie Ionenmobilität in alternierenden Frames für die Erfassung von MS<sup>1</sup>- und MS<sup>2</sup>-Daten. Metadaten, d. h. Systemeinstellungen und Akquisitionsbedingungen, Spektren und Chromatogramme werden aus den mzML-Dateien geparkt und in einfachen, aber strukturell definierten und verifizierten R-Objekten (hier: Data.Frame und List), innerhalb der *msAnalysis*-Klasse organisiert. Um die Laufzeit beim Parsen einer großen Anzahl von Dateien zu verkürzen, wurde eine Parallelverarbeitung implementiert. Bei Auswerterroutinen, die mehr als eine Datei umfassen, wird die S4-Klasse *msAnalysis* jeder Datei in ein Hauptobjekt der S4-Klasse namens *msData* integriert. Das *msData*-Objekt wird dann als Input für mehrere Funktionsmodule verwendet. Auf diese Weise wird immer eine konsistente Struktur zurückgegeben und es können Validierungstests durchgeführt werden, um die Konformität der Daten

sicherzustellen. Die Funktionsmethoden, die auf die *msData* angewendet werden können, sind dann die Workflow-Module für einen bestimmten Non-Target-Screening-Workflow.

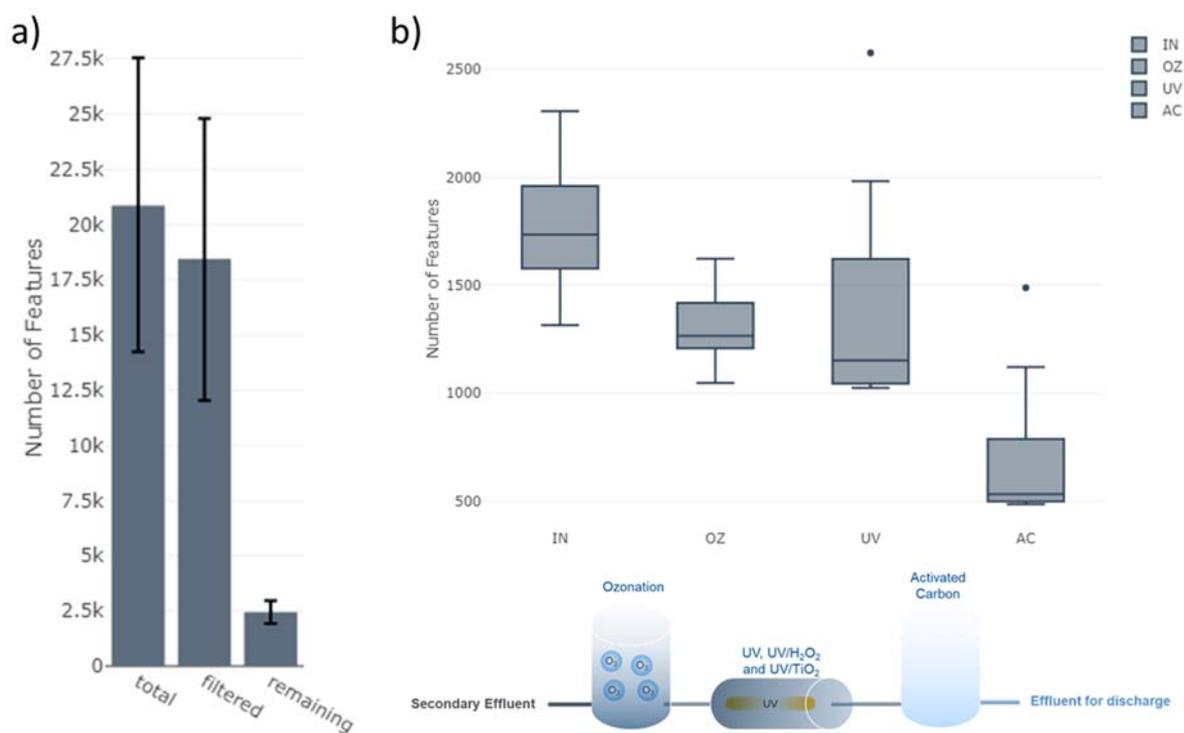
Um die Effizienz der Rahmen-, Klassensystem- und Funktionsmethoden zu erhöhen, sollten vier bewährte Verfahren für die Probenvorbereitung und die Probenliste sowie die Erfassungsbedingungen befolgt werden:

- Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, indem sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Features reduziert werden, sollten Wiederholungsmessungen (vorzugsweise in dreifacher Ausführung) einer bestimmten Probe durchgeführt werden;
- Eine Blindmessung, die mit einem Satz von Wiederholungsprobengruppen verbunden ist, sollte für eine Subtraktion des Hintergrunds (Blank) durchgeführt werden, wodurch die Priorisierung der Features erheblich verbessert wird;
- Interne Standards sollten jeder Probe (einschließlich des Blindwertes) zugesetzt werden, um die Qualität der prozessierten Daten sicherzustellen und z. B. eine Matrixkorrektur durchzuführen;
- Die Fragmentierung von Ionen ( $MS^2$ ) unter Verwendung von Tandem-MS in datenabhängiger oder datenunabhängiger Erfassung (DDA bzw. DIA) sollte in LC-basierten MS-Daten durchgeführt werden, um die Identifizierungsverarbeitungsschritte zu verbessern und neben  $m/z$ , Retentionszeit und CCS weitere spezifische Informationen aus einem gegebenen Feature extrahieren zu können.

Das Workflow-Konzept rund um die *msData* im *ntslUTA* R-Paket für die Anwendung von Non-Target Screening ist in Abbildung 23 dargestellt. Neben den grundlegenden Workflow-Verarbeitungsschritten können zusätzliche Kontrollfunktionen angewendet werden, um die Qualität der Daten auf der Grundlage externer und interner Standards zu gewährleisten. Ein weiterer zusätzlicher Schritt ist die rekursive Integration von Features, die in einem bestimmten Probenreplikat nach der Gruppierung fehlen. Durch die rekursive Integration wird die Zahl der falsch-negativen Features reduziert, indem ihr Fehlen bzw. Vorhandensein in einer bestimmten Probe überprüft wird. Für den erweiterten Workflow wurde eine Reihe von definierten Funktionen integriert, um relevante Features zu priorisieren und zu identifizieren. Die Priorisierung wird mit



jeden Probenstag. Der für jeden Probenstag angewandte grundlegende Workflow ermöglichte die Priorisierung von Features von anfänglich über 10.000 Feature-Gruppen nach der Feature-Suche und -Gruppierung auf etwa 2.500 Feature-Gruppen nach Anwendung der grundlegenden Filter, wie in Abbildung 24a dargestellt. Eine Feature-Gruppe bezeichnet dabei die Gruppe der entsprechenden Features, die in jeder Analyse vorkommen. Die mehr als vierfache Reduzierung der Anzahl der Feature-Gruppen erleichtert die weitere Datenverarbeitung, da die Anzahl der falsch-positiven und irrelevanten Features drastisch gesunken ist. Darüber hinaus sind die verarbeiteten Daten in *msData* unmittelbar verfügbar und es können statistische Analysen durchgeführt werden. Auf diese Weise lässt sich die Signifikanz der Reduktion von Chemikalien während der Behandlungskette abschätzen, wie in Abbildung 24b gezeigt.



**Abbildung 24:** a) Überblick über die Anzahl der Feature-Gruppen direkt nach der Feature-Gruppierung und nach Anwendung der Basisfilter; (b) Übersicht über die Anzahl der Feature-Gruppen für jeden Behandlungsschritt.

Ein weiterer Vorteil der Harmonisierung der Datenstruktur im *msData*-Objekt ist die retrospektive und kontinuierliche Überwachung der Datenqualität, z. B. durch die Bewertung der Wiederfindung interner Standards für jeden Probenstag, wie in

Abbildung 25a zeigt. Für den Probenatz 200408\_1 war eine deutliche Verringerung der Wiederfindung von Diclofenac-d4 zu erkennen. Dies wäre ohne eine Kreuzanalyse der *msData*-Objekte aus jedem Probenatz schwierig. Andere Qualitätsparameter, wie die Massenabweichung des berechneten Features *m/z* (Abbildung 25b) und die Feature-Retentionszeit, wurden ebenfalls in ntsIUTA integriert, um die Qualitätssicherung zu unterstützen.



**Abbildung 25:** a) Kontinuierliche Kontrolle der Datenqualität mit Hilfe der internen Standards (IS), die bei allen Analysen aufgestockt werden. Wiederfindung von aufgestocktem Diclofenac-d4 für jede Probenwiederholungsgruppe während der Probenahmekampagne. B) Massenabweichung (in ppm) des berechneten Features *m/z* für jeden internen Standard während der Probenahmekampagne.

Die weitere Anwendung fortgeschrittener Datenverarbeitungs-Workflowschritte unter Verwendung der kuratierten Feature-Liste verbessert die Aussagekraft der Ergebnisse für das Non-Target-Screening signifikant. In ntsIUTA werden fortgeschrittene Datenverarbeitungs-Workflowschritte für die Identifizierung von Substanzen, die Analyse des Intensitätsprofils (sog. Fold-Change) zwischen Input und Output eines bestimmten Behandlungsschritts oder einer Reaktion, die Trendanalyse über eine Probenahmekampagne und die Identifizierung von Transformationsprodukten anhand von Massendifferenzen oder über  $\text{MS}^2$ -Diagnose-Ionen implementiert.

Die weitere Entwicklung des ntsIUTA R-Pakets konzentrierte sich auf eine stärkere Integration der Workflowschritte und eine Verbesserung der Datenverwaltung und des Berichtswesens sowie auf eine Verbesserung der Benutzerfreundlichkeit, z. B. durch eine Erweiterung der Dokumentation und eine Kapselung der Methoden und Daten durch Referenzklassensysteme.

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

#### **3.1 Entwicklung der Ventilschaltung für den LC-ESI-MS-Modus**

Die Ventilschaltung für den LC-ESI-MS-Modus konnte wie im Antrag beschrieben umgesetzt werden. Es steht somit ein Verfahren zur Verfügung, das eine großvolumige Direktinjektion einer wässrigen Probe erlaubt.

#### **3.2 Methodenentwicklung und -optimierung zur Restwasserabtrennung für die GC-MS Analyse**

Der Restwasseranteil wurde mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt. Basierend auf den experimentellen Daten wurde die im ersten Arbeitspaket entwickelte Säulenschaltung modifiziert. Eine Reduktion des Restwasseranteils unter 10 µL konnte nicht erreicht werden. Vor diesem Hintergrund war es nicht möglich, eine kombinierte Analysenmethode zu entwickeln, um die LC- und GC-Trennung mit einem LC-GC-Interface zu koppeln. Um die technische Limitierung zu überwinden ist geplant, im Rahmen eines ZIM-Projektes mit einem KMU ein spezifisches Interface zu entwickeln, das in Kombination mit der miniaturisierten Flüssigkeitschromatografie eine direkte Kopplung von LC- und GC-Trennung zur Analyse wässriger Proben mittels großvolumiger Direktinjektion erlaubt.

#### **3.3 Kopplung von LC und GC und Übertrag der Methodik auf ein hochauflösendes Massenspektrometer zur Non-Target Analytik**

Aufgrund der Tatsache, dass eine Online-LC-GC-Kopplung, wie im ursprünglichen Antragskonzept vorgesehen, nicht möglich war, mussten beide Trenndimensionen einzeln betrachtet werden. Vor diesem Hintergrund war es nicht möglich, nur einen einzigen Aufbereitungsschritt für die Probenvorbereitung zu nutzen. Die erzielten Ergebnisse haben die ursprünglich definierte Arbeitshypothese des Projektantrags vollumfänglich bestätigt. Aufgrund der unterschiedlichen Probenvorbereitung für die LC- und GC-Analyse werden Diskriminierungseffekte beobachtet. Diese Effekte lassen sich somit nur durch eine Direktinjektion der wässrigen Probe, die ggf. gefiltert wird,

vermeiden. Darüber hinaus ist festzustellen, dass durch die kombinierte Analyse der LC- und GC-Fractionen die Komplementarität des Gesamtverfahrens signifikant erhöht wird. Auch dieses Ergebnis stützt die im Projektantrag postulierte Arbeitshypothese vollumfänglich.

### **3.4 Integration der Ionenmobilität als weitere Trennstufe**

Die Integration der Ionenmobilität (IM) erhöht die Komplexität des Verfahrens, liefert aber gleichzeitig wichtige Strukturinformationen, die zur Identifizierung potenziell unbekannter Verbindungen erforderlich sind. Um die Ionenmobilität für die Identifizierung im Rahmen eines umfassenden Non-Target Screening zu nutzen ist eine Umrechnung der Driftzeit in den Kollisionsquerschnitt (CCS, Collisional Cross Section) notwendig. Es gibt mehrere frei zugängliche Datenbanken, wie z. B. CCSCOMPEND und UJICCSLIB, die beide im NORMAN Suspect List Exchange aufgeführt sind und tabellierte CCS-Werte für die Substanz-Identifizierung enthalten. Vor diesem Hintergrund konnten die zu Projektbeginn definierten Ziele für dieses Arbeitspaket vollumfänglich erreicht werden.

MS-Geräte mit integrierter IM-Fähigkeit sind für die Datenerfassung verfügbar, aber die derzeitigen Softwarelösungen für die Verarbeitung von MS-Daten mit IM-Drifttrennung sind nicht flexibel genug für eine vollständige Automatisierung der nachgelagerten Datenverarbeitungsprozesse. Häufig wird eine spezielle Software des Herstellers für die Verarbeitung der Rohdaten verwendet, die dann manuell in nachgelagerte Datenverarbeitungsschritte exportiert werden können. Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung von Algorithmen für die automatisierte Verarbeitung von Daten mit IM-Drift-Trennung erforderlich. Derzeit verfügbare Algorithmen zur Feature-Extraktion, d. h. zur automatischen Erkennung von chromatografischen Peaks in MS-Daten, berücksichtigen nur die Masse und Zeit. Die Einbeziehung einer weiteren Dimension, d. h. der Driftzeit, soll im Rahmen geplanter Forschungsprojekte mit KMU gezielt weiterentwickelt werden.

### **3.5 Datahandling und Reduktion von Informationen durch automatisierte Softwareskripte zur zielgerichteten Identifikation unbekannter chemischer Verbindungen**

Im Rahmen des Projektes ist es gelungen, eine Open-Source-Software-Plattform zu entwickeln, die flexibel erweiterbar ist, um HRMS-Daten für das Non-Target-Screening herstellerunabhängig auszuwerten. Dieses Konzept basiert auf der Implementierung von R-basierten Open-Source Tools, die in einem selbst entwickelten Workflow in ntsIUTA zusammengefasst wurden. Bereits während der Projektlaufzeit erfolgte die Weiterentwicklung dieser offenen Plattform (siehe hierzu die Ausführungen in Kapitel 4). ntsData ist das Hauptdatenformat in ntsIUTA und ein S4 R-Objekt, das eine klar definierte Struktur und Speicherung von Datenkomponenten wie Qualitätsdaten und Workflow-Daten ermöglicht. In Bezug auf die Flexibilität und weitere Automatisierung der Datenprozessierung hat der S4-Rahmen jedoch nur begrenzte Möglichkeiten. So wird beispielsweise bei jedem angewandten Verarbeitungsschritt ein neues virtuelles Objekt erstellt. Wenn ein NTS-Workflow mit 10 verschiedenen Verarbeitungsschritten angewandt wird, muss der Benutzer die Version von 10 Ergebnisobjekten kontrollieren. Darüber hinaus variiert die Struktur jedes Objekts in Abhängigkeit des angewandten Verarbeitungsschrittes. Des Weiteren ist der S4-Rahmen formal, d. h. jeder Slot im Objekt hat einen vordefinierten Typ und eine Erweiterung ist nicht möglich. Diese Formalität schränkt die Erweiterung des Ergebnisdatensatzes mit selbst erstellten Algorithmen stark ein.

Um diese Herausforderung zu bewältigen, wird das in ntsIUTA entwickelte S4-Klassengerüst im Rahmen eines aktuellen BMBF-Projektes in das R6-Referenzklassengerüst umgewandelt. Die R6-Klasse hat die native Fähigkeit, die Eingabedaten zu ändern und die Erstellung eines neuen Objekts zu vermeiden, wenn eine Verarbeitungsfunktion angewandt wird, was die objektorientierte Programmierung in R ermöglicht. Die Fähigkeit der Selbstreferenzierung, wenn ein Workflow mit verschiedenen Verarbeitungsschritten angewandt wird, erleichtert das Projekt- und Datenmanagement. Darüber hinaus fördert R6 die Datenkonformität, da es dem Entwickler obliegt, die Datentransformation zu steuern und nicht dem Benutzer, indem er die verschiedenen Verarbeitungsschritte eines bestimmten Workflows miteinander verbindet.

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

Der wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Nutzen der erzielten Ergebnisse ist nach Abschluss des Forschungsvorhabens als sehr hoch zu bewerten. Insbesondere für KMU ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, neue und innovative Software- und Hardwareprodukte zu entwickeln.

Wie anhand der Ausführungen des Kapitels 3.5 ersichtlich ist, wurde mit ntsIUTA der Grundstein für ein Open-Source-Software-Tool gelegt, das im Rahmen eines aktuellen BMBF-Projektes mit dem Akronym streamFind zu einer herstellerübergreifenden Plattform weiterentwickelt wird. Die streamFind-Plattform zielt darauf ab, Open-Source-Software für die Datenverarbeitung zu entwickeln und zu kombinieren, um die datenwissenschaftliche Kompetenz der Nutzer zu erhöhen. streamFind wird vom Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e.V. (IUTA), dem Forschungszentrum Informatik (FZI) und weiteren assoziierten Netzwerkpartnern entwickelt und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie von der Aufbau- und Resilienzfazilität der EU unter der Kennnummer 16DKWN138 gefördert. Mittlerweile konnten wichtige nationale Partner aus verschiedenen Bereichen gewonnen werden, das Projekt als assoziierte Netzwerkpartner zu unterstützen (siehe Abbildung 26). Mit der erfolgreichen Projektakquisition ist ein herausragender Meilenstein erreicht worden, da die innerhalb des IGF-Forschungsvorhabens ComScreen erzielten Ergebnisse, die nun in eine herstellerunabhängige Open-Source-Software-Plattform münden, wie im Antrag unter Punkt 5.1.3 postuliert, einer breiten Fachöffentlichkeit zugänglich gemacht werden, ohne dass Lizenzgebühren anfallen. Aufbauend auf den im Rahmen von ComScreen erzielten Ergebnissen wird es darüber hinaus erstmalig möglich sein, multidimensionale Datensätze zu prozessieren. Hierauf aufbauend können dedizierte KMU aus den Bereichen Softwareentwicklung und Data Science nun neue Geschäftsmodelle entwickeln und die nicht proprietären Software-Algorithmen nutzen, um einen Transfer der Software-Skripte in eine vollständig validierte Umgebung zu

realisieren. Dieser Schritt ist immer dann notwendig, wenn die Nutzung von Software im akkreditierten oder hochregulierten Umfeld, wie z. B. der Pharmaindustrie, erfolgt.

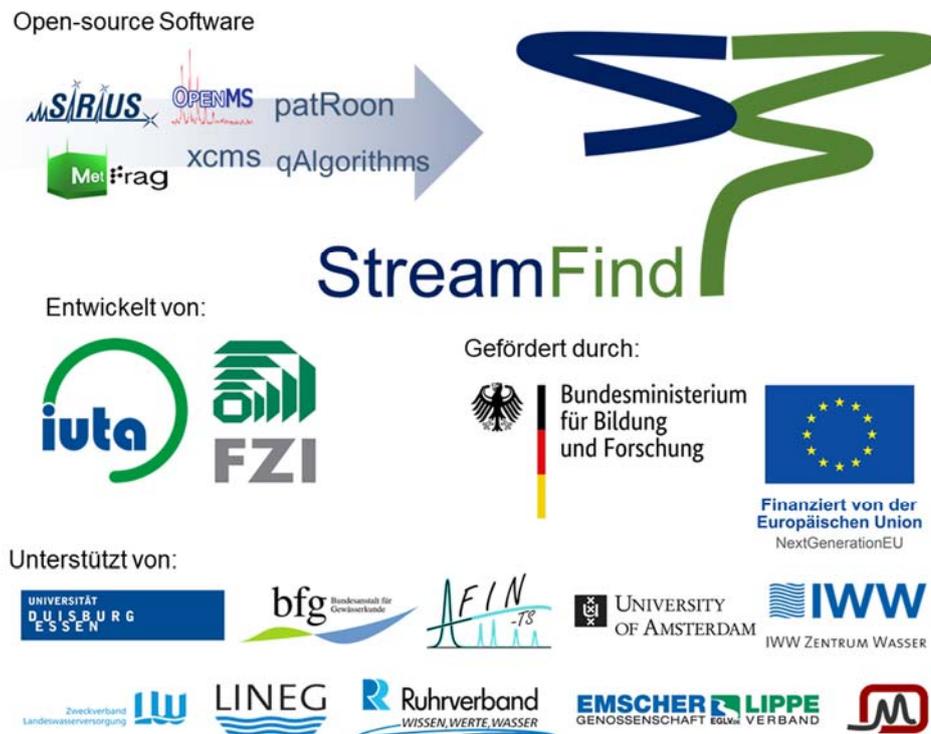


Abbildung 26: Darstellung der im Rahmen von streamFind aktiv geförderten sowie der assoziierten (Netzwerk-)Partner.

Der Bedarf nach herstellerübergreifenden Auswerte-Routinen komplexer Datensätze, insbesondere für das Non-Target-Screening, hat sich sehr eindrucksvoll auf der in 2023 abgehaltenen International Conference on Non-Target Screening (ICNTS 23) gezeigt. Das IUTA konnte im Rahmen eines Vortrags die innerhalb von ComScreen erzielten Ergebnisse umfassend vorstellen und einen Ausblick auf die weitere Transferstrategie geben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch das hier initiierte Forschungsprojekt aktuell bis zu fünf weitere Forschungsprojekte mit wissenschaftlichen und industriellen Partnern angestoßen werden konnten. Diese Projekte sind entweder bereits in der Umsetzung oder werden zum Zeitpunkt der Berichtsabgabe gestellt. Zusätzliche Informationen können dem nachfolgenden Kapitel 5 entnommen werden.

## **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 mit Schwerpunkt auf die Hardware- und Software-Entwicklung. Während der Projektlaufzeit wurden zwei Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses (PBA) durchgeführt.

### **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, aber auch internationalen Fachtagungen. Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen, auch über die Projektlaufzeit hinaus, können der in Tabelle 3 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 3 entnommen werden. Diejenigen Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem IGF-Vorhaben veröffentlicht wurden, sind **fett markiert unterstrichen**.

**Tabelle 3: Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.**

<b>Maßnahme</b>	<b>Ziel</b>	<b>Ort / Rahmen</b>	<b>Datum/ Zeitraum</b>
Vortrag	Es erfolgte eine kurze Vorstellung des Projektes.	Mülheim an der Ruhr / 4. Mülheimer Wasseranalytisches Seminar	16.09.2020 - 17.09.2020
Erste Sitzung des PBA	Es erfolgte die Vorstellung des Projektes sowie der ersten erzielten Ergebnisse. Darüber hinaus wurde der PBA anhand von Gastvorträgen aus dem akademischen Umfeld über die Datenauswertung auf Basis des Open-Access-Tools „R“ informiert. Vorträge von Software-Herstellern informierten über kommerziell verfügbare Lösungen zur herstellerübergreifenden Auswertung massenspektrometrischer Daten	Virtuell als Online-Meeting	09.12.2020
Vortrag	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der International Conference on Non-Target Screening (ICNTS 21). Die ICNTS versteht sich als internationale Konferenz. Anwender und Geräteentwickler auf dem Gebiet der instrumentellen Analytik präsentierten aktuelle Ergebnisse und Applikationen zum Non-Target Screening.	Erding	04.10.2021 – 07.10.2021
<b><u>Veröffentlichung</u></b>	<b><u>Publikation von Teilergebnissen.</u></b>	<b><u>Sonderband zum 14. Langenauer Wasserforum</u></b>	<b><u>November 2021</u></b>
Posterbeitrag und Vortrag	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des Langenauer Wasserforums. Das LWF widmet sich den aktuellen Entwicklungen im Bereich der Wasser- und Umweltanalytik.	Langenau / 14. Langenauer Wasserforum	15.11.2021 – 16.11.2021
Poster	Vorstellung des Projektes und relevanter Teilergebnisse im Rahmen der Analytica. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle.	München / analytica und analytica conference	21.06.2022 – 24.06.2022
Vortrag	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der IOA EAG3 Conference. Die Konferenz richtet sich an Anwender aus dem Bereich der (Ab-) Wasseraufbereitung.	Toulouse	28.- 30.11.2022
Vortrag	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der Ruhr-Rhein-Main-Talks. Die Veranstaltung richtet sich an Doktoranden und Wissenschaftler mit dem Hintergrund Non-Target-Analytik	Koblenz	20.12.2022
Zweite Sitzung des PBA	Es erfolgte eine Präsentation der erzielten Ergebnisse sowie die Diskussion aktueller Neuerungen aus der analytischen Fachwelt.	Duisburg	06.12.2022
Aufnahme von Teilprojektergebnissen in die Lehre	Vorlesung Wasseranalytik im B.Sc. Studiengang Water Science der Universität Duisburg-Essen	Essen	WS 2022/2023

<b>Geplante Maßnahme nach Abschluss des Vorhabens</b>	<b>Ziel</b>	<b>Ort / Rahmen</b>	<b>Datum/ Zeitraum</b>
Vortrag	ICNTS 2023 – International Conference on Non-Target-Screening. Die ICNTS versteht sich als internationale Konferenz. Anwender und Geräteentwickler auf dem Gebiet der instrumentellen Analytik präsentierten aktuelle Ergebnisse und Applikationen zum Non-Target Screening.	Erding	16.10. – 19.10.2023
<u>Veröffentlichung</u>	<u>Publikation von Teilergebnissen.</u>	<u>Sonderband zum 15. Langenauer Wasserforum</u>	<u>12.11. – 14.11.2023</u>
<u>Veröffentlichung</u>	<u>Publikation von Teilergebnissen</u>	<u>Journal of Chromatography A</u>	<u>Dezember 2032</u>
<u>Veröffentlichung</u>	<u>Publikation von Teilergebnissen</u>	<u>Dissertation, Universität Duisburg-Essen</u>	<u>Juni 2024</u>
Beratung von KMU	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend über die gesamte Projektlaufzeit durchgeführt.		Kontinuierlich

## **5.4 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts**

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurden die Transfermaßnahmen benannt. Hieraus geht hervor, dass seitens der Forschungseinrichtung 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. Bereits während der Projektlaufzeit wurden drei weitere Forschungsprojekte mit wissenschaftlichen und industriellen

Partnern realisiert. Besonders hervorzuheben ist das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Projekt streamFind.<sup>14</sup>

Die technische Limitierung in Bezug auf die Kopplung von Flüssigkeitschromatografie und Gaschromatografie soll durch ein Projekt mit Fokus auf die Hardware-Entwicklung über das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand mit einem KMU adressiert werden.

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.

Gewerbliche Schutzrechte wurden nicht erworben. Die Anmeldung gewerblicher Schutzrechte auf Basis der im Projekt erzielten Ergebnisse ist nicht geplant.

## **6 Verwendung der Zuwendung**

### **6.1 Forschungseinrichtung (IUTA e. V.)**

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

Es wurde wissenschaftlich-technisches Personal (HPA-A und –B) über insgesamt 24,92 Personenmonate eingesetzt.

#### **6.1.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)**

Die Beschaffung eines SICRIT® SC-30 Ionisationsset inkl. GC Ansteuerung erfolgte wie beantragt.

#### **6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)**

Nicht beantragt.

---

<sup>14</sup> [https://www.bildung-forschung.digital/digitalezukunft/de/wissen/Datenkompetenzen/datenkompetenzen\\_wissenschaftlichen\\_nachwuchs/Projekte/stream\\_find.html](https://www.bildung-forschung.digital/digitalezukunft/de/wissen/Datenkompetenzen/datenkompetenzen_wissenschaftlichen_nachwuchs/Projekte/stream_find.html)

## **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.

Das Projekt wurde ausgabenneutral um insgesamt 8 Monate verlängert, da umfangreiche Umbaumaßnahmen in den Laboren des IUTA durchgeführt werden mussten. Bis auf die Verzögerung hatte dies keine weiteren Folgen für den Projekterfolg.