

Kryogenes Mahlen

Beispiele für Anwendungen



C3 PROZESS- UND
ANALYSENTECHNIK

www.c3-analysentechnik.de

SPEX® SamplePrep®
www.spexsampleprep.com

Einleitung

Das Zerkleinern und Homogenisieren von Proben zur Vorbereitung für eine anschließende Analyse ist in den meisten Laboren ein alltäglicher Vorgang. Oftmals ist jedoch das Laborpersonal mit der Problematik konfrontiert, dass

- a) die Proben bei Raumtemperatur aufgrund deren elastischer bzw. weicher Konsistenz,
- b) deren Änderung der mechanischen Eigenschaften durch Temperatureinwirkung oder
- c) deren Empfindlichkeit gegenüber Temperaturerhöhungen ...

mit herkömmlichen Methoden wie z.B. Mörser und Pistill oder Kugelmøhlen nicht zerkleinert werden können. Um die eben besprochenen Faktoren zu eliminieren, werden Proben in vielen Laboren entweder in flüssigem Stickstoff vorgekühlt oder der Flüssigstickstoff wird direkt zum Mahlgut in den Mörser gegeben. Beide Vorgehensweisen sollten aus sicherheitstechnischer Sicht durch den möglichen direkten Kontakt mit dem tiefkalten Medium vermieden werden bzw. sind in vielen Laboren grundsätzlich nicht zulässig. Zusätzlich gilt es zu bedenken, dass die späteren Analysenergebnisse sehr stark von der Probenvorbereitung, im speziellen von der Feinheit des Analyten abhängig sein können. In diesem Zusammenhang sind natürlich - besonders im Bereich der Routineanalytik – gute Wiederholbarkeit und gute Reproduzierbarkeit erforderlich. Der Schritt weg vom manuellen hin zum automatisierten Zerkleinern bietet hier enorme Vorteile: Die Anwenderin bzw. der Anwender erhält reproduzierbare Mahlqualitäten durch programmierbare Abläufe, höchste Mahleffizienz, ohne kritische Probertemperaturen zu erreichen, bei gleichzeitig wesentlich kürzeren Mahlzeiten im Vergleich zu manuellen Methoden. Es werden also die Vorteile der tiefen Temperaturen mit denen des mechanischen Mahlens vereint (1).



Applikationsbeispiele - biologische Anwendungen

DNA-Extraktion / Forensik / Genotyping

Für die Erforschung von Krankheiten und die Herstellung wirksamer Medikamente zur Bekämpfung derselben ist ein genaues Verständnis der Vorgänge im Körper unerlässlich. In der Vergangenheit wurden oftmals Medikamente durch Zufall entdeckt, wie z.B. Penicillin. Heutzutage weiß man, dass viele Vorgänge im Zellinneren durch die Bindung eines Enzyms an einen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche ausgelöst werden. Hinweise auf diese sog. Target's können der bereits publizierten wissenschaftlichen Literatur entnommen werden oder aber auch auf aktuellen Berichten von ebenfalls in diesem Bereich forschenden Arbeitsgruppen basieren. Nicht zuletzt enthält das Erbgut, die DNA, oft die entscheidenden Hinweise zum besseren Verständnis des Zusammenspiels der unterschiedlichen Biomoleküle des Körpers.

In historischen Fällen, bei Massenkatastrophen oder bei der Identifizierung vermisster Personen, sind Knochen- und Zahnproben oft das beste bzw. einzige biologische Material, das für die DNA-Typisierung zur Verfügung steht. Dies ist auf die physikalische und chemische Natur der Protein-Mineral-Matrix des Knochens zurückzuführen, die gegenüber den nachteiligen Umwelteinflüssen und biologischen Angriffen relativ beständig ist (2). So beschreiben Sweet et. al. (3) eine alternative, vor allem aber schnelle und sterile Methode zur DNA-Gewinnung aus dem Mark von Backenzähnen, ohne manuelle Vorzerkleinerung. Dies geschieht nicht, wie vielfach üblich, durch Aufschneiden des Zahns und manuelles Auskratzen des Marks, sondern durch das Vermahlen des ganzen Zahnes.



Tooth sample before



Tooth sample after

Eine Methode der DNA-Gewinnung aus Knochensubstanz wird von Morales Colón et. al. beschrieben (4). Durch die effiziente Verhinderung einer Erwärmung der Probe während des Mahlvorganges war es möglich, mit der beschriebenen Methode reproduzierbare DNA-Profile bereits aus 0,1g Knochenpulver zu erzielen. Nicht zuletzt spielt die Gewinnung von DNA aus Zähnen und Knochen aufgrund des oftmaligen Fehlens von Gewebe in der Anthropologie eine entscheidende Rolle (5). Eine Methode mit minimal nötiger Probenmenge ist hier klar zu bevorzugen, da hiermit ein oftmals bedeutender Fund nicht noch weiter in Mitleidenschaft gezogen wird und weitestgehend erhalten bleibt.



HUMAN BONE - BEFORE

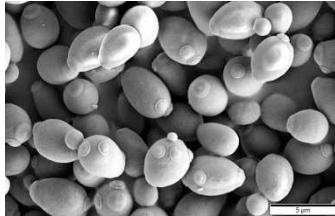


HUMAN BONE - AFTER



Protein-Isolation

Für eine Vielzahl von wissenschaftlichen Fragestellungen ist es notwendig, Proteine in den unterschiedlichsten Mengen rekombinant und in hoher Reinheit herzustellen. Proteinexpression ist ein sehr komplexer Vorgang, wobei viele Faktoren zu berücksichtigen sind, um den gewünschten



© Wikipedia

Erfolg zu erzielen. Essentiell ist im Vorfeld die Auswahl des geeigneten Expressions-Organismus, da dieser neben der Lokalisierung in der Membran auch die Faltung und die post-translationalen Modifikationen beeinflusst. Neben Bakterien-Systemen, wie z.B. *E.Coli* werden sowohl CHO-Zellen als auch Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) gern zur Proteinexpression herangezogen. Speziell letztgenannte zeichnen sich

durch eine unkomplizierte Vermehrung im Fermenter und kurze Generationszeiten, resultierend in einer hohen Menge an Biomasse, aus.



BEFORE



AFTER

Wurden nun, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, Biomoleküle als mögliche Interaktionspartner auf DNA-Ebene identifiziert und in einem geeigneten Zellsystem überexprimiert, so kann der Nachweis einer tatsächlichen Interaktion z.B. mittels Protein Co-Immunpräzipitation, wie von Foltman et.al. (6) beschrieben, erfolgen. Nach Zell-Lyse und Zugabe entsprechender Antikörper, welche an das überexprimierte Protein binden, können die Interaktionspartner mithilfe verschiedener Methoden sedimentiert werden. Zum Verständnis der Wirkmechanismen von Therapeutika ist es sinnvoll, lokale Veränderungen der betroffenen Gewebearten zu charakterisieren. Hierfür müssen Proteine für Interaktionsstudien auch direkt aus Gewebe gewonnen werden. Dabei kann es sich jedoch um komplexe Mischungen unterschiedlicher Knochen-, Knorpel- und Muskelgewebe handeln deren Zugänglichkeit zum extrahierenden Protein höchst unterschiedlich ist.

Die effizienteste und schnellste Methode ist, diese Gewebe-Mischungen ohne vorherige Separation gemeinsam zu vermahlen. In weiterer Folge können daraus Protein- und RNA-Lysate gewonnen werden, um proteomische und transkriptionale Endpunkte zu lokalisieren und die molekulare Charakterisierung relevanter Krankheitswege im lokalen Gewebe zu ermöglichen (7).



Lebensmittelsicherheit

Neben den oben beschriebenen Fragestellungen und Anwendungsgebieten ist ein weiterer, in Zeiten einer vernetzten Welt jeden einzelnen betreffenden Anwendungsbereich für die Kryogenvermahlung, der Bereich Lebensmittel- und Ernährungssicherheit. Neben der europäischen, jedoch nur beratenden, Behörde EFSA (European Food Safety Authority) und den jeweiligen nationalen Institutionen (z.B. AGES, BVL) werden Kontrollen und Analysen zur Erstellung der vom Gesetzgeber geforderten Nachweise auch von unabhängigen Dienstleistern erbracht. Um mit den ständig steigenden Anforderungen Schritt halten zu können, wird auch in diesem Bereich an ständigen Verbesserungen, zum einen in der Analytik, zum anderen aber auch im Bereich der Probenvorbereitung gearbeitet.



So berichten Riter et.al. (8) von einem neuen Ansatz zur Steigerung der Analysenqualität und des Durchsatzes. Dies wird erreicht durch die Einführung eines weiteren Feinmahlschrittes unter Verwendung einer bereits als repräsentativ bekannten Teilprobengröße. Eine Steigerung des Durchsatzes ist für den Anwender insofern von Interesse, da es aufgrund des Marktumfeldes und eines zu erwartenden Mehraufkommens an Proben, die Zeit und letztendlich auch die Kosten pro Analyse möglichst gering zu halten gilt. Ein vergleichbarer Ansatz zur Steigerung der Analysenqualität, in diesem Falle bei Obst- und Gemüseproben, wurde auch von Lehotay (9) verfolgt. Wie eingangs erwähnt, ist zukünftig mit vermehrtem Probenaufkommen zu rechnen. Hierzu bietet sich beispielsweise die QuEChERS-Methode als Probenvorbereitungsmethode für einen späteren Nachweis von Pestiziden oder anderen Rückständen an. Die Bezeichnung QuEChERS leitet sich von den positiven Eigenschaften der Methode ab: **Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**fficient, **R**ugged, **S**afe. Zu nennen ist hier beispielsweise das nicht selektive Herbizid Glyphosat® und seinem Hauptabbauprodukt Aminomethylphosphonsäure. Anstrengungen zur Entwicklung eines High-Throughput-Assay's wurden unter anderem von Riter et.al. (10) unternommen. Durch die Übertragung bereits bekannter Erkenntnisse hinsichtlich der Probenvorbereitung gelang es, auf Basis einer Probenmasse von lediglich 75mg einen Assay im 96-Well-Format, und somit Autosampler-tauglich, zu entwickeln. Im Zusammenhang mit immer wieder auftretenden Tierseuchen (z.B. BSE), Lebensmittelskandalen durch Fälschungen oder Um-Deklarierungen sowie zum Schutz der Verbraucherrechte ist der Fokus auch verstärkt auf die Rückverfolgbarkeit von Lebensmitteln gerichtet. Wang et. al. beschreiben hierfür ein innovatives Verfahren zum schnellen Nachweis und zur Identifizierung der Fleischart. Basierend auf einem Biosensorchip kommt es je nach Herkunft des Fleisches (Rind, Huhn, ...) zu jeweils unterschiedlichen Farbumschlägen. Acht unterschiedliche Fleischarten können somit letztlich mit bloßem Auge unterschieden werden, darunter Hirsch, Kaninchen, Ente, Huhn, Rind, Pferd, Schaf und Schwein (11).



Applikationsbeispiele – technische Anwendungen

Kunststoffanalytik (Weichmacher, Verpackungen)

Neben den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen biologischen Anwendungen spielt das Mahlen bei kryogenen Temperaturen auch in zunehmendem Maße bei Fragestellungen im Bereich der Technik eine Rolle. Da viele Stoffe auch als Verpackungsmaterial Anwendung finden, ergibt sich somit auch eine Schnittmenge mit den Anwendungen im Bereich der Biologie. Besonderes Augenmerk ist hierbei auf jene Werkstoffe zu richten, welche direkten Kontakt mit der menschlichen Haut haben oder mit Stoffen, welche als Verpackungsmaterial für Nahrungsmittel oder Medikamente dienen. Zu nennen sind hier primär Werkstoffe mit Bisphenol-A- und Phthalsäure-Verbindungen. Diese Verbindungen gehören zu den am meisten verwendeten Industriechemikalien und sind in vielen Produkten des täglichen Gebrauchs zu finden. Da die genannten Verbindungen allerdings nicht fest gebunden sind, ausdünsten oder durch kochen herausgelöst werden können, bergen sie ein nicht unerhebliches Gefahrenpotential, wenn sie in Kontakt mit Lebensmitteln kommen und auf diese übergehen.



Nudeln in Karton aus Altpapier;
© Stern

Diesen Umstand adressieren unter anderem Pérez-Palacios et. al. in einer Studie zu Recycling-Papiermaterialien für Lebensmittelverpackungen (12). Die Extraktion wurde erstmals mittels FUSLE (Focused ultrasonic solid-liquid extraction) in diesem Zusammenhang durchgeführt und es konnte klar gezeigt werden, dass Bisphenol-Verbindungen in den untersuchten Verpackungsmaterialien vorhanden waren. Diese Ergebnisse sind insofern bedenklich, da mittlerweile nachgewiesen wurde, dass Bisphenol-A endokrin, also

hormonell wirksam ist. Ein allgemeinerer Ansatz wurde von Perrin et. al. verfolgt. Hauptzweck der Studie war, das Ausmaß der Aryl-Veretherung in komplexen Epoxy- / Amin-Formulierungen zu bestimmen. Dies dient insbesondere dazu, eine mögliche Kontamination der Atmosphäre, des Wassers und des Bodens in der Umgebung zu erkennen, in der das ungebundene BPA (Bisphenol-A)



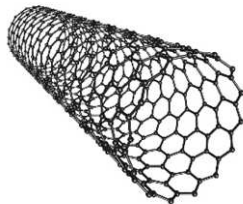
Polymerpellets

freigesetzt wird (13). Da Bisphenol-A unter aeroben Bedingungen abgebaut wird, sind die Konzentrationen in der Luft und im Boden gegenüber jenen im Wasser geringer. Durch den Verzehr von maritimen Lebensmitteln ist eine Aufnahme in den menschlichen Körper jedoch möglich.

Ein weiterer Anwendungsbereich für das kryogene Mahlen ist das Feld der Materialforschung, hier im Besonderen der Polymerbereich, zu nennen. Aufgrund der niedrigen Kosten werden viele Produkte aus Polypropylen hergestellt, wobei in letzter Zeit sog. isotaktisches Polypropylen (iPP) vermehrt zur Anwendung kommt. Um dessen schlechtere mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu PVC und PET zu verbessern, wurde von Lau et. al. mit Hilfe von kryogenem Mahlen ein Verstärkungsmittel eingemahlen. Die mittels DSC und Zugversuchen gewonnenen Ergebnisse zeigten



einen deutlichen Anstieg der Kristallisationstemperatur sowie eine Zunahme der Zugfestigkeit (14). Des Weiteren bietet sich die Vermahlung von Kunststoffen bei tiefkalten Temperaturen im Zuge der Probenvorbereitung für die Analytik an, da hierbei die eingetragene Wärme bedingt durch die mechanische Belastung des Werkstoffes effektiv abgeführt wird und eine Plastifizierung des Kunststoffes vermieden wird.



Carbo-Nanotube

Bedingt durch die Zunahme an, mit immer leistungsfähigeren Batterien bestückten, batterieelektrischen Anwendungen (E-Mobilität), rückt auch eine effiziente Abfuhr der in Form von Wärme generierten Verlustenergie der Systeme verstärkt in den Fokus. Diesen Umstand adressieren Ha et. al. (15) in einer Studie auf Basis einer Polyamid 6 (PA 6) – Matrix mit einem Hybridfüllstoff, bestehend aus Graphit-Nanoplättchen (GNPs), und einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs). Die mittels Laser-Flash gemessenen Werte der Wärmeleitfähigkeit zeigten im Vergleich zu normalem PA6 eine Verbesserung der Wärmeleitfähigkeit um das 35-fache (15), wodurch sich eine Verwendung als Batteriegehäuse für die oben beschriebenen Anwendungen anbietet.

Mehr und mehr gilt es bei Produkt-Neuentwicklungen auch das Thema Recycling zu betrachten, also den gesamten Produktlebenszyklus. Somit ist auch das Thema Recycling und Wiedergewinnung kostbarer Rohstoffe ein wichtiger werdendes Anwendungsfeld für die Kryogenvermahlung,



Circuit board before



Circuit board after

wenngleich auch vorerst primär im Bereich der Forschung. Die vom Kunden gewünschte bzw. geforderte Leistungsfähigkeit elektronischer Geräte bei gleichzeitig möglichst kleinen Abmessungen, verbunden mit maximaler Energieeffizienz, lässt sich in der Regel nur mehr unter Einsatz von Edelmetallen und seltenen Erden erzielen. Durch das Recycling von Geräten und die Rückgewinnung verschiedener Elemente, besteht großes Potenzial zur Verringerung der Umweltbelastung. Eine aktuelle Studie von Buechler et. al. (16) untersuchte hierzu elektronische Geräte und Komponenten auf deren Gehalt an seltenen Erden, Edelmetallen und kritischen Metallen. So konnten in dieser Studie 14 verschiedene seltene Erden, sechs Metalle der Platingruppe, 20 kritische Metalle und 16 andere Elemente, einschließlich einiger Edelmetalle, nachgewiesen werden. Im Falle von Computerfestplatten konnte ein Gesamtwert der oben genannten Elemente von 454 US-Dollar hochgerechnet werden (16). Das Ergebnis der Studie legt nahe, dass eine Konzentration auf Strategien und Methoden der Rückgewinnung unverzichtbar ist, nicht zuletzt, um auch die Umweltauswirkungen im Zusammenhang mit dem Abbau und der Raffination von Metallen zu reduzieren.

Zusammenfassung

Probenvorbereitung durch Mahlen, mit welcher Methode auch immer, gehört in vielen Laboren zur täglichen Routine. Vielfach ist die Handhabung des Ausgangsmaterials unkritisch, da die Proben nicht temperatursensitiv und ausreichend spröde für ein Standard-Mahlverfahren, wie z.B. mittels Kugel- oder Scheibenschwingmühle, sind. Oftmals ist dies jedoch, bedingt durch die Erwärmung aufgrund des Energieeintrags oder durch die Elastizität der Probe, bei Raumtemperatur nicht möglich. In diesen Fällen hat sich die Kryogenvermahlung als Methode der Wahl etabliert. Durch die Verwendung programmierbarer Kryomöhlen, wie z.B. der drei Freezer/Mill Modelle von SPEX, erhält man reproduzierbare Mahlqualitäten, höchste Mahleffizienz ohne kritische Probertemperaturen, bei gleichzeitig wesentlich kürzeren Mahlzeiten im Vergleich zu manuellen Methoden.



Übersicht - verfügbare Modelle



Literaturverzeichnis

1. **Suryanarayana, C.** Mechanical alloying and milling. *Progress in Materials Science* 46; 1–184. 2001.
2. **Mohammadi, A., Ghorbani Alvanegh, A., Khafaei, M., Habibi Azarian, S., Naderi, M., Kiyani, E., ... & Tavallaee, M.** A new and efficient method for DNA extraction from human skeletal remains usable in DNA typing. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 4(2), 609-614. 2017.
3. **Sweet, D. and Hildebrand, D.** Recovery of DNA from Human Teeth by Cryogenic Grinding. *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 43, No. 6, 1998, pp. 1199-1202,.
4. **Morales Colón, E., Hernández, M., Candelario, M., Meléndez, M., & Dawson Cruz, T.** Evaluation of a freezer mill for bone pulverization prior to DNA extraction: an improved workflow for STR analysis. *Journal of forensic sciences*, 63(2), 530-535. 2018.
5. **Fóthi, E., Gonzalez, A., Fehér, T., Gugora, A., Fóthi, Á., Biró, O., & Keyser, C.** Genetic analysis of male Hungarian Conquerors: European and Asian paternal lineages of the conquering Hungarian tribes. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 12(1), 31. 2020.
6. **Foltman, M., & Sanchez-Diaz, A.** Studying protein–protein interactions in budding yeast using co-immunoprecipitation. *Yeast Cytokinesis*, 239-256. 2016.
7. **Jones, B., Hitchcock, S., Loza, M., Malaviya, R., Ort, T., & Shen, F.** A Cryo-pulverization Protocol for Processing Mouse Paws to Evaluate Molecular Pathways of Tissue Inflammation in a Collagen Induced Arthritis Model. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (152), e60229. 2019.
8. **Riter, L. S., Lynn, K. J., Wujcik, C. E., & Buchholz, L. M.** Interlaboratory assessment of cryomilling sample preparation for residue analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(18), 4405-4408. 2015.
9. **Lehotay, S. J., Han, L., & Sapozhnikova, Y.** Use of a quality control approach to assess measurement uncertainty in the comparison of sample processing techniques in the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(22), 5465-5479. 2018.
10. **Riter, L. S., & Wujcik, C. E.** Novel two-stage fine milling enables high-throughput determination of glyphosate residues in raw agricultural commodities. *Journal of AOAC International*, 101(3), 867-875. 2018.
11. **Wang, W., Zhu, Y., Chen, Y., Xu, X., & Zhou, G.** Rapid visual detection of eight meat species using optical thin-film biosensor chips. *Journal of AOAC International*, 98(2), 410-414. 2015.
12. **Pérez-Palacios, D., Fernández-Recio, M. Á., Moreta, C., & Tena, M. T.** Determination of bisphenol-type endocrine disrupting compounds in food-contact recycled-paper materials by focused ultrasonic solid–liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 99, 167-174. 2012.



13. **Perrin, F. X., Nguyen, T. M. H., Tran, T. M. L., & Vernet, J. L.** Determination of bisphenol A (BPA) by gas chromatography–mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy during curing of epoxy–amine resins. *Polymer testing*, 25(7), 912-922. 2006.
14. **Lau, S., Ramesh, S., Rivero, I. V., & Korley, L.** A Solid-State Processing Approach to Enhance the Mechanical Performance of Polyolefins. *Proceedings of the 2018 IISE Annual Conference*. 2018.
15. **Ha, S. M., Kwon, O. H., Oh, Y. G., Kim, Y. S., Lee, S. G., Won, J. C., ... & Yoo, Y.** Thermally conductive polyamide 6/carbon filler composites based on a hybrid filler system. *Science and technology of advanced materials*, 16(6), 065001. 2015.
16. **Buechler, D. T., Zyaykina, N. N., Spencer, C. A., Lawson, E., Ploss, N. M., & Hua, I.** Comprehensive elemental analysis of consumer electronic devices: Rare earth, precious, and critical elements. *Waste Management*, 103, 67-75. 2020.

Weitere Informationen erhalten Sie von:



**C3 PROZESS- UND
ANALYSENTECHNIK**

www.c3-analysentechnik.de / info@c3-analysentechnik.de



**C3 PROZESS- UND
ANALYSENTECHNIK**

SPEX® SamplePrep
www.spexsampleprep.com