Moderne LC/LC-MS-Verfahren zur Online-Analyse biotechnologischer Prozesse

Astrid Rehorek

Inhalte

1. Prozessanalysentechnik in der Biotechnologie

2. Online-Einzel- und Mehrkomponentenanalyse

3. Online-LC/LC-MS-Beispiele

   - Online-Kontrolle eines Kläranlagenzulaufs

   - Online-Monitoring in einem anaerob/aeroben Bioreaktor zur Ermittlung von optimalen Prozessführungsparametern

   - Multi-Analyser Bioreaktorsystem

Bioprozessanalysenmesstechnik

Analysator	Einsatz
UV-VIS Spektrometer (UV-VIS)	Insitu- und Online-Monitoring in der flüssigen Phase
Fluoreszens-Spektroskopie	Zellkonzentrationsmessung, Zellmetabolismus
Nuklear-Magnetische-Resonaz-Spektroskopie (NMR)	Zellmetabolismus
Fourier-Transformations-Nahinfrarot-Spektrometer (FT IR)	Insitu-Monitoring in komplexen Matrizes, z.B. Fettsäuren in Bioreaktoren
Nah-Infrarot-Spektrometer (NIR)	Gasanalyse
Fourier-Transformations-Mikrowellen-Spektrometer (FT MW)	Gasanalyse (Ozon)
Biosensoren (Kombination eines Mikroorganismus, Antikörpers, Enzyms, etc. mit einem Messumformer)	In-Situ-Einsatz zellfreier Lösungen, “Realzeit”-signale bei hoherSelektivität

Online messbare abwasserrelevante Summenparameter

Messaufgabe	Online-Methode
pH-Wert	Potentiometrische Methode
TOC/VOC	Katalytische Verbrennung mit IR-Detektion (mit VOC-Kanal), Verdünnung und Filterung; UV-VIS
TN	Verbrennungs-/Chemilumineszenz-Methode
CSB	Oxidierung mit Ozon - Sensorische Sauerstoffmessung in der Gasphase, Elektrochemisch, Spektroskopisch
BSB	Erfassung als Kurzzeit-BSB (Respirationsrate)
DOC	Reinstwasser DOC (UV-Zersetzung und Leitfähigkeitsmessung)

UV-VIS	(inline) Xenon Blitzlampe mit DAD, Fiberoptische Spektrometer

Online-Analytik biotechnologischer Prozesse

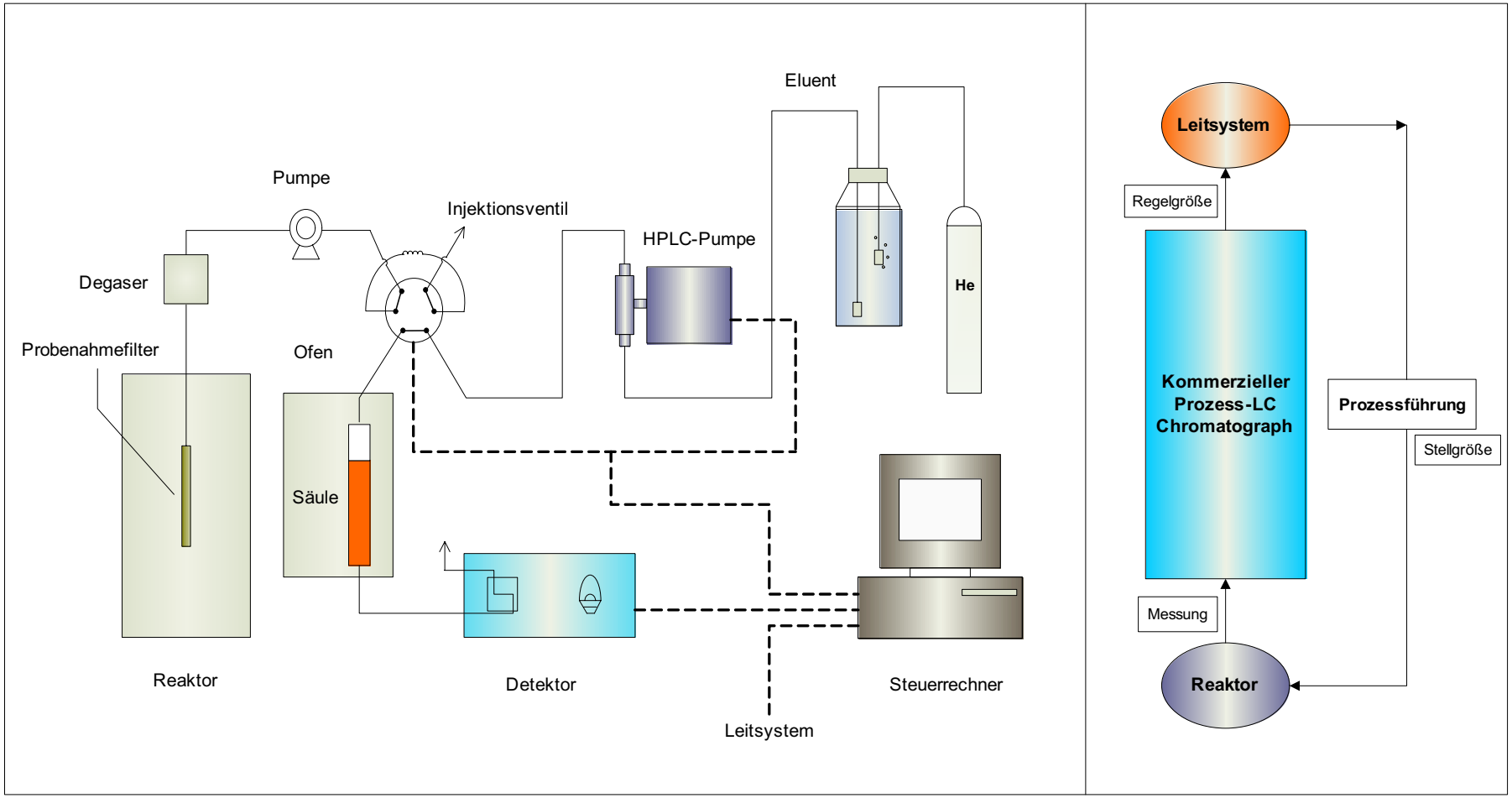
Summenparameter

Einzelstoffanalyse

Multikomponentenanalyse

Ziel: Vordefinierte Produktqualität

Prozess-Flüssigchromatographen: Modulare HPLC-Betriebsmessplätze oder Komplett-Analysatoren



Kommerzielle LC-Prozesschromatographen

Hersteller	Bezeichnung	Detektoren	Anwendungsgebiete
Bayer Technology Services	**Baychro*MAT*® (GC, HPLC, GPC)**	Verschiedene Detektoren	Bestimmung der Molmasse in Polymeranlagen, Prozesskontrolle, Nebenkomponenten im ppm-Bereich, Isomerenbestimmung
Dionex	**DX 800** Prozesschromatograph (LC)	UV-, Leitfähigkeits-, und elektrochemischer Detektor	Spurenbest. in Reinstwasser, org. Säuren bei Nylonherstellung, Nitrit/Nitrat Kläranlage, Fermenter-Monitoring

Ionenchromatographischer Process-LC-Analysator der Firma *DIONEX*

DX-800

Modulare LC/LC-MS Prozessanalysentechnik

Automatisierte, kontinuierliche Online-Probenahmetechniken

- Sedimentation/Porenfiltration
- Mikro- u. Ultrafiltration
- Membranextraktion
- Automatisierte SPE/ SPME

Online-Kontrolle eines Kläranlagenzulaufs

Etablierung eines automatisierten

Online-Analysensystems,

das die Kläranlage und damit die Umwelt

vor Stoßbelastungen durch

plötzliche, hohe Stoffemissionen

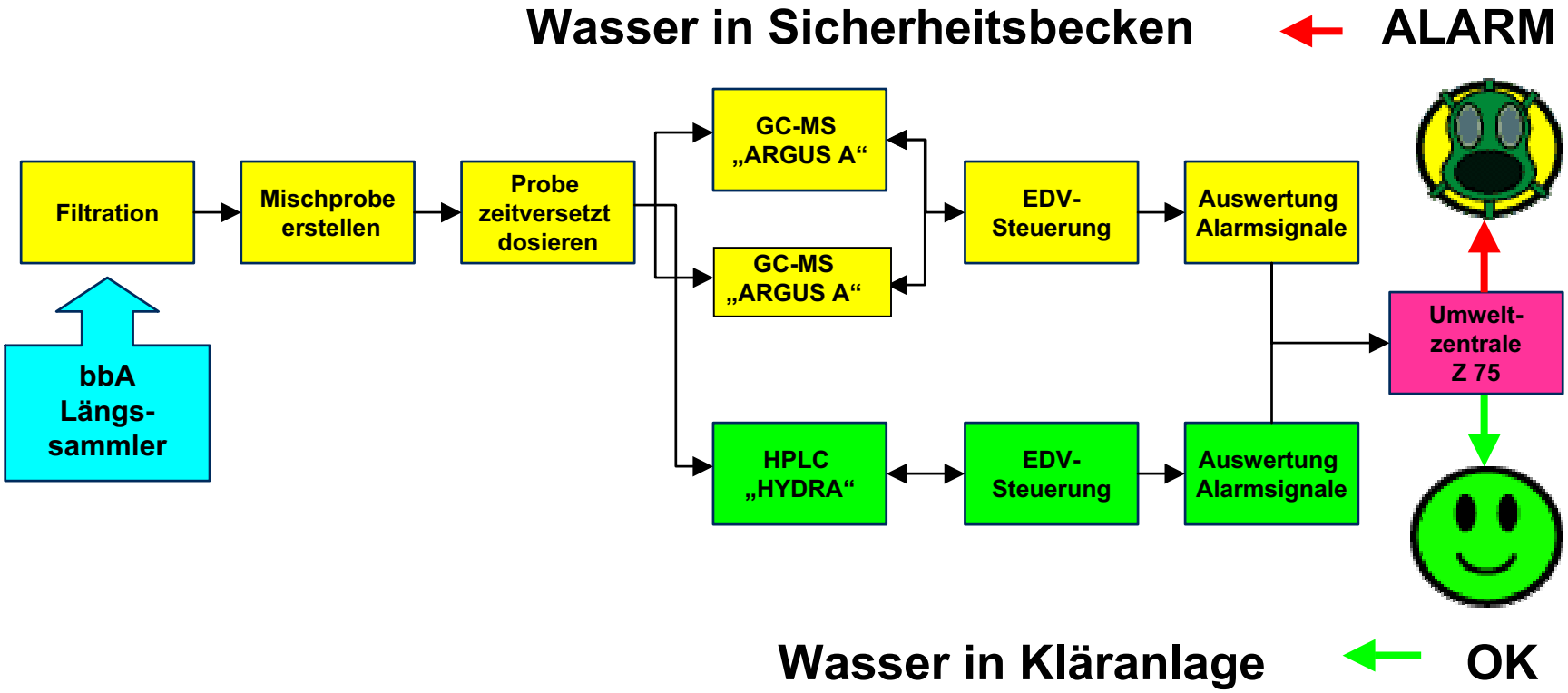
von organischen Einzelkomponenten schützt.

Mit freundlicher Genehmigung der BASF, Dr. Kurz

BASF

Konzeption der BASF- Kläranlagen-Online-Überwachung:

ARGUS und HYDRA



BASF

Probenvorbereitung für ARGUS und HYDRA

Sandfang

Bandfilter

Vorlage

BASF

Prinzip von ARGUS / HYDRA

ARGUS:

- Prinzip: GC/MS-Analyse mit Wasserdirektinjektion
- gaschromatographisch erfassbare Stoffe
- Messzyklus ca. 40 min (effektiv 20 min; 2 Geräte)
- 130 Stoffe kalibriert
- Arbeitsbereich: 1-100 mg/L

HYDRA:

- Prinzip: Ionenpaarchromatographie mit Dioden-Array- und Fluoreszenz-Detektion
- polare und höhermolekulare Stoffe
- Messzyklus: 20 min
- ca. 45 Stoffe kalibriert
- Arbeitsbereich: 0,1-20 mg/L (sehr stoffspezifisch)

BASF

ARGUS

BASF

HYDRA

1 Probezufuhr

2 Durchflußzelle

3 Injektionsspritze

4 Testlösungen

5 Injektionsventil

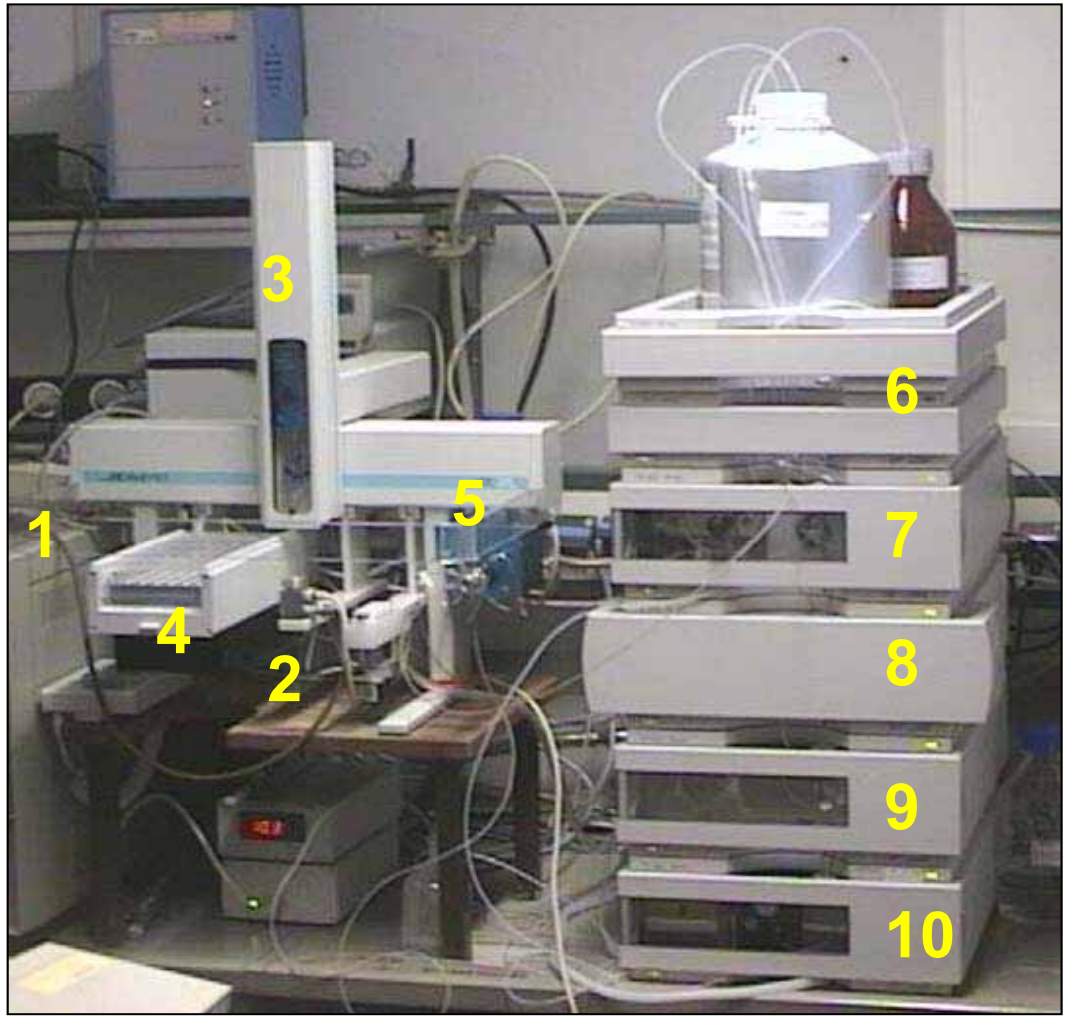
6 Laufmittel + Entgaser

7 Pumpe

8 Säulenofen

9 Dioden-Array-Detektor

10 Fluoreszenz-Detektor



BASF

Ferndiagnose-Tools

a) Fern-Zugriff auf Chromatogramme und Reports über das Internet mit Bereitschaftsdienst-Laptop

b) Fernsteuerung der Geräte

c) Web-Cam zur visuellen Beurteilung von Fehlfunktionen und Anleitung bei Reparaturen

d) Fehlermeldung nach Auswertung der Qualitätskriterien werden als SMS auf Bereitschaftsdienst-Handy übertragen

Summary: ARGUS und HYDRA

- ARGUS und HYDRA überwachen kontinuierlich den Zulauf der Kläranlage auf **ca. 200 organische Einzelstoffe**.
- Systeme laufen seit mehreren Jahre mit nahezu 100%-iger Verfügbarkeit
  ARGUS: seit 1992, ca. 350.000 Analysen
  HYDRA: seit 2001, ca. 100.000 Analysen
- Zentrale Überwachung ist billiger als Einzelüberwachung in den Betrieben.
- Bei mehreren Einleitern werden kumulative Effekte berücksichtigt.
- Systeme werden auch zum Abwassermanagement benutzt.

Unerwünschter Farbe auf der Spur –

LC-MS-Monitoring zur Prozessoptimierung der biologischen Behandlung von Farbabwasserkonzentraten

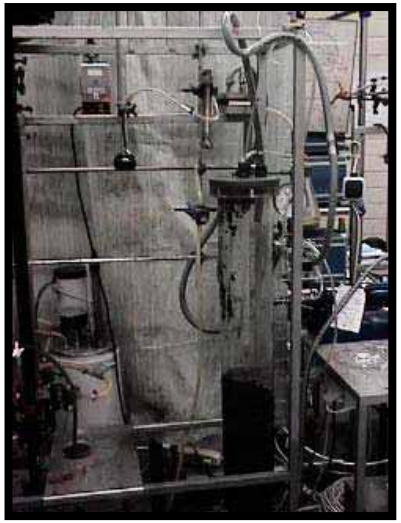
Gefördert duch

Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen

Entwicklung von anaerob/aeroben Bio-Membran-Reaktoren für die Behandlung von textilen Azofarbstoff-Abwasserkonzentraten

1998-1999

- 3-Liter anaerob/aerobe BMR (ungekoppelt)
- Offline-UV/VIS Spektroskopie
- Offline pH -Messung



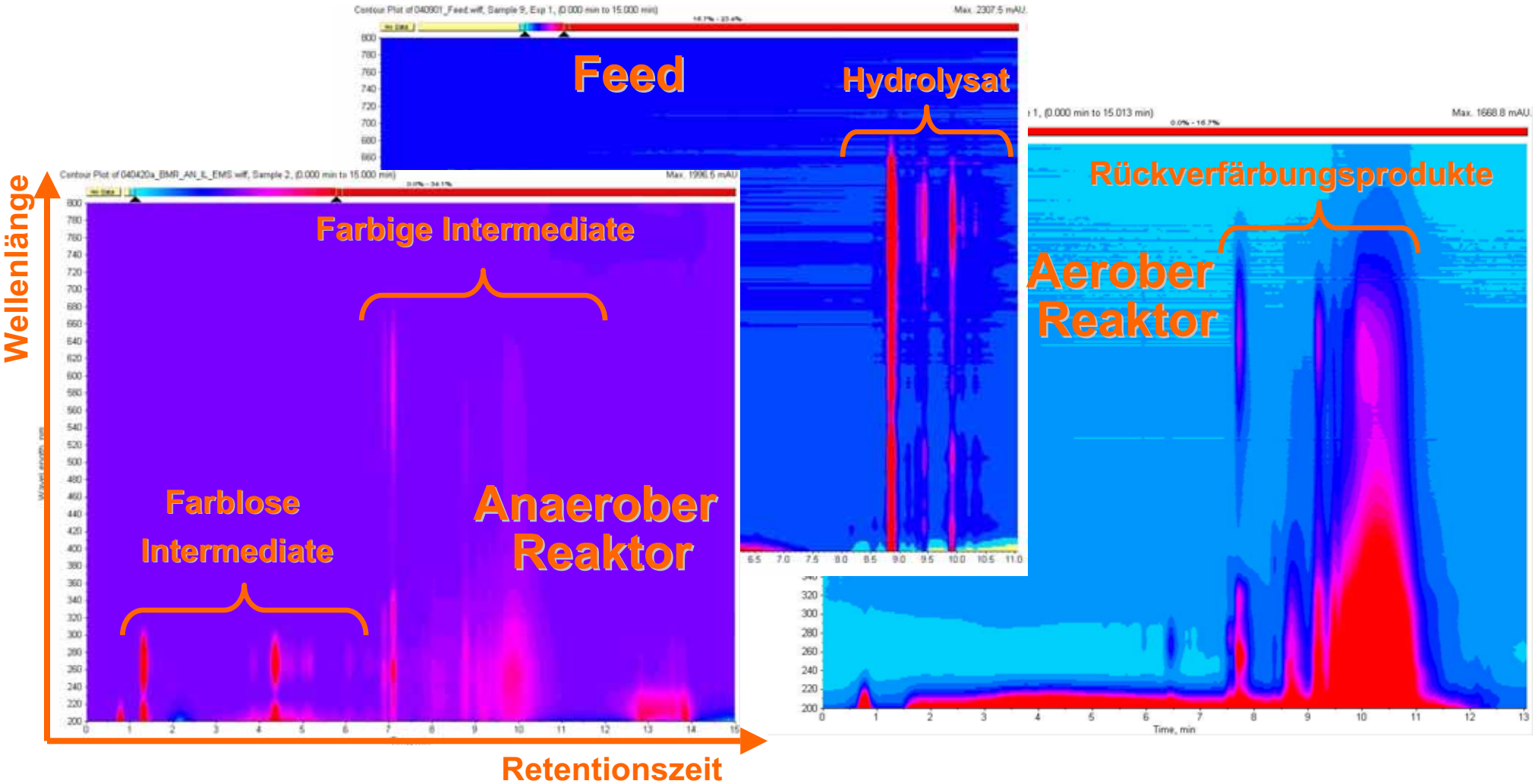
2000-2001

- 10-Liter gekoppeltes anaerob/aerobes BMR-System
- Online-UF-LC-DAD-Monitoring
- Online-RI-Monitoring
- Offline pH-& Redoxmessung

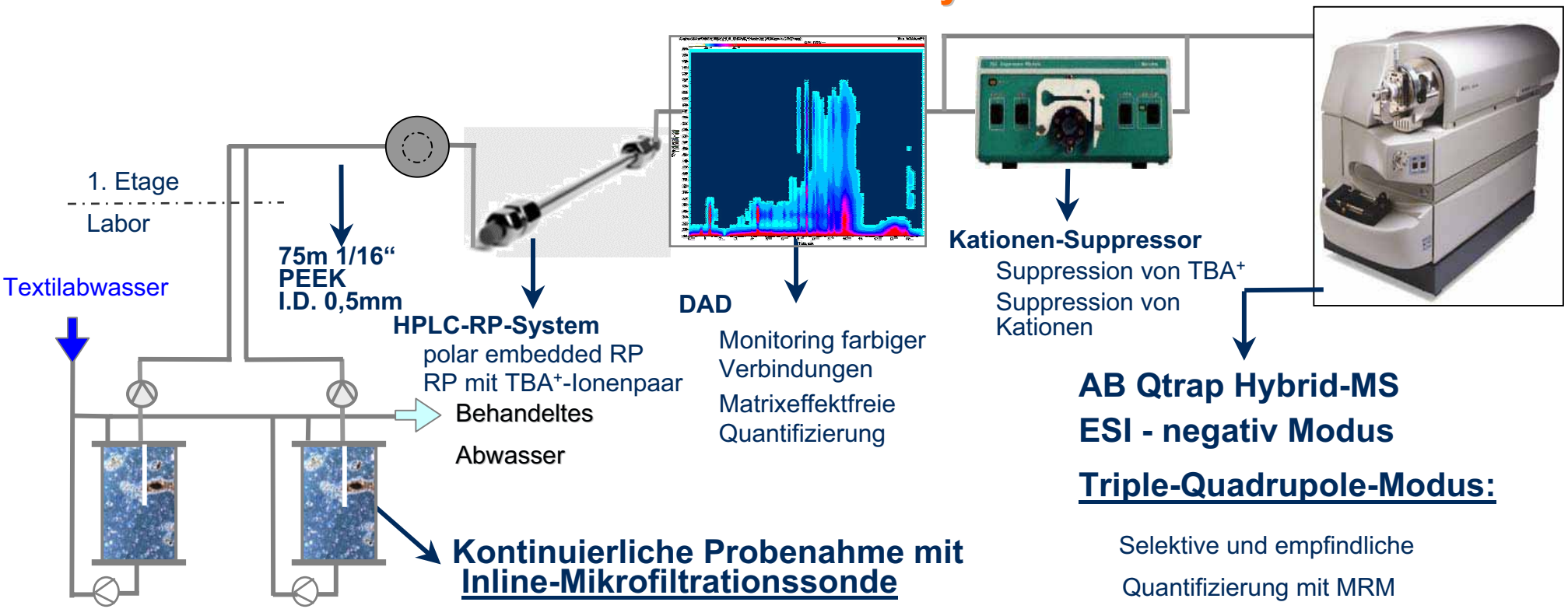
2002-2005

- 40-Liter anaerob/aerob BMR-System
- Automat. Messdatenerfassung +Steuerung
- Online-MF-HPLC-DAD-Spektroskopie

Chromatographische Auftrennung von Realproben



Set-up und Methodenentwicklung des massenspektroskopischen Verfahrens: Online-MF-HPLC-DAD-IC-ESI-MS²- Analysenverfahren



Zweistufiger anaerob/aerober Bioreaktor (2 x 40L)

Triple-Quadrupole-Modus:

Selektive und empfindliche Quantifizierung mit MRM

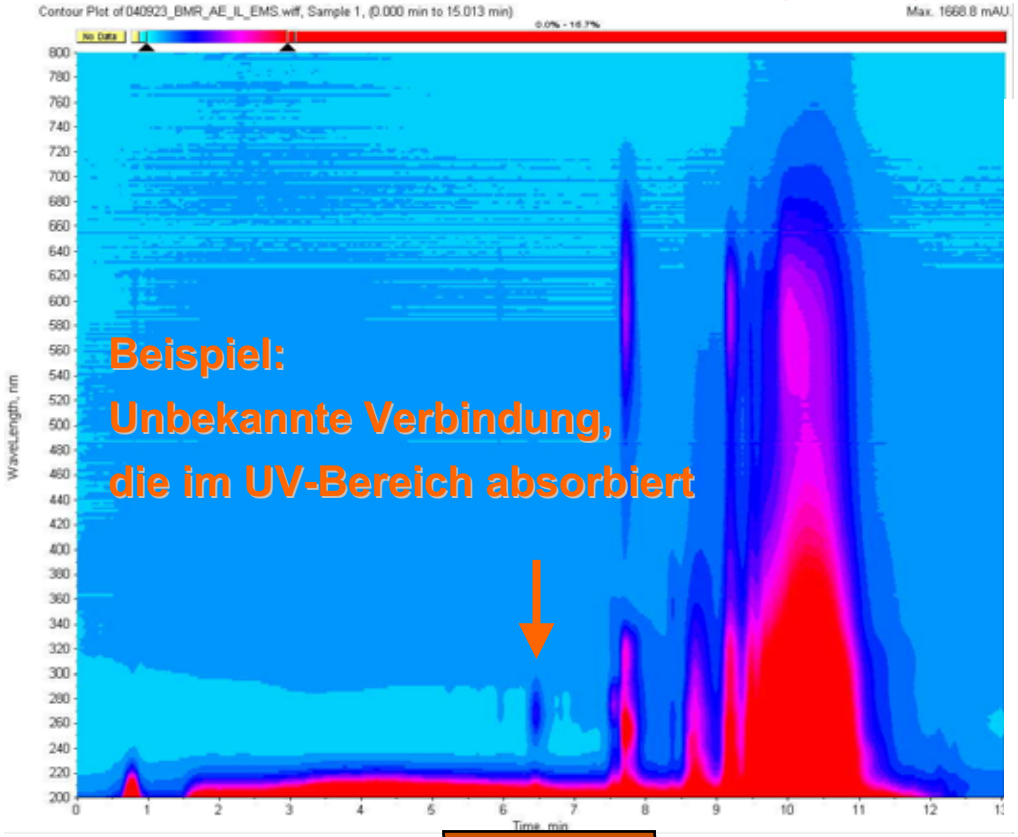
IonTrap-Modus:

Enhanced (E) MS-Scans: EMS, EPI, EMC, MS^3 für die Strukturanalyse

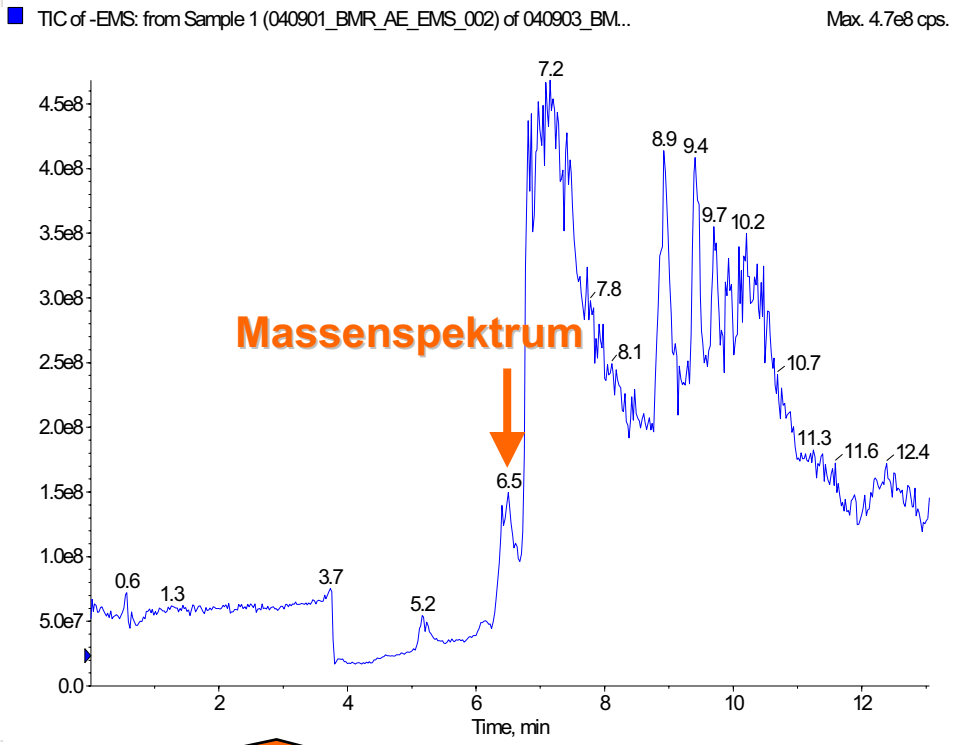
Strukturaufklärung von Azofarbstoffintermediaten mittels Online-LC-MS² aus Realmatrix

- Charakterisierung von primären und sekundären Verbindungen hydrolysierter Reaktiver Farbstoffe im Feed (Reaktorzulauf aus Realmatrixabwasser)
- Identifizierung von primären Abbauprodukten der anaeroben und aeroben biologischen Behandlung mittels Online-LC-MS² im Klärschlamm
- Strukturaufklärung durch Interpretation von Fragmentierungsmustern erzeugt aus negativen und positiven Ionen

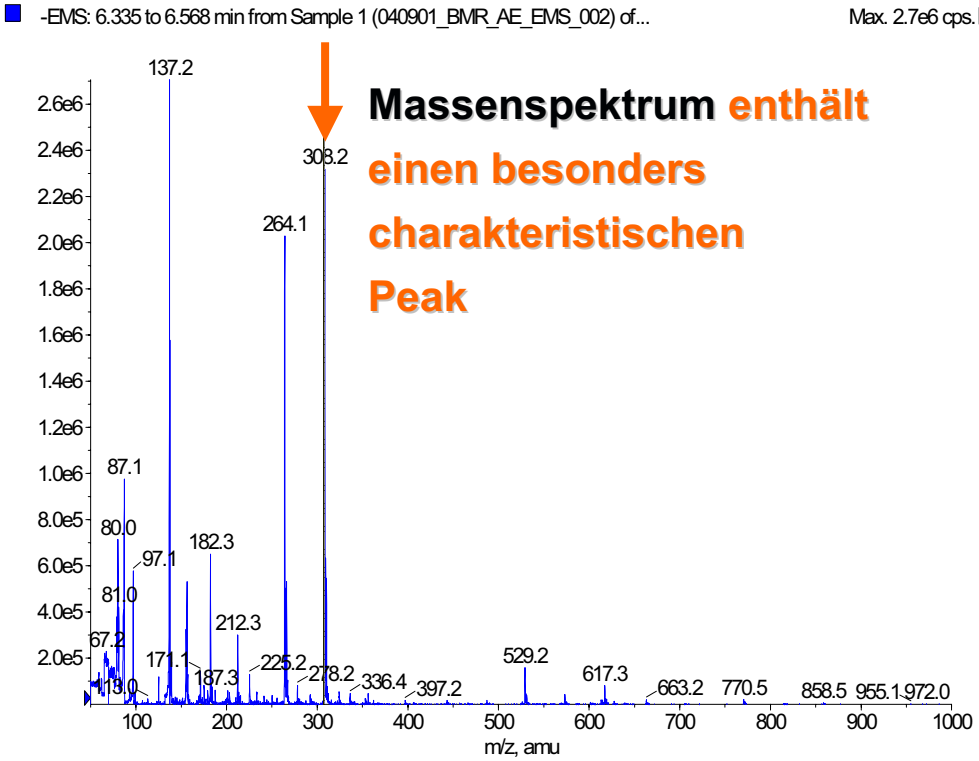
Identifizierung von Farbabbau-Intermediaten aus Realmatrix durch Online-LC-MS



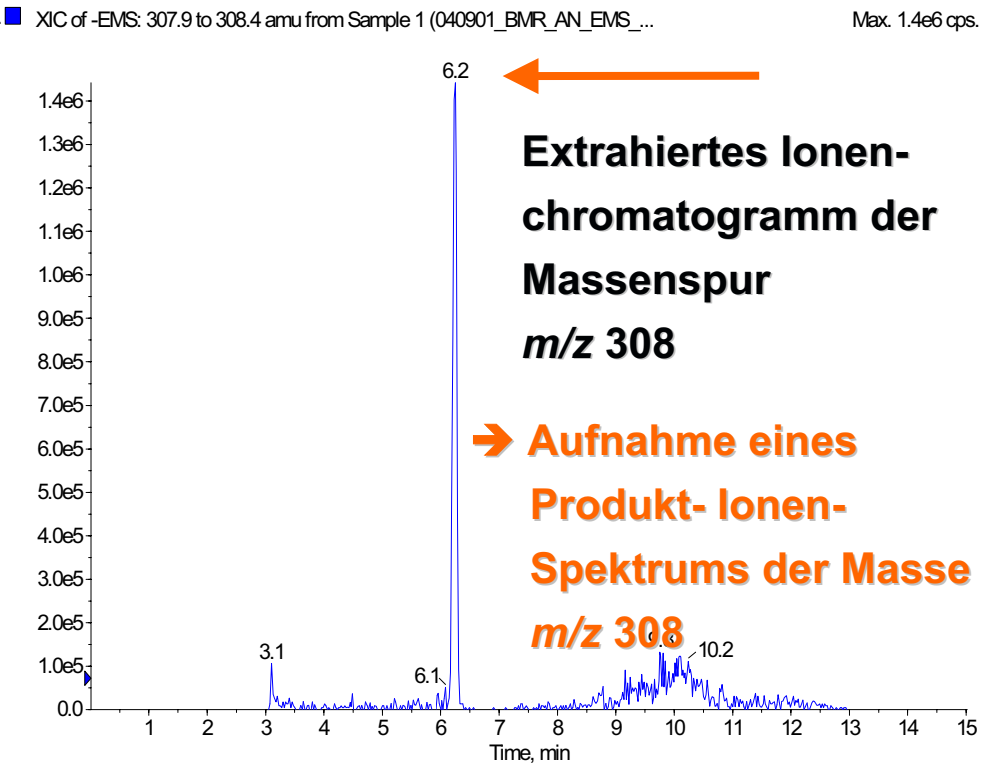
Totalionenchromatogramm



ESI(-)-MS-Scan 50-1700 amu



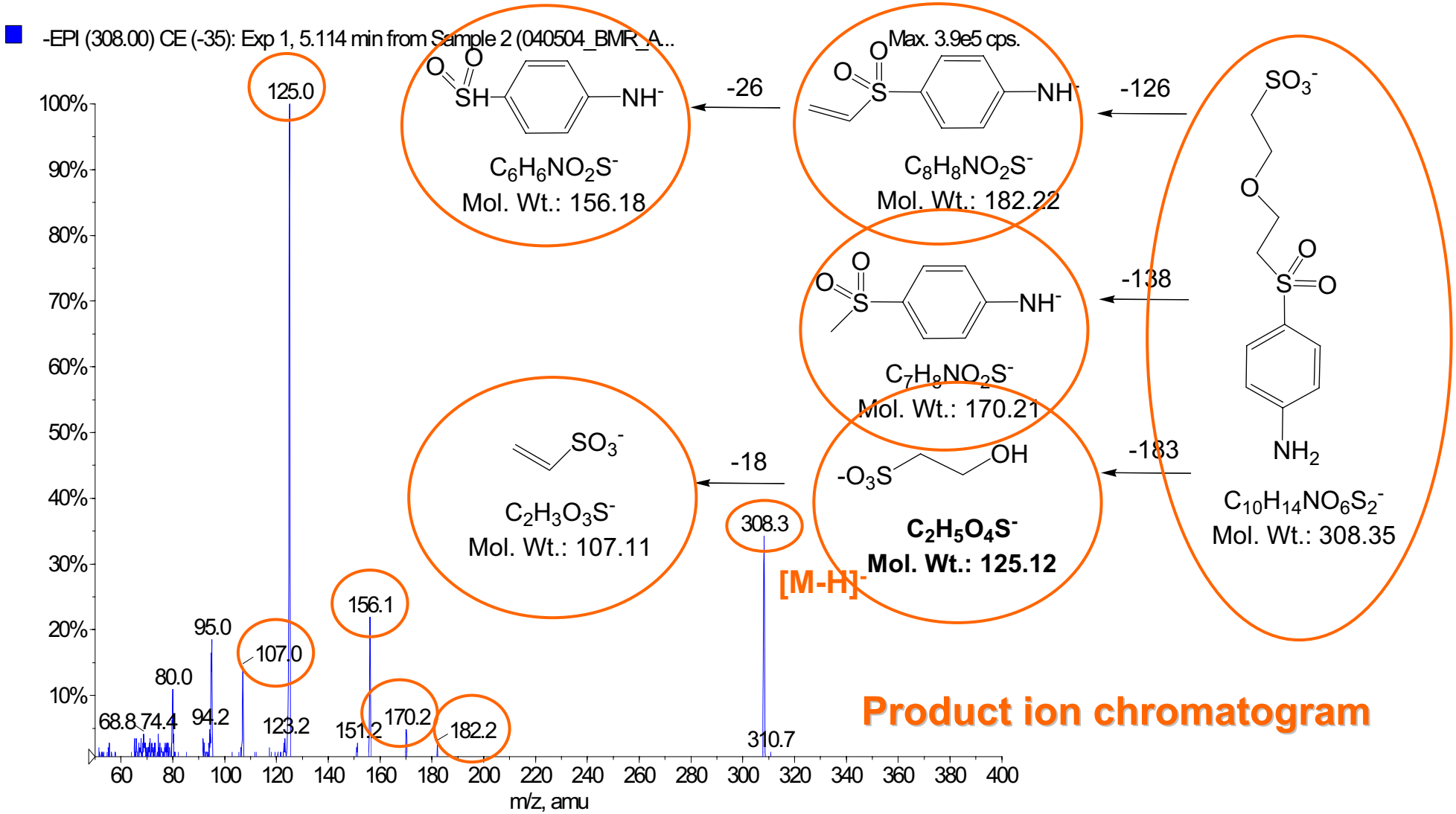
Massenspektrum enthält einen besonders charakteristischen Peak



Extrahiertes Ionen-chromatogramm der Massenspur *m/z* 308

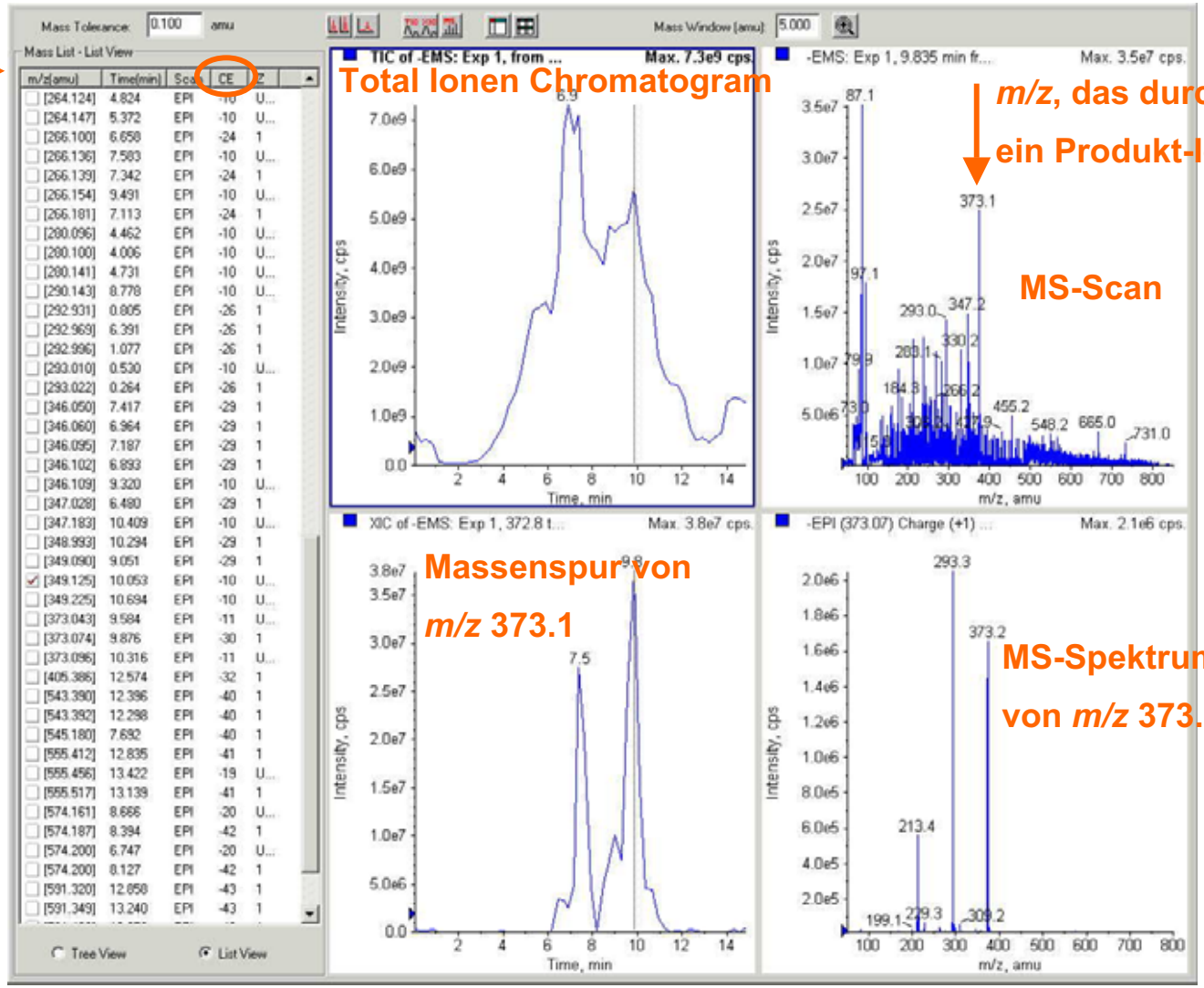
➔ **Aufnahme eines Produkt- Ionen-Spektrums der Masse *m/z* 308**

Identifizierung eines Intermediats aus Realmatrix durch Online-LC-MS

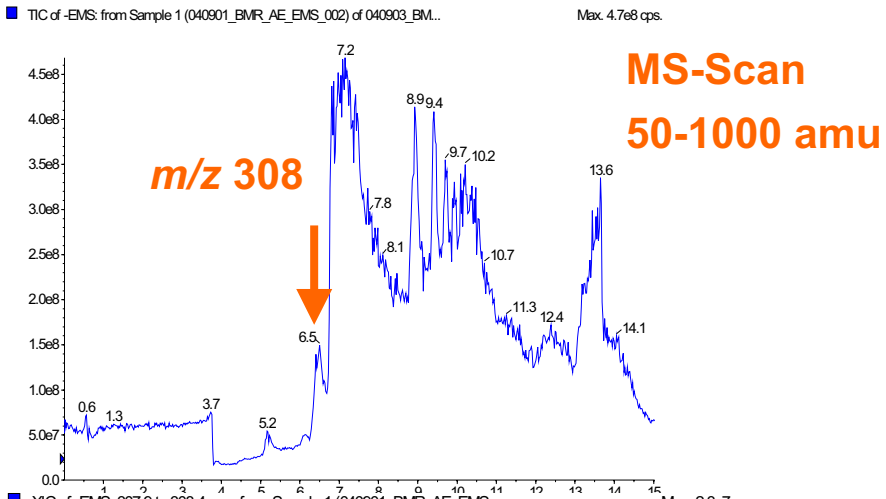


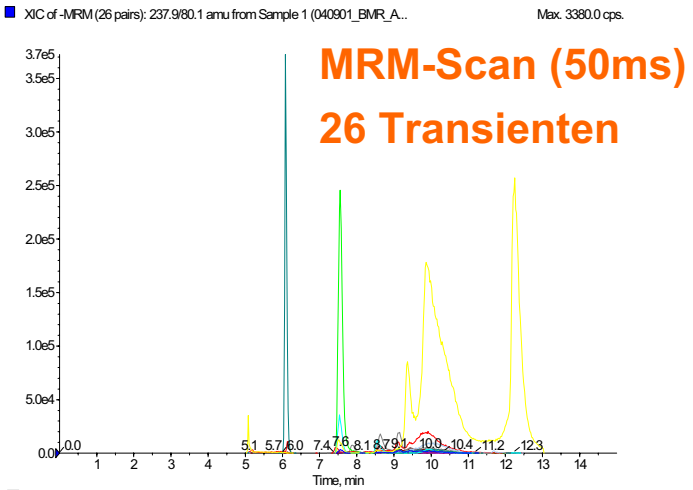
Information Dependent Aquisition - IDA

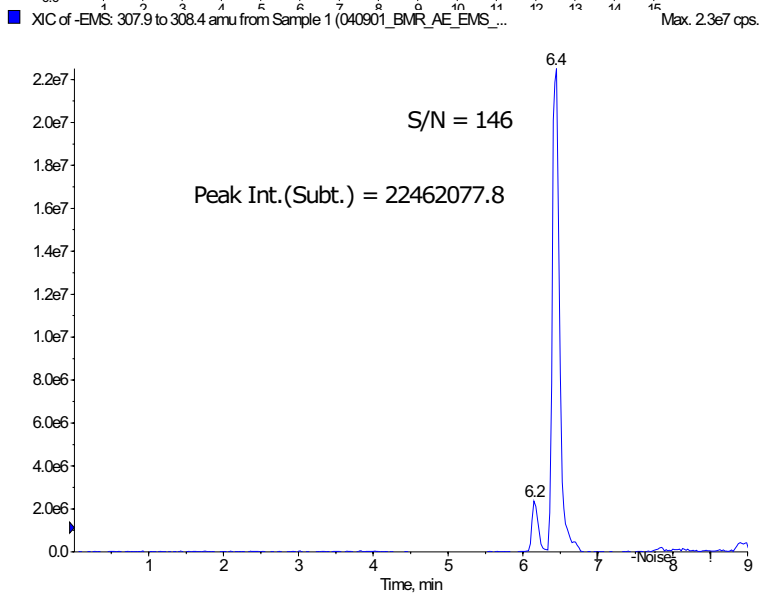
Liste von Ionen mit *m/z*, Retentionszeit und Kollisions-energie von denen automatisch ein Produkt-Ionen-Scan aufgenommen wurde.

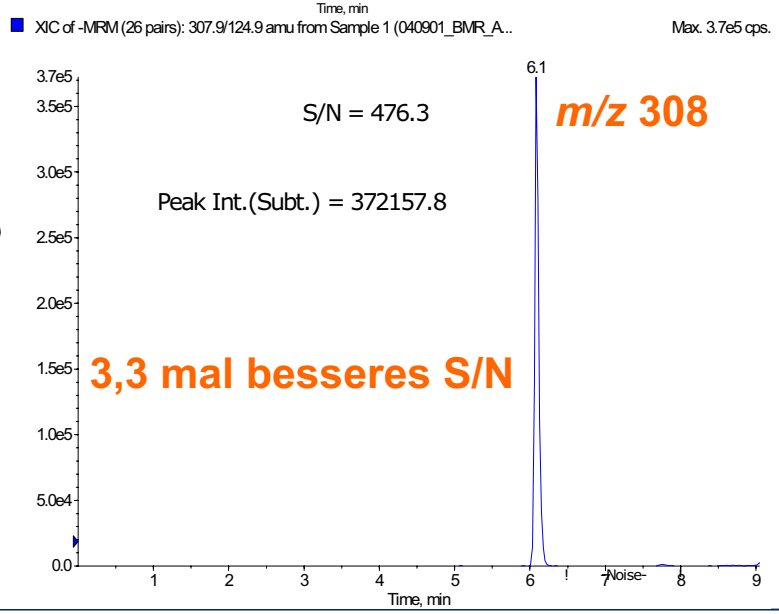


Hochselektives Monitoring von Intermediaten im MRM-Modus









Methodenvalidierung mittels simulierter Farbabwässer in Salzlösung

	c = µM, n=5	PB	Metanilsäure	RO107-H	$TAHNDS_{DP2}$	H-Säure	RB-OH	RB5-H
MSMS	MW	201	173	442	348	319	532	743
	RT (min)	2.2	5.4	7.1	7.3	7.5	7.8	8.0
	Q1 (amu)	200	171.8	441	346.9	317.8	264.6	370.5
	Q3 (amu)	107.9	80	186.1	187.1	237.8	80	370.6
	DP (V)	-56	-51	-81	-61	-151	-31	-41
	EP (V)	-10	-10	-7	-9.5	-7.5	-8.5	-7
	CEP (V)	-13.52	-12	-22	-18	-16	-14	-18
	CE (V)	-28	-34	-66	-44	-36	-48	-8
	CXP (V)	0	0	-4	-4	-4	0	-4
	LOD (MRM)	***n.b.	0.59	0.001	0.001	0.010	0.003	0.012
	LLOD (MRM)	-	4.88	0.610	0.153	0.122	4.88	1.22
	ULOD (MRM)	-	78.1	625	78	7.81	313	313
	r^2 *,**	-	*0.9953	*0.9977	*0.9985	*0.9927	*0.9989	*0.9982
	RSD (%)	-	7.8	6.1	7.0	6.8	6.2	4.7
DAD	Wellenlänge (nm)	270	n.b.	n.b.	585	300	500	585
	LOD (UVVIS)	1.33	-	-	0.33	0.26	0.26	0.15
	LLOD (UVVIS)	9.77	-	-	4.88	15.6	2.44	0.61
	ULOD (UVVIS)	2500	-	-	625	500	625	625
	r^2*,**	*0.9997	-	-	*0.9996	*0.9997	*0.9993	*0.9991
	RSD (%)	3.1	-	-	3.6	8	4.1	7.0

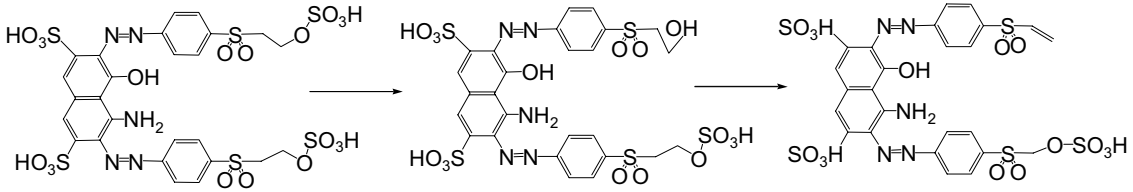
*quadratische Regression und x^{-1}-Wichtung **lineare Regression und x^{-1}-Wichtung ***n.b. - nicht be

NWG (abs.) im pg-Bereich

RSD <10%

Lineare Mess-bereiche über drei Dekaden, hohe Linearität

MS-Identifizierung von Haupt- und Nebenkomponenten im Feed (RB5)

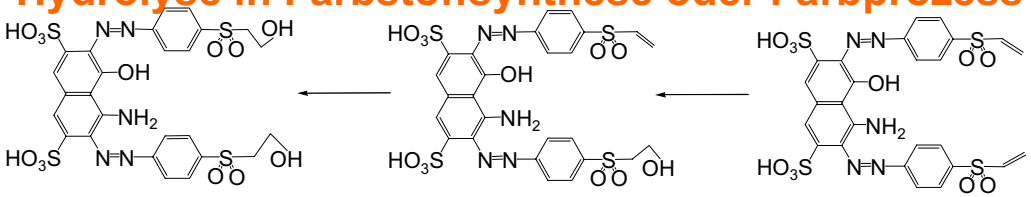


RB5
[M-H]$^-$ *m/z*=902,8

RB5 (-SO_3)
[M-H]$^-$ m/z 822,8

RB5 (-H_2SO_4)
[M-H]$^-$ *m/z*=804,8
(2 Isomere)

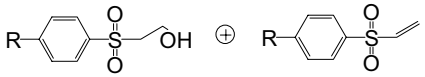
Hydrolyse in Farbstoffsynthese oder Färbprozess



RB5-H
[M-H]$^-$ *m/z*=742,8

RB5-HV
[M-H]$^-$ *m/z*=724,8
(2 Isomere)

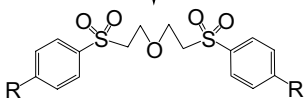
RB5-V
[M-H]$^-$ *m/z*=706,7



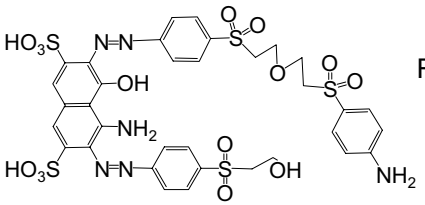
R = -NH_2 oder -N=N-RB5-H

Hydrolyse-nebenreaktion

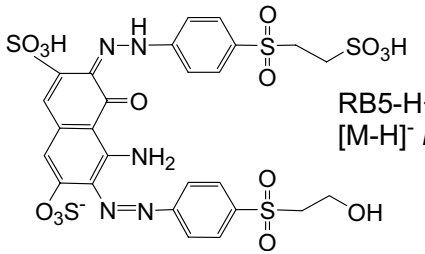
Etherbildung



R=NH_2: DPBE *m/z* 383



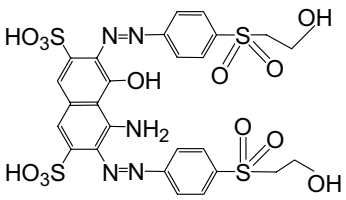
RB5-H+DPBE
m/z = 926
(2 Isomere)



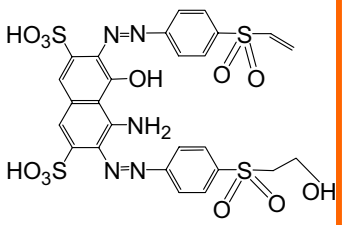
RB5-H+SO_2
[M-H]$^-$ *m/z* 806

Nebenreaktionsprodukt aus Synthese oder Hydrolyse sowie weitere, noch nicht identifizierte Verbindungen (UNKs)

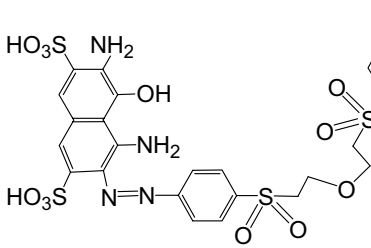
Identifizierung farbiger Intermediate mit Online-LC-DAD-MSMS



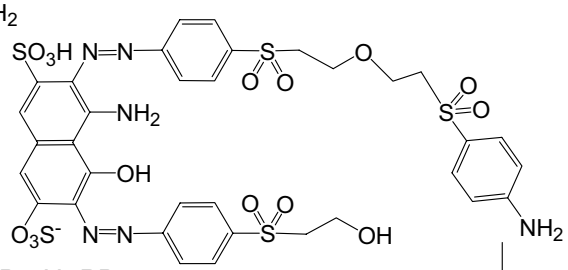
RB5-H
$[M-H]^-$ *m/z*=742,8



RB5-HV
$[M-H]^-$ *m/z*=724,8



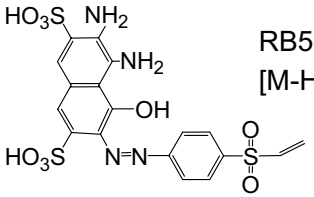
RB5-H -PB +DPBE
$[M-H]^-$ *m/z*=728,8



RB5-H+PB
$[M-H]^-$ *m/z*=926

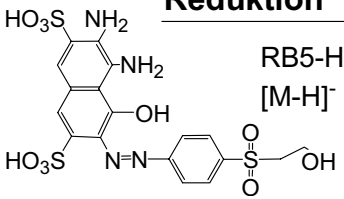
1. Stufe der anaeroben Reduktion

Neu identifizierte farbige Intermediate in Feed & Anaerob- & Aerob-Bioreaktor

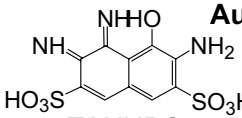


RB5-HV -PB
$[M-H]^-$ *m/z*=527,5

2.Stufe der anaeroben Reduktion

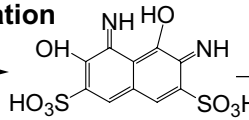


RB5-H -PB
$[M-H]^-$ *m/z*=545,5

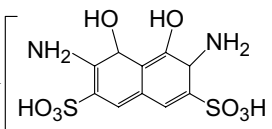


$TAHNDS_{DP1}$
$[M-H]^-$ *m/z*=346,3
Strukturvorschlag

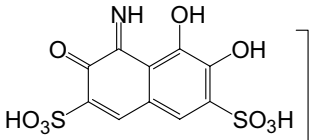
Autoxidation



$TAHNDS_{DP2}$
$[M-H]^-$ *m/z*=347,3

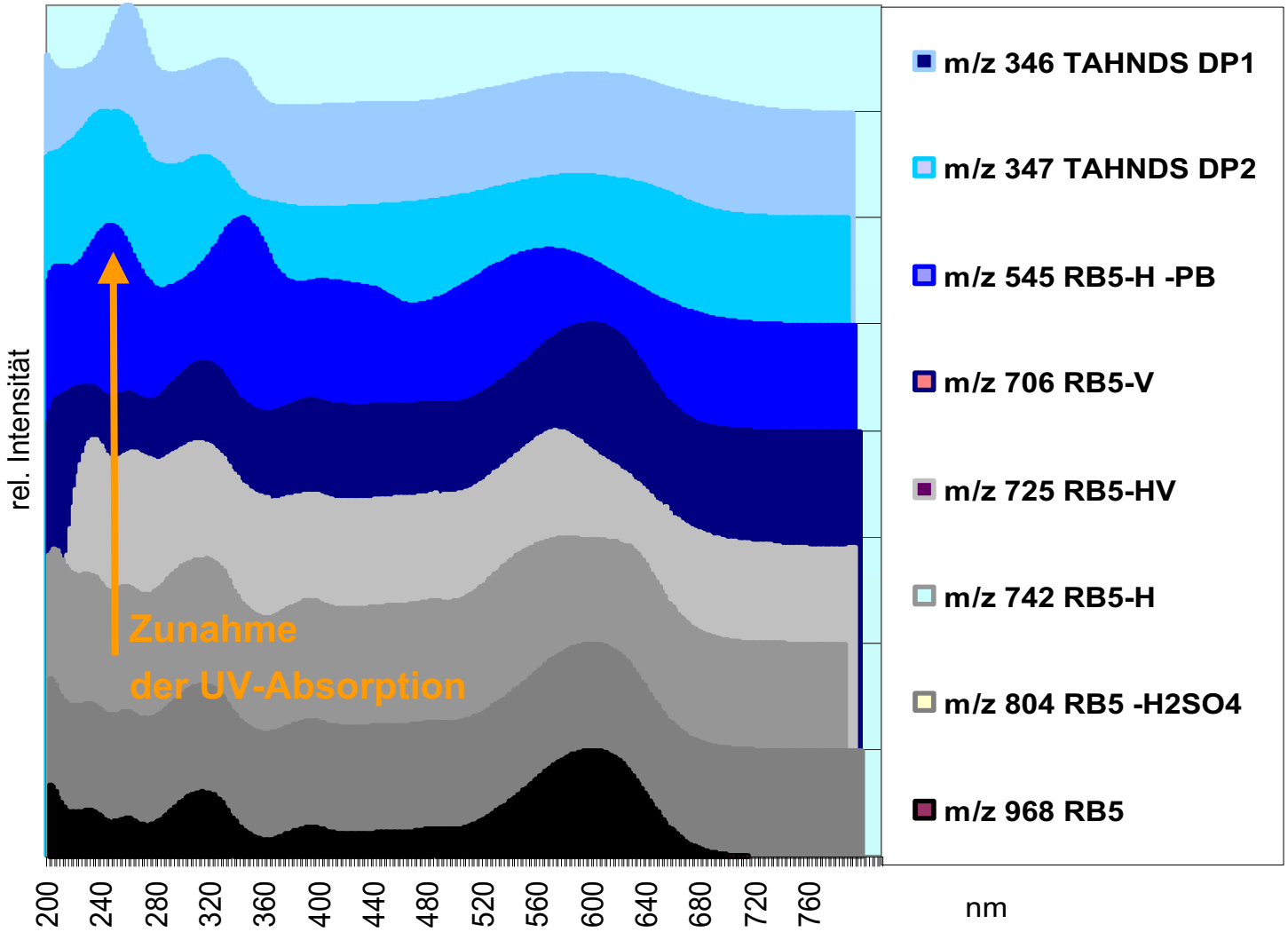


$TAHNDS_{DP3}$
$[M-H]^-$ *m/z*=349,3
Strukturvorschlag



$TAHNDS_{DP4}$
$[M-H]^-$ *m/z*=348,3
Strukturvorschlag

Blaues Abwasser nach der Anaerobstufe - Reste von blauem Farbstoff ?



Verbindungen, die nach Reduktion Rück-verfärbung verursachen

Teilreduzierter Farbstoff

Reaktivfarbstoff als: Teilhydrolysat

Vinyl-Form

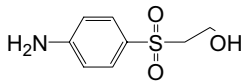
Hydrolysat

Ester-Vinyl-Form

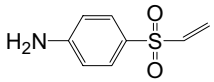
Esterfrom

Identifizierung nicht-farbiger Intermediate mit Online-LC-DAD-MSMS

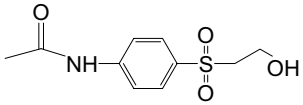
Abbauprodukte, die bei der Reduktion von Reaktivfarbstoffen freigesetzt werden



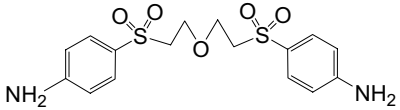
p-Base (PB)
$[M-H]^-$ *m/z*=201,2



vinyl-p-Base (VPB)
$[M-H]^-$ *m/z*=183,2

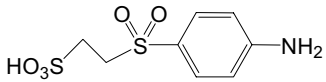


N-Acetamid-p-Base (NAPB)
$[M-H]^-$ *m/z*=243,2

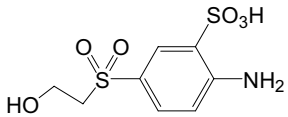


Di-p-Base-Ether (DPBE)
$[M-H]^-$ *m/z*=383,5

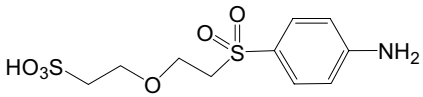
<u>Neu</u> identifizierte Abbauprodukte, die als Nebenkomponenten im Feed vorliegen oder bei der Reduktion von Farbstoffnebenkomponenten freigesetzt werden



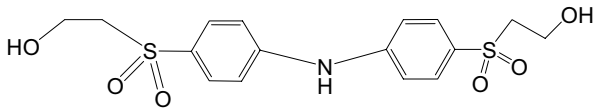
2-(4-Amino-benzenesulfonyl)-ethanesulfonic acid



2-Amino-5-(2-hydroxy-ethanesulfonyl)-benzenesulfonic acid

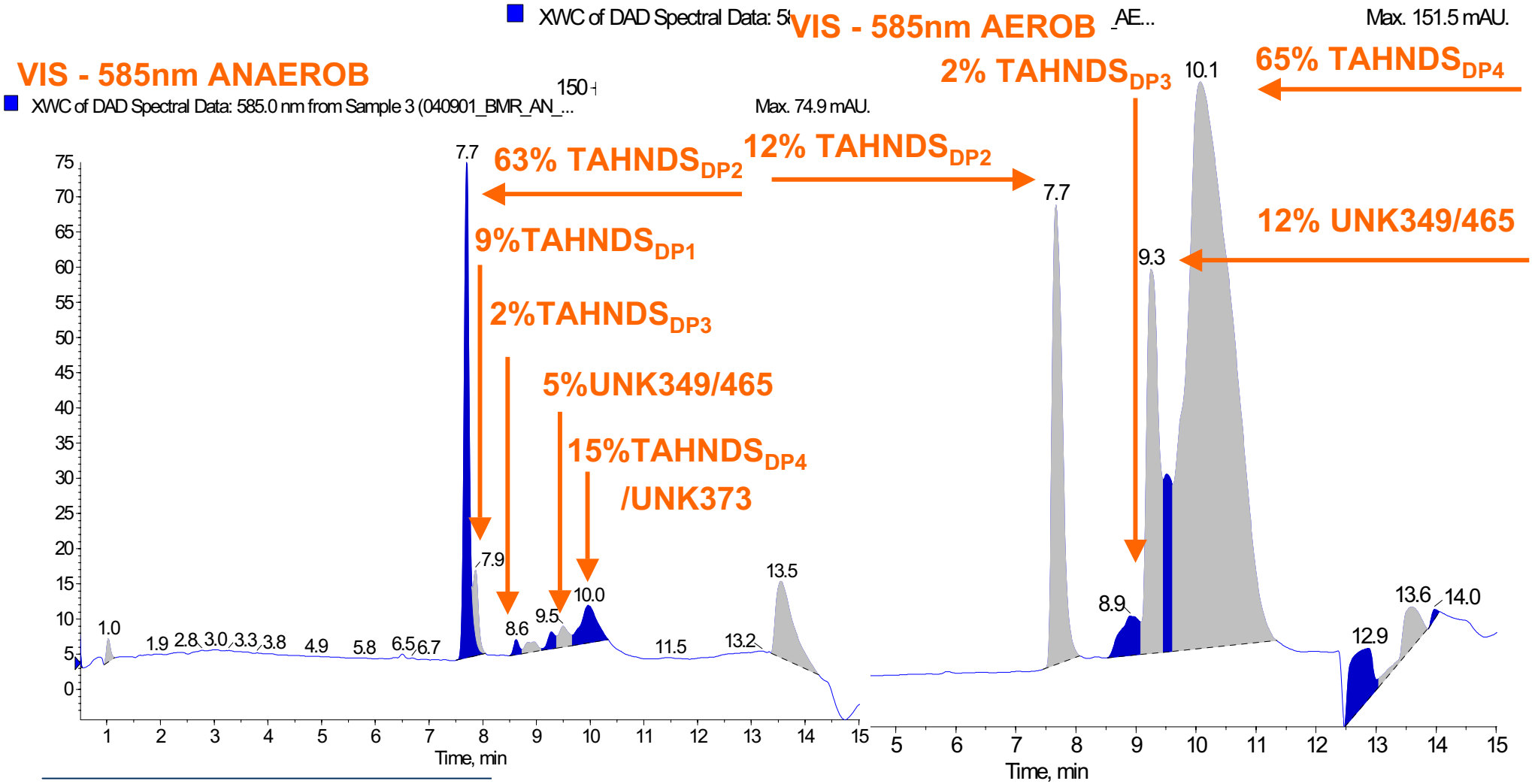


2-[2-(4-Amino-benzenesulfonyl)-ethoxy]-ethanesulfonic acid



2-{4-[4-(2-Hydroxy-ethanesulfonyl)-phenyl-amino]-benzenesulfonyl}-ethanol

Stoffspezifische Anteile an spektraler Extinktion im VIS-Bereich



Stoffspezifische Anteile an spektraler Extinktion im UV-Bereich

UV - 270nm ANAEROB

XWC of DAD Spectral Data: 270.0 nm from Sample 3 (040901_BMR_AN...

Max. 331.0

54% p-Base

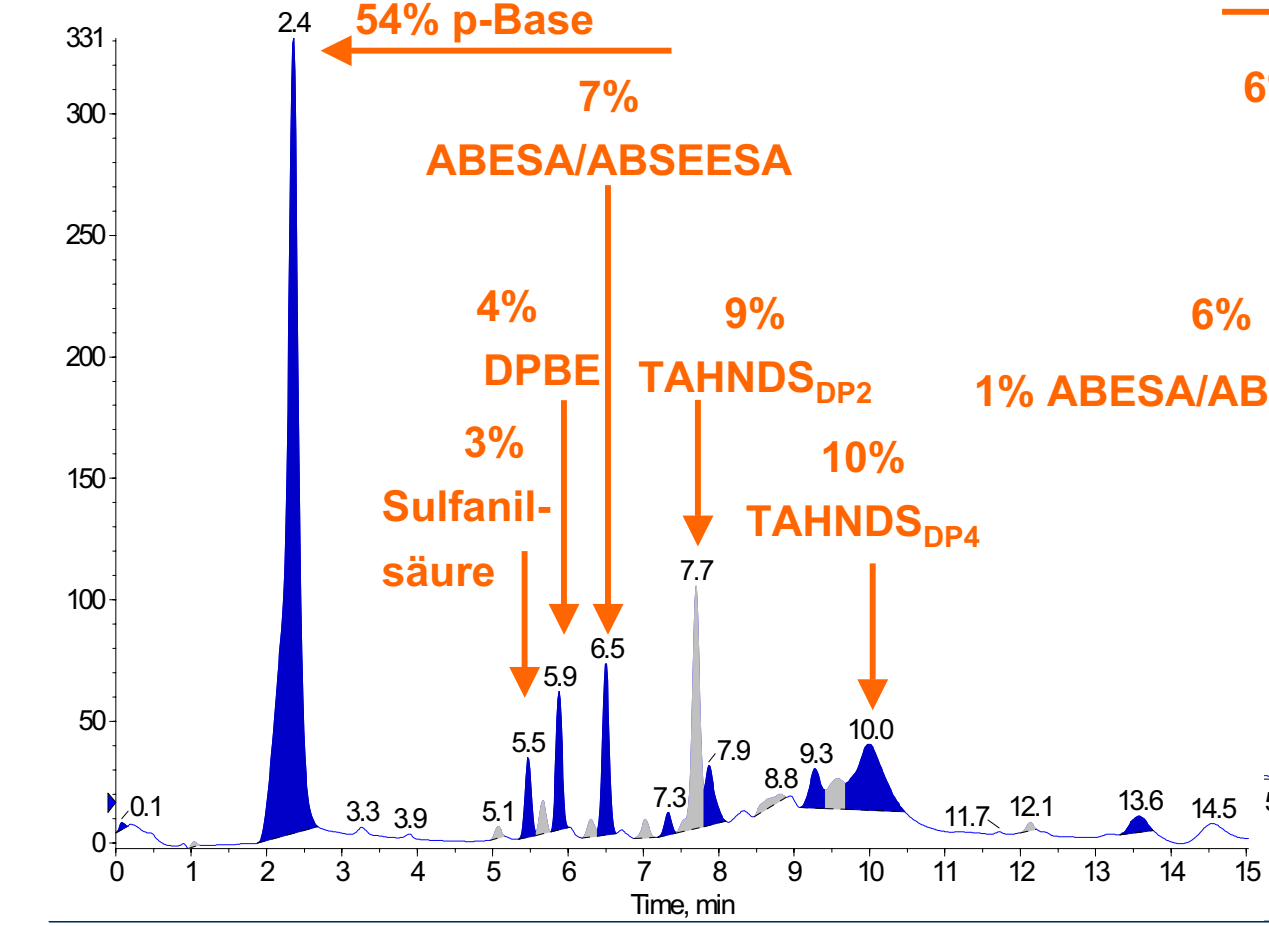
7% ABESA/ABSEESA

4% DPBE

3% Sulfanil-säure

9% $TAHNDS_{DP2}$

10% $TAHNDS_{DP4}$



UV - 270nm AEROB

XWC of DAD Spectral Data: 270.0 nm from Sample 3 (040901_BMR_AE...

Max. 715.8 mAU.

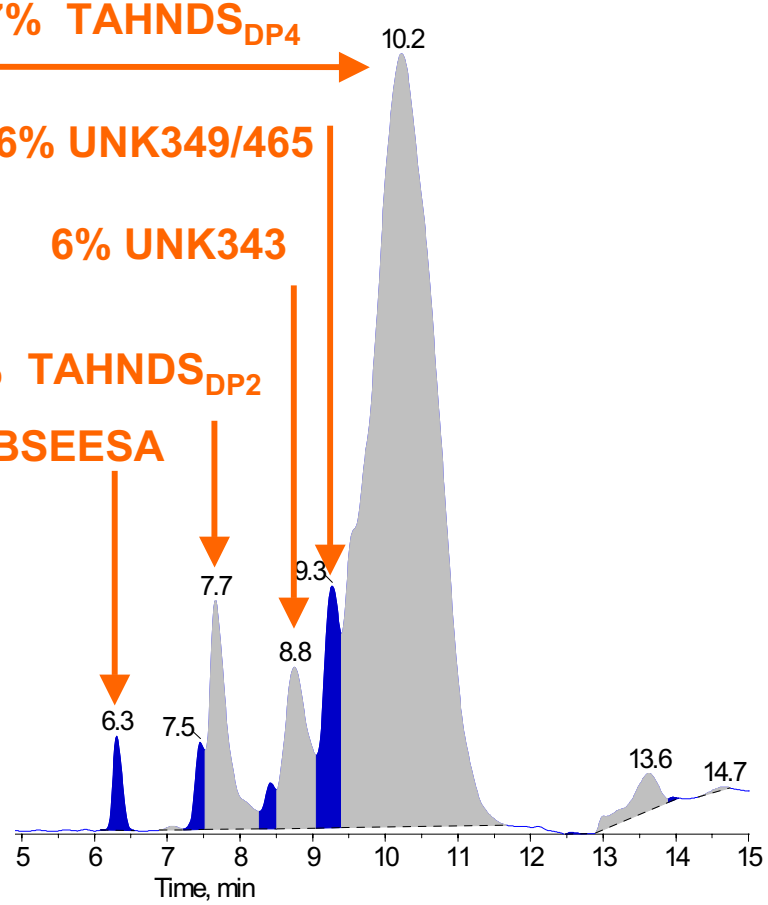
77% $TAHNDS_{DP4}$

6% UNK349/465

6% UNK343

6% $TAHNDS_{DP2}$

1% ABESA/ABSEESA



Anaerobe/Aerobe Abbaubarkeit von Feed-Haupt- und Nebenkomponenten

+ vorhanden/ gut abbaubar

- nicht gefunden/ schlecht abbaubar

~ Schwankende Abbaubarkeit

Verbindung	RT	*m/z* Q1	*m/z* Q3	Feed	AN	AE	Anaerobe Abbaubarkeit	Aerobe Abbaubarkeit
NAPB	4,0	241,9	132,9	+	+	+	-	+
UNK384	5,5	384,2	275,2	+	+	+	-	+
PBSE	6,1	280,2	171,2	+	+	+	-	+
UNK145	7,0	145,1	65,0	+	+	+	+	+
RB-OH	8,5	264,5	79,9	+	+	+	+	+
RB5-H	8,8	370,5	370,5	+	+	+	+	-
RB5-H+DPBE	8,9	925,2	861,2	+	+	-	+	-
RB-NH2	9,2	530,0	316,9	+	+	-	+	-
RB5-H-H2O	9,2	723,9	660,0	+	+	-	+	-
RB5-H+SO_2	9,4	806,0	236,0	+	+	-	+	-
Di-RB5-H	9,7	1467,4	927,4	+	-	-	+	-
UNK733	9,9	733,0	236,0	+	+	-	+	-
RB5-H-2H_2O	10	705,9	642,0	+	+	-	+	-
ABSEESA	6,4	307,9	124,9	+	+	+	-	-
ABSESA	6,6	264,2	81,2	+	+	+	-	~

Farbige Verbidungen

Nicht abbaubar

Anaerob/aerobe Abbaubarkeit von Intermediaten

+ vorhanden/gut abbaubar

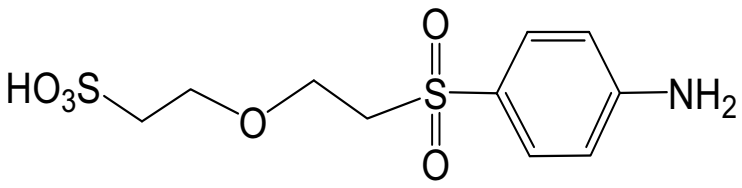
- nicht vorhanden/abbaubar

~ schwankende Abbaubarkeit

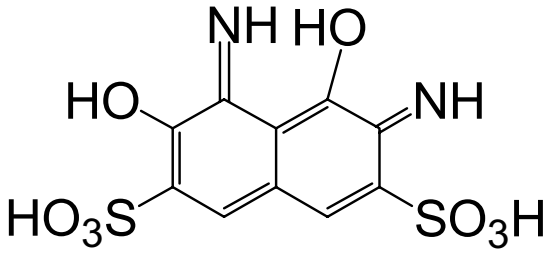
Compound	RT	*m/z* Q1	*m/z* Q3	Feed	AN	AE	anaerobic degradability	aerobic degradability
p-Base	2,4	200		-	+	+	-	+
DPBE	4,5	383,0	383	-	+	+	-	+
Sulfanilsäure	5,2	171,8	79,9	-	+	+	-	+
VPB	5,2	183,0	183	-	+	-	-	+
HABSA	6,4	188,2	96,2	-	+	+	-	+
RB5-H-PB	6,5	545,0	264,0	-	+	+	+	+
UNK371	7,9	371,2	183,2	-	+	+	-	+
UNK584	9,1	584,2	424,2	-	+	-	-	+
UNK661	9,4	661,0	501,0	-	+	+	-	+
UNK373	10,1	373,2	293,2	-	+	+	~	+
$TAHNDS_{DP3}$	8,1	347,9	188,1	+	+	-	-	~
RB5-H-PB	8,3	545,0	264,0	-	+	+	+	~
$TAHNDS_{DP3}$	8,9	347,9	188,1	-	+	+	~	~
UNK386	7,8	358,0	278,0	-	+	+	~	~
$TAHNDS_{DP2}$	7,9	346,9	187,1	-	+	+	-	-
$TANHDS_{DP1}$	8,1	345,9	186,1	-	+	-	-	-
UNK543	8,4	543,1	463,1	-	+	+	-	-
$TAHNDS_{DP4}$	10,4	348,9	189,1	-	+	+	-	-

Nicht abbaubar

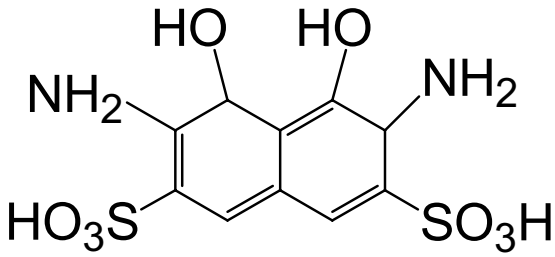
Primäre Verursacher von Rückverfärbungen nach aerober Behandlung



ABSEESA



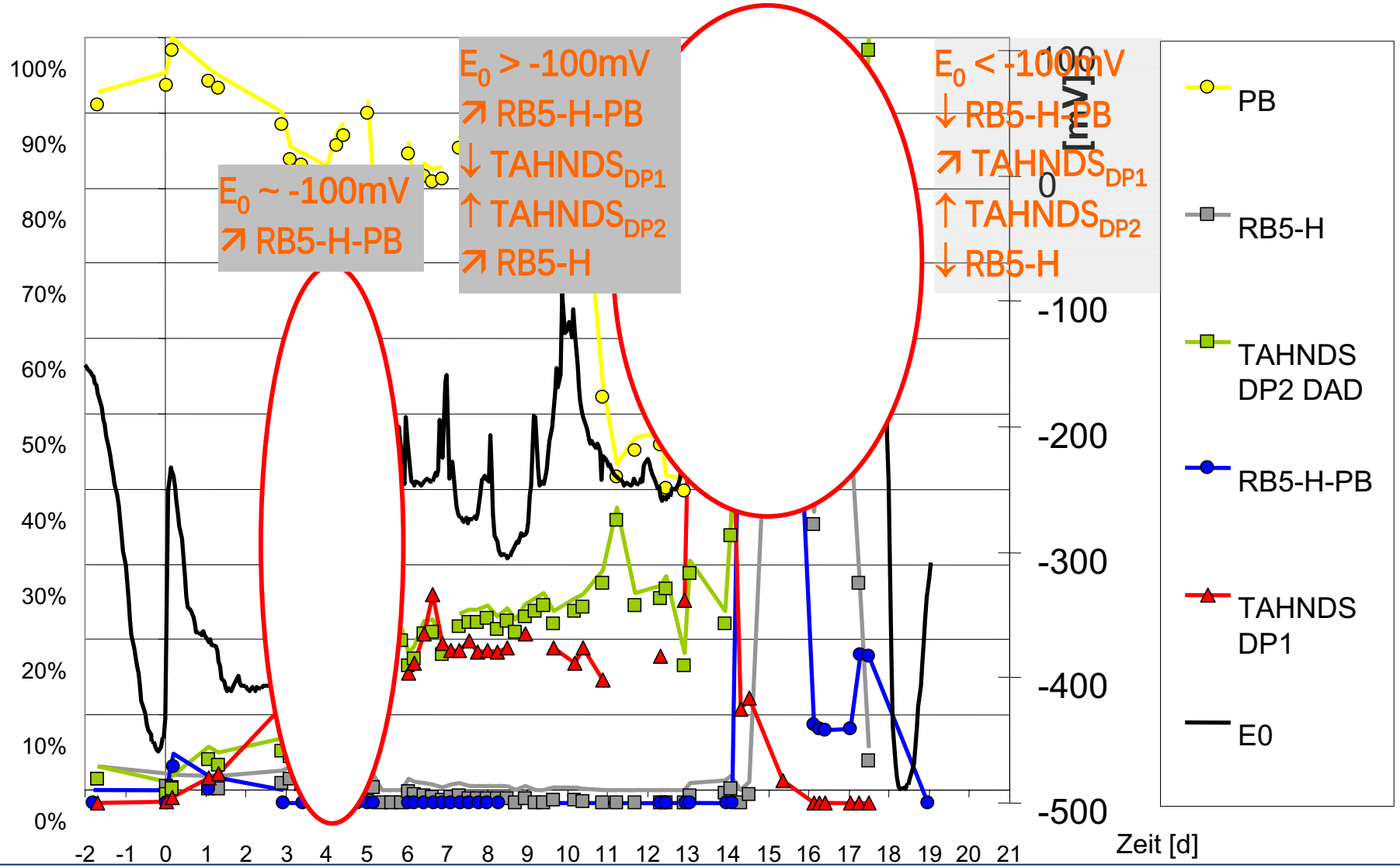
$TAHNDS_{DP2}$



$TAHNDS_{DP3}$
Strukturvorschlag

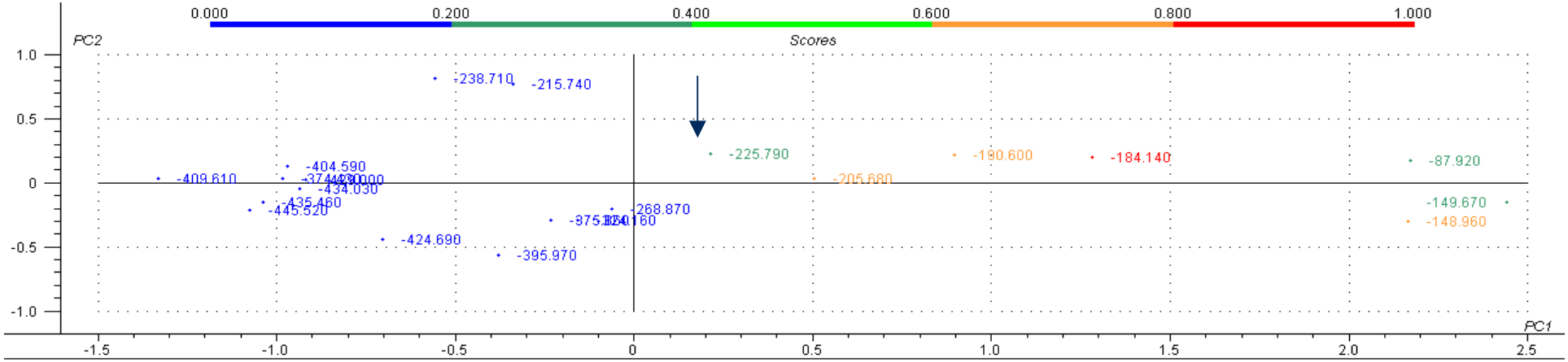
- ⇨ **Meist hochsubstituierte aromatische Verbindungen (Naphthalinderivate)**
- ⇨ **Anionisch durch ein bis mehrere Sulfonsäuregruppen**
- ⇨ **Nebenkomponenten aus Farbstoff und auch Abbauprodukte der Farbstoffe**

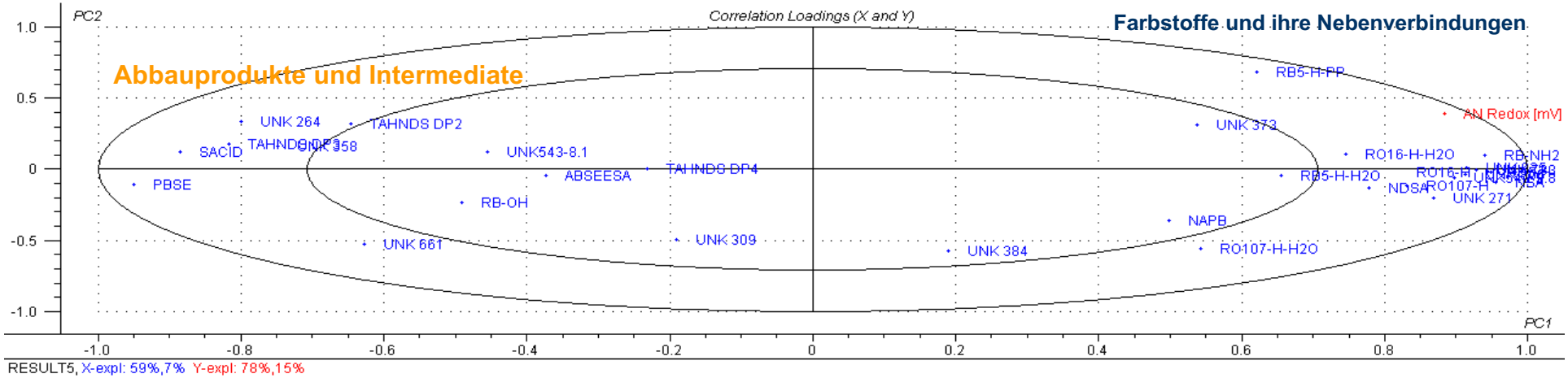
Einfluss des Redoxpotenzials auf die anaerobe Reduktion



Einfluss des Redoxpotentials auf den Abbau von C. I. Reactive Black 5 im anaeroben Reaktor

Schwellenwert -225 mV

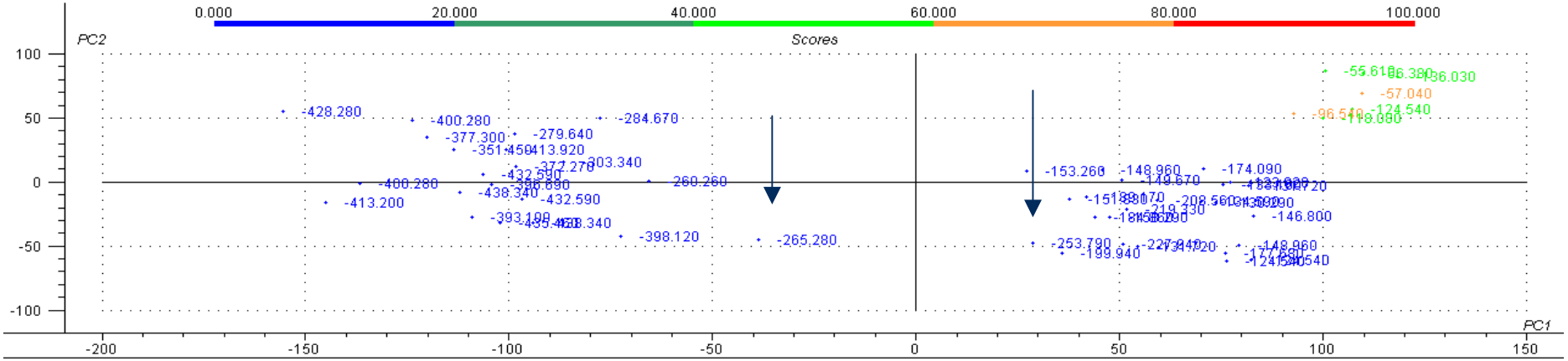


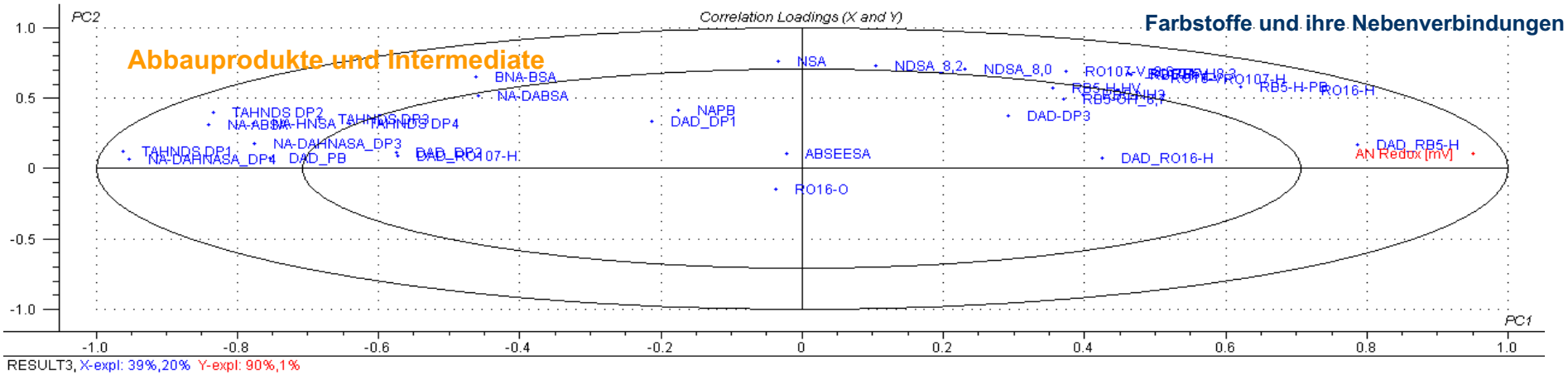


Partial Least Square (PLS-1), The Unscrambler® v9.2

Einfluss des Redoxpotentials auf den Abbau von Navy Blue im anaeroben Reaktor

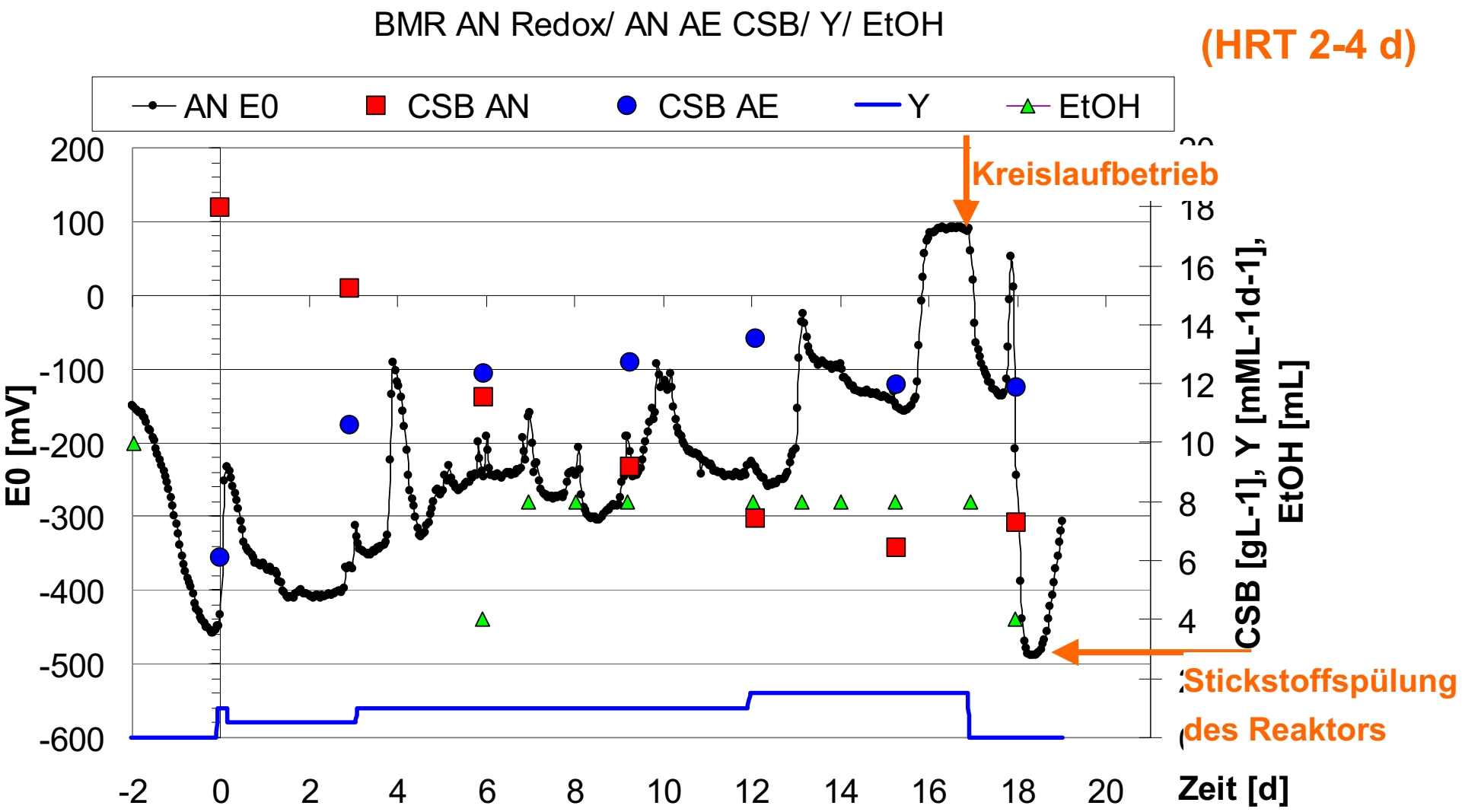
Schwellenwert: –255 mV (Trichromie-Versuch)





Partial Least Square (PLS-1), The Unscrambler® v9.2

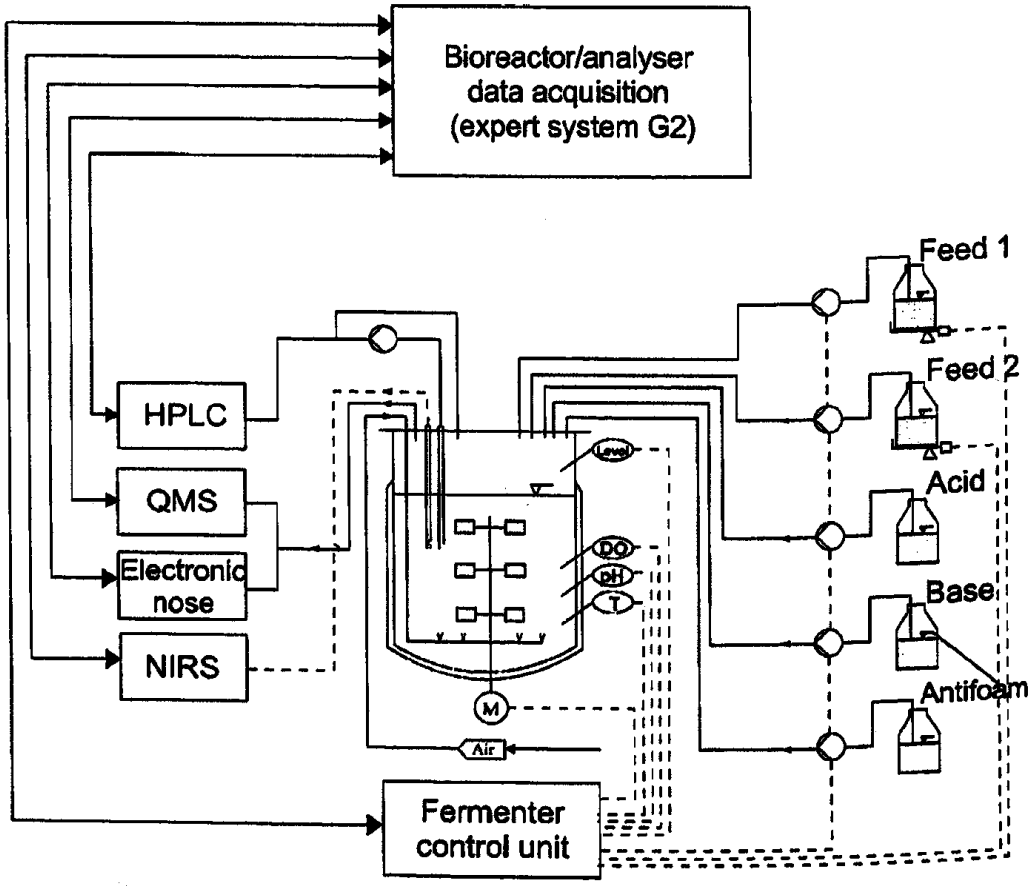
Abhängigkeit des Redoxpotenzials von Ethanolgaben



Ergebnisse Monitoring und Optimierung der Betriebsparameter

- Die anaerobe Reduktion korreliert mit dem Redoxpotenzial – steuern!
- Unvollständige Reduktion von Diazo-Farbstoffen bei Redoxpotenzialen > -100mV
- Autoxidation von Intermediat $TAHNDS_{DP1}$ zu $TAHNDS_{DP2/DP3/DP4}$
- Raumbelastungen von 0,5-1,5 $mML^{-1}d^{-1}$ werden bei E_0 < -100 mV ausreichend reduziert, 1,5 - 5 $mM\ ^{-1}d^{-1}$ benötigen E_0 < -250 mV
- Beurteilung des stoffspezifische Abbauverhaltens über Online-LC-DAD-MS Monitoring und Identifizierung der Verursacher von Restfarbtigkeit

Online monitoring of a bioprocess based on a multi-analyser system and multivariate statistical process modelling

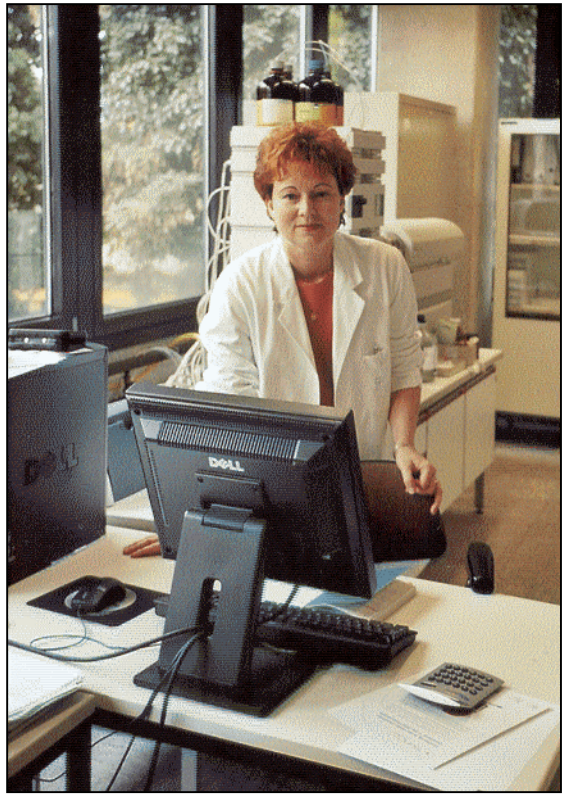


Christian Cimander

Linköping University, Sweden

Carl-Frederic Mandenius
Novozymes Biopharma AB, Sweden

J. Chem. Technol. Biotechnol. 77, 1157-1168, 2002



Arbeitskreis Chemische Verfahrens- und Prozessanalysentechnik an der FH Köln

astrid.rehorek@fh-koeln.de

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!