

# **Phasensynthese und Methodenentwicklungen für die HPLC-Analytik pharmazeutischer Wirkstoffe**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

**Iris Gostomski**

**Saarbrücken  
2009**

**Tag des Kolloquiums: 20. Mai 2009**

**Dekan: Prof. Dr. Uli Müller**

**Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Huber  
Prof. Dr. Rolf Müller  
Dr. Ulrich F. Schäfer  
Prof. Dr. Michael Springborg**

## Zusammenfassung

Auf Basis der Arbeiten von Alpert und Regnier [1] konnte ein Anionenaustauscher durch Ummanteln von porösen Kieselgelteilchen mit Polyethylenimin und späterem Quervernetzen mit einem bifunktionellen Epoxid synthetisiert werden. Diese Phasen wurden primär in der Protein- und Oligonukleotidanalytik angewandt. Die in dieser Arbeit synthetisierten Polyethyleniminphasen konnten auch für die Analytik niedermolekularer Substanzen eingesetzt und erfolgreich in der pharmazeutischen Analytik angewandt werden.

Auch für synthetische Schilddrüsenhormone (Levothyroxin, Liothyronin) müssen mögliche Abbauprodukte identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde eine HPLC-Methode für thermisch gestresste Schilddrüsenhormonproben entwickelt, die mit der Flugzeitmassenspektrometrie gekoppelt wurde. Auf Basis exakter Massenmessungen konnten erfolgreich Strukturvorschläge für mehr als 30 mögliche Abbau- bzw. Nebenprodukte ausgearbeitet werden.

Ein schon länger bekannter Ansatz zur HPLC-Methodenentwicklung, liegt im Kombinieren verschiedener stationärer Phasen, wobei die Kopplung dieser Phasen immer eine Herausforderung war. Seit kurzem ist eine totvolumenfreie Kopplung von Säulensegmenten (POPLC™) erstmals kommerziell verfügbar [2]. Das POPLC-System wurde erfolgreich für thermisch gestresste Levothyroxinproben eingesetzt. Durch die optimierte stationäre Phase konnte die Analysendauer von vorher 60 min in einem linearen Gradienten auf 40 min in einem Stufengradienten reduziert werden. Gleichzeitig wurde durch den Stufengradienten die Detektionsempfindlichkeit der Flugzeitmassenspektrometrie signifikant erhöht.

## **Abstract**

In this work, an anion exchange material for liquid chromatography was developed based on the work of Alpert and Regnier [1] by coating porous silica particles with Polyethyleneimine followed by crosslinking with a bifunctional epoxide. These stationary phases were used by Alpert and Regnier for protein and oligonucleotide analysis. In this work, the application of the synthesized phases could successfully be extended to the separation of low-molecular weight substances. Accordingly it was shown that polyethyleneimine-based stationary phases could be used in pharmaceutical analysis.

As a further aim, the degradation and by-products of synthetic thyroid hormones (Levothyroxine, Liothyronine) had to be identified. In this work, an HPLC method compatible with time-of-flight mass spectrometry was developed and applied. Based on exact mass measurements, chemical structures could be proposed for more than 30 degradation and by-products.

A new approach for the dead-volume-free combination and coupling of different stationary phases for liquid chromatography has been commercialized within the last years (POPLC™) [2]. This POPLC system was also successfully applied for thermally stressed Levothyroxine samples. The separation time of the standard mixture could be reduced significantly using a Step gradient on the optimized stationary phase combination. As an additional benefit, the detection sensitivity of the time-of-flight mass spectrometry was significantly improved by the step gradient on the optimized stationary phase.

# Inhaltsverzeichnis

---

---

---

<b>Intention dieser Arbeit</b> -----	<b>6</b>
<b>Grundlagen und theoretische Hintergründe</b> -----	<b>9</b>
<b>1. Grundlagen und Definitionen der HPLC</b> -----	<b>10</b>
1.1. Chromatographische Größen-----	10
1.2. Bandenverbreiterung -----	15
1.3. Gradient-Volumen-Konzept -----	19
<b>2. Stationäre Phasen</b> -----	<b>22</b>
2.1. Retentionsmechanismen-----	23
2.1.1. Ionenaustauschchromatographie-----	23
2.1.2. Umkehrphasenchromatographie (Reversed-Phase-Chromatographie, RPC) -----	26
2.1.3. Normalphasenchromatographie-----	28
2.2. Phasensynthese auf dem Trägermaterial Kieselgel -----	29
<b>3. Strukturaufklärung mit Hilfe der Massenspektrometrie</b> -----	<b>32</b>
3.1. Ionisierungstechniken und Interfaces -----	33
3.2. Grundlagen der Ionenfallen- und Flugzeitmassenspektrometrie -----	35
3.3. Kopplung der analytischen HPLC mit der Massenspektrometrie-----	38
3.4. Strukturaufklärung niedermolekularer Verbindungen mittels exakter Massen -----	40
<b>Entwicklung eines Anionenaustauschers auf Basis eines porösen Kieselgels</b> -----	<b>43</b>
<b>1. Literaturüberblick</b> -----	<b>44</b>
<b>2. Experimenteller Teil</b> -----	<b>46</b>
2.1. Geräte und Instrumente-----	46
2.2. Verwendete Chemikalien -----	47
2.3. verwendete Säulenhardware und Kieselgel-Trägermaterial -----	47
2.4. Phasensynthese-----	47
2.4.1. CHN-Analyse -----	48
2.4.2. Berechnung des PEI- und EDGE-Bedeckungsgrades der stationären Phasen -----	49
2.5. Packung -----	50
2.6. Probenvorbereitung-----	51
2.7. Bezugsnachweis -----	52
2.8. HPLC-Methoden zur Charakterisierung der Packungsqualität -----	52

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>2.9. Normalphasenchromatographie</b>	<b>53</b>
<b>2.10. HPLC-Methoden zur Bestimmung der van-Deemter-Parameter</b>	<b>53</b>
<b>2.11. HPLC-Methode zur Bestimmung der chromatographischen Kapazität</b>	<b>53</b>
<b>2.12. HPLC-Methoden für Stabilitätstests</b>	<b>55</b>
2.12.1. Stabilitätstest mit Phosphatpuffer bei pH 7,0	55
2.12.2. Stabilitätstest mit TRIS/HCl bei pH 7,0	55
2.12.3. Stabilitätstest mit Essigsäure	56
<b>2.13. HPLC-Methoden für Applikationen</b>	<b>56</b>
<b>3. Synthesestrategien auf 5 µm-120Å-Trägermaterial</b>	<b>57</b>
<b>3.1. Synthesestrategien</b>	<b>57</b>
<b>3.2. Phasenstabilitätstest</b>	<b>60</b>
<b>4. Vergleich unterschiedlicher Kapazitäten und Porengrößen auf 10 µm-Trägermaterial</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Synthesestrategien zum Erreichen verschiedener Kapazitäten</b>	<b>65</b>
<b>4.2. Eigenschaften des Massentransports</b>	<b>70</b>
<b>4.3. Oberflächenaktivierung</b>	<b>75</b>
<b>4.4. Schlussfolgerung</b>	<b>80</b>
<b>5. Upscaling der Synthese auf 5 µm-120Å-Trägermaterial</b>	<b>81</b>
<b>5.1. Synthese und Oberflächenaktivierung</b>	<b>81</b>
<b>5.2. Chromatographische Phasencharakterisierung</b>	<b>85</b>
5.2.1. Ionenaustausch und Hydrophobie	85
5.2.2. Massentransport	88
<b>5.3. Stabilitätsmessungen</b>	<b>90</b>
5.3.1. Stabilität bei pH 7,0 mit TRIS/HCl	91
5.3.2. Essigsäure	93
<b>5.4. Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>6. Applikation des Polyethylenimin-Anionenaustauschers in verschiedenen chromatographischen Modi</b>	<b>97</b>
<b>6.1. Normalphasenchromatographie</b>	<b>97</b>
<b>6.2. Ionenaustauschchromatographie mit Benzoessäurederivaten</b>	<b>100</b>
<b>6.3. Trennung des Standardgemisches aus synthetischen Thyroxin-Derivaten</b>	<b>103</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>105</b>

<b>Strukturaufklärung von Abbauprodukten synthetischer Schilddrüsenhormone mittels Umkehrphasenchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie -----</b>	<b>106</b>
<b>1. Literaturüberblick und Zielsetzung -----</b>	<b>107</b>
<b>2. Experimenteller Teil-----</b>	<b>111</b>
2.1. Geräte und Instrumente-----	111
2.2. verwendete Chemikalien und Probenvorbereitung -----	111
2.2.1. Bezugsnachweis-----	113
2.3. Verwendete Säulenhardware und Instrumente-----	114
2.4. Verwendete HPLC-Methoden -----	114
2.4.1. Herstellen der verwendeten Eluenten -----	114
2.4.2. Verwendeter Gradient für alle HPLC-Messungen -----	114
2.5. HPLC-MS-Methoden-----	115
2.5.1. HPLC-negativ-ESI-MS mit der Ameisensäuremethode -----	115
2.5.2. HPLC-neg/posAPCI-MS mit der Ameisensäuremethode -----	116
2.5.3. HPLC-neg/posAPCI-MS mit der Ammoniumacetatmethode -----	116
<b>3. Transfer der Phosphatpuffermethode zwischen den zwei Laboratorien -----</b>	<b>117</b>
<b>4. Einfluss verschiedener Ionisierungsmodi-----</b>	<b>119</b>
<b>5. Übertragung der Phosphatpuffermethode auf die MS-kompatible Ameisensäuremethode -----</b>	<b>122</b>
<b>6. Strukturidentifizierungen am Beispiel einer T4-Probe -----</b>	<b>126</b>
6.1. Vorgehen der Strukturidentifizierung-----	128
6.1.1. Ausarbeitung möglicher Strukturen ausgehend von Thyroxin -----	128
6.1.2. Softwareunterstützte Strukturaufklärung-----	129
6.2. Korrelation der Massenspektren einer thermisch gestressten T4-Probe mit möglichen Strukturen-----	132
6.3. Peakfraktionierung und Identifizierung der Fraktionen mit HPLC/TOF-MS--	150
<b>7. Zusammenfassung-----</b>	<b>155</b>
<b>Methodenentwicklung durch Optimierung stationärer Phasen für synthetische Schilddrüsenhormon-Proben-----</b>	<b>157</b>
1. Literaturüberblick und theoretischer Hintergrund-----	158
1.1. Das „PRISMA“-Modell für die Optimierung stationärer Phasen-----	159



---

<b>1.2. Zielsetzung</b> .....	<b>163</b>
<b>2. Experimenteller Teil</b> .....	<b>164</b>
<b>2.1. Geräte und Instrumente</b> .....	<b>164</b>
2.1.1. HPLC-Instrumente .....	164
2.1.2. Massenspektrometer und gekoppelte Systeme .....	164
<b>2.2. verwendete Chemikalien und Probenvorbereitung</b> .....	<b>165</b>
2.2.1. Bezugsnachweis .....	167
<b>2.3. Verwendete Säulenhardware und Instrumente</b> .....	<b>167</b>
<b>2.4. Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen</b> .....	<b>168</b>
<b>3. Methodenentwicklung durch Optimierung der stationären Phase</b>	<b>171</b>
3.1. Basismessungen auf den homogenen Phasen .....	171
3.2. Optimierung der stationären Phase .....	174
3.3. Erweiterung der isokratischen Methode für eine thermisch gestresste Thyroxin-Probe .....	178
<b>4. Kopplung mit der Flugzeitmassenspektrometrie</b> .....	<b>184</b>
4.1. Zusammenfassung .....	190
<b>5. Optimierung stationärer Phasen mit einem Polyethylenimin-     Anionenaustauscher</b> .....	<b>192</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>197</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>203</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>205</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>212</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>214</b>

# Intention dieser Arbeit

---

---

---

Heute unterliegt die Synthese pharmazeutischer Wirkstoffe strengen Regulatorien (GMP, Good manufacturing practice). Durch Zulassungsbehörden werden für jeden Wirkstoff Randbedingungen festgelegt, die eingehalten werden müssen. Neben der Reinheitsbestimmung müssen auch Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden, wobei die einzelnen niedermolekularen Wirkstoffe unter definierten Bedingungen über einen längeren Zeitraum gelagert aber auch gestresst werden. Ausgewertet werden dann unter anderem Abbauprofile, wobei zum einen die Abnahme des Wirkstoffgehaltes und zum anderen die Zunahme von Abbauprodukten relevant sind. Diese Untersuchungen setzen eine erfolgreiche analytische Trennung aller relevanten Analyten voraus und arbeiten mit speziell auf diese komplexe Trennproblematik hin entwickelten Trennmethoden. Dabei kommen seit geraumer Zeit bevorzugt flüssigchromatographische Methoden, gekoppelt mit UV-Detektion (HPLC-UV) und, in neuerer Zeit, mit Massenspektrometrie (HPLC-MS) zum Einsatz. Am häufigsten sind hierbei Trennungen an hydrophoben Umkehrphasen (RP) beschrieben. Auf dem Markt gibt es eine große Vielfalt an RP-Materialien für die HPLC-Analytik, die unterschiedliche Trennungen einzelner Substanzgemische hervorrufen, wobei die Trennung bzw. Retention von Analyten mit polaren, basischen oder sauren Eigenschaften an RP-Phasen häufig kritisch ist. Für diese Analyten sind auch geladene Austausch- oder polare Phasen geeignet. Üblicherweise erfolgt die Entwicklung von HPLC-Methoden zur Trennung komplexer Probengemische meist durch Testen unterschiedlicher stationärer Phasen mit verschiedenen Selektivitäten unter Optimierung der mobilen Phase. Meist steht dem Anwender ein Pool mit einer begrenzten Anzahl an stationären Phasen zur Verfügung. Auf der Säule mit der erfolgsversprechendsten Selektivität wird dann die Trennung durch Modifizieren der mobilen Phase oft durch eine Gradientenelution optimiert. Ein entgegengesetzter Ansatz zur HPLC-Methodenentwicklung, liegt im Kombinieren verschiedener stationärer Phasen, wobei die totvolumenfreie Kopplung dieser Phasen immer eine Herausforderung war. Durch die Kombination von stationären Phasen mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen können neue Selektivitäten erreicht werden, die mit einer einzelnen homogenen Phase nicht möglich wären. Dies kann eine effektive Lösung für anspruchsvolle Trennprobleme sein. Seit kurzem ist eine totvolumenfreie Kopplung von Säulensegmenten mit Phasen unterschiedlicher Selektivitäten (POPLC<sup>TM</sup>) erstmals kommerziell verfügbar [2].

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen zum einen die Entwicklung und Optimierung stationärer Phasen für die HPLC zur Analytik niedermolekularer Wirkstoffe zum anderen

die Untersuchung dieser Wirkstoffe auf Verunreinigungen mit chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden. Konkret wurde dabei die synthetischen hergestellten Schilddrüsenhormone Levothyroxin und Liothyronin betrachtet.

Im ersten Teil der Arbeit soll zunächst ein Anionenaustauscher für die HPLC-Analytik auf Basis der Arbeiten von Alpert und Regnier [1] durch Ummanteln von porösen Kieselgelteilchen mit Polyethylenimin und anschließendem Quervernetzen mit einem bifunktionellen Epoxid entwickelt werden. Im Unterschied zu Regnier, der diese Phasen primär in der Protein- und Oligonukleotidanalytik eingesetzt hat, soll dieser Anionenaustauscher hier für die Analytik niedermolekularer Substanzen, speziell von pharmazeutischen Wirkstoffen, geeignet sein.

Eine zweite Aufgabe dieser Arbeit ist die Identifizierung von unbekanntem Abbauprodukten synthetischer Schilddrüsenhormone (Levothyroxin, Liothyronin), die zuvor teilweise starkem thermischen Stress ausgesetzt wurden. Durch diese Stressung wurden die Konzentrationen möglicher relevanter Abbauprodukte in kürzester Zeit stark erhöht, um für eine Analyse in der Probe ausreichend konzentriert vorzuliegen. Zuerst muss dazu eine bereits bestehende validierte HPLC-UV-Methode zur Reinheitskontrolle in eine mit der Massenspektrometrie kompatible HPLC-Methode transferiert werden. Dabei sollen beide HPLC-Methoden miteinander vergleichbar sein und keine signifikanten Unterschiede im Peakmuster aufweisen. Durch die Kopplung der modifizierten HPLC-UV-Methode mit der Flugzeitmassenspektrometrie sollen mittels Messungen von exakten Massen plausible Strukturvorschläge für möglichst viele detektierten Peaks im Massenchromatogramm ausgearbeitet werden.

Die Trennung dieser thermisch gestressten Levothyroxinproben soll zudem mit dem kommerziell erhältlichen POPLC-System optimiert und mit der Massenspektrometrie gekoppelt werden. Zusätzlich soll das POPLC-System um den eingangs entwickelten Anionenaustauscher erweitert und für die Trennung thermisch gestresster Levothyroxinproben angewandt werden.

# Kapitel 1

---

## Grundlagen und theoretische Hintergründe

**„Eine gute Theorie ist das Praktischste, was es gibt.“**

**Gustav Robert Kirchhoff**

**(1827 - 1887)**

## **1. Grundlagen und Definitionen der HPLC**

In vielen Lehrbüchern wurde bereits die Theorie der HPLC hinreichend erläutert [3-6], daher wird in diesem Kapitel nur auf die in dieser Arbeit angewandten Grundlagen und genutzten chromatographische Größen eingegangen. In der IUPAC-Empfehlung von 1993 (Pure & Appl. Chem. Vol. 65, 819 – 872, deutsche Ausgabe von Engelhardt und Rohrschneider) sind die Nomenklatur, die theoretischen Zusammenhänge und chromatographischen Größen festgelegt und näher beschrieben.

### **1.1. Chromatographische Größen**

In der HPLC basiert das Packungsmaterial, also die stationäre Phase, meist auf Kieselgel, welches porös oder unporös sein kann. In dieser Arbeit wurden poröse Kieselgele als Trägermaterial verwendet. Durch den Einsatz eines porösen Trägermaterials wird die Oberfläche der stationären Phase deutlich erhöht. Dabei nimmt das Skelett des Trägermaterials nur ca. 20 %, das Poren- und Zwischenkornvolumen jeweils 40 % des Gesamtsäulenvolumens ein. So sind ca. 80 % des Gesamtsäulenvolumens der mobilen Phase zugänglich. Danach ergibt sich die totale Porosität  $\varepsilon_T$  der Säule aus dem Verhältnis des Volumens der mobilen Phase und des Gesamtsäulenvolumens. Die mobile Phase wird in der HPLC mit einer Pumpe durch die Trennsäule befördert. Der resultierende Volumenstrom wird in Volumen pro Zeiteinheit angegeben. Die mobile Phase transportiert die Analyten und durchströmt das Packungsbett der stationären Phase. Dabei ist die Permeabilität, also die Durchlässigkeit der Säulenpackung, auch ein wichtiger Parameter, welcher unter anderem auch für den Druckabfall der Säule während der Messung ausschlaggebend ist. Das Trennsystem besteht in der HPLC aus der verwendeten mobilen und stationären Phase. Inwieweit dieses System in der Lage ist, ein Substanzgemisch aufzutrennen, hängt von der Selektivität, also dem Verhältnis der Aufenthaltszeit beider Substanzen in der mobilen und stationären Phase, ab. Folglich ist die Selektivität ein Maß der Qualität des Trennsystems für ein Substanzgemisch und wird durch den Trennfaktor  $\alpha$  beschrieben. Die Analyten werden über verschiedene Wechselwirkungen unterschiedlich stark an der stationären Phasen zurückgehalten. Diese Wechselwirkungen sind unter anderem abhängig von der Molekülstruktur der Analyten, der Zusammensetzung der mobilen Phase und von der Oberflächenchemie der

stationären Phase. Im optimalen Fall werden die Substanzen in der Säule vollständig in einzelne Zonen getrennt. Nach der Säule können die einzelnen Zonen im Detektor als Peaks in einem Chromatogramm detektiert werden. Eine schematische Darstellung eines solchen Chromatogramms ist in Abb. 1.1 gezeigt.

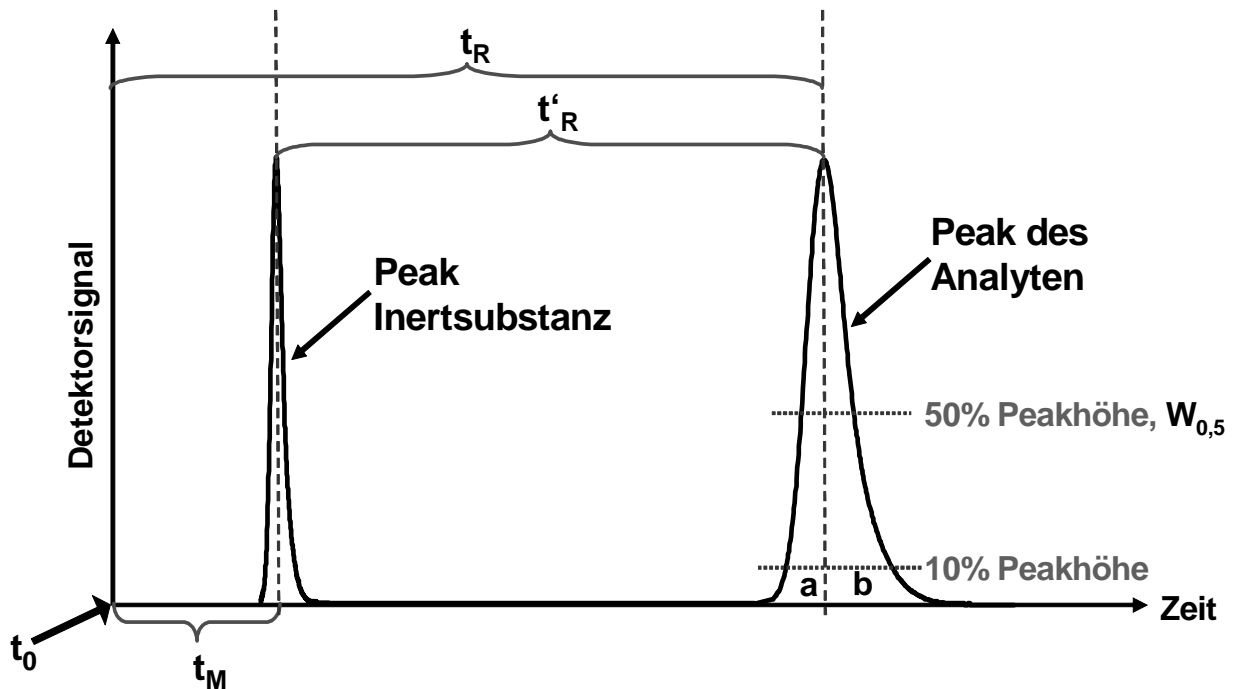


Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines Chromatogramms

Eine Substanz, die keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht, wird unretardiert mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert und detektiert. Der erste Peak in Abb. 1.1 entspricht dieser so genannten Inertsubstanz. Die Zeit, die eine inerte Substanz von der Injektion bis zur Detektion benötigt, wird als Durchflusszeit  $t_M$  einer Säule bezeichnet. Aus dem Fluss der mobilen Phase ( $F$ ), der in Volumen pro Zeiteinheit angegeben wird, und der Durchflusszeit  $t_M$  kann das Durchflussvolumen der Säule, also das Volumen an mobiler Phase, bestimmt werden (Formel 1).

**Formel 1 Durchflusszeit und Durchflussvolumen**

$$t_M = \frac{V_M}{F}$$

Eine Trennung der Substanzen in einem Gemisch erfolgt durch die unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase, wodurch die Elution ungleich verzögert wird. Dennoch halten sich alle Substanzen gleich lang in der mobilen Phase auf. Die Nettoretentionszeit  $t'_R$ , also die Verweilzeit eines Analyten in der

stationären Phase, ist die Differenz aus der Retentionszeit  $t_R$  (Abb. 1.1) und der Durchflusszeit (Formel 2).

**Formel 2 Nettoretentionszeit**

$$t'_R = t_R - t_M$$

Die Nettoretentionszeit einer Substanz ist unter anderem abhängig von der Säulenlänge und apparativen Faktoren. Um Trennungen eines Gemisches zwischen verschiedenen Geräten oder Laboratorien miteinander vergleichen zu können, wird daher der Retentionsfaktor  $k$  (Formel 3) genutzt. Dieser Faktor definiert das Verhältnis der Aufenthaltszeit einer Analytsubstanz in der stationären und mobilen Phase für ein bestimmtes Trennsystem, einen bestimmten Fluss und eine bestimmte Packungsdichte.

**Formel 3 Retentionsfaktor (k-Wert)**

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Der Retentionsfaktor ist zugleich eine thermodynamische Größe, die auf die Adsorptionsgleichgewichtskonstante bzw. den Nernst'schen Verteilungskoeffizient zurückgeführt werden kann. Ein Vergleich der Retentionsfaktoren ist daher nur unter isokratischen Bedingungen möglich. Die Gründe dafür werden in Kapitel 1.3 (S. 19) näher erläutert. Um Retentionszeiten in einer Gradientenelution, bei der ein Parameter, meist die Elutionsstärke, während der Trennung kontinuierlich verändert wird, unter identischen Trennbedingungen miteinander zu vergleichen, können relative Retentionszeiten genutzt werden. In diesem Fall werden die Retentionszeiten der Analyten auf die Retentionszeit einer bekannten Substanz innerhalb des Chromatogramms bezogen (Formel 4).

**Formel 4 relative Retentionszeit**

$$t_{R_{rel}} = \frac{t_{R_{Analyt}}}{t_{R_{Bezug}}}$$

Wie vorher schon erwähnt, ist die Selektivität ein Maß der Qualität des Trennsystems für ein bestimmtes Substanzgemisch. Ein Maß für die Trennleistung einer Säule ist die Bodenzahl  $N$ , welche wiederum von der zu trennenden Substanz und der Säulenlänge abhängig ist. Je größer diese Zahl, umso höher ist die Trennleistung der Säule. Es soll hier aber nicht unerwähnt bleiben, dass die Bodenzahl mit einer Zunahme der



Säulenlänge auch größer wird. Durch die Bandenverbreiterung (Kapitel 1.2, S. 15) besteht eine Abhängigkeit der Bodenzahl von der Retentionszeit und damit auch der Peakbreite. In Formel 5 ist diese Abhängigkeit von der Peakbreite in 50 % der Peakhöhe ( $w_h$ ) dargestellt. Die Berechnung mit der Peakbasisbreite ist ungenauer und der Einfachheit halber hier nicht aufgeführt, kann aber in der IUPAC-Nomenklatur (siehe S. 10) nachgelesen werden.

**Formel 5 Bodenzahl**

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Die Bodenzahl ist dimensionslos. Häufig findet man auch die Angabe in Böden pro Meter Trennstrecke, die einen direkten Vergleich verschiedener Trennsystem erleichtert. Ein verbreitetes Maß für die Bandenverbreiterung ist die von der Säulenlänge unabhängige Bodenhöhe  $H$  (Formel 6). Sie ist umgekehrt proportional zur Bodenzahl. Der Zusammenhang mit der Bandenverbreiterung wird im folgenden Kapitel erläutert werden.

**Formel 6 Bodenhöhe**

$$H = \frac{L}{N} [\mu m]$$

Wie später gezeigt wird, hat der Teilchendurchmesser  $d_p$  einen Einfluss auf die Peakbreite und damit auch auf die Bodenzahl und Bodenhöhe. Um von diesem Einfluss unabhängig zu sein, normiert man die Bodenhöhe  $H$  auf den Teilchendurchmesser  $d_p$  und erhält so die reduzierte Bodenhöhe  $h$  (Formel 7). Diese Größe hat in der Praxis eine besondere Relevanz, da sie ein direktes Maß für die Güte der Packung einer Trennsäule ist.

**Formel 7 Reduzierte Bodenhöhe**

$$h = \frac{H}{d_p}$$

Zwei Substanzen mit einer gegebenen Selektivität können auf einer Säule mit einer hohen Bodenzahl besser aufgelöst werden, da die Substanzzonen schmaler sind. Von Bedeutung für die erfolgreiche Trennung zweier Substanzzonen ist daher neben der

Selektivität auch die Auflösung  $R_s$  (Formel 8). In diese gehen sowohl die Retentionszeiten wie auch die Peakbreiten ein.

Formel 8 Auflösung

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R_2} - t_{R_1})}{(w_{0,5_1} + w_{0,5_2})}$$

In nachfolgender Abb. 1.2 ist dieser Zusammenhang schematisch dargestellt. Im Falle der breiten Peaks (Abb. 1.2a) ist keine Basislinientrennung möglich. Wenn die Bodenzahl höher ist, resultieren schmalere Peaks (Abb. 1.2b). So können beide Komponenten bei gleicher Selektivität wie im Fall a noch basisliniengetreunt werden.

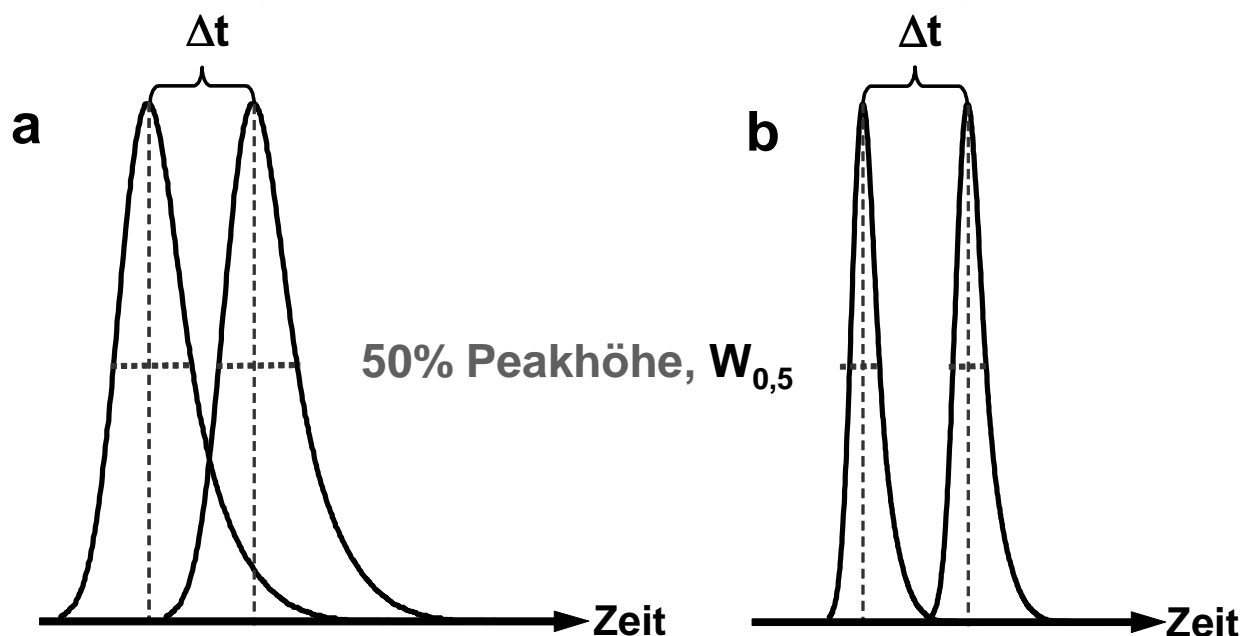


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Auflösung zweier Peaks in Abhängigkeit von der Peakbreite.

Eine weitere chromatographische Größe ist die Peakasymmetrie  $A_s$  (Formel 9). Sie gibt das Verhältnis der Peakbreite hinter und vor dem Lot in 10 % der Peakhöhe wieder. Dieser Asymmetriefaktor erlaubt unter anderem Aussagen zum Elutionsverhalten Analyten. Dabei wird zwischen Peaks mit Tailing und Fronting unterschieden. Im Falle eines Tailings ist der Peakabfall flacher als der –anstieg ( $A_s > 1$ ), beim Fronting verhält sich die Symmetrie umgekehrt ( $A_s < 1$ ). In Abb. 1.2a sind demnach tailende Peaks zu sehen. Wenn der Symmetriefaktor den Wert eins erreicht, liegen symmetrische Peaks vor.

Formel 9 Symmetrie-Faktor (in 10% Peakhöhe siehe Abb. 1.1, S. 11)

$$A_s = \frac{b}{a}$$

## 1.2. Bandenverbreiterung

Über die Theorie der Bandenverbreiterung wurden viele Arbeiten veröffentlicht [7]. Dabei wurde versucht, den typischen Kurvenverlauf der Abhängigkeit der Bodenhöhe von der Lineargeschwindigkeit theoretisch zu interpretieren und in Form einer Gleichung zu beschreiben. Katz, Ogan und Scott [7] verglichen 1983 die Gleichungen von Horváth [8], Huber [9], Knox [10], van Deemter [11] und Giddings [12] für eine größere Anzahl experimenteller Datensätze. Dabei wurde deutlich, dass die Gleichung von van Deemter (Formel 10), die das meistverwendete Modell darstellt, den Kurvenverlauf ausreichend genau beschreibt.

Formel 10 van Deemter-Gleichung für die Bandenverbreiterung

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Die Gleichung beschreibt eine parabelförmige Abhängigkeit der Bodenhöhe von der Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase (Abb. 1.3). Dabei entspricht die Lineargeschwindigkeit  $u$  (Formel 11) der Strecke, die von einer nicht retardierenden Substanz in einer bestimmten Zeit zurückgelegt wird. Sie ist im Gegensatz zum Volumenfluss, der an der Förderpumpe eingestellt wird, nur abhängig von der Säulenlänge  $L$ , nicht aber vom Säulendurchmesser.

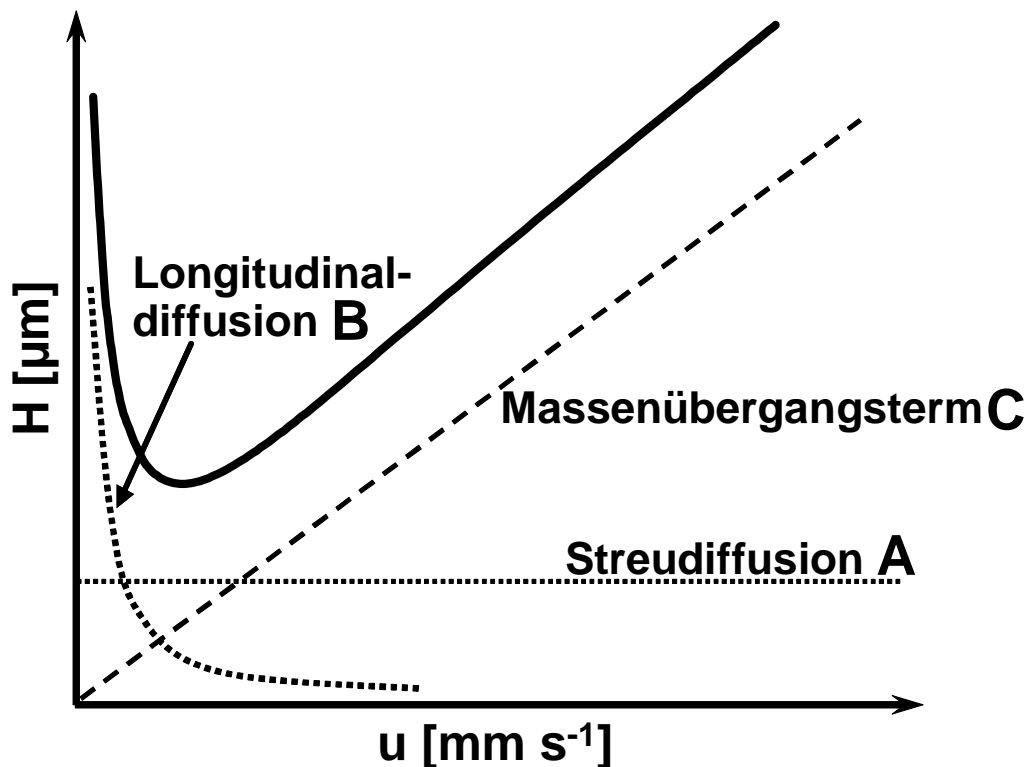


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Bandenverbreiterung und der einzelnen van Deemter-Parameter (Formel 10). Bodenhöhe  $H$  in Abhängigkeit von der Lineargeschwindigkeit.

Formel 11 Lineargeschwindigkeit

$$u = \frac{L}{t_M} = \left[ \frac{\text{mm}}{\text{s}} \right]$$

In Abb. 1.3 ist der theoretische Kurvenverlauf für die Abhängigkeit der Bodenhöhe von der Lineargeschwindigkeit dargestellt. Diese Kurve kann durch die drei van Deemter-Parameter A, B und C (Formel 10) näher beschrieben werden. Dabei liegt die optimale Lineargeschwindigkeit, bei der alle bandenverbreiterten Einflüsse geringsten Einfluss besitzen, im Minimum der van Deemter-Kurve. Der Term der Eddydispersion A (Formel 12) ist eine Konstante und beschreibt die Verbreiterung der Probenzone durch unterschiedlich lange Wegstrecken im Packungsbett. Da es sich um eine Verteilung der Probenzone innerhalb der unregelmäßigen Teilchenzwischenräume und nicht um einen Diffusionsprozess handelt, ist dieser Term unabhängig von der Geschwindigkeit der mobilen Phase. Dieser Term wird auch als Packungsfaktor bezeichnet und ist umso kleiner, je homogener die Packung ist. Dabei fließen der Teilchendurchmesser  $d_p$  und ein Faktor für die Packungsunregelmäßigkeit  $\lambda$  in diesen Term ein.

**Formel 12 A-Term der van Deemter-Gleichung (Streu- oder Eddydispersion)**

$$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$$

Die Bandenverbreiterung innerhalb einer Probenzone ist weiterhin abhängig von der Molekulardiffusion der Probenmoleküle in der mobilen Phase, die auch Longitudinaldiffusion genannt wird, da nur die Diffusion in Längsrichtung zonenverbreiternd wirkt. Der B-Term (Formel 13) der van Deemter-Gleichung beschreibt diesen Diffusionsprozess, der von dem Diffusionskoeffizienten  $D_m$  des Analyten in der mobilen Phase und einem Labyrinthfaktor  $\gamma$  abhängig ist. Bei höheren Lineargeschwindigkeiten der mobilen Phase nimmt der Einfluss des B-Terms auf Grund der kürzeren Aufenthaltsdauer des Analyten in der mobilen Phase ab (siehe Abb. 1.3). In der Flüssigchromatographie erfolgt die Diffusion der Analyten in der mobilen Phase vergleichsweise langsam. Daher ist der Einfluss des B-Terms auf die Bandenverbreiterung nicht so groß wie zum Beispiel in der Gaschromatographie.

**Formel 13 B-Term der van Deemter-Gleichung (Longitudinaldiffusion)**

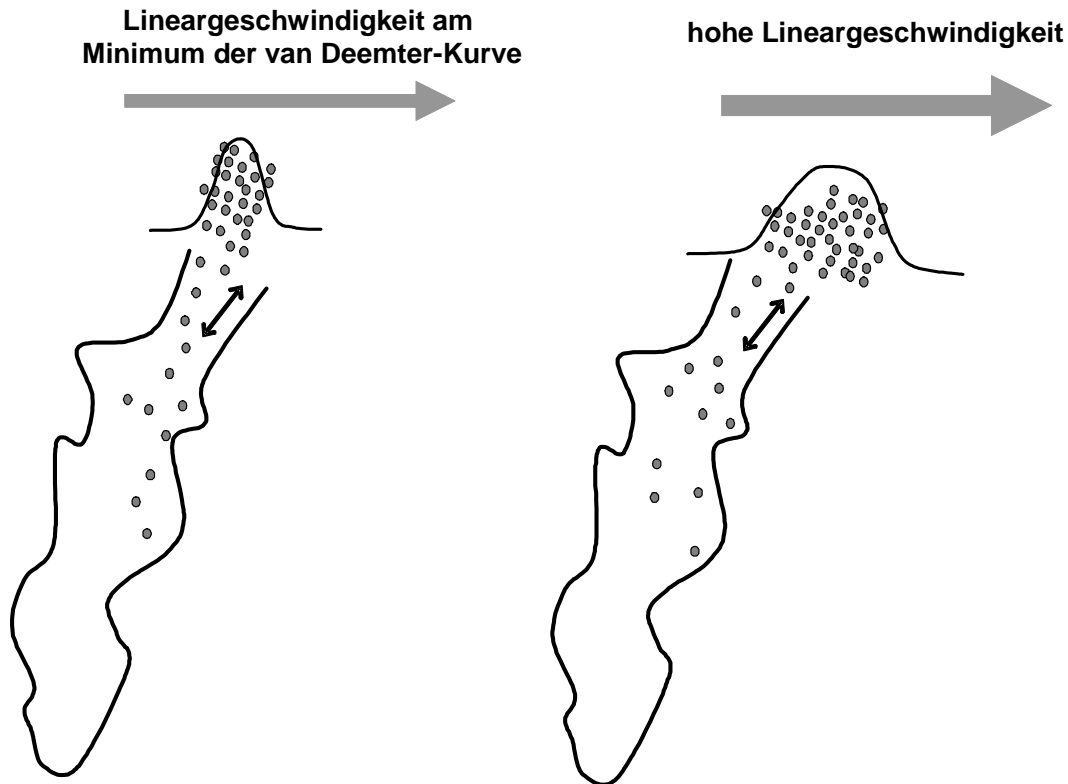
$$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_m$$

Einen großen Einfluss auf die Bandenverbreiterung in der HPLC hat der verzögerte Massentransport (C-Term der van Deemter-Gleichung (Formel 14)), der mit der Lineargeschwindigkeit linear zunimmt (Abb. 1.3).

**Formel 14 C-Term der van Deemter-Gleichung (verzögerter Massentransport)**

$$C = \frac{\omega \cdot d_p^2}{D_s}$$

Der verzögerte Massentransport entsteht durch Diffusion der Analytmoleküle in die Poren der stationären Phase hinein und heraus. Mit höheren Lineargeschwindigkeiten wandert die Probenzone in der mobilen Phase schneller, als die retardierten Analytmoleküle aus den Poren wieder herausdiffundieren (Abb. 1.4). Dadurch verbreitert sich die Probenzone stärker, was breitere Peaks im Chromatogramm zur Folge hat.



**Abb. 1.4** Schematische Darstellung der Bandenverbreiterung durch höhere Lineargeschwindigkeiten an einer Pore in einer porösen Kieselgeloberfläche.

Die Diffusion der Analyten in die Poren der stationären Phase kann durch einen Diffusionskoeffizienten  $D_S$  beschrieben werden. Der Faktor  $\omega$  in Formel 14 beinhaltet den Einfluss der Porengeometrie.

Der Teilchendurchmesser  $d_p$  geht quadratisch in den Term der Bandenverbreiterung ein (Formel 14). Daher sollten unterschiedliche Teilchendurchmesser des Trägermaterials einen deutlichen Einfluss auf die Bandenverbreiterung haben. Halász untersuchte diesen Zusammenhang (Abb. 1.5) [13, 14].

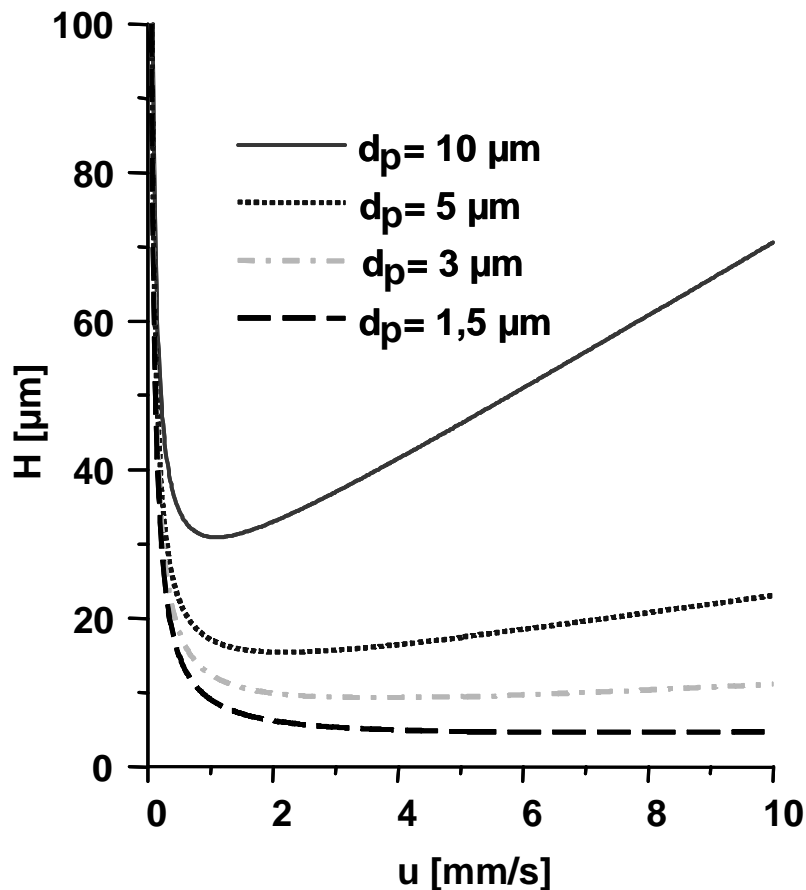


Abb. 1.5 Van Deemter-Kurven für Trägermaterialien mit unterschiedlichen Teilchendurchmessern. Berechnet nach Halász.

Den steilsten Anstieg des C-Terms weist das 10 μm-Trägermaterial auf. Auch wird deutlich, dass die Höhe des Minimums (A-Term der van Deemter-Gleichung) von dem Teilchendurchmesser abhängt. Mit Verringerung des Teilchendurchmessers wird der Einfluss höherer Lineargeschwindigkeiten auf die Bandenverbreiterung geringer und die optimale Lineargeschwindigkeit verschiebt sich zu höheren Werten. Dies ermöglicht kürzere Analysenzeiten ohne merklichen Verlust an Trenneffizienz, was bei der Verwendung von Trennsäulen, die mit größeren Partikeln gefüllt sind, einen Verlust der Auflösung zur Folge hätte (Abb. 1.2).

### 1.3. Gradient-Volumen-Konzept

Eine Gradientenelution bietet unter anderem die Möglichkeit, komplexe Probengemische, die einen breiten Polaritätsbereich aufweisen, innerhalb einer akzeptablen Analysenzeit aufzutrennen. Während einer isokratischen Trennung bleibt die Elutionskraft der mobilen Phase zeitlich unverändert, was sehr lange Analysenzeiten für komplexe Probengemische zu Folge haben kann. Durch einen

Gradienten wird die Eluentenzusammensetzung im Laufe einer Trennung kontinuierlich von einem schwachen bis zu einem starken Eluenten hin verändert. Das Probengemisch wird in eine mobile Phase mit einer schwachen Elutionskraft injiziert. Dabei ist die Verweildauer der einzelnen Analyten in der stationären Phase im Extremfall unendlich groß. Durch die Erhöhung der Elutionsstärke wird schließlich eine kritische Eluentenzusammensetzung erreicht, bei der die Affinität der einzelnen Probenbestandteile zur mobilen Phase größer wird als zur stationären Phase. Durch die weitere kontinuierliche Erhöhung der Elutionskraft ist das Zeitfenster für die Probezone in der mobilen Phase zu kurz, um den Einflüssen der Bandenverbreiterung zu unterliegen. Die Wechselwirkungen mit der stationären Phase werden durch die steigende Elutionsstärke mehr und mehr unterdrückt. Dies hat unter anderem schmalere Peaks im Chromatogramm zur Folge. Durch die nahezu inerte Elution der einzelnen Substanzen zum Ende der Säule hin ist der Retentionsfaktor dort gleich Null, was die Auswertung der  $k$ -Werte und Bodenzahlen innerhalb einer Gradientenelution nicht aussagekräftig macht. Da der Retentionsfaktor  $k$  ein thermodynamisches Adsorptionsgleichgewicht beschreibt, das bei der Gradientenelution aber nicht besteht, ist der  $k$ -Wert in der Gradientenelution nicht definiert und sollte in diesem Zusammenhang auch nicht verwendet werden.

An dieser Stelle soll eine von vielen Optimierungsmöglichkeiten in der HPLC erläutert werden. Wenn die Analysenzeit einer bereits bestehenden Methode mit einem linearen Gradienten verkürzt werden soll, bietet das so genannte Gradienten-Volumen-Konzept dazu die Möglichkeit. Engelhardt und Elgass [15] zeigten 1986, dass eine Trennung im linearen Gradientenmodus nahezu ohne Veränderung der Trennung beschleunigt werden kann, indem das Gradientenvolumen  $V_G$  und damit auch die Eluentenzusammensetzung konstant gehalten und die Gradientendauer  $t_G$  über den Fluss  $F$  verändert wird. Da die Elution der einzelnen Komponenten immer bei einer bestimmten Eluentenzusammensetzung erfolgt, kann somit die Analysendauer verkürzt werden. Beim Transfer auf eine Säule anderer Abmessungen muss darüber hinaus das Gradientenvolumen  $V_G$  auf das Säulenvolumen  $V_C$  so angepasst werden, dass  $V_G/V_C$  konstant bleibt. Mittels des Gradient-Volumen-Konzepts (Formel 15) ist es dann möglich, eine Trennmethode ohne Veränderung des Chromatogramms auf eine Säule mit kleinerem Innendurchmesser ( $d_C$  bzw. Radius  $r_C$ ) zu übertragen. Durch diesen Zusammenhang ist es ebenfalls möglich, eine bestehende Gradientenmethode auf kürzere Säulen zu transferieren, was zusätzlich eine kürzere Analysenzeit erlaubt.



## Formel 15 Gradient-Volumen-Konzept

$$Konst. = \frac{V_G}{V_c} \quad \text{wobei } V_G = F \cdot t_G \quad \text{und } V_c = \pi \cdot r_c^2 \cdot L$$

Dennoch sind auch dieser Möglichkeit der Methodenoptimierung Grenzen gesetzt. Eine Verringerung der Gradientendauer  $t_G$  wird durch eine Erhöhung des Flusses  $F$  erreicht (Formel 15), wodurch sich der Druckabfall der Säule erhöht. Dem resultierenden Druckabfall sind aber apparative Grenzen gesetzt. Kommerzielle HPLC-Systeme haben ihr Drucklimit bei 400 bis 500 bar erreicht. Eine weitere Grenze des Gradient-Volumen-Konzeptes liegt in der im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Bandenverbreiterung in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der mobilen Phase. Trotz des geringeren Einflusses der Bandenverbreiterung innerhalb einer Gradientelution sind die Probenzonen bei Flüssen der mobilen Phase außerhalb des Minimums der van Deemter-Kurve der Bandenverbreiterung stärker ausgesetzt. Dies hat dann breitere Probenzonen zur Folge, was die Auflösung zwischen zwei Peaks innerhalb eines Chromatogramms verringert (Abb. 1.2, S. 14). Nur bei entsprechend kleinen Partikeln kann auch bei höheren Lineargeschwindigkeiten gearbeitet werden, ohne zuviel Trennleistung durch die Bandenverbreiterung zu verlieren.

## 2. Stationäre Phasen

In der HPLC ist die Natur der stationären Phase entscheidend für die Trennung eines Substanzgemisches. Auf dem Markt ist eine große Anzahl an unterschiedlichen Materialien erhältlich. Allein in der Umkehrphasenchromatographie gibt es momentan über 800 stationäre Phasen mit vielfältigen Selektivitäten. Zusätzlich kann der Anwender auch zwischen unterschiedlichen Trägermaterialien wählen. Am weitesten verbreitet sind stationäre Phasen, die auf Kieselgel basieren, welches porös und unporös sein kann. Kieselgel zeichnet sich unter anderem durch eine hohe mechanische Stabilität und gut kontrollierbare Partikel- und Porengröße aus. Neben Kieselgel können auch Zirkoniumdioxid, Aluminiumoxid wie auch Titandioxid in der HPLC verwendet werden. Auch organische Polymere wie Polystyrol-Divinylbenzol werden als Trägermaterial genutzt. In jüngerer Zeit finden verstärkt so genannte Monolithen Einsatz in der HPLC, auf die aber nicht näher eingegangen werden soll.

Für den Anwender besteht die große Herausforderung, aus diesem mannigfaltigen Pool an Füllmaterialien eine geeignete Säule für sein Trennproblem zu finden. Prinzipiell können stationären Phasen für die HPLC nach der Art der chromatographischen Oberfläche unterteilt werden (Abb. 2.1).

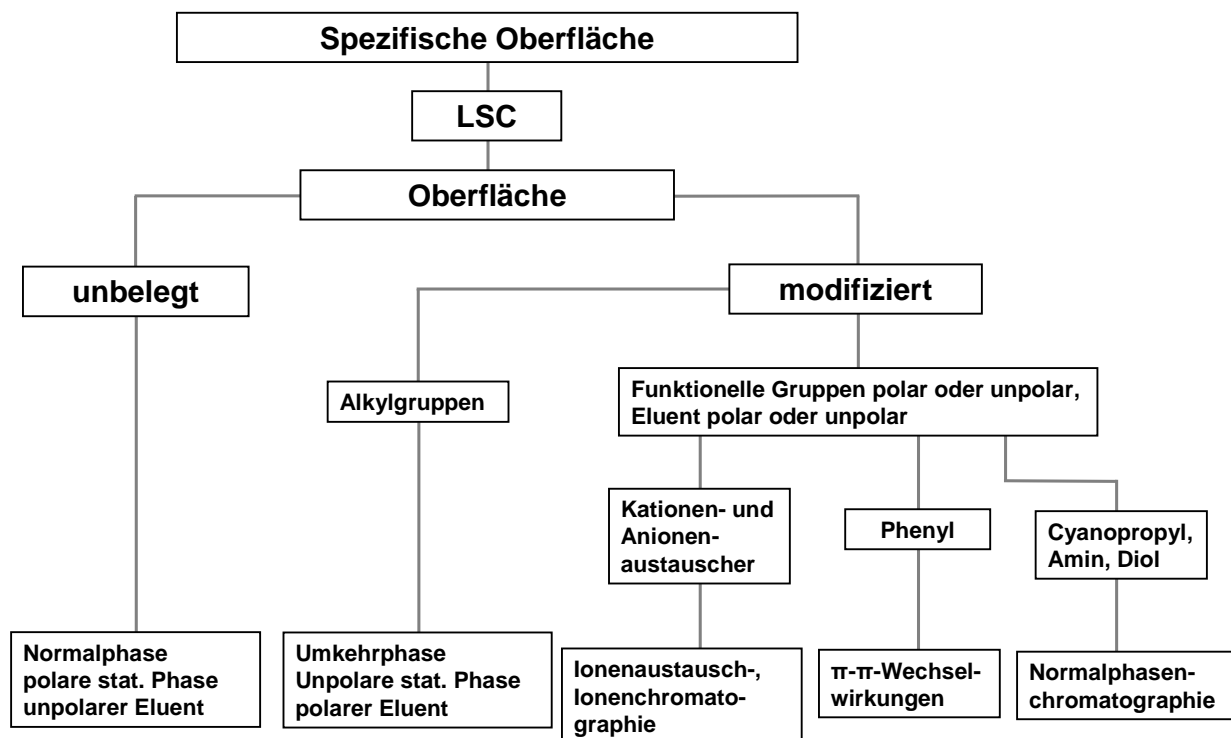


Abb. 2.1 Grobe Einteilung kommerzieller stationärer Phasen für die HPLC. LSC = Liquid Solid Chromatography.

In dieser Arbeit wurden auf porösem Kieselgel basierende stationäre Phasen verwendet. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

## **2.1. Retentionsmechanismen**

Einer chromatographischen Trennung in der HPLC können verschiedene Retentionsmechanismen zugrundeliegen. Allgemein erfolgt eine Auftrennung einzelner Probenbestandteile durch unterschiedliche starke Wechselwirkungen der Komponenten mit der stationären und mobilen Phase. Diese Wechselwirkungen können unter anderem ionischer oder hydrophober Natur sein. Aber auch Adsorption, Größenausschluss oder Ionenausschluss können eine Rolle spielen. Meist liegt nicht nur ein Mechanismus vor, der zur erfolgreichen Trennung eines Gemisches führt. Dennoch dominiert in den meisten Fällen ein Retentionsmechanismus, welcher von der Art der stationären und mobilen Phase abhängig ist. In diesem Abschnitt wird daher auf die in dieser Arbeit angewandten Retentionsmechanismen der Ionenaustausch-, Umkehrphasen- und Normalphasenchromatographie näher eingegangen.

### **2.1.1. Ionenaustauschchromatographie**

Trägermaterialien für Ionenaustauschtaucher sind meist modifizierte Kieselgele oder Austauschharze, die geladene Gruppen tragen. Dabei handelt es sich um ionische oder ionisierbare Gruppen, die entweder positive oder negative Ladungen tragen können. Je nach Art der vorliegenden Austauschfunktionen an der Oberfläche der stationären Phase wird zwischen Anionen- und Kationenaustauscher unterschieden. Abhängig von den Eigenschaften der vorliegenden Austauschfunktionen kann weiterhin zwischen starken und schwachen Ionenaustauschern unterschieden werden (Abb. 2.2). Im Falle von schwachen Ionenaustauschern hat der pH-Wert des verwendeten Eluenten einen entscheidenden Einfluss auf die Anzahl und Art der vorliegenden Ladung. Starke Ionenaustauscher tragen meist starke Säuren oder Basen als Austauschfunktion und sind daher kaum abhängig vom pH-Wert, da sie über einen weiten pH-Bereich ionisiert vorliegen. Die funktionellen Gruppen eines starken Anionenaustauschers liegen bei einem pH-Wert kleiner 10 vollständig ionisiert vor, im Falle eines starken Kationenaustauschers dagegen bei einem pH-Wert größer 2 (Abb. 2.2). Die geladene Austauschfunktion benötigt immer ein Gegenion auf Grund der Elektroneutralitätsbedingung. Als Gegenion kann ein Eluent- oder Probenmolekül

dienen. Liegen negativ ionisierbare Gruppen an der Oberfläche vor, dient ein positiv geladenes Ion als Gegenion. In diesem Fall handelt es sich bei der stationären Phase um einen Kationenaustauscher.

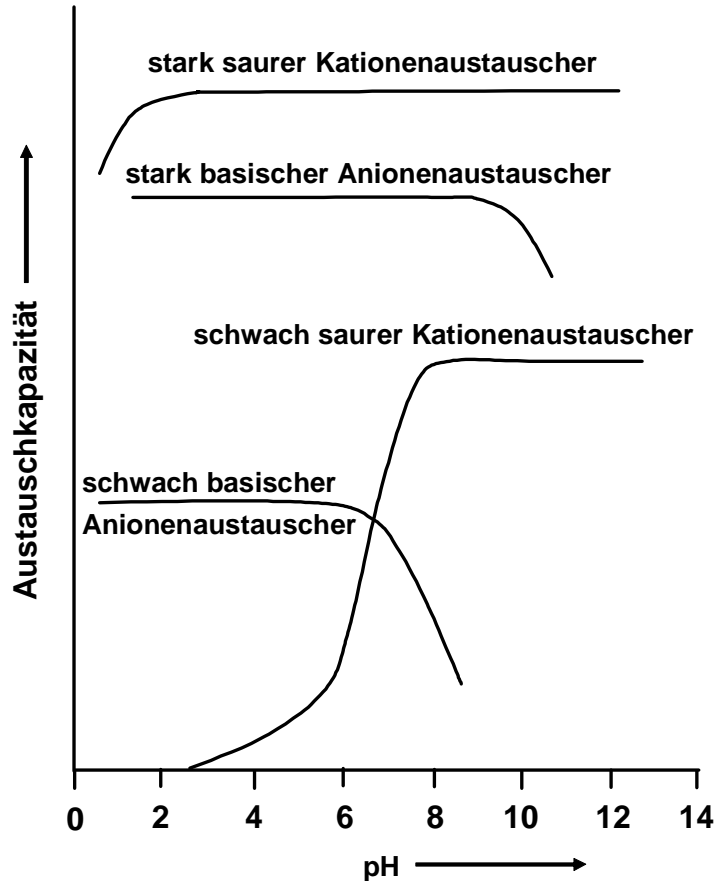


Abb. 2.2 Einteilung von Ionenaustauschern in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Im Falle des Ionenaustausches handelt es sich um einen stöchiometrischen Verdrängungsprozess. Eine hohe Ionenstärke des Eluenten beschleunigt die Verdrängung eines Analyten von der stationären Phase. Daher erfolgt die Trennung eines komplexen Probengemisches in der Ionenaustauschchromatographie oft in einem Salzgradienten. Eine Ionenaustauscherphase enthält neben den ionisierbaren Gruppen meist auch hydrophobe Stellen an der Phasenoberfläche. Daher können die Probenmoleküle neben dem Ionenaustausch auch hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufweisen. Durch Zugabe eines organischen Modifiers zum Eluenten können diese hydrophoben Wechselwirkungen verringert bzw. unterdrückt werden. Die Abhängigkeit der Retentionsfaktoren ausgewählter Analyten von der Ionenstärke des Eluenten bietet eine Möglichkeit, Aussagen über die so genannte Resthydrophobie der stationären Phase zu treffen. Wenn der Retentionsfaktor dabei mit sinkender reziproker Ionenkonzentration des Eluenten linear abnimmt, liegt eindeutig

Ionenaustausch vor. Die Auftragung des Retentionsfaktors in Abhängigkeit der inversen Ionenkonzentration ( $1/c$ ) des Eluenten lässt somit Aussagen über die Resthydrophobie eines Ionenaustauschers zu (Abb. 2.3). Im Falle einer Extrapolation dieser Auftragung hin zu einer unendlichen Salzkonzentration würde diese im Punkt  $1/c = 0$  (siehe Abb. 2.3) liegen. Wenn Ionenaustausch als einziger Retentionsmechanismus vorliegt, geht der Verlauf der Gerade durch den Koordinatenursprung, da die Analyten bei einer unendlich hohen Salzkonzentration vollständig von der stationären Phase verdrängt werden, ohne mit dieser Wechselwirkungen einzugehen. Dieser Effekt ist auch schon bei hohen Salzkonzentrationen zu beobachten. In Abb. 2.3 sind zwei typische Kurven für eine Substanz A für eine Säule a und eine Säule b schematisch dargestellt. Der Schnittpunkt mit der y-Achse bei  $1/c = 0$  liegt für diese Substanz auf Säule a bei einem höheren  $k$ -Wert als auf Säule b. Demnach ist der Einfluss eines zweiten Retentionsmechanismus auf der stationären Phase A größer. Da es sich meist um hydrophobe Wechselwirkungen handelt, ist es wahrscheinlich, dass Phase a hydrophober ist als Phase b.

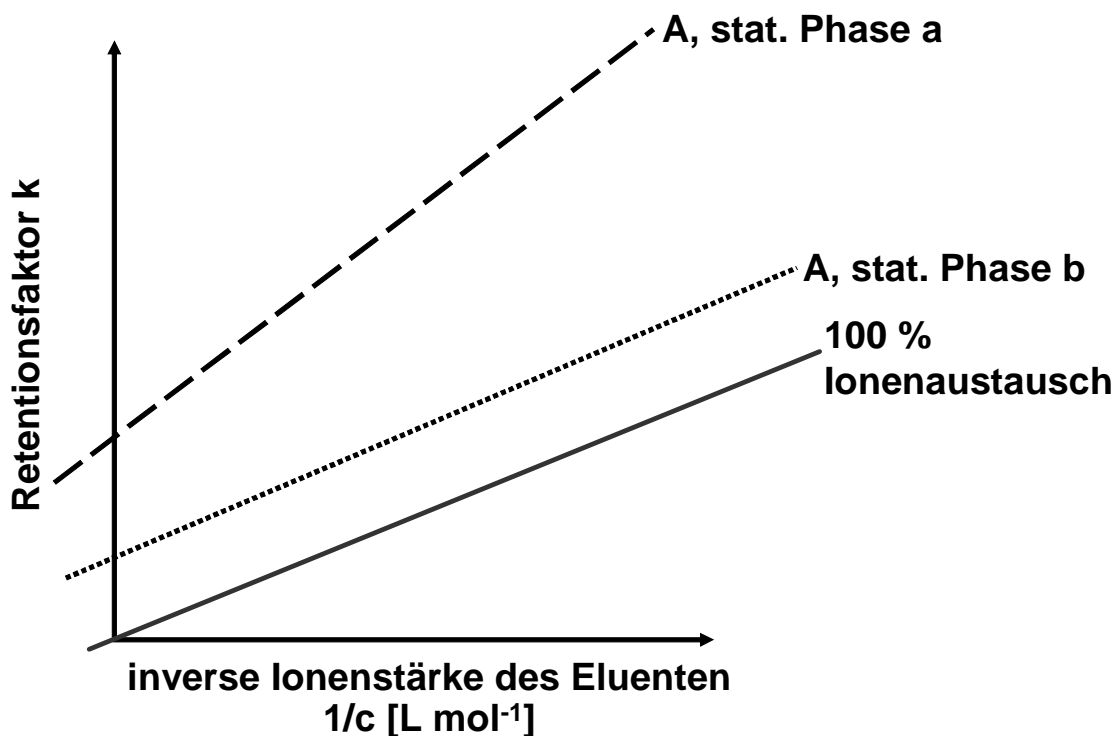


Abb. 2.3 Theoretische Darstellung der Abhängigkeit des Retentionsfaktors der Substanz A von der inversen Ionenstärke des Eluenten für Ionenaustauscherphase a und b.

Weiterhin hat die vorliegende Ladung der Analyten einen entscheidenden Einfluss auf das Elutionsverhalten. Prinzipiell eluieren höher geladene Analyten im Ionenaustauschmodus später als einfach geladene. Organische Ionen zeigen meist

stärkere hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase als anorganische Ionen. Die hydrophoben Wechselwirkungen können durch organische Modifizier im Eluenten reduziert werden. Wenn die Retention dieser Analyten mit einer Modifiziererhöhung abnimmt, ist dies ein weiteres Indiz für das Vorliegen von hydrophoben Wechselwirkungen. An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass der Anteil an organischem Lösemittel in der mobilen Phase nicht beliebig erhöht werden kann. Die Salze des Eluenten sind im nicht-wässrigen Medium nicht unbegrenzt löslich und fallen ab einem bestimmten Organikgehalt aus.

Nähere Informationen zur Ionenchromatographie können der weiterführenden Literatur [16, 17] entnommen werden.

### **2.1.2. Umkehrphasenchromatographie (Reversed-Phase-Chromatographie, RPC)**

Das am weitesten verbreitete Prinzip der HPLC ist die Umkehrphasenchromatographie (RP-Chromatographie). Hier dienen meist modifizierte Kieselgele als stationäre Phasen. Im Gegensatz zur Normalphasenchromatographie (siehe Kapitel 2.1.3) liegt durch chemische Modifizierung eine hydrophobe Kieselgeloberfläche vor. Auf dem Markt gibt es eine große Auswahl an RP-Materialien, deren Selektivität sich teilweise stark unterscheidet (Abb. 2.4). Für den Anwender besteht die Herausforderung, für sein Trennproblem die geeignete stationäre Phase zu finden. Dabei können chromatographische Tests helfen. Auf Grund eines speziell ausgewählten Probengemisches, bei dem die einzelnen Testsubstanzen als „Sonden“ für bestimmte Eigenschaften der stationären Phasen dienen, ist es unter vorgegebenen Eluentenbedingungen möglich, Aussagen über zum Beispiel die molekulare Formerkennung (shape selectivity) [18-20], Hydrophobie und die silanophile Aktivität der getesteten Phase zu treffen [21-26]. Am weitesten verbreitet sind die klassischen Octadecylsilica-Phasen (Abb. 2.4 A), die so genannte „C18-Borsten“ enthalten. Auf den ersten entwickelten Octadecylsilica-Phasen zeigten die Chromatogrammpeaks basischer Analyten eine starke Asymmetrie, was auf zusätzlichen Wechselwirkungen mit nicht umgesetzten Silanolgruppen auf der Kieselgeloberfläche beruhte. Aus sterischen Gründen ist es nicht möglich, alle Silanolgruppen des Kieselgels mit C18-Ketten zu belegen. Daher werden nach der Silanisierung der längeren Alkylketten kleinere Alkylsilane auf die Kieselgeloberfläche aufgebracht (Abb. 2.4 A). So sind die meisten Silanolgruppen durch dieses so genannte Endcapping abgeschirmt. Diese stationären Phasen sind sehr gut für die Trennung hydrophober Analyten geeignet. Um

das Retentionsverhalten und die Peaksymmetrie polarer und basischer Analyten zu verbessern, werden polare Gruppen in die Alkylkette (Abb. 2.4 C) oder ins Endcapping (Abb. 2.4 B) eingebracht. Durch die Vielfalt an polaren Gruppen und Alkylketten sind viele Variationen möglich, die wiederum Unterschiede in den Selektivitäten dieser Phasen zur Folge haben.

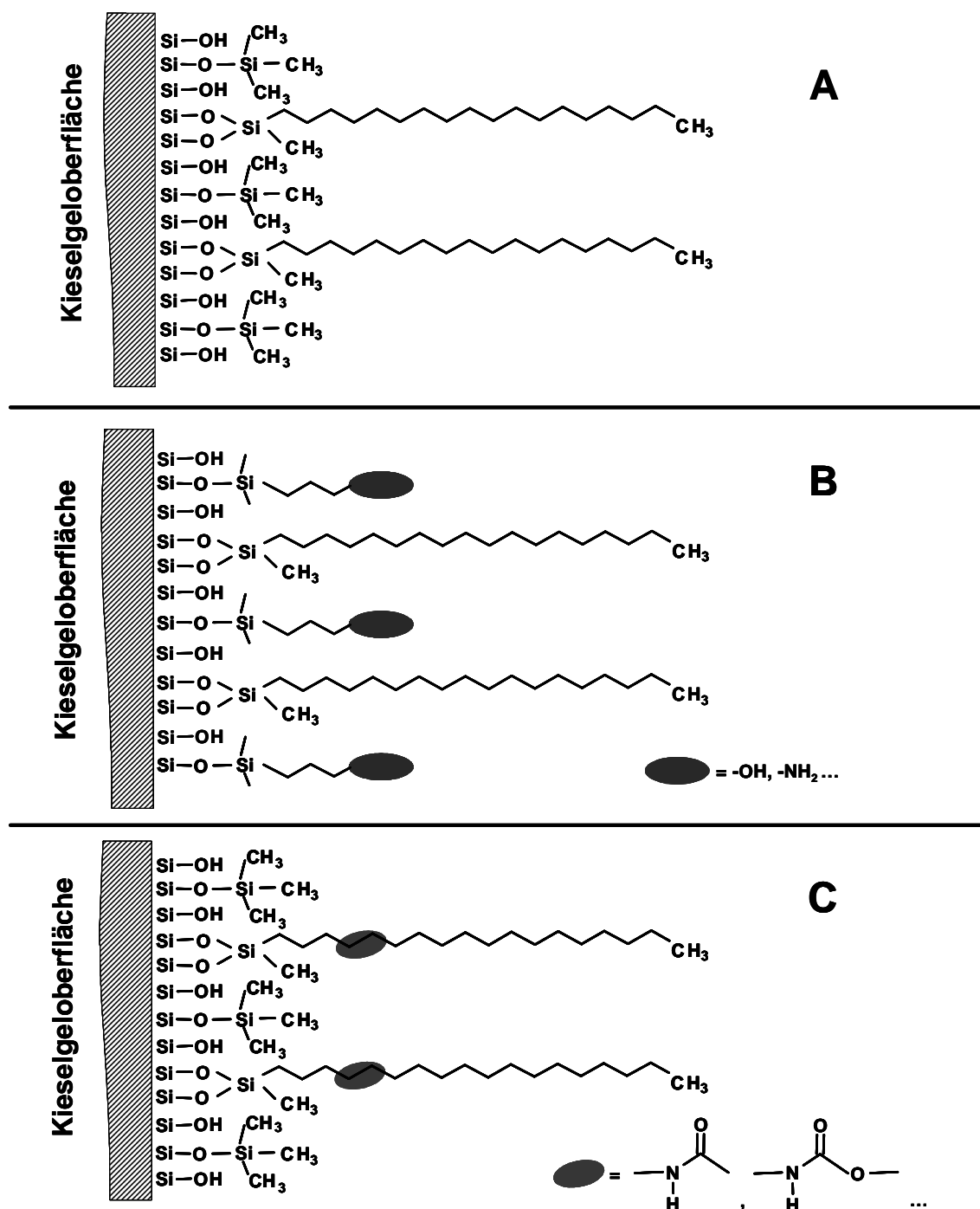


Abb. 2.4 Beispiele für die Vielfalt der Oberflächenmodifikationen verschiedener Umkehrphasen. (A) klassische C18-Phase, hydrophobe Octadecyl-Ketten mit Endcapping, (B) Octadecyl-Ketten mit polarem Endcapping, (C) Shield-Phase, Octadecyl-Ketten mit eingebetteten polaren Gruppen, klassisches Endcapping.

In der Umkehrphasenchromatographie erfolgt die Trennung eines Substanzgemisches vorwiegend auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase. Folglich besitzt ein unpolarer Eluent die höchste Elutionskraft, Wasser dagegen besitzt die geringste Elutionskraft. Durch Abmischen eines organischen und wässrigen Eluenten kann die Retention der Analyten eingestellt werden, wobei auf die Mischbarkeit der beiden Eluentenbestandteile geachtet werden muss. Am häufigsten werden Acetonitril bzw. Methanol als organischer Anteil des Eluenten eingesetzt. Wie stark zum Beispiel hydrophobe Verbindungen auf Grund von Wechselwirkungen in bzw. an der stationären Phase zurückgehalten werden, steht in der Umkehrphasenchromatographie in einem engen Zusammenhang mit dem Kohlenstoffgehalt der stationären Phase. Je höher dieser ist, umso später eluieren hydrophobe Verbindungen. Durch diese Vielfalt der chemischen Modifikationen der Kieselgeloberfläche sind weitere retentionsbeeinflussende Faktoren möglich.

### **2.1.3. Normalphasenchromatographie**

Die Normalphasenchromatographie wird auch als Adsorptionschromatographie bezeichnet. Im Gegensatz zur Umkehrphasenchromatographie ist hier die stationäre Phase polar und die mobile Phase unpolar. Unmodifiziertes Kieselgel kann als stationäre Phase dienen. Substanzgemische, die sich in der Position und Art der funktionellen Gruppe unterscheiden, können im Normalphasenmodus gut getrennt werden. Prinzipiell lässt sich sagen, dass mit steigender Polarität der funktionellen Gruppen auch ihr Beitrag zur Retention steigt. Wie vorher schon erwähnt, dienen unpolare Lösungsmittel als mobile Phase. Nicht alle unpolaren Lösungsmittel sind UV-durchlässig und daher auch nicht für die HPLC geeignet, da die UV-Detektion die bedeutendste in HPLC ist. Meist werden aliphatische Kohlenwasserstoffe verwendet. Ein großes Problem der Normalphasenchromatographie ist Wasser, welches hier die stärkste Elutionskraft besitzt und sich in den Eluenten und auf der stationären Phase unkontrolliert, z.B. durch Luftfeuchtigkeit, anreichern kann. Somit führen schon kleine Anteile an Wasser zu großen Änderungen in der Retention. Daher sollten mobile Phasen sofern möglich immer mit Wasser gesättigt werden. Die Zugabe von polaren organischen Solventien wie Beispiel Alkoholen oder Ethern erhöht die Elutionsstärke des Eluenten und ist somit ein Optimierungsparameter in der Methodenentwicklung, wobei die Mischbarkeit der Lösungsmittel den Spielraum einengt. Die Normalphasenchromatographie findet heute nicht mehr viel Anwendung mit Ausnahme



von chiralen stationären Phasen zur Enantiomerentrennung und präparativen Trennungen.

## 2.2. Phasensynthese auf dem Trägermaterial Kieselgel

Das Gebiet der Phasensynthese [27] ist sehr umfangreich, daher soll in diesem Abschnitt nur ein stark verkürzter Überblick gegeben werden.

Kieselgel kann unmodifiziert auch als stationäre Phase in der Normalphasenchromatographie genutzt werden. Heute jedoch findet chemisch modifiziertes Kieselgel aus den in Kapitel 2.1.3 auf Seite 28 genannten Gründen die häufigste Anwendung. Die Silanolgruppen sind schwache Säuren mit einem  $pK_a$ -Wert von 9,5 oder kleiner, die je nach pH-Wert protoniert oder deprotoniert vorliegen. Kieselgel kann demnach auch als schwacher Kationenaustauscher agieren. Es können unterschiedliche Arten von Silanolgruppen auftreten (Abb. 2.5), deren Eigenschaften entscheidend für die chemische Modifizierung sind. Es befinden sich circa  $8 \mu\text{mol m}^{-2}$  Silanolgruppen an der Kieselgeloberfläche, wovon circa  $4,3 \mu\text{mol m}^{-2}$  isolierte und  $3,7 \mu\text{mol m}^{-2}$  vicinale Silanolgruppen sind, wobei die isolierten deutlich reaktiver als die vicinalen sind. Aus sterischen Gründen kann nur etwa die Hälfte der Silanolgruppen mit den Silanisierungsreagenzien umgesetzt werden.

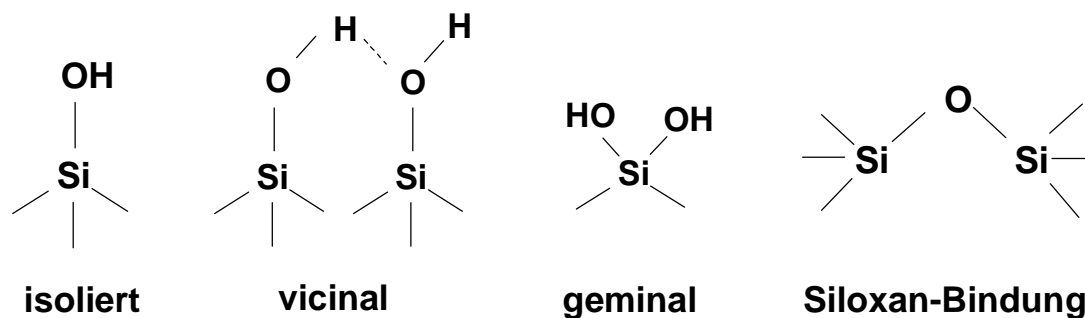
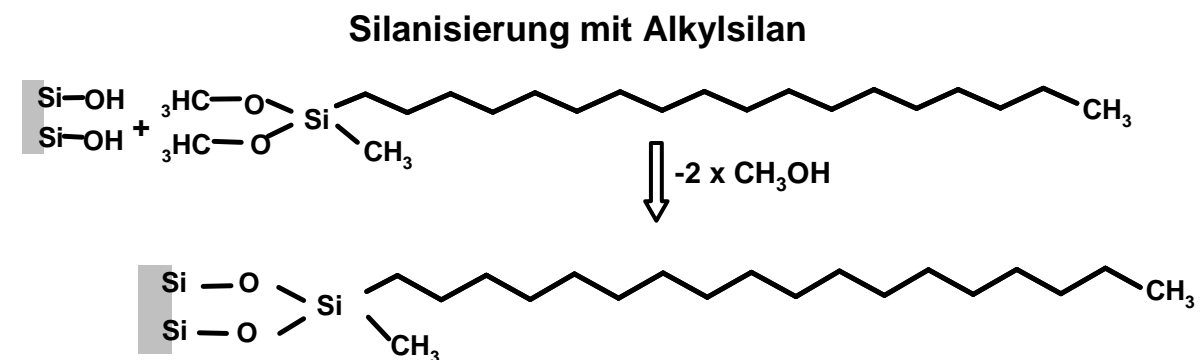


Abb. 2.5 Mögliche Arten von Silanolgruppen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Kieselgeloberfläche zu modifizieren. Diese Modifikationen sind entscheidend für die Eigenschaften der stationären Phase.

Eine typische Synthesemethode für so genannte Bürstenphasen ist die Silanisierung. Dabei werden Alkylsilane (siehe Abb. 2.4 A, S. 27) mit reaktiven Gruppen (meist Chlor- oder Alkoxysilane) über eine Silanisierungsreaktion an der Kieselgeloberfläche (Abb. 2.6) verankert. Polare Gruppen im Endcapping oder in den Alkylketten beeinflussen das Retentionsverhalten polarer Analyten (siehe Abb. 2.4 B und C, S. 27).



**Endcapping mit kleinem Silan**

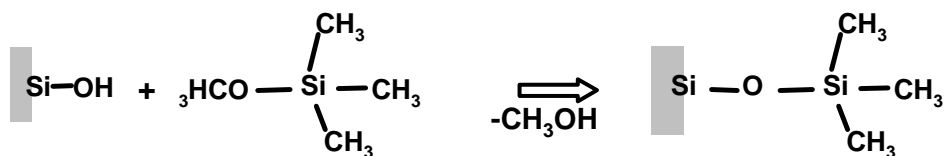
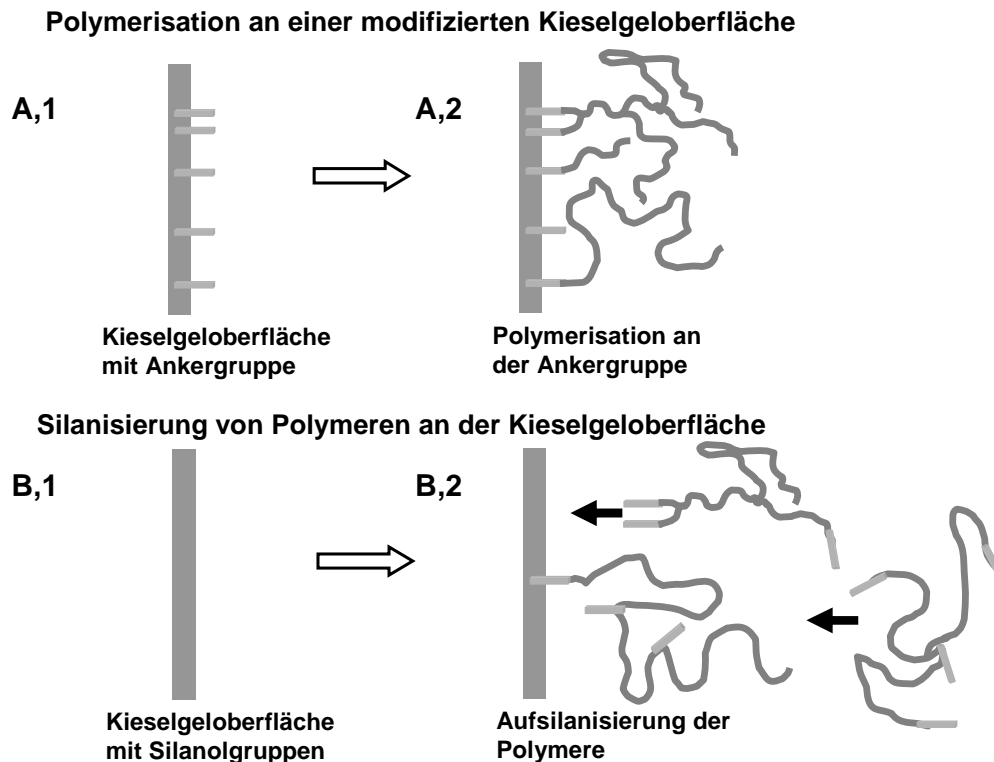


Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Modifikation der Kieselgeloberfläche mittels Silanisierung von Alkylsilanen.

Alternativ zur Bürstenphase können polymerverkapselte Kieselgelphasen, so genannte PolyEncap-Materialien, synthetisiert werden. Die Herstellung polymerverkapselter Kieselgelphasen kann grob in zwei voneinander unabhängigen Synthesewegen erfolgen. Zum einen kann die Polymerisation direkt an der Kieselgeloberfläche erfolgen (Abb. 2.7A). Dabei wird die Kieselgeloberfläche zunächst mit einem Silan, welches eine polymerisationsfähige Gruppe enthält und als Ankergruppe wirkt, modifiziert (Abb. 2.7A, 1). Danach erfolgt die Polymerisation des gewünschten Monomers an diesen polymerisationsfähigen Gruppen des Ankers, die meist Doppelbindungen sind, direkt an der modifizierten Kieselgeloberfläche (Abb. 2.7A, 2). Die Ketten wachsen von der Kieselgeloberfläche weg, wobei je nach verwendeten Monomeren verzweigte oder lineare Polymere entstehen können. Ein weiterer Syntheseweg ist die Verankerung von Polymeren auf der Kieselgeloberfläche (Abb. 2.7B). Hierbei ist entscheidend, dass die Polymere mindestens eine silanisierungsfähige Gruppe enthalten, da die Verbindung mit der Kieselgeloberfläche auch hier über eine Silanisierungsreaktion erfolgt (Abb. 2.7B,2).



**Abb. 2.7** Schematische Darstellung der Polymerisation direkt an der modifizierten Kieselgeloberfläche (A) und Aufsilanisierung von Polymeren mit Ankergruppe (B).

Das Ummanteln (engl. Coating) der Kieselgelteilchen mit Polymeren ist eine weitere Möglichkeit der Modifikation. Da es sich hierbei nicht um Silanisierungsreaktionen handelt, ist das Coaten unabhängig von der Anzahl Silanolgruppen an der Kieselgeloberfläche. Über elektrostatische und polare Wechselwirkungen lagern sich die Polymere an der Kieselgeloberfläche an. Dies setzt voraus, dass die verwendeten Polymere polare oder ionische Eigenschaften aufweisen. Zwischen freien Polymeren in Lösung und adsorbierten Polymeren an der Kieselgeloberfläche stellt sich über einen bestimmten Zeitraum ein Adsorptionsgleichgewicht ein. Dabei können sowohl monomolekulare Schichten (Monolayer) als auch Mehrschichtadsorptionen (Polylayer) auftreten. Durch Waschprozesse können die Polylayer bis hin zu einer Monolayer abgewaschen werden. Um dies zu verhindern, werden häufig Quervernetzer eingesetzt. Dabei handelt es sich um bifunktionale Moleküle, die die einzelnen Polymerketten zusätzlich zu Netzen verknüpfen. Auf Grund der Schichtdicken der Multilayer können bei porösen Kieselgelen die Poren stark verkleinert bzw. ganz verschlossen werden. Dies hat einen entscheidenden Einfluss auf die chromatographischen Eigenschaften der stationären Phase, insbesondere den Massentransport.

### 3. Strukturaufklärung mit Hilfe der Massenspektrometrie

Es wurden in diesem Abschnitt Grundlagen zusammengefasst, die zum Verständnis dieser Arbeit nötig sind. Für nähere Informationen wird die weiterführende Literatur empfohlen [28-34].

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Detektions- bzw. Analysenmethode, die Informationen über die Masse der Analyten und zum Teil auch über den Molekülaufbau liefern kann. Eine zentrale Bedeutung hat die MS in der Bioanalytik erlangt, um Informationen über die Molekülzusammensetzung, z.B. die Aminosäuresequenz von Peptiden zu erhalten. Über die genauen Massen und die Identifizierung der Aminosäuresequenz der Peptide mittels Fragmentierungen können diese mit Hilfe von Datenbanken bestimmten Proteinen eindeutig zugeordnet werden. Im Bereich der Proteomics ist die Massenspektrometrie daher eine weit verbreitete Methode, um Proteinidentifizierungen und -charakterisierungen durchzuführen. Aber auch bei klassischen analytischen Fragestellungen, z. B. in der Pharma- oder Umweltanalytik, setzt sich diese Detektionstechnik rasant durch.

Für die Strukturaufklärung niedermolekularer organischer Verbindungen mit HPLC-MS stehen im Gegensatz zur GC-MS meist keine Datenbanken zur Verfügung. Über Fragmentierungsspektren ist es häufig nicht möglich, die räumliche Anordnung der einzelnen funktionellen Gruppen bzw. Fragmente im Molekülgerüst genau zu bestimmen. Daher können mit Hilfe der Massenspektrometrie im Falle niedermolekularer Verbindungen häufig nur mögliche Strukturvorschläge unterbreitet werden. Um eine eindeutige Strukturzuordnung treffen zu können, sind noch weitere Analysentechniken wie die NMR-Spektroskopie notwendig. Eine endgültige Bestätigung solcher Strukturvorschläge kann jedoch erst durch eine unabhängige Synthese und den Vergleich mit den vorliegenden Messdaten erfolgen.

In dieser Arbeit wurde die HPLC mit der Ionenfallen- und Flugzeitmassenspektrometrie gekoppelt, um Strukturvorschläge für Abbauprodukte synthetischer Schilddrüsenhormone mit molaren Massen zwischen 300 und 1500 g mol<sup>-1</sup> zu unterbreiten. Dabei wurden auch Versuche mit verschiedenen Ionisierungstechniken durchgeführt.

### 3.1. Ionisierungstechniken und Interfaces

Um Substanzen im Massenspektrometer detektieren zu können, müssen diese ionisierbar sein und in die Gasphase überführt werden können. Ist dies nicht der Fall, können diese Substanzen im Massenspektrometer nicht detektiert werden.

Es gibt zahlreiche Ionisierungsmethoden, die sich unter anderem in der Ladungs- bzw. Energieübertragung und damit im Ausmaß der chemischen Zerstörung der Analyten unterscheiden. In dieser Arbeit wurden die chemische Ionisierung bei atmosphärischem Druck (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) und die Elektrospray-Ionisierung (ESI) angewandt.

Das Prinzip der chemischen Ionisierung unter Atmosphärendruck basiert auf der pneumatischen Zerstäubung und thermischen Verdampfung des Eluenten. In Abb. 3.1 ist eine APCI-Quelle schematisch abgebildet.

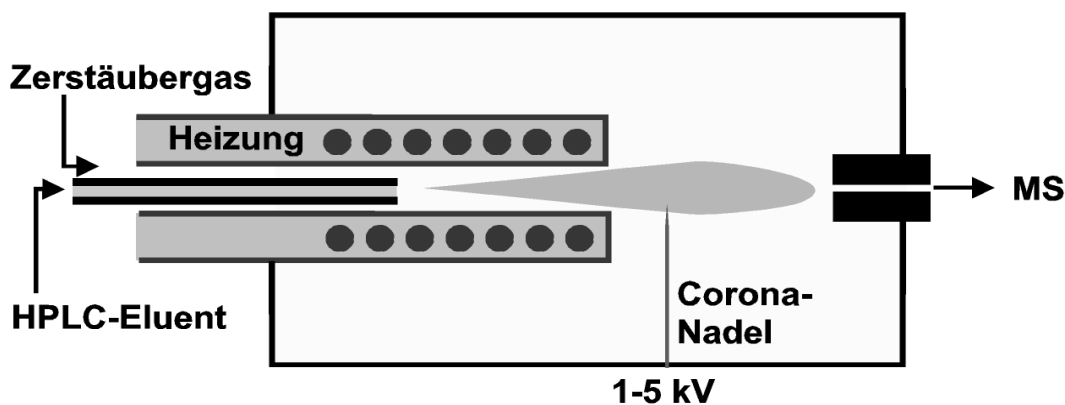


Abb. 3.1 Schematische Darstellung einer Quelle für die chemische Ionisierung unter atmosphärischem Druck (APCI, atmospheric pressure chemical ionization).

Der Eluent bzw. die Analytlösung wird durch eine Kapillare in ein beheizbares Keramikrohr geleitet. Durch das Zerstäubergas (Stickstoff) entsteht ein Spray. Auf Grund der hohen Temperaturen (200 bis 400 °C) im Keramikrohr verdampft das Lösungsmittel. Durch den Kontakt mit einer spitzen Elektrode, der so genannten Coronanadel, an der eine Hochspannung von bis zu fünf Kilovolt anliegt, entsteht durch Coronaentladung aus dem Lösungsmitteldampf ein Reaktandgas (Abb. 3.2). Dieses Plasma wird durch Elektronen aus der Corona-Entladung an der Nadel gebildet und setzt sich zunächst aus ionisierten Eluentmolekülen zusammen. Diese übertragen die Ladung auf die Analytmoleküle, welche dann später detektiert werden können, wodurch es auch zu Fragmentierungen der Analyten kommen kann.

Die Anwesenheit von Lösemittelmolekülen ist für die chemische Ionisierung notwendig. So ist diese Methode auch für höhere Flussraten (von 0,1 bis 2 mL min<sup>-1</sup>) anwendbar, was die Kopplung mit der HPLC erleichtert.

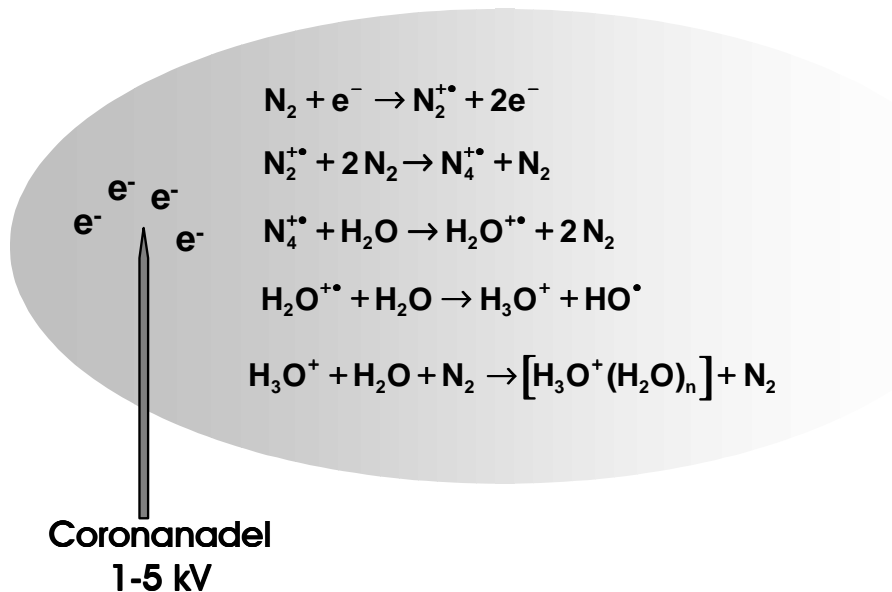


Abb. 3.2 Darstellung der Bildung reaktiver Spezies durch eine Korona-Entladung (APCI).

Eine schonendere Ionisierungsmethode ist die Elektrospray-Ionisierung (Abb. 3.3). Auch hier werden die Ionen unter Atmosphärendruck erzeugt. Die Lösung wird durch eine Stahlkapillare geführt, an der eine Spannung im Kilovoltbereich anliegt. Durch Elektrolyse wird die Überschussladung in Form von Protonen auf die Analytmoleküle übertragen. Das Anlegen einer positiven oder negativen Spannung entscheidet darüber, ob die Analyten protoniert oder deprotoniert vorliegen. Durch ein Zerstäubergas kann die Lösung zusätzlich fein versprüht werden, und an der Kapillarspitze bildet sich auf Grund von Ladungsabstoßungen ein Taylorkonus aus. Es entstehen kleine Tröpfchen die ein feines Spray bilden. Durch das Verdampfen von Lösungsmittelmolekülen verkleinern sich die Tröpfchen, bis es auf Grund von Ladungsabstoßung zu Coulomb'schen Explosionen kommt, bei der das Solvenströpfchen durch die elektrostatische Abstoßung gleichartige Ladungsträger an der Tropfenoberfläche zerplatzt. Dieser Prozess läuft fortwährend ab, bis hin zu einzelnen desolvatisierten, geladenen Analytmolekülen in der Gasphase.

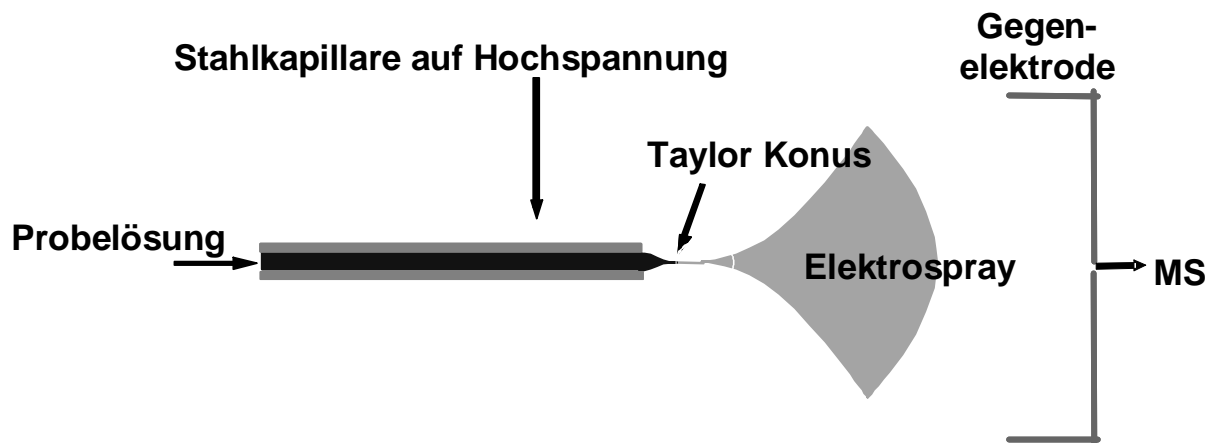


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Prinzips der Elektrospray-Ionisierung (ESI).

Durch diese Ionisierungsmethode können vor allem auch Makromoleküle, wie zum Beispiel Proteine, ohne Fragmentierungsreaktionen während der Ionisierung detektiert werden. Da der pneumatisch unterstützte ESI-Prozess optimal bei recht niedrigen Flussraten (bis zu  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ ) abläuft, sollten möglichst Säulen mit Innendurchmessern von 1 oder 2 mm oder gar Kapillarsäulen verwendet werden. Dennoch sollte nicht unerwähnt bleiben, dass hier im Gegensatz zur APCI meist der HPLC-Fluss vor dem Massenspektrometer gesplittet werden muss.

### 3.2. Grundlagen der Ionenfallen- und Flugzeitmassenspektrometrie

In dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen Massenanalytoren gearbeitet. Diese sollen nun näher erläutert werden. Der Vollständigkeit halber muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Ionisationstechniken unabhängig von den Massenanalytoren sind und je nach Gerätehersteller beliebig mit verschiedenen Ionisationsquellen kombiniert werden können. So können beispielsweise APCI- und ESI-Quellen beliebig mit Ionenfallen- oder Flugzeitmassenspektrometern kombiniert werden, wenn das Design der Geräte dies erlaubt.

Es wurde zum einen ein Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer (QIT, engl. quadrupole ion trap) verwendet (Abb. 3.4). Über eine Transferkapillare gelangen hier die geladenen Analytmoleküle von der Sprayquelle in den Ionentransferbereich, wo Vorvakuum herrscht. Durch Quadrupole oder Octapole wie auch elektrische Linsen werden die Ionen fokussiert. Über den so genannten Skimmer, eine konische, gelochte Elektrode, gelangen die Ionen dann in den Hochvakuumbereich und dort in die Ionenfalle, welche aus einer Ringelektrode mit zwei Endkappen besteht. Die Falle ist mit einem inerten Stoßgas (meist Argon oder Helium) gefüllt, welches zum einem durch

Kollisionen die eintretenden Ionen abbremst und zum anderen der Partner für gezielte Fragmentierungsreaktionen ist. Durch das Anlegen von Wechselfeldern an den Elektroden der Falle werden die Ionen angeregt, verlassen bei spezifischen Frequenzen getrennt nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis die Falle und werden detektiert. Das Füllen und Leeren der Falle erfolgt im Millisekundenbereich, was zu hohen Scangeschwindigkeiten von einem bis zehn Spektren pro Sekunde führt. Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer besitzen typischerweise eine Massengenauigkeit bis zu 100 ppm.

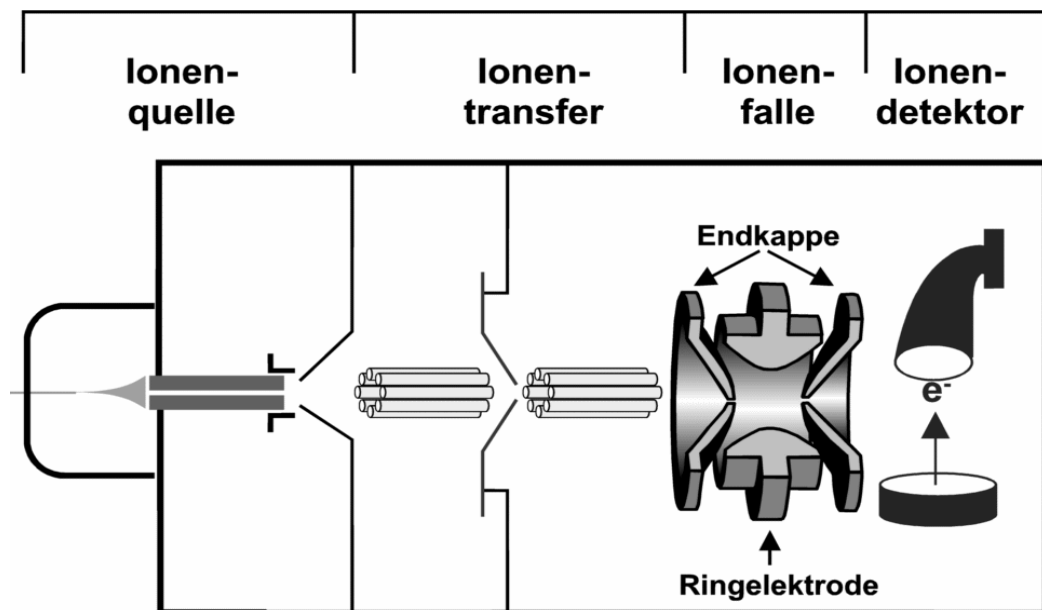


Abb. 3.4 Schematische Darstellung eines Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometers.

Für die Bestimmung exakter Massen werden meist Flugzeitmassenspektrometer (TOF, engl. time of flight) eingesetzt (Abb. 3.5). Auch hier gelangen die Ionen von der Sprayquelle über eine Transferkapillare in den Vorvakuumbereich der Transferoptik. Hier erfolgt wiederum durch Linsen, Skimmer und Octapole die Bündelung der Ionen. Im Flugrohr herrscht Hochvakuum. Wenn die Ionen ins Flugrohr gelangen werden sie durch einen Impuls (orthogonaler Puls) ins Flugrohr beschleunigt, am Reflektor reflektiert und am Detektor nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) getrennt detektiert. Durch den Reflektor ist die Wegstrecke, die die geladenen Analyten zurücklegen müssen, länger und es kann eine bessere Auftrennung nach  $m/z$  erreicht werden. Zudem korrigiert der Reflektor eventuelle Unschärfen in der kinetischen Energie der fliegenden Molekülionen und trägt somit zur hohen Genauigkeit (bis zu 10 ppm genau) der Messung bei. Wenn Ionen gleichen  $m/z$ -Verhältnisses unterschiedlich schnell fliegen, tauchen die schnelleren tiefer in den Reflektor ein. Dadurch haben alle Ionen des



gleichen  $m/z$ -Verhältnisses beim Verlassen des Reflektors auch die gleiche Geschwindigkeit und werden auf den Detektor fokussiert.

So können höhere Auflösungen und genauer detektierte  $m/z$ -Verhältnisse erreicht werden. Letzteres kann bis auf fünf Nachkommastellen genau erfolgen. Mit einer hinreichend genauen Massenmessung im unteren ppm-Bereich kann dadurch eine Summenformel ermittelt werden, die für kleine Moleküle sogar eindeutig sein kann.

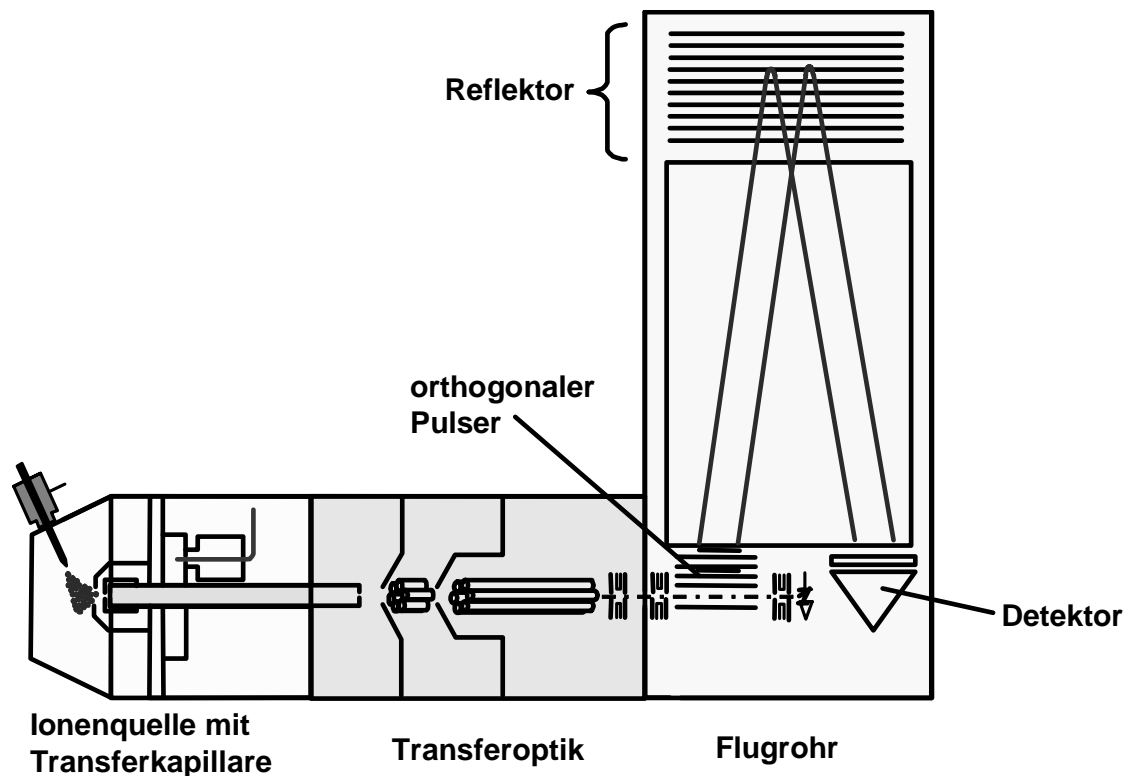


Abb. 3.5 Schematische Darstellung eines Flugzeitmassenspektrometers.

Durch die hohe Auflösung können Isotopenmuster der Analyten genauer bestimmt werden. In einem Ionenfallenmassenspektrometer werden zum Beispiel die Isotopenpeaks dreifach-geladener Ionen nicht mehr eindeutig getrennt detektiert und erscheinen als ein breiter Peak im Massenspektrum (Abb. 3.6), was eine Identifizierung erschwert.

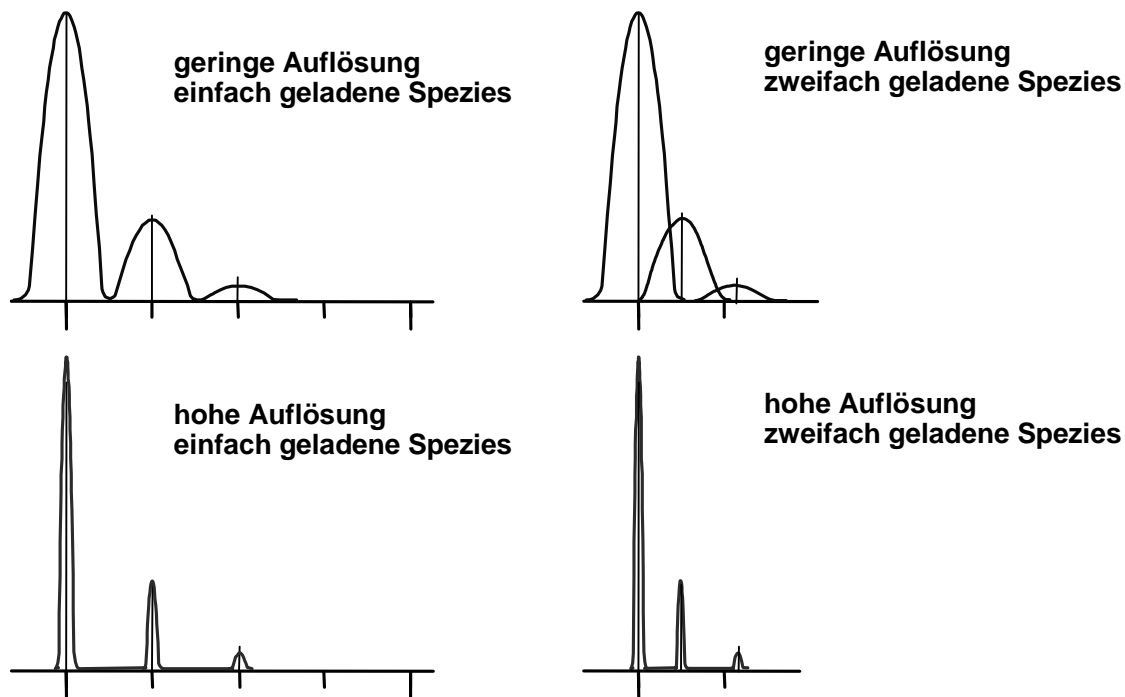


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Auflösung von Isotopenpeaks im Massenspektrum mit hoher Auflösung (unten) und geringer Auflösung (oben)

### 3.3. Kopplung der analytischen HPLC mit der Massenspektrometrie

Unbekannte komplexe Probengemische können mit der Massenspektrometrie nicht aufgetrennt werden. Wenn zu viele Analyten gleichzeitig im Massenspektrometer detektiert werden, ist eine Zuordnung nahezu unmöglich. Daher wird eine Trenntechnik wie GC, HPLC oder Kapillarelektrophorese der massenspektrometrischen Detektion vorgeschaltet, was auch einen zusätzlichen Informationsgewinn auf Grund des Retentions- bzw. Migrationsverhalten erbringt. In dieser Arbeit wurden die komplexen Probengemische mittels RP-HPLC chromatographisch aufgetrennt, wobei das Trennsystem direkt mit dem Massenspektrometer gekoppelt wurde (siehe Abschnitt 3.1, S. 33). Die Kopplung der HPLC mit der massenspektrometrischen Detektion stellt aber auch Anforderungen an das Trennsystem.

Die Auswahl an Eluentenzusätzen ist für die HPLC begrenzt, wenn diese mit der Massenspektrometrie gekoppelt werden soll. Viele Salze eignen sich kaum als Eluentadditiv, da sie schwer flüchtig sind und neben einer Unterdrückung der Ionenbildung das Massenspektrometer stark verschmutzen. Um geladene Analyten zu erzeugen, werden dem Eluenten leichtflüchtige Modifier wie organische Säuren und Amine zugegeben, die aber auch einen großen Einfluss auf die chromatographische Trennung haben. Es sollte ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden, dass nicht alle

Analyten ionisierbar sind und daher nicht im Massenspektrometer, dafür aber in herkömmlichen UV-Detektoren detektiert werden können. Umgekehrt können Substanzen im Massenspektrometer detektiert werden, die nicht UV-aktiv sind. Daher können Massenspektrometer ebenso wenig als universaler Detektor eingesetzt werden wie der UV-Detektor auch.

In der analytischen HPLC werden meist, je nach Säulendimension, Flussraten zwischen  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  und  $2 \text{ mL min}^{-1}$  angewandt. Je nach Ionisierungstechnik (Kapitel 3.1, S. 33) ist es notwendig, die Flussraten ins Massenspektrometer zu verringern. Dafür gibt es Splitsysteme (Abb. 3.7), die direkt nach der HPLC-Pumpe den Primärfluss, der an der Pumpe eingestellt wird, so aufteilen, dass über die HPLC-Säule der gewünschte reduzierte Fluss fließt. Diese Splitsysteme können aber auch zum Splitten des Flusses zwischen Analytsäule und Massenspektrometer eingesetzt werden.

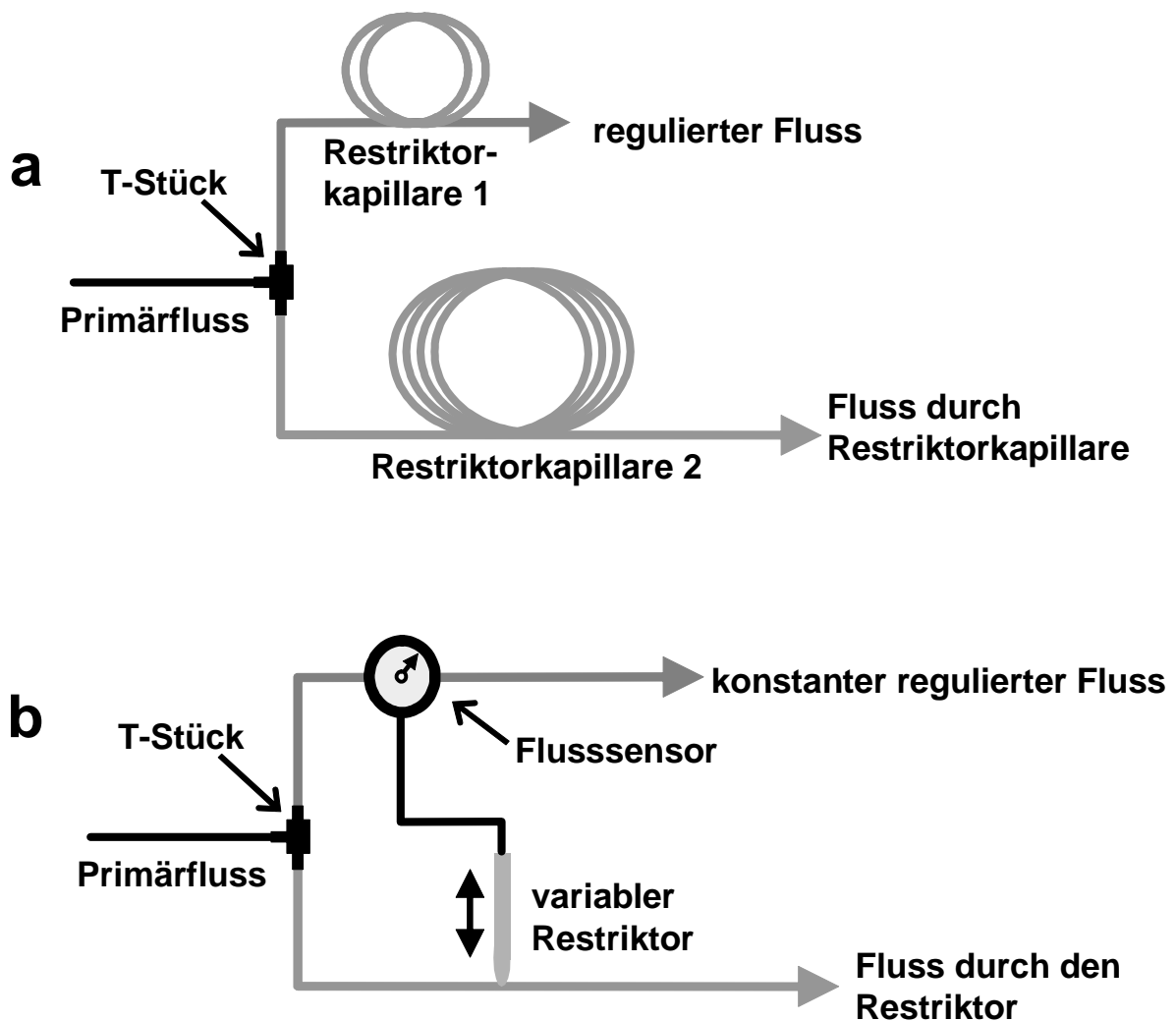


Abb. 3.7 Passives (a) und elektronisch reguliertes (b) Splitsystem.

Das passive Splitsystem (Abb. 3.7a) ist apparativ sehr einfach zu verwirklichen. Über ein T-Stück werden die Zuleitung des Primärflusses sowie die Restriktorkapillaren 1 und 2 miteinander verbunden. Über den Durchmesser und die Länge beider Restriktorkapillaren wird der Fluss durch die resultierenden Unterschiede des Druckabfalls beider Kapillaren im Verhältnis der beiden Kapillardimensionen geteilt. In Abb. 3.7a wird der Volumenfluss der Kapillare 1 über die Länge der Restriktorkapillare 2 eingestellt (Formel 16).

**Formel 16 Berechnung des Splitverhältnisses eines passiven Flussplits**

$$\frac{S_1}{S_2} = \left( \frac{r_1}{r_2} \right)^4 \cdot \frac{L_2}{L_1}$$

$S_1$ : Fluss über Restriktorkapillare 1

$S_2$ : Fluss über Restriktorkapillare 2

$r_1$ : innerer Radius der Restriktorkapillare 1

$r_2$ : innerer Radius der Restriktorkapillare 2

$L_1$ : Länge der der Restriktorkapillare 1

$L_2$ : Länge der der Restriktorkapillare 2

Ein Zuschneiden von Restriktorkapillaren ist bei einem elektronisch regulierten Splitsystem (Abb. 3.7b) nicht notwendig. Auch hier werden zwei Kapillaren mit der Primärflussskapillare über ein T-Stück verbunden. Der Unterschied besteht im variablen Restriktor, der den Gegendruck der Restriktorkapillare variieren kann. Dieser Gegendruck wird so eingestellt, dass der über den Flusssensor gemessene Säulenfluss konstant bleibt.

Neben diesen Dingen bleibt anzumerken, dass eine Verringerung des Säulenflusses auf MS-kompatible Dimensionen nur unter gleichzeitiger Miniaturisierung der Trennsäule ohne Trennleistungsverlust zu verwirklichen ist.

### **3.4. Strukturaufklärung niedermolekularer Verbindungen mittels exakter Massen**

Auch dieser Abschnitt soll die wichtigsten Fakten aus der weiterführenden Literatur [35, 36] für die Problemstellung diese Arbeit zusammenfassen.

Die Aminosäuresequenzen von Peptiden können mittels Fragmentierungen in der Ionenfallenmassenspektrometrie aufgeklärt werden. Die planare Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren wird durch gezielte Fragmentierung gebrochen.

Über die bestimmte Masse und Ladung der einzelnen Fragmente können diese eindeutig den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Durch gezielte Abspaltung kann die Aminosäuresequenz der Peptide bestimmt werden. Durch einen Abgleich mit Datenbanken können die identifizierten Peptiden auch den entsprechenden Proteinen zugeordnet werden. Hierin liegt ein großer Vorteil der biologischen Moleküle, da Proteine, abgesehen von einzelnen Seitenkettenmodifizierungen, nur aus 20 Aminosäuren bestehen. So ist die Anzahl möglicher Kombinationen zwar sehr groß, aber durch die Rückführung auf diesen begrenzten Baustein-Pool gut automatisierbar durch Computer lösbar.

Für die Identifizierung niedermolekularer organischer Verbindungen mit molaren Massen unter  $1000 \text{ g mol}^{-1}$  aus HPLC-MS-Experimenten stehen meist keine Datenbanken zur Verfügung. Zusätzlich sind die Moleküle variantenreicher aufgebaut, und die Bindungen innerhalb des Moleküls werden durch die Fragmentierung nicht so typisch gebrochen wie im Falle der Peptidbindung. Dadurch kann nicht eindeutig festgestellt werden, wo genau das Fragment im Molekül positioniert war. Isomere müssen vor der massenspektrometrischen Detektion chromatographisch getrennt werden, da sie sich nur in der Position eines Atoms oder einer funktionellen Gruppe unterscheiden und somit die gleiche Masse wie auch fast immer identische Fragmentierungsspektren aufweisen. So ist es mit Hilfe der Massenspektrometrie nur möglich, Strukturvorschläge zu unterbreiten, da die räumliche Anordnung bestimmter Strukturelemente, wie Atome oder funktionelle Gruppen im Molekül, mit dieser Methode nicht eindeutig bestimmt werden können. Mit einem Ionenfallenmassenspektrometer können zwar Fragmentierungsreaktionen untersucht werden, aber die gemessenen Massen sind nur 100 ppm genau.

Wie vorher schon erwähnt, können mit Hilfe der Flugzeitmassenspektrometrie Isotopenverteilungen der Analyten und exakte Massen bis zu 10 ppm genau ermittelt werden.

Die Isotopenverteilung der Analyten in den Massenspektren hängt vom der Molekülaufbau ab. Zum Beispiel ist die Anzahl der natürlich vorkommenden  $^{13}\text{C}$ -Isotope in einem Molekül entscheidend für die Signalhöhe des zweiten Isotopenpeaks. Atome, die keine natürlich vorkommenden Isotope besitzen, liefern auch keinen Beitrag zur Isotopenverteilung, sondern nur zum monoisotopischen Peak. Mit Hilfe der exakten Masse und der Isotopenverteilung kann die atomare Zusammensetzung des detektierten Moleküls, also die Summenformel, ermittelt werden. Dies wird heute durch

geeignete Software unterstützt. Mittels der Summenformel können aber noch keine eindeutigen Aussagen über die vorliegende Struktur getroffen werden. Wenn es sich im Falle der unbekanntem Analyten um Abbauprodukte oder Synthesenebenprodukte bekannter Substanzen handelt, kann die unbekannte Struktur aus bekannten Substanzen und denkbaren chemischen Reaktionen abgeleitet werden. Denkbare Abbauprodukte unterscheiden sich meist nicht sehr stark von den Hauptsubstanzen. In vielen Fällen treten Veränderungen in Seitenketten oder Abspaltungen bestimmter Molekülgruppen auf. Wenn die Struktur der Ausgangssubstanz bekannt ist, können durch Überlegungen Vorschläge für mögliche Molekülstrukturen unterbreitet werden. Von diesen Strukturvorschlägen wird die theoretische exakte Masse berechnet und mit der gemessenen Masse verglichen. Je kleiner die Differenz zwischen gemessener und theoretisch berechneter Masse ist, umso wahrscheinlicher ist die vorgeschlagene Struktur. Mit Hilfe von geeigneten Computerprogrammen kann die theoretische Isotopenverteilung einer vorgeschlagenen Substanz berechnet und mit dem gemessenen Isotopenmuster verglichen werden. Nichtsdestotrotz können auch hier keine eindeutigen Aussagen über Positionen bestimmter Gruppen oder Atomen im Molekül getroffen werden. In solchen Fällen ist es immer nötig die Strukturen durch deren Synthese und weitere strukturaufklärende Analysen (z.B. NMR-Spektroskopie) zu bestätigen.

Um Summenformeln aus Massenspektren abzuleiten, können einige Regeln hilfreich sein. Zunächst ist wichtig, dass für eine gemessene akkurate Masse nur eine endliche Anzahl an Elementkombinationen möglich ist. Je größer die Masse, umso mehr Kombinationsmöglichkeiten gibt es. Weiterhin kann die Stickstoffregel angewandt werden. Wenn die Molekülmasse gerade ist, weist das Molekül kein oder eine gerade Anzahl an Stickstoffatomen auf. Bei einer ungeraden Anzahl von Stickstoffatomen wird ungerade Molekülmasse gemessen. Die so genannte Doppelbindungsregel spiegelt den Grad der Ungesättigtheit einer organischen Verbindung wieder. Die Doppelbindungsäquivalente entsprechen der Anzahl an  $\pi$ -Bindungen bzw. Ringen innerhalb eines Moleküls und können aus der Summenformel berechnet werden. So kann allein aus der Bestimmung der exakten Masse und Isotopenverteilung eine Vielzahl an Informationsbausteinen abgeleitet werden, die schließlich zu einem Strukturvorschlag zusammengesetzt werden müssen. In Kapitel 3, das die Strukturidentifizierung erläutert, wird näher auf diese einzelnen Regeln eingegangen (Abschnitt 6.1, S. 128).

# Kapitel 2

---

## Entwicklung eines Anionenaustauschers auf Basis eines porösen Kieselgels

„Ich war niemals ein Teilchen in der Säule“

Prof. Dr. István Halász

## 1. Literaturüberblick

Im Rahmen dieses Kapitels soll ein Anionenaustauscher auf Basis von Polyethylenimin (PEI) auf porösem Kieselgel als stationäre Phase für die HPLC entwickelt werden. Polyethylenimin-Anionenaustauscher wurden bisher hauptsächlich für die Protein- und Oligonukleotid-Analytik eingesetzt. Daher lag in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Synthese eines auf Polyethylenimin basierenden Anionenaustauschers für die Analytik niedermolekularer Verbindungen.

Polyethylenimin ist ein Polymer mit einer hohen Dichte an basischen Aminofunktionen und kann daher auch je nach pH-Wert als Polykation bezeichnet werden. Industriell werden diese Polymere unter anderem in der Papier- und Zigarettenindustrie eingesetzt [37-40].

Über einen weiten pH-Bereich sind die vorliegenden Aminofunktionen des Polyethylenimins protoniert (Abb. 1.1). Daher wirkt es auch als schwacher Anionenaustauscher und ist als stationäre Phase in der Ionenaustauschchromatographie geeignet.

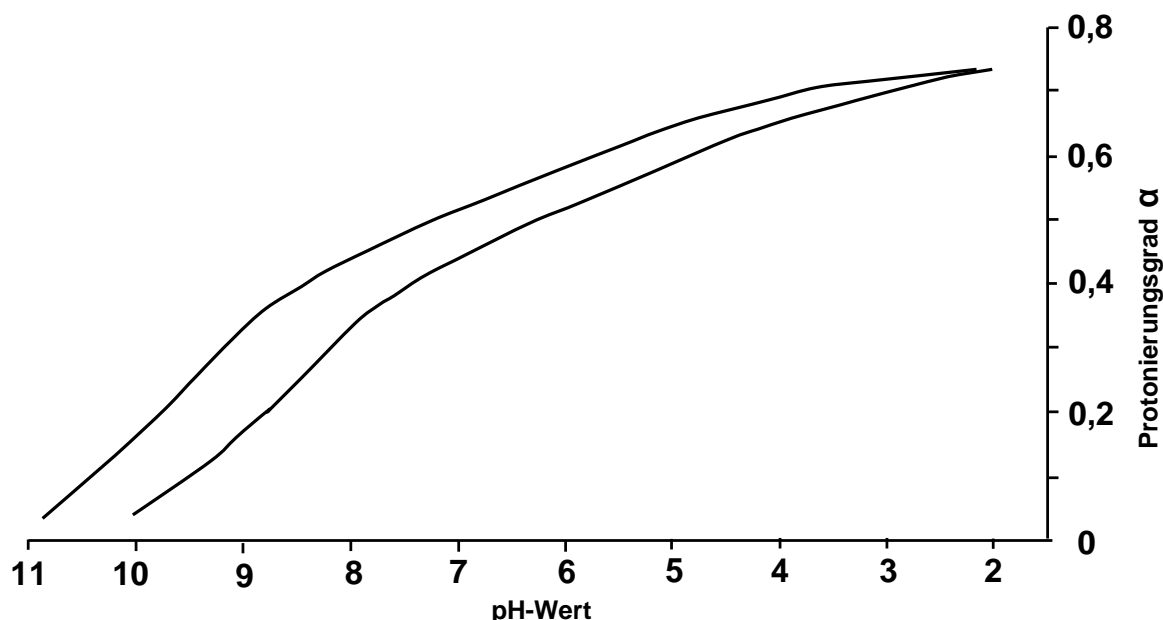


Abb. 1.1 Verlauf der pH-Werte während der Titration von freiem linearem Polyethylenimin [PEI]=0,421 eq/L; [NaCl]=1 mol/L. (untere Kurve) ohne Zusatz von Salz; (obere Kurve) mit Zusatz von Salz [Steffen Traser, Dissertation TU Darmstadt, 2005]

In dieser Arbeit wurde ein Anionenaustauscher durch Ummanteln (engl. Coaten) von porösen Kieselgelteilchen mit Polyethylenimin synthetisiert. Zur Stabilisation des Coatings werden die Polymere an der Kieselgeloberfläche mit einem bifunktionellen



Epoxid (hier: Ethandioldiglycidylether, EDGE) quervernetzt. Diese Entwicklung eines Polyethylenimin-Anionenaustauschers ist seit längerem bekannt. Erste Arbeiten mit Polyethylenimin-Cellulose als stationäre Phase in der Dünnschichtchromatographie wurden bereits 1964 von Randerath [41, 42] veröffentlicht. Alpert und Regnier [1] entwickelten 1979 eine Synthese, die apparativ sehr simpel gehalten wurde. Polyethylenimin als stationäre Phase wurde von ihnen für Protein-Trennungen in der HPLC eingesetzt. Die einfache Handhabbarkeit ermöglichte die Variation zahlreicher Einflussgrößen. Unter anderem wurde der Einfluss auf das Retentionsverhalten und die Kapazität verschiedener Teilchendurchmesser, Porengrößen, Polymerkettenlängen und Quervernetzern untersucht [43]. Regnier et al. [44, 45] zeigten, dass Polyethylenimin-Phasen auch für die Oligonukleotidanalytik geeignet sind. In einer späteren Arbeit [46] wurden Versuche zur Epoxidderivatisierung des quervernetzten Polyethylenimins durchgeführt. Jilge et al. [47] konnten die Synthese auf unporöse 2,1 µm-Kieselgele übertragen. Durch eine Quarternisierung der Aminofunktionen war es möglich, Proteine, wie auch Nukleotide erfolgreich zu trennen. 1987 übertrugen Rounds, Rounds und Regnier diese Coating-Methode auf Polystyrol-Divinylbenzol-Teilchen [48], welches vor der Adsorption von Polyethylenimin sulfoniert wurde. McNeff, Zhao und Carr [49] brachten Polyethylenimin auf Zirkoniumdioxid mit der Adsorptionsmethode von Alpert und Regnier und einer Evaporationsmethode auf. Es konnte von Ihnen gezeigt werden, dass sich die auf Zirkoniumdioxid synthetisierten Phasen auch für kleine Moleküle wie Nitrit, Nitrat und Benzoessäurederivate eignen [49, 50]. 1983 wurden von Lawson et al. [51] bereits mit Kieselgel gepackte Säulen „in situ“ mit Polyethylenimin gecoatet und danach quervernetzt. Dieses Verfahren konnte erfolgreich umgesetzt werden, wurde aber von den Autoren als sehr kostenintensiv eingestuft. Polyethylenimin wird unter anderem auch in der Chromatographie mit überkritischen Fluiden [52] wie auch in der Dünnschichtchromatographie [53] eingesetzt.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1. Geräte und Instrumente

Die einzelnen HPLC-Trennungen wurden zum einem auf zwei isokratischen, einem Niederdruck- und einem Hochdruckgradientensystem realisiert.

Es wurde ein binäres Hochdruckgradientensystem HP1100 von Agilent, bestehend aus einer Pumpe G1312A, einem Entgaser G1322A, einem Festwellenlängendetektor G1314A mit Semi-Micro-Cell (5  $\mu$ L Zellvolumen) und einem Autosampler G1313A bzw. einem manuellen Injektionsventil 7125 von Rheodyne verwendet. Als Steuerungssoftware und zur Datenauswertung wurde Chromeleon™ der Version 6.70 eingesetzt. Als Niederdruckgradientensystem wurde eine Alliance 2695 der Firma Waters mit einem Diodenarray-Detektor DAD 996 verwendet. Als Steuerungssoftware und zur Datenauswertung wurde Empower™ 2 genutzt.

Bei beiden eingesetzten isokratischen Systemen handelt es sich um Bischoff 2200-Pumpen. Die Datenaufzeichnung mit einem Detektor der Firma Knauer und einer 140 nL-Zelle sind mit der Software HP Chemstation Rev. A. 05.02 [273] von Agilent über einen AD-Wandler HP Interface 35900E aufgezeichnet worden. Für die Messung der Durchbruchkurven wurden ein manuelles Umschaltventil Niederdruck-6-Wege-5012 und ein Injektionsventil 7125 von Rheodyne verwendet. Für die Packungscharakterisierung und Normalphasenchromatographie wurde ein Injektionsventil 7125 von Rheodyne eingesetzt. Die Datenauswertung wurde mit Chemstation Version Rev. A. 05.02 durchgeführt.

Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter WTW, Microprocessor pH Meter / pH 537 überprüft.

Für die Synthesen wurde ein Flaschenschüttler KS 130 basic, IKA eingesetzt. Die HPLC-Säulen wurden mit einer Wellchrom Pneumatic Pump K-1900 von Knauer und einer Air driven fluid pump der Firma Haskel gepackt.

## 2.2. Verwendete Chemikalien

Verwendetes Methanol (gradient grade) und Isopropanol (gradient grade) waren von VWR™ Prolabo, Acetonitril (gradient grade) und n-Hexan (gradient grade) von Sigma-Aldrich. Bei Fluka wurden Natriumdihydrogenphosphat (p.a.), Natriumnitrat (p.a.), Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) (purum 99 %), und Ethylenglycoldiglycidylether (EDGE) (techn., ~50 % (GC)) bestellt. Salzsäure (37 %-ig) wurde bei Fisher Scientific bestellt, Ameisensäure 98-99 % und Essigsäure Suprapur® 100 % bei Merck. Von Grüsing waren Natriumhydroxid (p.a.) und Natriumchlorid 99,5 %. Polyethylenimin 99 % (PEI-6,  $M = 600 \text{ g mol}^{-1}$ ) wurde bei Polyscience Inc. bestellt. Ethylacetat (Analyzed® Reagent) wurde bei Baker und Tetrachlorkohlenstoff (puriss p.a.) bei Riedel-de Haën bestellt. Entionisiertes Wasser wurde einer Reinst-Wasseranlage der Firma Elga, Model Pure Lab Genetic Ultra entnommen.

## 2.3. verwendete Säulenhardware und Kieselgel-Trägermaterial

Alle verwendeten Trägermaterialien waren ProntoSIL-Kieselgele von Bischoff Analystechnik und -geräte GmbH. Die Synthesestrategien wurden auf ProntoSIL-5  $\mu\text{m}$ -120 Å, Batch: 00/B0 302, ausgearbeitet. Die dafür verwendete Säulendimension war 125 x 2,0 mm i.D. Das Upscaling wurde auf ProntoSIL-5  $\mu\text{m}$ -120 Å, Batch: 1532, in Säulendimensionen von 125 x 2,0 mm i.D. bzw. 100 x 2,0 mm i.D. durchgeführt. Der Einfluss unterschiedlicher Porengrößen wurde auf ProntoSIL-10  $\mu\text{m}$ -120 Å, Batch: 1247, und ProntoSIL-10  $\mu\text{m}$ -100 Å, Batch: 1457, mit Säulen der Dimension von 50 x 2,0 mm i.D. untersucht. Die Applikationen wurden auf Säulen der Dimension 150 x 4,6 mm i.D. entwickelt.

## 2.4. Phasensynthese

Die entsprechende Menge an Polyethylenimin (99 %) wurde eingewogen und in Methanol gelöst (10, 20, 30 % (w/v)). Diese Lösung wurde dem Kieselgel zugegeben (3 g Kieselgel auf 50 mL methanolischer Polymerlösung) und für 30 min mit einem Flaschenschüttler bei Raumtemperatur durchmischt. Danach wurde ohne das Kieselgel zu waschen die überschüssige methanolische Polymerlösung über eine Nutsche (Schott, Duran, Porengröße 4) abgesaugt. Dem feuchten Polyethylenimin-Kieselgel wurde eine 5 %-ige bzw. 15 %-ige methanolische Ethylenglycoldiglycidylether-Lösung

zugegeben (für 3 g Kieselgel 50 mL methanolische Epoxidlösung). Hierbei ist zu beachten, dass Ethylenglycoldiglycidylether vom Hersteller in 50 %-iger-Lösung geliefert wurde. Laut Angabe des Herstellers bestehen die anderen 50 % aus Lösungsmittel, zu dem aber keine näheren Angaben gemacht wurden. Die Volumenangaben des Quervernetzers in dieser Arbeit entsprechen der vollständig eingesetzten EDGE-Lösung, die in Methanol gelöst wurde, und nicht dem reinen EDGE-Anteil der Lösung. Nach der vollständigen Suspension des Kieselgels wurde der Ansatz auf einem Flaschenschüttler bei Raumtemperatur für 16 h inkubiert. Die Quervernetzung des Polyethylenimins mit dem Epoxid ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt.

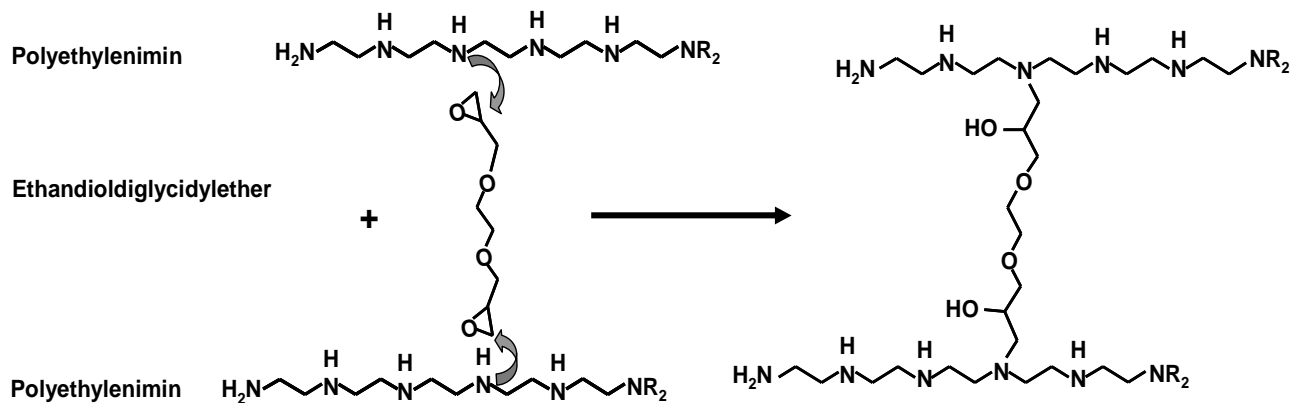


Abb. 2.1 Syntheschema der Quervernetzung von Polyethylenimin mit Ethandioldiglycidylether.

### 2.4.1. CHN-Analyse

Zur Überprüfung der Synthese und Charakterisierung der einzelnen Synthesestrategien wurde die CHN-Analyse (Elementar vario EL) genutzt. Man erhält durch Verbrennen der einzelnen Proben deren prozentualen Anteil von Kohlenstoff (%C), Stickstoff (%N) und Wasserstoff (%H). Die Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalte der stationären Phasen können genutzt werden, um die Bedeckungsgrade in  $\mu\text{mol m}^{-2}$  stationärer Phase zu berechnen. Der Ionenaustausch findet im Falle der hier synthetisierten Phasen an den Aminogruppen des Polyethylenimins statt. Daher kann mit Hilfe der CHN-Analyse aus den Stickstoff-Gehalten die theoretische Austauschkapazität bestimmt werden (Formel 17). Der durchschnittliche Bedeckungsgrad für den Gesamtkohlenstoffgehalt wurde äquivalent bestimmt (Formel 18). Der Quervernetzer-Anteil der einzelnen Phasen kann über mehrere Schritte bestimmt werden (Abschnitt 2.4.2).

**Formel 17 Berechnung des Stickstoff-Bedeckungsgrades (BG) mittels N% der CHN-Analyse**

$$BG_N = \frac{\%N * 10^6}{14 * n * O_{sp} \left( 100 - \frac{\%N * M}{14 * n} \right)} = [\mu\text{mol m}^{-2}]$$

**Formel 18 Berechnung des Kohlenstoff-Bedeckungsgrades (BG) mittels C% der CHN-Analyse**

$$BG_C = \frac{\%C * 10^6}{12 * n * O_{sp} \left( 100 - \frac{\%C * M}{12 * n} \right)} = [\mu\text{mol m}^{-2}]$$

- O<sub>sp</sub> spezifische Oberfläche des Kieselgels [m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>]  
 M molare Masse des gebundenen Moleküls bzw. Atoms, hier 14,0067 g mol<sup>-1</sup> für Stickstoff und 12,0107 g mol<sup>-1</sup> für Kohlenstoff  
 %N mit CHN-Analyse ermittelter elementarer Stickstoff  
 %C mit CHN-Analyse ermittelter elementarer Kohlenstoff  
 n Anzahl der aufgebundenen N- bzw. C-Atome, hier 1

#### 2.4.2. Berechnung des PEI- und EDGE-Bedeckungsgrades der stationären Phasen

Über den Stickstoff-Gehalt der CHN-Analyse wird der mittlere PEI-Gehalt berechnet. Da wegen der Molmassenverteilung von PEI nicht die genaue Summenformel der Polyethylenimin-Polymere angegeben werden kann, wird in diesem Fall die mittlere Summenformel H<sub>2</sub>N-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N)<sub>n</sub>-H (Angabe des Herstellers) genutzt (Formel 19).

**Formel 19 Berechnung des PEI-Bedeckungsgrades (BG) mittels N% der CHN-Analyse**

$$BG_{PEI} = \frac{\%N * 10^6}{14 * n * O_{sp} \left( 100 - \frac{\%N * M}{14 * n} \right)} = [\mu\text{mol m}^{-2}]$$

- O<sub>sp</sub> spezifische Oberfläche des Kieselgels [m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>]  
 M molare Masse des gebundenen Moleküls, hier 600 g mol<sup>-1</sup>  
 %N mit CHN-Analyse ermittelter elementarer Stickstoff  
 n Anzahl der aufgebundenen N-Atome, hier 14,6

Über den Bedeckungsgrad für PEI kann nun durch Umstellen der Formel 19 der Kohlenstoff-Anteil des PEIs am Gesamt-Kohlenstoff-Anteil der CHN-Analyse berechnet werden (Formel 20).

**Formel 20 Berechnung des Anteils von PEI am Gesamt-Kohlenstoff-Gehalt der CHN-Analyse**

$$C\%_{PEI} = \frac{BG_{PEI} \cdot 12n \cdot Osp \cdot 100}{10^6 + BG_{PEI} \cdot M \cdot Osp}$$

$BG_{PEI}$  berechneter Bedeckungsgrad für Polyethylenimin (Formel 19) [ $\mu\text{mol m}^{-2}$ ]

$Osp$  spezifische Oberfläche des Kieselgels [ $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ]

$M$  Molare Masse des aufgebundenen Moleküls; hier PEI mit  $600 \text{ g mol}^{-1}$

$n$  Anzahl der aufgebundenen C-Atome eines Moleküls, hier 27,1

$C\%$  Kohlenstoffanteil der CHN-Analyse, der von PEI beigetragen wird

Der durch die CHN-Analyse ermittelte gesamte Kohlenstoffgehalt der Phase setzt sich aus dem Kohlenstoff des PEI und des EDGEs zusammen. Aus der Differenz des gesamten C%-Gehalts und des mit Formel 20 ermittelten  $C\%_{PEI}$  erhält man den prozentualen Anteil des Quervernetzlers EDGE am Gesamtkohlenstoff. Mit diesem  $\Delta C\%$  kann durch Einsetzen in Formel 18 der Bedeckungsgrad des Quervernetzlers bestimmt werden (Formel 21).

**Formel 21 Berechnung des Bedeckungsgrades des Quervernetzlers EDGE**

$$BG_{EDGE} = \frac{\% \Delta C * 10^6}{12n * Osp \left( 100 - \frac{\% \Delta C * M}{12n} \right)}$$

$BG_{EDGE}$  Bedeckungsgrad für Kohlenstoff [ $\mu\text{mol m}^{-2}$ ]

$Osp$  spezifische Oberfläche des Kieselgels [ $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ]

$M$  Molare Masse des aufgebundenen Moleküls; hier EDGE  $174,20 \text{ g mol}^{-1}$

$n$  Anzahl der aufgebundenen C-Atome eines Moleküls, hier 8

**2.5. Packung**

Alle Säulen wurden aus einer Suspension von 20 bis 30 % stationärer Phase in Tetrachlorkohlenstoff (w/v) heraus gepackt [54]. Wenn nötig wurde auch ein Isopropanol/Tetrachlorkohlenstoff-Gemisch als Suspensionsmittel verwendet. Der Packungsdruck lag je nach Partikelgröße des Trägermaterials zwischen 400 und 750 bar. Als Pushing Solvent wurde Methanol verwendet.

## 2.6. Probenvorbereitung

Für Trennungen im Normalphasenmodus wurde ein Gemisch aus Toluol und Dimethylphenolisomeren genutzt. Es wurden jeweils 100 ppm Toluol (destilliert, chemisch reinst), 2,6-, 2,4-, 2,5- und 3,5-Dimethylphenol (p.a., Sigma-Aldrich) in n-Hexan + 10 % Ethylacetat gelöst. Diese Stammlösung wurde vor der Injektion immer 1:10 mit dem Eluenten verdünnt.

Die kleinen Anionen Nitrit, Nitrat und Iodid (p.a., Fluka) wurden als Natriumsalze eingesetzt. Für eine Stammlösung wurden 1000 ppm des jeweiligen Salzes in Wasser gelöst. Vor der Injektion wurden Nitrit und Nitrat auf jeweils 25 ppm und Iodid auf 100 ppm mit Wasser verdünnt. Das Anionengemisch wurde aus den Stammlösungen wie die Einzelproben angesetzt. Weiterhin wurden 1000 ppm der 2-Amino-6-naphthalensulfonsäure (p.a., Fluka) in Wasser gelöst und vor der Injektion 1:100 mit Wasser verdünnt. Jeweils 2000 ppm von 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin, 3,5,3'-Triiodothyroessigsäure (Peptido GmbH) und 3,5-Diiodothyropropionsäure (p.a., Sigma-Aldrich) wurden in Extraction Solution (200 mg NaOH in 250 mL Wasser + 250 mL Methanol) gelöst und vor der Injektion 1: 100 mit Wasser verdünnt.

Für das Standardgemisch der Schilddrüsenhormone wurden jeweils 300 bis 500 ppm 3,3'-Diiodo-L-Thyronin, 3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin, 3,5,3'-Triiodothyropropionsäure (Sigma-Aldrich), 3,5-Diiodo-L-Thyronin, 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin, 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin, 3,5-Diiodothyroessigsäure, 3,5,3'-Triiodothyroessigsäure, 3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure und 3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure (Peptido GmbH) in Extraction Solution (200 mg NaOH in 250 mL Wasser + 250 mL Methanol) gelöst und vor der Injektion 1:10 mit Wasser verdünnt.

In Wasser mit 2 % Methanol wurden jeweils 1000 ppm Vanillinsäure (p.a., Acros Organics), 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure (puriss., Sigma-Aldrich), Ferulasäure, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben (p. purum, Fluka), Benzoesäure, 3,5-Dinitrobenzoesäure, Acetylsalicylsäure (p.a., Merck), 4-Hydroxybenzaldehyd (p.a., Merck) und 3-Iodo-L-Tyrosin, 3,5-Diiodo-L-Tyrosin (p.a., Sigma-Aldrich) gelöst. Vor der Injektion wurden für Injektionen der Einzelsubstanzen und des Probengemisches die Stammlösungen mit Wasser wie folgt verdünnt: 20 ppm Dinitrobenzoesäure, 25 ppm Hydroxybenzoesäure und Methylparaben, 35 ppm Ethylparaben, 50 ppm Salicylsäure, Acetylsalicylsäure, Vanillinsäure, Benzoesäure,

3-Iodo-L-Tyrosin und 3,5-Diiodo-L-Tyrosin, 60 ppm Propylparaben sowie 100 ppm Dihydroxybenzoesäure und Ferulasäure.

## 2.7. Bezugsnachweis

Nachfolgend sind die Firmensitze der Hersteller der verwendeten Geräte und Chemikalien aufgelistet.

**Tab. 2.1 Auflistung der Firmensitze verwendeter Chemikalien- und Gerätehersteller.**

Acros Organics	Heidelberg	Deutschland
Agilent Technologies	Waldbronn	Deutschland
Bischoff Analystechnik und -geräte	Leonberg	Deutschland
Fisher Scientific	Schwerte	Deutschland
Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	Deisenhofen	Deutschland
Grüsing GmbH	Filsum	Deutschland
Haskel Int.	Burbank, CA	USA
Knauer	Berlin	Deutschland
Mallinckrodt Baker B. V.	Deventer	Holland
Merck KgaA	Darmstadt	Deutschland
Peptido GmbH	Bexbach	Deutschland
Polysciences, Inc.	Eppelheim	Deutschland
Rheodyne	Californien, CA	USA
Riedel de Haën (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	Deisenhofen	Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deisenhofen	Deutschland
VWR™, Prolabo	Darmstadt	Deutschland
Waters	Eschborn	Deutschland

## 2.8. HPLC-Methoden zur Charakterisierung der Packungsqualität

Zur Packungscharakterisierung im Anionenaustauschmodus wurden zwei verschiedene Puffersysteme verwendet. Auf einem HP1100-System mit manuellem Injektionsventil und einer 5 µL-Probenschleife wurde unter isokratischen Bedingungen bei einem Fluss von 250 µL min<sup>-1</sup> ein Anionengemisch aus Nitrit, Nitrat und Iodid getrennt. Eluent war 5 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,0 + 10 % Acetonitril (v/v), wobei der pH-Wert des Phosphatpuffers mit Natronlauge eingestellt wurde. Detektiert wurde bei 215 nm.



Auf dem Alliance-System wurde die Packungscharakterisierung des 10  $\mu\text{m}$ -Trägermaterials und des Masterbatches mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % Acetonitril (v/v) bei einem Fluss von 250  $\mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Detektiert wurde bei 215 nm.

## **2.9. Normalphasenchromatographie**

Für die Normalphasenchromatographie wurde eine isokratische Pumpe von Bischoff Modell 2200 mit manuellem Injektionsventil und einer 5  $\mu\text{L}$ -Probenschleife verwendet. Die UV-Detektion erfolgte mittels eines Knauer-Detektors mit einer 140 nL-Zelle. Zur Datenübertragung diente ein AD-Wandler HP (Interface) 35900E.

Ein Gemisch aus Toluol und 2,6-, 2,4-, 2,5- und 3,5-Dimethylphenol wurde unter isokratischen Bedingungen mit 10 % Ethylacetat in n-Hexan (v/v) + 500 ppm Wasser bei einem Fluss von 250  $\mu\text{L min}^{-1}$  getrennt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm.

## **2.10. HPLC-Methoden zur Bestimmung der van-Deemter-Parameter**

Alle Messungen wurden auf dem Alliance-System durchgeführt. Die Abhängigkeit der Bodenhöhe von der Lineargeschwindigkeit wurde für das 10  $\mu\text{m}$ -Trägermaterial bei Flüssen von 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 900, 1000 und 1200  $\mu\text{L min}^{-1}$  untersucht. Die Bestimmung der van-Deemter-Parameter für den Masterbatch erfolgte bei Flüssen im Bereich von 100 bis 1200  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Die kleinen Anionen Nitrit, Nitrat und Iodid wurden mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % Acetonitril (v/v) getrennt. Für die Trennung der höhermolekularen Anionen 2-Amino-6-Naphthalensulfonsäure, Thyroxin und Triiodothyroessigsäure wurde der Acetonitrilgehalt auf 50 % erhöht. Alle Ionen wurden bei 215 nm detektiert. Die generierten Daten wurden mit Origin 6.0 (Originlabs) gefittet, um die van-Deemter-Parameter zu bestimmen.

## **2.11. HPLC-Methode zur Bestimmung der chromatographischen Kapazität**

Die chromatographische Kapazität bzw. Beladungskapazität kann mit Durchbruchmessungen, auch Frontanalyse genannt, bestimmt werden [55, 56]. Zum Äquilibrieren und Beladen der Ionenaustauschgruppen der stationären Phase wurde die Säule mit 1 M Natriumchloridlösung gespült. Danach wurde die Säule mit Wasser gespült, um überschüssiges Salz zu entfernen. Die Aufnahme der Durchbruchkurve erfolgte mit einer 5 mM bzw. 10 mM Natriumnitrat-Lösung bei 230 nm bei einem Fluss

von 250 oder 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Um den Fluss genau zu bestimmen, wurde während der Aufnahme der Durchbruchskurve die benötigte Zeit für ein definiertes Volumen gestoppt und daraus der Fluss berechnet. Um das Spülen mit verschiedenen Eluenten zu erleichtern, wurde ein manuelles Niederdruck-6-Wege-Umschaltventil (5012, Rheodyne) der isokratischen Bischoff 2200-Pumpe vorgeschaltet (apparativer Aufbau siehe Abb. 2.2).

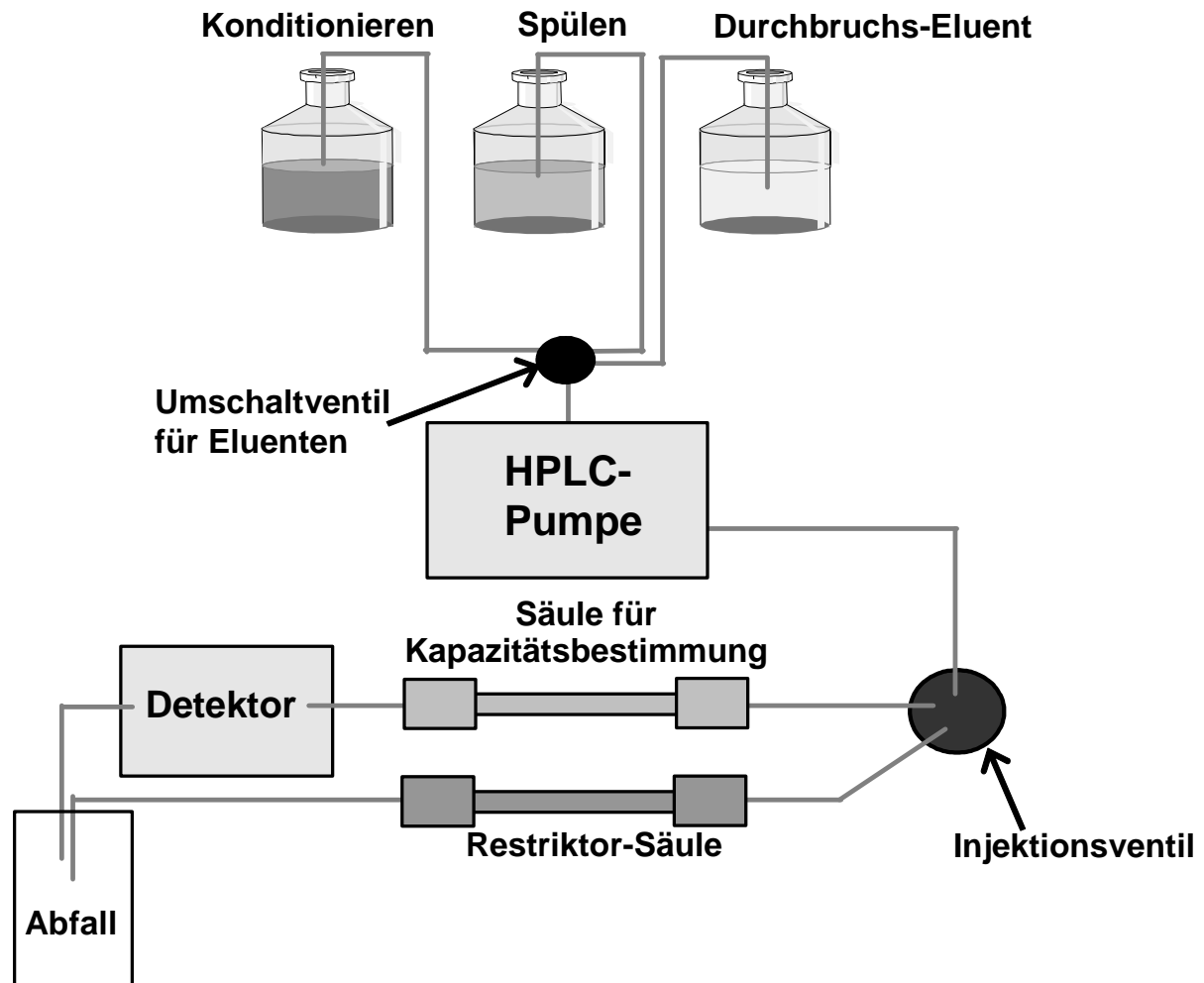


Abb. 2.2 Schematischer Aufbau der Apparatur für die Durchbruchmessungen.

Die Probenschleife des manuellen Injektionsventils 7125 (Rheodyne) wurde entfernt und die Analysensäule auf Position 1 geschaltet. Eine so genannte Restriktorsäule befand sich auf Position 3, wobei der Zugang der Pumpe auf Position 2 erfolgte (Abb. 2.3). Die Restriktorsäule ist notwendig, um einen konstanten Druckabfall beim Umschalten des Ventils zu gewährleisten. So war es möglich, in der „Load“-Position des Ventils das gesamte Kapillarvolumen mit der Probenlösung über die Restriktorsäule zu spülen. Durch Umschalten in die „Inject“-Position wurde die Probenlösung über die Testsäule

geleitet und die Durchbruchskurve aufgenommen. Die UV-Detektion erfolgte bei 230 nm.

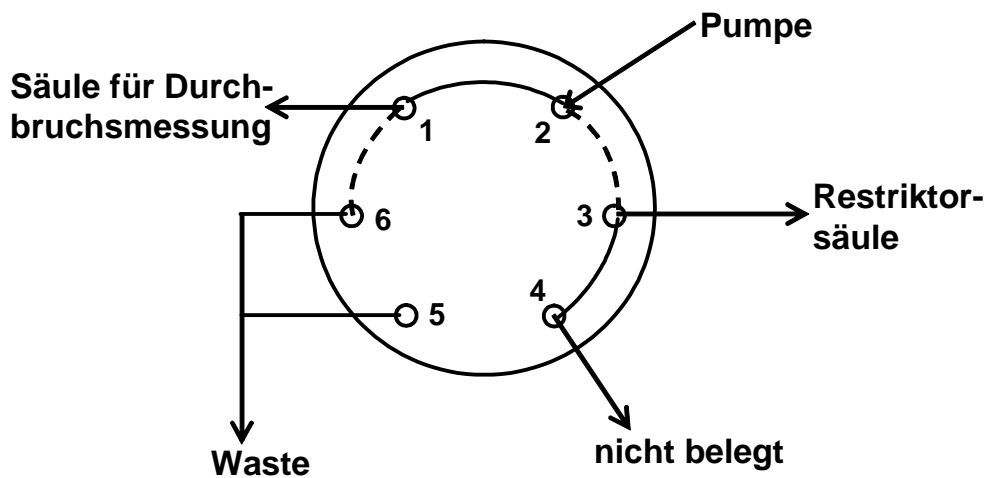


Abb. 2.3 Belegung des Injektionsventils 7125 (Rheodyne) für die Durchbruchmessungen.

## 2.12. HPLC-Methoden für Stabilitätstests

### 2.12.1. Stabilitätstest mit Phosphatpuffer bei pH 7,0

Auf dem Alliance-System wurden zwei Säulen eines Syntheseansatzes mit 10 % Polyethylenimin (w/v) und 5 % Ethandiolglycidylether (v/v) in Methanol auf chemische Phasenstabilität hin getestet. Dabei wurden die Säulen immer für 4 h mit 50 % Acetonitril (v/v) in 5 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,0 mit einem Fluss von  $250 \mu\text{L min}^{-1}$  gespült. Danach wurde nach einem Äquilibrationsschritt von 30 min ein Gemisch aus Nitrit, Nitrat, und Iodid injiziert, wobei der Acetonitrilgehalt des Eluenten auf 10 % reduziert wurde. Die Detektion erfolgte bei 210 nm.

### 2.12.2. Stabilitätstest mit TRIS/HCl bei pH 7,0

Die Phasenstabilität des Masterbatches 2 wurde auf dem HP1100-System mit manuellem Injektionsventil und  $5 \mu\text{L}$  Probenschleife durchgeführt. Bei einem Fluss von  $250 \mu\text{L min}^{-1}$  wurden 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 50 % Acetonitril (v/v) kontinuierlich durchgepumpt. Es wurden über den gesamten Zeitraum hinweg in unterschiedlichen zeitlichen Abständen jeweils 2-Amino-6-naphthalensulfonsäure und ein Gemisch aus Nitrit und Iodid injiziert und bei 215 nm detektiert.

### 2.12.3. Stabilitätstest mit Essigsäure

Mit jeweils einer Säule des Masterbatches 1 bzw. 2 wurde die Phasenstabilität mit Essigsäure an der HP1100-Anlage mit manuellem Injektionsventil und 5  $\mu\text{L}$ -Probenschleife untersucht. Als Eluent wurde in beiden Fällen Wasser/Acetonitril (60/40) mit 0,10 % Essigsäure (v/v/v) als Additiv verwendet. In unterschiedlichen zeitlichen Abständen wurde ein Gemisch aus 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin (T4, Thyroxin) und 3,5-Diiodothyropropionsäure (DiProp) injiziert und bei 225 nm detektiert. Während des ganzen Zeitraumes betrug der Fluss immer  $250 \mu\text{L min}^{-1}$ .

### 2.13. HPLC-Methoden für Applikationen

Ein Gemisch aus 13 Benzoessäurederivaten (20 ppm Dinitrobenzoessäure, je 25 ppm Hydroxybenzoessäure und Methylparaben, 35 ppm Ethylparaben, je 50 ppm Salicylsäure, Acetylsalicylsäure, Vanillinsäure, Benzoessäure, 3-Iodo-L-Tyrosin und 3,5-Diiodo-L-Tyrosin, 60 ppm Propylparaben sowie 100 ppm Dihydroxybenzoessäure und Ferulasäure) wurde unter Ionenaustauschbedingungen getrennt. Die Trennung konnte auf dem Alliance-System mit einem Salzgradienten (Tab. 2.2) von 0 bis 150 mM Natriumchlorid in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 realisiert werden. Auf einer 150 x 4,6 mm i.D. Säule des Masterbatches 1 und 2 wurden die Substanzen bei einem Fluss von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von 240 nm detektiert.

Tab. 2.2 Verwendeter Salzgradient zur Analyse der Benzoessäurederivate.

Zeit [min]	Konzentration NaCl in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0	Fluss
0,0	0 mM	$1 \text{ mL min}^{-1}$
0,5	0 mM	$1 \text{ mL min}^{-1}$
32,0	150 mM	$1 \text{ mL min}^{-1}$
35,0	150 mM	$1 \text{ mL min}^{-1}$
35,1	0 mM	$1 \text{ mL min}^{-1}$
37,0	0 mM	$1 \text{ mL min}^{-1}$

Das Standardgemisch der Schilddrüsenhormone wurde auf einer Säule des Masterbatches 2 mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten getrennt. Den Eluenten A (Wasser) und B (Acetonitril) wurden jeweils 0,1 % Ameisensäure zugegeben. Vor dem 20 min-Gradienten von 5 % bis 60 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % Ameisensäure erfolgte die Trennung für 5 min isokratisch mit 5 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % Ameisensäure. Die Detektion der Substanzen erfolgte bei 225 nm.

### **3. Synthesestrategien auf 5 µm-120Å-Trägermaterial**

Die ersten Synthesen eines Polyethylenimin-Anionenaustauschers auf Kieselgel wurden 1979 von Alpert und Regnier [1] durchgeführt. Jilge et al. [47] modifizierten die Synthese für unporöse 2,1 µm-Silica-Teilchen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Phasensynthesen orientieren sich an der Arbeit von Jilge et al. und wurden für die verwendeten porösen 5 µm-Silica-Teilchen angepasst und modifiziert.

Die Polyethyleniminpolymere (PEI) adsorbieren auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen an der Kieselgeloberfläche, die wegen der Silanolgruppen anionische Eigenschaften aufweist. Es stellt sich nach bestimmter Zeit ein Gleichgewicht zwischen den an der Kieselgeloberfläche adsorbierten und den sich in Lösung befindenden Polymeren ein. Dieses Gleichgewicht hängt stark von der Konzentration der methanolischen Polymerlösung ab. Weiterhin lagern sich auf Grund des Gleichgewichts nur eine begrenzte Anzahl der Polymere an der Oberfläche an. Während dieses Prozesses wird die methanolische Polymerlösung durch Absaugen vom Kieselgel entfernt. Die elektrostatisch „gebundenen“ Polymere bleiben an der Kieselgeloberfläche haften. Alpert und Regnier zeigten [1], dass sich durch mehrere Waschschriffe mit Methanol Polymerschichten bis hin zu einer Monoschicht abwaschen lassen. Daher wird dem PEI-Kieselgel ein Epoxid zugegeben, in dieser Arbeit Ethandioldiglycidylether (EDGE), was durch die Epoxid-Gruppen die Polyethylenimin-Polymere miteinander quervernetzt und somit einen stabilen Polymerfilm um die einzelnen Kieselgelteilchen bildet.

In dieser Arbeit wurde nun versucht, diese Synthese anzupassen, um kleine Anionen bzw. niedermolekulare Substanzen mittels des Polyethylenimin-Anionenaustauschers aufzutrennen.

#### **3.1. Synthesestrategien**

Der Anionenaustausch findet an den sekundären Aminogruppen des Polyethylenimins (PEI) statt. Daher hängt die chromatographisch zugängliche Austauschkapazität stark vom PEI-Anteil der stationären Phase ab. Um eine möglichst hohe Kapazität zu erreichen, wurde der PEI-Anteil in den einzelnen Synthesen zwischen 10 %, 20 % und 30 % PEI (w/v) in methanolischer Lösung variiert. Dabei betrug der Anteil des aus 50 %-iger Lösung eingesetzten Quervernetzers Ethandioldiglycidylether (EDGE) 5 Vol%

in methanolischer Lösung. Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung des Quervernetzer-Anteils eine Erhöhung der Kapazität zur Folge hat, wurden auch je ein Ansatz mit 30 % PEI in methanolischer Lösung und 15 Vol% EDGE untersucht. Mit Hilfe der CHN-Verbrennungsanalyse können die einzelnen Synthesen miteinander verglichen werden (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1 Ergebnisse der CHN-Analyse und daraus berechnete Bedeckungsgrade für Stickstoff (N), Kohlenstoff (C), Polyethylenimin (PEI) und dem Quervernetzer EDGE der verschiedenen Synthesestrategien.**

<b>PEI-Anteil in der Synthese (w/v)</b>	<b>10 %</b>	<b>10 %</b>	<b>20 %</b>	<b>30 %</b>	<b>30 %</b>	<b>30 %</b>
<b>EDGE-Anteil in der Synthese (v/v) **</b>	<b>5 %</b>	<b>5 %</b>	<b>5 %</b>	<b>5 %</b>	<b>5 %</b>	<b>15 %</b>
<b>C/N</b>	3,96	4,21	3,70	3,44	3,42	4,89
<b>%C</b>	8,26	8,95	9,09	9,28	9,02	12,86
<b>%N</b>	2,09	2,13	2,46	2,70	2,64	2,63
<b>Bedeckungsgrad N [µmol m<sup>-2</sup>] <sup>(a)</sup></b>	5,07	5,18	6,00	6,60	6,46	6,43
<b>Bedeckungsgrad C [µmol m<sup>-2</sup>] <sup>(a)</sup></b>	25,00	27,32	27,77	28,42	27,53	41,00
<b>Bedeckungsgrad PEI [µmol m<sup>-2</sup>] <sup>(b)</sup></b>	0,36	0,37	0,43	0,48	0,47	0,47
<b>Bedeckungsgrad EDGE [µmol m<sup>-2</sup>] <sup>(b)</sup></b>	1,88	2,15	1,98	1,90	1,82	3,57

<sup>(a)</sup> Berechnung siehe Abschnitt 2.4.1

<sup>(b)</sup> ausgehend von der mittleren Molekularformel H<sub>2</sub>N-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N)<sub>13-14</sub>-H, Berechnung siehe Abschnitt 2.4.2

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

Vanecek und Regnier untersuchten den Einfluss der Kettenlängen und Konzentrationen des Polyethylenimins auf porösen Kieselgelen mit unterschiedlichen Porengrößen [43]. Als Quervernetzer wurde von ihnen Butandioldiglycidylether (BUDGE) verwendet. In dieser Arbeit diente der kürzerkettige Ethandioldiglycidylether als Quervernetzer. Folglich sind bei Vanecek und Regnier höhere Kohlenstoffgehalte in den CHN-Analysen zu erwarten. Bei einem Ansatz mit einer 10 %-igen methanolischen Polyethylenimin-Lösung von PEI-6 ( $M = 600 \text{ g mol}^{-1}$ ) und einer 10 %-igen BUDGE-Lösung in Dioxan erreichten sie für eine Kieselgeloberfläche von  $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  einen Kohlenstoffgehalt (C%) von 13,04 % und einen Stickstoffgehalt (N) von 4,62 %. Die in dieser Arbeit erzielten Gehalte liegen unter denen von Vanecek und Regnier. Selbst bei der Synthese eines 30 %-igen PEI-Ansatz mit 15 % EDGE wurde nur ein Stickstoffgehalt der Phase von 2,6 % erreicht. Das kann zum Einsatz eines anderen Quervernetzers liegen,

aber auch an der Synthese selbst. Wie später noch gezeigt wird, kann ein höherer Quervernetzergehalt während der Synthese eine höhere chromatographische Kapazität zur Folge haben. In dieser Arbeit wurde in methanolischer Lösung quervernetzt, wodurch elektrostatisch gebundene Polyethylenimin-Polymere wieder in Lösung übergehen könnten. Vanecek und Regnier nutzen das weniger polare, aprotische Dioxan als Lösungsmittel für die Quervernetzung. In Dioxan ist Polyethylenimin schwer löslich, was ein Ablösen von der Kieselgeloberfläche verhindert. Mit einer Erhöhung der Oberfläche des Trägermaterials geht eine Erhöhung der Bedeckungsgrade pro Gramm Trägermaterial einher. Dies kann aber auch eine Verringerung der Bedeckungsgrade pro Quadratmeter zur Folge haben. In dieser Arbeit wurden mit einem 30 %-igen PEI-Ansatz auf einer Oberfläche von 300 m<sup>2</sup> pro Gramm Kieselgel (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) Stickstoff-Bedeckungsgrade von 6,4 µmol m<sup>-2</sup> erreicht, was dem Bedeckungsgrad einer Oberfläche von 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> von 7,1 µmol m<sup>-2</sup> in der Arbeit von Vanecek und Regnier nahe kommt. Für 300 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> wurden doppelt so hohe Bedeckungsgrade von 11,5 µmol m<sup>-2</sup> für einen 10 %-igen PEI-Ansatz erzielt. Die Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnisse (C/N) bestätigen den geringeren Polyethylenimin-Gehalt der in dieser Arbeit synthetisierten Phasen. Vanecek und Regnier erreichten C/N-Verhältnisse unter drei, quervernetzten aber mit dem kohlenstoffreicheren BUDGE, was eine Erhöhung des Verhältnisses zu Folge hätte. Im Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Werte wurden jedoch höhere Verhältnisse zwischen 4 und 5 erzielt, was den geringeren Stickstoff-Bedeckungsgrad ebenfalls bestätigt.

Entscheidend für den Ionenaustausch ist jedoch die chromatographisch zugängliche Austauschkapazität, da aus sterischen Gründen nicht alle Aminogruppen dem Ionenaustausch zugänglich sind. Dies soll nun näher betrachtet werden. Die Kapazität kommerziell erhältlicher Anionenaustauscher liegt um 1 µeq m<sup>-2</sup> (Mikroäquivalent pro Quadratmeter Oberfläche). In nachfolgender Tab. 3.2 sind die chromatographischen Kapazitäten der verschiedenen Synthesestrategien aufgelistet. Diese Kapazitäten wurden mittels Durchbruchmessungen einer 10 mM Nitratlösung bestimmt.

Tab. 3.2 Gegenüberstellung von chromatographisch zugänglicher und theoretischer Kapazität.

PEI-Anteil in der Synthese (w/v)	10 %	10 %	20 %	30 %	30 %	30 %
EDGE-Anteil in der Synthese (v/v) **	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	15 %
Chromatographische Kapazität [ $\mu\text{mol m}^{-2}$ ] <sup>(A)</sup>	0,6	0,8	1,0	0,9	1,3	1,0
Theoretische Kapazität [ $\mu\text{mol m}^{-2}$ ] <sup>(B)</sup>	5,07	5,18	6,00	6,60	6,46	6,43
%C	8,26	8,95	9,09	9,28	9,02	12,86
%N	2,09	2,13	2,46	2,70	2,64	2,63
C/N	3,96	4,21	3,70	3,44	3,42	4,89

<sup>(A)</sup> Bestimmt mittels Frontanalyse mit NaNO<sub>3</sub>

<sup>(B)</sup> Bedeckungsgrad für Stickstoff, bestimmt mittels CHN-Analyse

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

Wie erwartet folgt einer Erhöhung des PEI-Gehaltes in der Synthese auch eine Erhöhung der Ionenaustauschkapazität. Mit einem PEI-Gehalt von 10 % wurden Kapazitäten zwischen 0,6 und 0,8, mit 20 % PEI dagegen bereits 1,0  $\mu\text{eq m}^{-2}$  erreicht. Mit einem PEI-Gehalt von 30 % schwankten die Kapazitäten zwischen 0,9 und 1,3  $\mu\text{eq m}^{-2}$ . Die theoretischen wie auch chromatographischen Kapazitäten dieser Ansätze zeigten keinen Einfluss des Quervernetzer-Anteils. Die Tendenz der CHN-Ergebnisse war auch in den chromatographischen Kapazitäten erkennbar. Die durch Frontanalyse bestimmten Kapazitäten hängen von der Menge stationärer Phase innerhalb einer Trennsäule ab. Dies kann durch den Packvorgang von Säule zu Säule leicht variieren, womit die Schwankungen innerhalb der identischen Ansätze erklärt werden können. Insgesamt sind 12 bis 15 % der theoretischen Kapazität dem Ionenaustausch zugänglich. Der Vergleich der erreichten chromatographischen Kapazitäten mit Werten aus der Literatur ist nicht möglich, da Regnier die Kapazität mit der statischen Methode und Picrinsäure oder chromatographisch mit Hämoglobin bestimmt hat.

### 3.2. Phasenstabilitätstest

Die chemische Stabilität stationärer Phasen kann anhand der k-Werte beobachtet werden. Wenn sich während des Dauerbetriebes das Coating ablöst, sollten die k-Werte der Analyten abnehmen. Eine Abnahme der Bodenzahlen ist ein Indiz für den Zusammenbruch der Packung der stationären Phase. Inwieweit das Coating der hier



synthetisierten stationären Phasen auch unter chromatographischen Bedingungen stabil ist, wurde mit 5 mM Phosphatpuffer bei pH 7,0 untersucht. Es wurde jeweils vier Stunden mit 5 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 50 % Acetonitril gespült. Danach wurde ein Anionengemisch mit Nitrit, Nitrat und Iodid injiziert, wobei der Acetonitrilgehalt des Eluenten auf 10 % reduziert wurde.

Miteinander verglichen wurden hier zwei Säulen der Dimension 125 x 2,0 mm i.D. des gleichen Syntheseansatzes mit 10 % Polyethylenimin (w/v) und 5 % Ethandioldiglycidylether (v/v) in Methanol (Abb. 3.1).

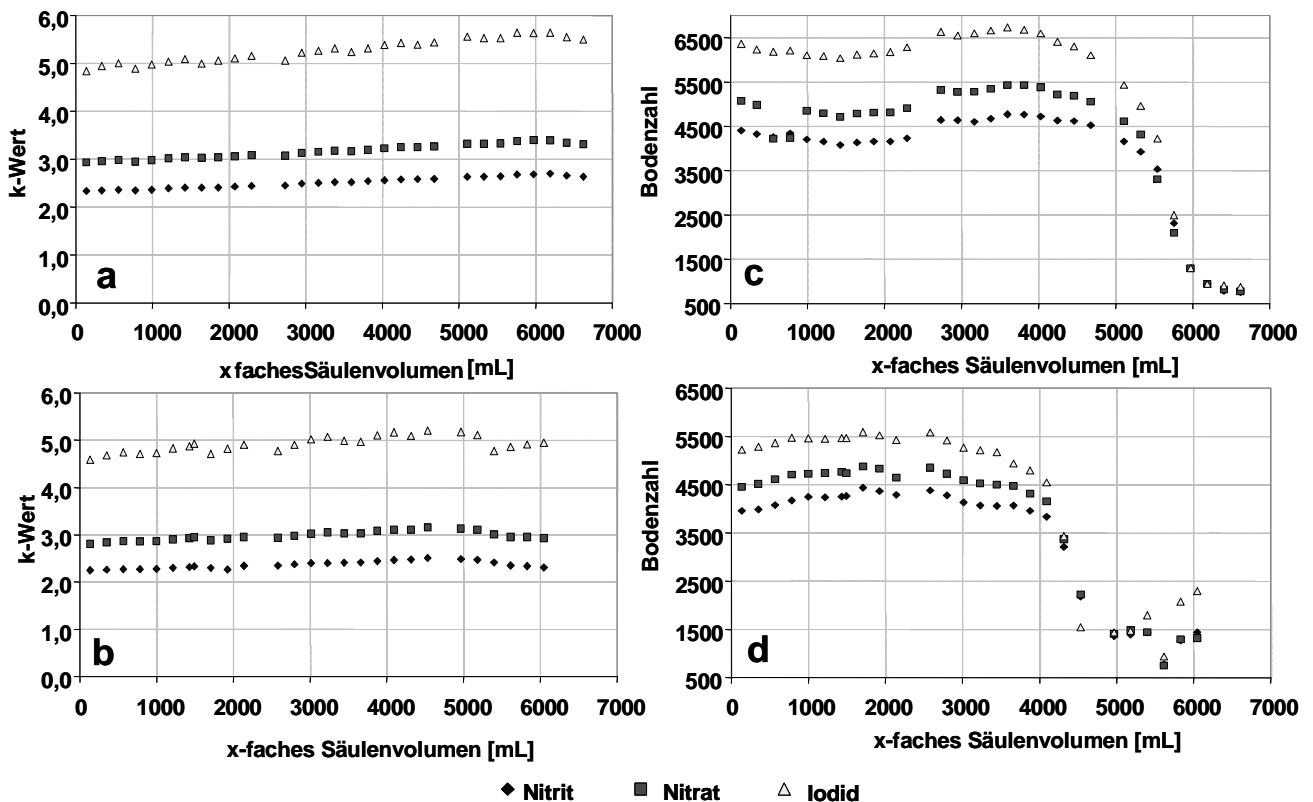


Abb. 3.1 Stabilitätstest zweier Säulen (a, b und c, d) eines Syntheseansatzes mit 10 % Polyethylenimin (w/v) und 5 % Ethandioldiglycidylether (v/v) in Methanol. Bodenzahlen (c, d) und k-Werte (a, b) in Abhängigkeit von den Säulenvolumina an Eluent. Spülen 4 h mit 50 % Acetonitril in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), Injektion Gemisch (Nitrit, Nitrat und Iodid) mit 10 % Acetonitril in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), Waters Alliance, 250 µL min<sup>-1</sup>, 210 nm. Beispielchromatogramme siehe Abb. 3.2.

Das Coating ist unter den gewählten Bedingungen chemisch stabil, da sich die k-Werte (Abb. 3.1a, b) beider untersuchten Säulen nicht ändern. Die Bodenzahlen (Abb. 3.1c, d) brechen dagegen nach 5000 bzw. 4000 Säulenvolumina an Eluent ein, was am der Packen der Phasen liegen könnte. Jedoch sollte hier auch nicht außer Acht gelassen werden, dass ein pH-Wert von 7,0 im Falle des 5 mM Phosphatpuffers schon an der Grenze der Kieselgelstabilität liegen kann, wie im Folgenden näher erklärt wird. In der Ionenaustauschchromatographie an schwachen Anionenaustauschern wie PEI hat der

pH-Wert des Eluenten einen entscheidenden Einfluss auf die Ladung und die Anzahl der geladenen Ionenaustauschgruppen der stationären Phase. Im Falle des hier eingesetzten basischen, sekundären Amins PEI liegen auch bei neutralen und basischen pH-Werten protonierte Aminogruppen vor. Die notwendigen Protonen stammen aus dem Eluenten, der zugesetzte Puffer fängt dabei normalerweise eine Änderung des pH-Wertes des Eluenten ab. Das hier genutzte Trägermaterial Kieselgel ist bis zu einem pH-Wert von 8 stabil. Für den Fall, dass die Anzahl der geladenen Aminogruppen die Pufferkapazität des  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  übersteigt, würden durch die stark basischen Aminogruppen dem Wasser zusätzlich Hydroniumionen entzogen werden, was den pH-Wert im Medium direkt an der Kieselgeloberfläche erhöht. Zwar wird in der HPLC ständig neuer Eluent nachgeliefert, doch der Austausch der mobilen Phase in den Kieselgelporen, welche ca. 40 % des Gesamtsäulenvolumens ausmachen, erfolgt verzögert, da dies ausschließlich diffusionskontrolliert geschieht. Im Falle einer pH-Wert-Erhöhung an der Kieselgeloberfläche, ausgehend von dem hier verwendeten pH-Wert von 7,0, wäre dadurch der pH-Wert von 8 an der Porenoberfläche schnell erreicht, obwohl der mittlere pH-Wert der mobilen Phase noch bei 7 liegt. Ab diesem pH-Wert würde sich das Kieselgel langsam auflösen. In diesem Fall besitzt das durch das Coaten entstandene Netzwerk keine Stabilität mehr und bricht in sich zusammen. Mit dem Einbruch der Bodenzahlen (Abb. 3.1c, d) ist auch eine starke Erhöhung des Druckabfalls der Säulen bis über 300 bar verbunden, was durch den Zusammenbruch des Netzwerkes erklärt werden kann. Zudem entstehen beim Auflöseprozess des Kieselgels kleinere Teilchen. Der Teilchendurchmesser geht quadratisch in den Gegendruck ein, was zu einem deutlich höheren Druckabfall über die Säule führt. Dieser Prozess des Auflösens kann durch die Amin-Funktionen des PEI zusätzlich katalysiert werden.

Um das vermutete Auflösen des Kieselgels zu bestätigen, wurden die zwei Säulen ausgepackt und mit Phasenmaterial eine CHN-Analyse durchgeführt (Tab. 3.3). Mittels Verbrennungsanalyse werden die prozentualen Massenanteile der Elemente an der stationären Phase bestimmt. Wenn das Kieselgel unter dem Polymer beginnt, sich aufzulösen, nimmt der Massenanteil des Kieselgels ab und die prozentualen Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte nehmen zu. Wie Tab. 3.3 zeigt, ist auf beiden Phasen nach dem Stabilitätstest tatsächlich eine Zunahme der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte zu erkennen. Dies belegt die Annahme einer Auflösung des Kieselgels. Zusätzlich wurde eine weitere Säule (Säule 3, Tab. 3.3) über einen längeren

Zeitraum mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0) gespült und danach die stationäre Phase am Anfang, in der Mitte und am Ende der Säule mittels CHN-Analyse untersucht. Es ist ein deutliches Abfallen der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte zum Säulenende hin zu erkennen. Auf den ersten Blick nehmen die Bedeckungsgrade zum Säulenende hin ab, was dem Auflösen des Kieselgels nicht entsprechen würde. In einem späteren Abschnitt (4.3, S. 75) wird jedoch gezeigt werden, dass durch das Spülen mit Phosphatpuffer nicht gebundenes Coating von der Phasenoberfläche gewaschen wird. Die Folge ist eine Abnahme der Werte in der CHN-Analyse. Im Falle der stationären Phase der Säule 3 war eine Abnahme bis zu einem C%-Gehalt von ca. 6,0 % und N%-Gehalt von ca. 1,90 % zu beobachten. Daher deuten die hier beobachteten höheren Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte ebenfalls auf die Auflösung des Kieselgels hin. Demnach setzt die Kieselgelauflösung am Säulenanfang ein und nimmt zum Säulenende hin ab. Zudem sättigt sich die mobile Phase vom Säulenkopf her mit dem gelösten Silica, was eine Auflösung des Kieselgels zum Säulenende hin verringert. Der höhere Kohlenstoffgehalt kann aber auch auf eine Anreicherung von Verunreinigungen des Eluenten aber auch von Probenmolekülen am Säulenkopf zurückgeführt werden.

**Tab. 3.3 Ergebnisse der CHN-Analyse vor und nach dem Stabilitätstest der Säulen aus Abb. 3.1. Daraus wurden Bedeckungsgrade für Stickstoff (N) und Kohlenstoff (C) berechnet.**

	direkt nach der Synthese	Säule 1 nach Stabilitätstest	Säule 2 nach Stabilitätstest	Säule 3 nach Spülen mit Phosphatpuffer			
				nach Synthese	Säulen-Anfang	Säulen-Mitte	Säulen-Ende
<b>C/N</b>	3,96	3,64	3,66	3,37	3,33	3,17	3,19
<b>%C</b>	8,26	9,69	8,86	7,08	7,04	6,29	5,93
<b>%N</b>	2,09	2,66	2,42	2,10	2,11	1,99	1,86
<b>Bedeckungsgrad N [µmol m<sup>-2</sup>]<sup>(a)</sup></b>	5,07	6,51	5,91	5,11	5,14	4,82	4,51
<b>Bedeckungsgrad C [µmol m<sup>-2</sup>]<sup>(a)</sup></b>	25,00	29,82	27,02	21,17	21,02	18,66	17,51

<sup>(a)</sup> Berechnung siehe Abschnitt 2.4.1

In Abb. 3.2 sind für die zum Stabilitätstest verwendeten Säulen jeweils zwei Beispielchromatogramme dargestellt, die identische Tendenzen erkennen lassen. Die Anionentrennungen zu Beginn des Stabilitätstests (Abb. 3.2a, b) zeigen gut aufgelöste, schmale wie auch symmetrische Peaks. Nach über 4000 Säulenvolumina Eluent (Abb. 3.2c, d) ist ein deutlicher Verlust der Trennleistung erkennbar, also breite,

unsymmetrische und nicht mehr basisliniengetrennte Peaks. Die Retentionszeiten und damit auch die Selektivitäten verändern sich dagegen nur leicht. Folglich ist der Verlust der Trenneffizienz eher auf eine Verringerung der Bodenzahlen, bedingt durch den Zusammenbruch des Packungsbettes der stationären Phase infolge der Kieselgelauflösung (Tab. 3.3), als auf den Verlust der Selektivität zurückzuführen.

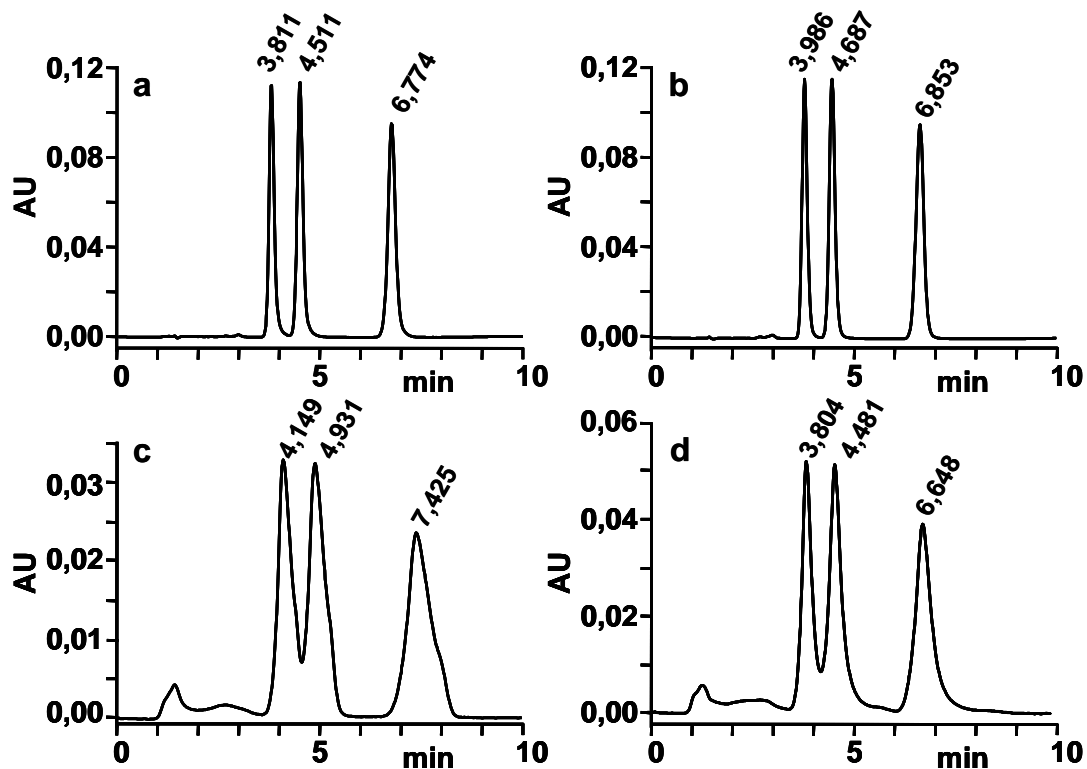


Abb. 3.2 Beispielchromatogramme der Anionentrennung des Stabilitätstests (Abb. 3.1). Säule 1 nach (a) 4 h, (c) 116 h Spülen und Säule 2 nach (b) 4 h, (d) 100 h Spülen. Injektion Gemisch (Nitrit, Nitrat und Iodid), 10 % Acetonitril in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), Waters Alliance, 250 µL min<sup>-1</sup>, 210 nm.

Auf Grund des vorher erwähnten hohen Druckabfalls der Säulen in Zusammenhang mit der rapiden Abnahme der Bodenzahlen mussten die Stabilitätsmessungen abgebrochen werden. So lässt sich an diesem Punkt feststellen, dass das Coating über 6000 Säulenvolumina Eluent stabil war.

Ein anderes Puffersystem könnte das Auflösen des Kieselgels eindämmen bzw. verhindern. Dies kann einen genaueren Aufschluss über die Stabilität der gecoateten Phasen geben. So werden in einem späteren Abschnitt (Abschnitt 5) Stabilitätstests unter anderen Eluentenbedingungen näher untersucht werden.

## 4. Vergleich unterschiedlicher Kapazitäten und Porengrößen auf 10 µm-Trägermaterial

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Polyethyleniminingehaltes während der Synthese auch eine höhere theoretische wie auch chromatographische Kapazität zur Folge hat. Mit einer größeren Oberfläche des Basiskieselgels sollte sich die erreichte Kapazität pro Quadratmeter nicht ändern, da bei einer größeren Oberfläche auch mehr PEI angelagert wird. Jedoch wird sich auf Grund der höheren Kieselgeloberfläche die Kapazität pro Gramm Trägermaterial erhöhen, was eine höhere Kapazität in der Trennsäule zur Folge hätte. Eine Vergrößerung der Oberfläche wird durch eine Verringerung des Porendurchmessers erreicht. Kleine Poren können allerdings schneller durch den Polymerfilm stark verkleinert werden. Regnier [43] zeigte, dass bei einem Syntheseansatz mit 10 % PEI das Polymercoating eine Dicke von 60 Å bis 80 Å erreichen kann. In dieser Arbeit wurden poröse Trägermaterialien mit 120 Å und 100 Å Porengröße verwendet, daher ist durchaus mit einer starken Verkleinerung bzw. mit dem Verschließen der Poren zu rechnen. Dies sollte starke Auswirkungen auf die Eigenschaften des Massentransports der einzelnen stationären Phasen haben. Mit den folgenden Untersuchungen sollte daher geklärt werden, welche Porengröße des porösen Kieselgels und welcher Syntheseansatz die höheren Kapazitäten und gleichzeitig gute Massentransporteigenschaften aufweist. Um die einzelnen Syntheseansätze richtig miteinander vergleichen zu können, wurden für diese Untersuchungen die gleichen Teilchendurchmesser verwendet. Auf Grund der leichteren Handhabbarkeit wurden alle Phasen für diese Untersuchung auf 10 µm-Partikeln synthetisiert.

### 4.1. Synthesestrategien zum Erreichen verschiedener Kapazitäten

Im vorhergehenden Abschnitt wurde bereits gezeigt, dass mit einem 30 %-igen PEI-Ansatz chromatographische Kapazitäten bis zu  $1,3 \mu\text{mol m}^{-2}$  erreicht werden können. Um diese Ergebnisse zu reproduzieren, wurde auf ProntoSIL-120 Å-10 µm ebenfalls 10 % und 30 % PEI (w/v) aufgebunden, wobei der Anteil des Quervernetzers (EDGE) 5 % (v/v) betrug. Ein weiterer Ansatz enthielt 30 % PEI (w/v) und 15 % EDGE (v/v) in methanolischer Lösung. Der Quervernetzer wurde auch hier in einer 50 %-igen Lösung eingesetzt.

Um zu verhindern, dass die Poren des ProntoSIL-100 Å-10 µm durch den hohen Polymeranteil zu stark verkleinert werden, wurden in diesen Synthesen die Ansätze der größeren Kieselgeloberfläche zwar angepasst, aber nicht verdreifacht, wie vorher auf dem 120 Å-Trägermaterial. Daher entspricht hier die 30 %-ige PEI-Konzentration einem doppelten Ansatz bezogen auf die Erhöhung der Kieselgeloberfläche von vorher 300 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> auf 450 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Der Anteil des Quervernetzers wurde immer der höheren Kieselgeloberfläche angepasst. Der PEI-Anteil betrug 15 % (entspricht 10 % auf 120 Å - Material) bzw. 30 % (w/v) mit einem Quervernetzer-Anteil von 8 % (v/v). Auch hier wurde ein weiterer Ansatz mit einem höheren Quervernetzer-Gehalt von 15 % (v/v) und einem PEI-Gehalt von 30 % (w/v) synthetisiert. Mit Hilfe der CHN-Analyse wurden die theoretischen Kapazitäten der einzelnen Synthesestrategien berechnet (Tab. 4.1).

**Tab. 4.1 Unterschiedliche Porengrößen und Synthesestrategien. Gegenüberstellung der Ergebnisse der CHN-Analyse und daraus berechnete Bedeckungsgrade für Stickstoff (N), Kohlenstoff (C), Polyethylenimin (PEI) und dem Quervernetzer EDGE.**

	ProntoSIL-120 Å-10 µm			ProntoSIL-100 Å-10 µm		
PEI-Anteil in der Synthese (w/v)	10 %	30 %	30 %	15 %	30 %	30 %
EDGE-Anteil in der Synthese (v/v) **	5 %	5 %	15 %	8 %	8 %	15 %
C/N	3,92	3,35	4,86	4,50	3,34	4,65
%C	8,27	8,84	12,43	12,29	10,62	14,19
%N	2,11	2,64	2,56	2,73	3,17	3,05
Bedeckungsgrad N [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(a)</sup>	5,13	6,45	6,25	4,46	5,21	4,99
Bedeckungsgrad C [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(a)</sup>	25,03	26,95	39,43	25,95	21,99	30,62
Bedeckungsgrad N [µmol g <sup>-1</sup> ] <sup>(a)</sup>	1539,50	1934,31	1874,68	2004,61	2342,03	2247,29

<sup>(a)</sup> Berechnung siehe Abschnitt 2.4.1

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

Die auf dem 10 µm-Trägermaterial erzielten Bedeckungsgrade sind mit den Ergebnissen, die auf ProntoSIL-120 Å-5 µm erreicht wurden (Tab. 3.1, S. 48), vergleichbar. Die Bedeckungsgrade eines 10 % PEI-Ansatzes lagen auf beiden 120 Å-Materialien bei 5,1 µmol m<sup>-2</sup> und die eines 30 % PEI-Ansatzes über 6 µmol m<sup>-2</sup>. Überraschend hierbei ist jedoch der höhere Bedeckungsgrad für Stickstoff, wenn in der Synthese weniger Quervernetzer eingesetzt wird. Diese Tendenz ist auch auf dem ProntoSIL-100 Å-10 µm-Material zu beobachten. Durch die Verdopplung und nicht Verdreifachung des Syntheseansatzes auf dem 100 Å-Material liegen die

Bedeckungsgrade pro Quadratmeter (Tab. 4.1) deutlich unter denen des 120 Å-Trägermaterials. Jedoch sollte man hier auch auf Grund der größeren Kieselgeloberfläche des 100 Å-Materials die Bedeckungsgrade pro Gramm Kieselgel betrachten. In diesem Fall wurde durch die Erhöhung der Kieselgeloberfläche ein Anstieg der theoretischen Kapazität pro Gramm Kieselgel um ca. 11 % erreicht. Entscheidend ist hierbei jedoch die chromatographisch zugängliche Kapazität. Mittels Durchbruchmessungen von Nitrat wurden zunächst die chromatographischen Kapazitäten des 100 Å-Materials der Synthesen mit 15 % und 30 % PEI mit jeweils 8 % EDGE und später auch für 30 % PEI und 15 % EDGE beider Trägermaterialien bestimmt (Tab. 4.2). Die chromatographischen Kapazitäten der hoch konzentrierten PEI- und EDGE-Ansätze sind vergleichbar, aber viel zu gering im Vergleich zu den Ergebnissen des vorherigen Abschnitts (Tab. 3.3, S. 59). Die zu geringe Kapazität wird beim Betrachten der Ergebnisse auf dem 100 Å-10 µm-Trägermaterial (Tab. 4.1) besonders deutlich. Die Synthese mit einem geringen Anteil an PEI würde in dem Fall eine um 35 % bis 40 % höhere Kapazität liefern als ein doppelt so konzentrierter PEI-Ansatz. Das scheint eher unwahrscheinlich. Die untersuchten Säulen wurden unter identischen Bedingungen in identische Säulenhardware gepackt, für die Durchbruchmessungen wurden die gleichen Eluenten verwendet. Jedoch wurde vor den Durchbruchmessungen die Charakterisierung der Packungsqualität unter abweichenden Bedingungen durchgeführt. Die Anionentrennung der zwei Säulen, die eine hohe chromatographische Kapazität aufweisen, wurde mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 + 10 % Acetonitril (Abschnitt 2.8, S. 52) durchgeführt. Für die anderen zwei Säulen erfolgte die Packungscharakterisierung mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % Acetonitril. Dies deutet auf einen deutlichen Einfluss der Säulenvorbehandlung hin, wie in Abschnitt 4.3 (Oberflächenaktivierung, S. 75) näher untersucht wird.

**Tab. 4.2 Unterschiedliche Porengrößen und Synthesestrategien. Gegenüberstellung chromatographisch zugänglicher und theoretischer Kapazität.**

	ProntoSIL-120 Å-10 µm	ProntoSIL-100 Å-10 µm		
PEI-Anteil in der Synthese (w/v)	30 %	30 %	30 %	15%
EDGE-Anteil in der Synthese (v/v) **	15 %	15 %	8 %	8 %
Chromatographische Kapazität [ $\mu\text{mol m}^{-2}$ ] <sup>(A)</sup>	0,66 <sup>(a)</sup>	0,62 <sup>(a)</sup>	0,96 <sup>(b)</sup>	0,87 <sup>(b)</sup>
Chromatographische Kapazität [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ ] <sup>(A)</sup>	199,03 <sup>(a)</sup>	278,88 <sup>(a)</sup>	433,74 <sup>(b)</sup>	392,23 <sup>(b)</sup>
Theoretische Kapazität [ $\mu\text{mol m}^{-2}$ ] <sup>(B)</sup>	6,25	4,99	5,20	4,50
Theoretische Kapazität [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ ] <sup>(B)</sup>	1875	2246	2340	2025

<sup>(A)</sup> Bestimmt mittels Frontanalyse mit  $\text{NaNO}_3$

<sup>(B)</sup> Bedeckungsgrad für Stickstoff, bestimmt mittels CHN-Analyse

<sup>(a)</sup> Packungscharakterisierung mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % Acetonitril

<sup>(b)</sup> Packungscharakterisierung mit 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 + 10 % Acetonitril

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

Eine weitere Möglichkeit Aussagen über die chromatographische Kapazität treffen zu können, bietet der Vergleich der k-Werte von, in diesem Fall, Anionen im Ionenaustauschmodus in einem gepufferten Eluentensystem. Hier können natürlich keine absoluten Angaben gemacht werden, aber um eine Tendenz zu erkennen und zwischen den einzelnen Synthesen zu vergleichen, ist dieser Ansatz ausreichend. Hintergrund für diese Herangehensweise ist der Zusammenhang zwischen k-Wert und chromatographischer Kapazität der Phase im Falle der Ionenaustauschchromatographie. Mit einer Kapazitäts-Erhöhung der stationären Phase sollten unter gleichen chromatographischen Bedingungen auch die k-Werte ansteigen. Hier werden Aussagen über Tendenzen in den Synthesen mit Hilfe der k-Werte von Iodid getroffen, die mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % Acetonitril gemessen wurden (Abb. 4.1). Acetonitril wurde dem Puffer zugegeben, um mögliche hydrophobe Wechselwirkungen des Iodids mit der stationären Phase zu unterdrücken. Der Vollständigkeit halber und im Vorgriff auf den nachfolgenden Abschnitt (4.3, S. 75) soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass bereits die Packungscharakterisierung der für diese Betrachtung verwendeten Säulen mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % Acetonitril durchgeführt wurde. Daher sind diese Säulen niemals mit Phosphatpuffer in Berührung gekommen.



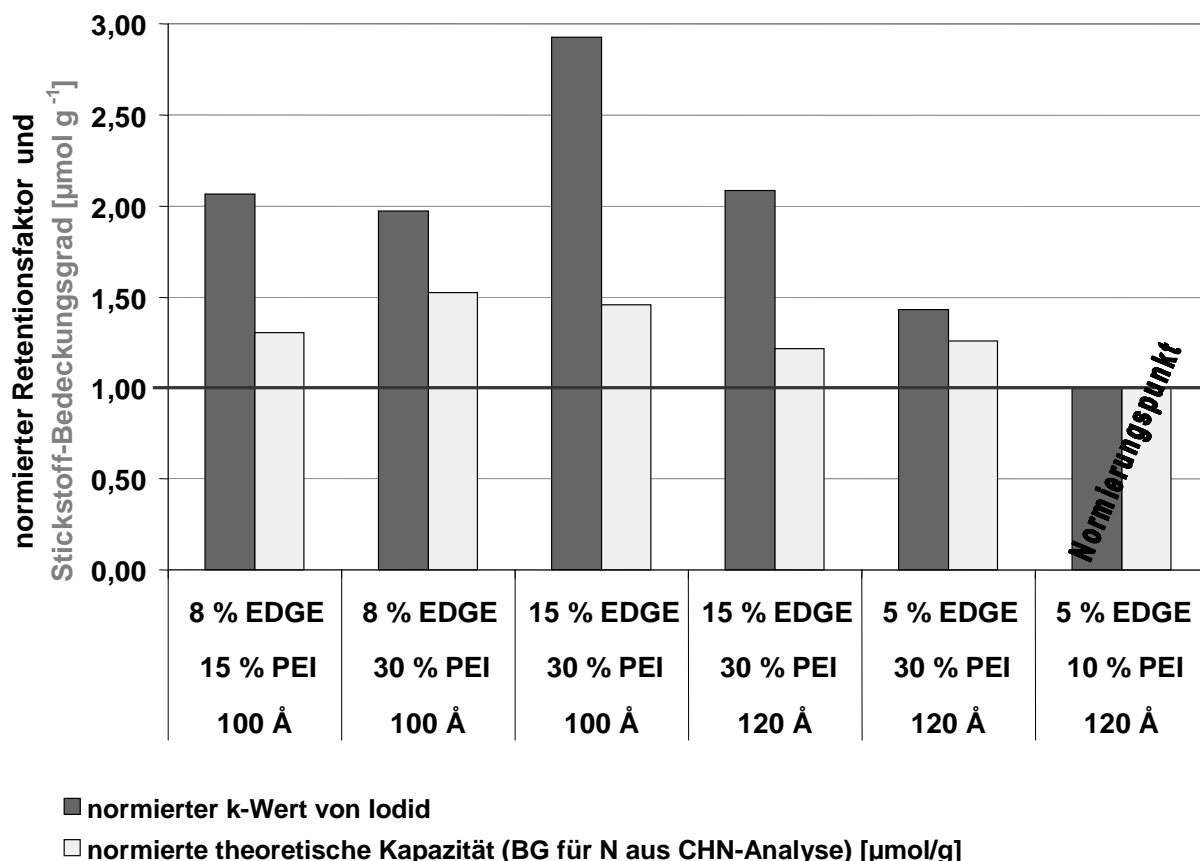


Abb. 4.1 Vergleich der k-Werte von Iodid (dunkler Balken) und Stickstoffbedeckungsgrade (BG, in [μmol g<sup>-1</sup>]) (heller Balken) durch Normierung auf den Ansatz mit 10 % PEI und 5 % EDGE auf ProntoSIL-120 Å-10 μm. 100 Å entspricht dem Trägermaterial ProntoSIL-100 Å-10 μm, 120 Å entspricht dem Trägermaterial ProntoSIL-120 Å-10 μm. 50 x 2,0 mm i.D., 10 % Acetonitril in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, 250 μL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 215 nm, Alliance.

Die k-Werte und die Bedeckungsgrade in Abb. 4.1 wurden auf den Ansatz mit der geringsten Kapazität normiert. Das heißt, alle k-Werte bzw. Bedeckungsgrade wurden immer durch die des Ansatzes mit 10 % PEI (w/v), 5 % EDGE (v/v) auf ProntoSIL-120 Å-10 μm dividiert. Wie zu erwarten war, liefern die Ansätze mit dem höchsten PEI-Gehalt auch die höchsten k-Werte für Iodid. Beim näheren Betrachten aller Ansätze mit 30 % PEI wird der Einfluss des Quervernetzers deutlich. Höhere Stickstoff-Bedeckungsgrade werden mit einem geringeren EDGE-Anteil erreicht. Die größeren k-Werte erreichen aber hier die Phasen mit dem höheren Quervernetzer-Gehalt in der Synthese. So scheint der Quervernetzer einen starken Einfluss auf die chromatographisch zugängliche Kapazität der gecoateten Polyethyleniminphasen zu haben. Obwohl sich die Bedeckungsgrade für Stickstoff signifikant unterscheiden, scheinen sich die chromatographischen Kapazitäten der beiden Ansätze mit 8 % EDGE nicht zu unterscheiden, da die beiden normierten k-Werte um 2,0 liegen. Dies kann zum einen durch Differenzen während der Synthese erklärt werden, oder die Poren wurden

im 30 % PEI-Ansatz zu stark verkleinert und nicht alle ionenaustauschfähigen Gruppen sind tatsächlich dem Ionenaustausch zugänglich. Vergleichbare normierte k-Werte wurden auf 120 Å-10 µm-Basiskieselgel mit 30 % PEI und 15 % EDGE erreicht. Die chromatographische Kapazität konnte innerhalb der Trennsäule durch Vergrößerung der Kieselgeloberfläche des Trägermaterials, nach den normierten k-Werten zu urteilen, mit einem 30 %-igen PEI und 15 %-igen EDGE Ansatz auf dem 100 Å-Material erhöht werden. Welchen Einfluss der hohe PEI-Gehalt auf die Eigenschaften des Massentransports der stationären Phasen hat, wird im nachfolgenden Abschnitt 4.2 (S. 70) näher untersucht werden. Wie vorher schon erwähnt, sind die hier diskutierten Säulen nie in Kontakt mit Phosphatpuffer gekommen. Die Ergebnisse in Tab. 4.2 (S. 68) lassen aber vermuten, dass der Kontakt der stationären Phase mit Phosphatpuffer einen entscheidenden Einfluss auf die mit der Frontanalyse bestimmte chromatographische Kapazität, daher auch auf den k-Wert, hat. Wie in Abschnitt 4.3 (Oberflächenaktivierung) gezeigt werden wird, können die hier verwendeten k-Werte dennoch als repräsentativ angenommen werden.

## **4.2. Eigenschaften des Massentransports**

Aussagen über die Massentransporteigenschaften von stationären Phasen können mittels der Theorie von van Deemter [10, 11] getroffen werden. Diese Theorie beschreibt unter anderem den Zusammenhang zwischen der Bandenverbreiterung und der Lineargeschwindigkeit. In diesen Zusammenhang gehen die Streudispersion und Longitudinaldiffusion (A und B) wie auch der Massentransport (C) (Formel 22) ein (nähere Erläuterung siehe Kapitel 2, Abschnitt 1.2, Bandenverbreiterung). Praktisch werden so genannte H-u-Kurven durch Injektion einer Analytsubstanz bei verschiedenen Flüssen aufgenommen. Dabei wird die erreichte Bodenhöhe H in µm in Abhängigkeit von der Lineargeschwindigkeit u in mm s<sup>-1</sup> aufgetragen. Mittels einer geeigneten Software können durch Fitten der H-u-Kurve die van Deemter-Parameter (Formel 22) bestimmt werden. An diesen Parameter lässt sich ablesen, welche Synthesestrategie für die Polyethylenimin-Phasen geeignet ist. Aussagen über den Massentransport können anhand des C-Terms, der unter anderem von der Lineargeschwindigkeit u abhängig ist, getroffen werden. Je kleiner dieser Term ist, umso besser sind die Eigenschaften des Massentransports der untersuchten stationären Phase.

Formel 22 vereinfachte van Deemter-Gleichung

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Die Bodenhöhe (Quotient aus Säulenlänge und Bodenzahl) nimmt unter isokratischen Bedingungen mit dem k-Wert des Analyten zu, daher sollten immer H-u-Kurven analoger k-Werte miteinander verglichen werden. An dieser Stelle sollte nochmals darauf hingewiesen werden, dass die hier untersuchten stationären Phasen auf 10 µm-Partikeln synthetisiert wurden. Daher sind relativ steile C-Terme zu erwarten. Es wurden für jeweils eine Säule der verschiedenen Synthesestrategien (Tab. 4.1, S. 66) H-u-Kurven mit den kleinen Anionen Nitrit, Nitrat und Iodid aufgenommen. In nachfolgender Abb. 4.2 wurden die experimentell bestimmten H-u-Kurven der einzelnen stationären Phasen für den k-Wert von ca. 10 dargestellt. Der Syntheseansatz auf ProntoSIL-100 Å-10 µm mit 15 % PEI und 8 % EDGE wurde zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die van Deemter-Parameter der H-u-Kurven für Nitrit, Nitrat und Iodid aller Synthesen sind im Anhang (Seite A-7 und Folgende) aufgelistet.

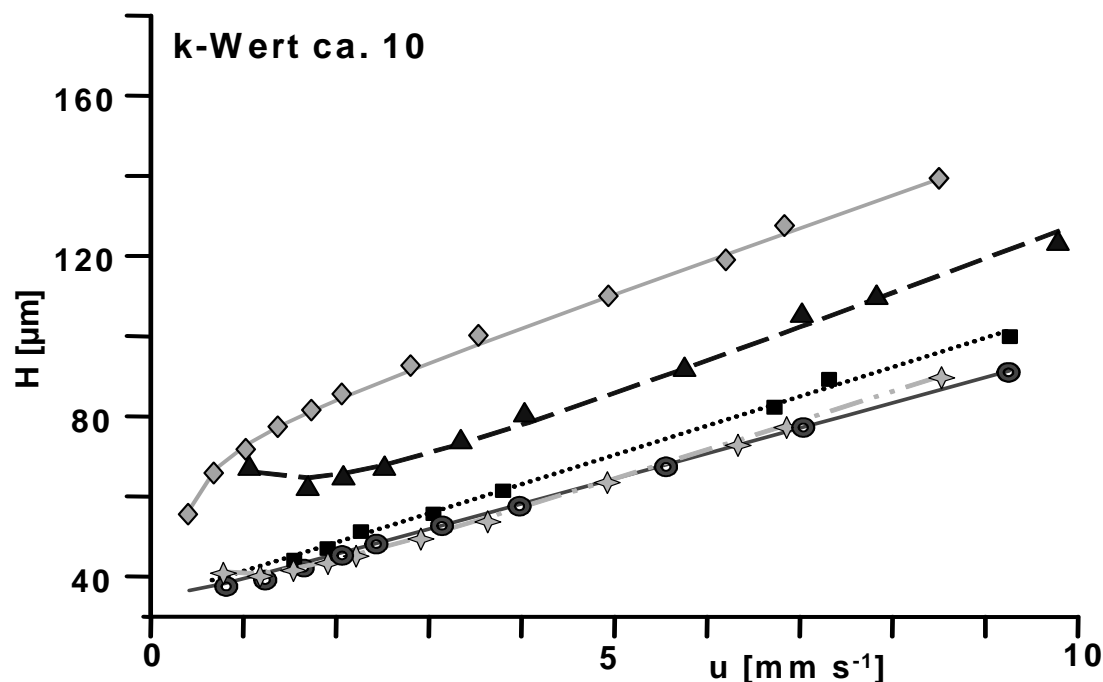


Abb. 4.2 H-u-Kurven der Synthesestrategien und unterschiedlichen Porengrößen des 10 µm-Kieselgelmaterials (Tab. 4.1). Ionen die mit einem k-Wert von 10 eluiert wurden (von Nitrit, Nitrat oder Iodid).

ProntoSIL-120 Å-10 µm, ◆ 10 % PEI 5 % EDGE, ☆ 30 % PEI 5 % EDGE, ■ 30 % PEI 15 % EDGE, ProntoSIL-100 Å-10 µm, ● 30 % PEI 8 % EDGE, ▲ 30 % PEI 15 % EDGE. 10 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, UV @ 215 nm, 50 x 2,0 mm i.D., Flüsse: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 900, 1000, 1200 µL min<sup>-1</sup>

In Abb. 4.2 wird deutlich, dass für die gezeigten Kurven nur die Ansätze mit 30 % PEI und 5 % EDGE auf ProntoSIL-120 Å-10 µm und 30 % PEI und 15 % EDGE auf

ProntoSIL-100 Å-10 µm unter den Bedingungen überhaupt ein Minimum für einen k-Wert von 10 erreichen. Daher hat der B-Term der van Deemter-Gleichung selbst bei einem Fluss von 50 µL min<sup>-1</sup> noch keinen Einfluss auf den Kurvenverlauf. Der Ansatz auf ProntoSIL-120 Å-10 µm mit 10 % PEI und 5 % EDGE zeigt eine auffällige nicht typische Abhängigkeit der Bodenhöhe von der Lineargeschwindigkeit. Die Kurven verlaufen fast spiegelverkehrt zum zu erwarteten Bild. Dieser untypische Verlauf könnte auf einen weiteren Retentionsmechanismus hindeuten. Generell unterscheiden sich die einzelnen Syntheseansätze nicht sehr stark im Anstieg des C-Terms. In Abb. 4.3 wurde daher das 100 Å- und 120 Å-Basismaterial vergleichbarer Syntheseansätze gegenübergestellt. So sollen Aussagen getroffen werden können, welches Trägermaterial die besseren Massentransporteigenschaften aufweist.

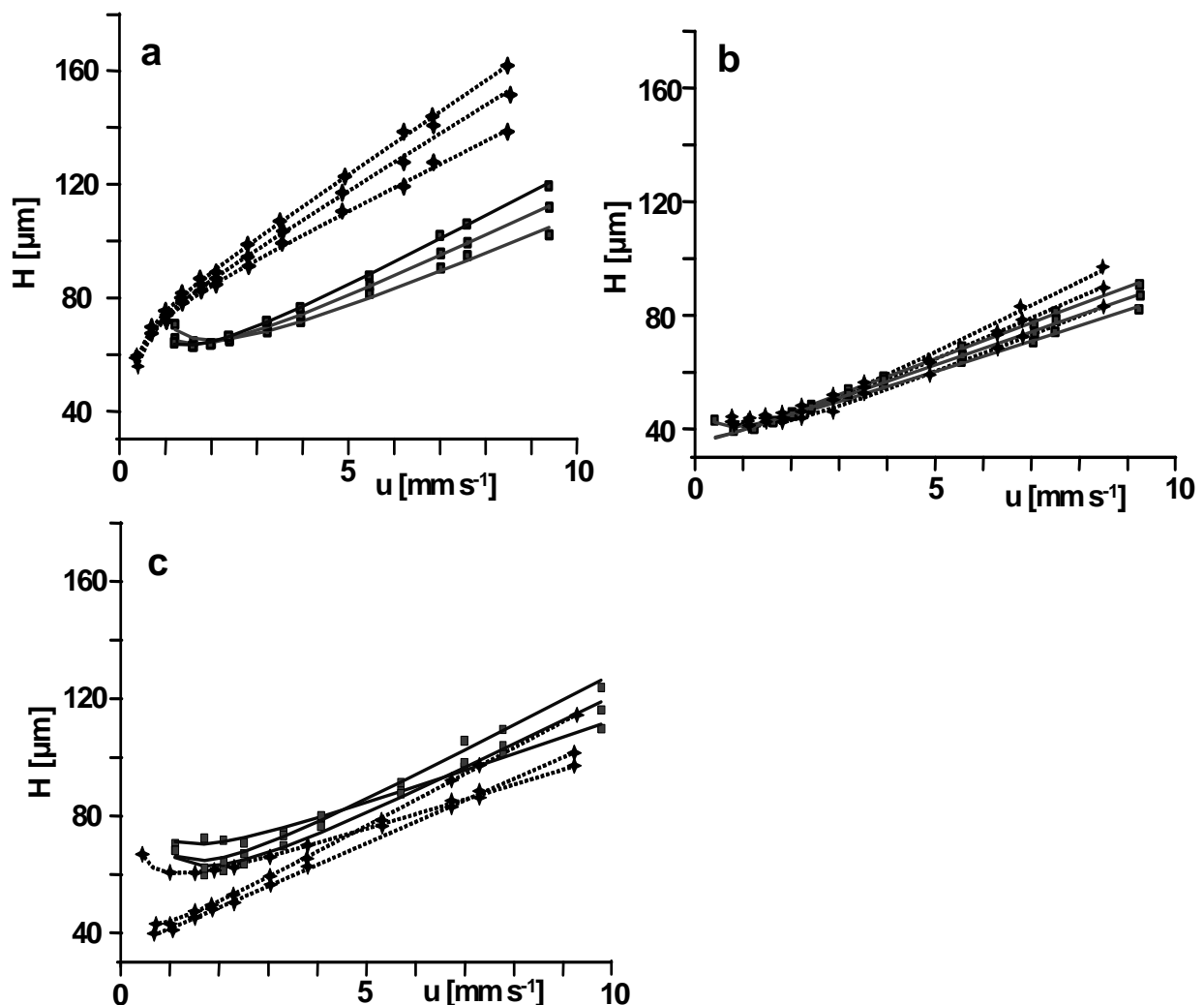


Abb. 4.3 Gegenüberstellung der H-u-Kurven ähnlicher Synthesestrategien zum Vergleich der zwei verwendeten Porengrößen (Tab. 4.1). (♦.....) ProntoSIL-120 Å-10 µm, (■—) ProntoSIL-100 Å-10 µm. (a) ♦ 120 Å, 10 % PEI 5 % EDGE, ■ 100 Å, 15 % PEI 8 % EDGE, (b) ♦ 120 Å, 30 % PEI 5 % EDGE, ■ 30 % PEI 8 % EDGE, (c) ♦ 120 Å, 30 % PEI 15 % EDGE, ■ 100 Å, 30 % PEI 15 % EDGE. 10 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, (von oben nach unten Nitrit, Nitrat oder Iodid) UV @ 215 nm, 50 x 2,0 mm i.D., Flüsse: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 900, 1000, 1200 µL min<sup>-1</sup>

In allen Gegenüberstellungen in Abb. 4.3 erreichen die Phasen auf ProntoSIL-100 Å das Minimum der van Deemter-Kurve bei höheren Lineargeschwindigkeiten als die Phasen des 120 Å-Trägermaterials. Dies ist in Übereinstimmung mit der Bandenverbreiterungstheorie nach van Deemter zu erwarten und kann mit der Diffusion der Analyten in den Poren erklärt werden. Je höher die Lineargeschwindigkeit  $u$ , umso stärker dominiert der verzögerte Massentransport, hervorgerufen durch die Diffusion der Analyten in die Poren des Phasenmaterials und die stationäre Phase (C-Term), die Bandenbreite und die Bodenhöhe  $H$ . Ein längerer Aufenthalt von Analytteilchen in den Poren oder der stationären Phase im Vergleich zu den Analytteilchen in der strömenden mobilen Phase bedeutet dabei eine stärkere Bandenverbreiterung. Dieser längere relative Aufenthalt kann nun durch kleinere Diffusionskoeffizienten der Analyten, durch höhere Lineargeschwindigkeiten nicht retardierter Analytmoleküle, oder durch längere Diffusionswege, also Porengrößen, verursacht werden. In großen Poren mit entsprechend langen Diffusionswegen benötigt der Diffusionsprozess mehr Zeit, wodurch die Bandenverbreiterung schon bei kleineren Lineargeschwindigkeiten eine entscheidende Rolle spielt. Daher liegt das Minimum der van-Deemter-Plots des 120 Å-Trägermaterial bei kleineren Flüssen als das des 100 Å-Materials.

Die van-Deemter-Plots der Ansätze mit den geringsten Polyethylenimin-Gehalten (Abb. 4.3a) weisen die steilsten Anstiege auf. Im Falle des 120 Å-Materials kristallisierte sich für alle drei Ionen auf diesem Syntheseansatz ein nicht typischer Kurvenverlauf heraus, welcher für das Iodid am stärksten ausgeprägt war (Abb. 4.3a, oberste Kurve). Die Messungen wurden für diese Säule wiederholt und zeigten, dass dieser Kurvenverlauf reproduzierbar ist. Eine mögliche Erklärung für diesen anormalen Verlauf könnte das Vorliegen zweier Retentionsmechanismen sein. Dieser Effekt ist offenbar für Iodid am stärksten ausgeprägt. Von den hier untersuchten Ionen kann Iodid auch über hydrophobe Interaktionen mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten, so dass Iodid in diesem Fall neben dem Ionenaustausch- auch durch einen Umkehrphasenmechanismus retardiert wird.

Die Ansätze mit 30 % PEI und dem geringeren Quervernetzeranteil zeigen unter den hier gewählten Bedingungen nicht nur die kleinsten Anstiege im C-Term, sondern auch keine entscheidenden Unterschiede zwischen den zwei Porengrößen (Abb. 4.3b). Dennoch ist auch hier die Tendenz des 120 Å-Material zu steileren C-Termen hin zu erkennen. Die C-Terme der beiden Ansätze mit den hohen Polyethylenimin- und Quervernetzeranteilen liegen zwischen denen der zwei anderen Synthesestrategien (Abb. 4.3c). An dieser Stelle lässt sich zusammenfassen, dass die Phasen des

100 Å-Trägermaterials für die kleinen Anionen die geringfügig besseren Massentransporteigenschaften aufweisen. Die einzelnen Zahlenwerte aller bestimmten van-Deemter-Parameter sind im Anhang (Seite A-7 und Folgende) aufgelistet.

Bisher können nur Aussagen über das Verhalten der synthetisierten Phasen gegenüber kleinen Anionen getroffen werden. Beim Betrachten des Massentransportes und der Kapazitäten (vergl. Abb. 4.6, S. 77 und Abb. 4.1, S. 69) scheinen die zwei Syntheseansätze mit 30 % Polyethylenimin und 15 % Ethandioldiglycidylether die am besten geeignete Kombination aus beiden Eigenschaften zu sein. Daher soll nun im Weiteren geklärt werden, wie sich der Massentransport für Moleküle größerer Molmassen auf den zwei ausgewählten Phasen verhält. 2-Amino-6-naphthalensulfonsäure (AminonaphthSO<sub>3</sub>), 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin (T4) und 3,5,3'-Triiodothyroessigsäure (TriAc), die einen Molmassenbereich von 200 bis 800 g mol<sup>-1</sup> einschließen, wurden dafür als Analytmoleküle ausgewählt.

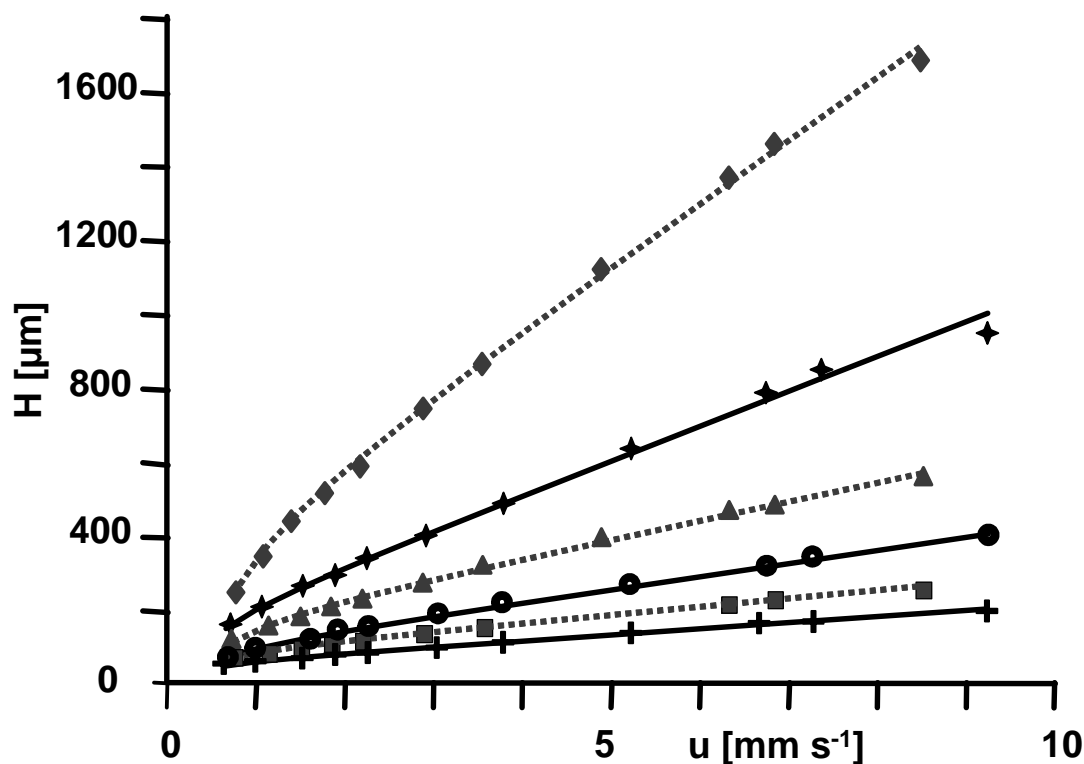
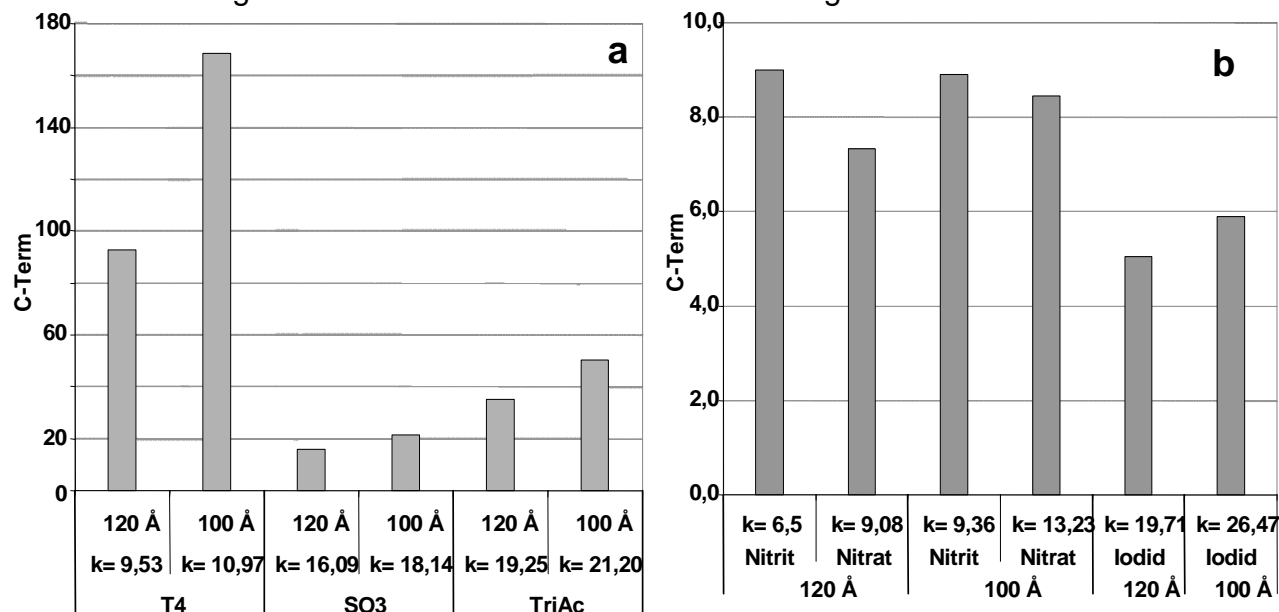


Abb. 4.4 H-u-Kurven höhermolekularer Analyten. Vergleich der Synthese mit 30 % PEI und 15 % EDGE auf zwei verwendeten Porengrößen (Tab. 4.1). (—) ProntoSIL-120 Å-10 µm, ● TriAc, ★ T4, + Aminonaphthalensulfonsäure (SO<sub>3</sub>), (.....) ProntoSIL-100 Å-10 µm, ▲ TriAc, ◆ T4, ■ Aminonaphthalensulfonsäure (SO<sub>3</sub>). 50 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, UV @ 225 nm, 50 x 2,0 mm i.D., Flüsse: 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 900, 1000, 1200 µL min<sup>-1</sup>

In Abb. 4.4 sind die experimentell ermittelten van-Deemter-Kurven dargestellt. Speziell im Vergleich der Kurven des T4 wird der Unterschied zwischen den zwei Porengrößen deutlich. Das 100 Å-Trägermaterial zeigt einen fast doppelt so großen C-Term wie das

120 Å-Material. Die Tendenz ist auch für die Sulfonsäure und die Triiodothyroessigäure zu beobachten. Zur besseren Übersicht wurden die Werte der C-Terme aller Analyten für die zwei ausgewählten Phasen in Abb. 4.5 zusammengefasst.



**Abb. 4.5 Zusammenfassung der C-Terme (sortiert nach k-Wert) für den Syntheseansatz mit 30 % PEI und 15 % EDGE auf ProntoSIL-120 Å-10 µm und ProntoSIL-100 Å-10 µm.**  
 SO<sub>3</sub> = Aminonaphthalensulfonsäure

Für die kleinen Anionen Nitrit, Nitrat und Iodid zeigen beide Trägermaterialien für den Syntheseansatz mit 30 % PEI und 15 % EDGE vergleichbare Massentransportterme. Erst bei Analyten mit größeren Molekulargewichten bis 800 g mol<sup>-1</sup> werden grundlegende Unterschiede deutlich. Die experimentell bestimmten C-Terme des 100 Å-Materials sind größer als die des 120 Å-Materials. Daher sollten die Anionenaustauscherphasen auf Grund der besseren Massentransporteigenschaften bevorzugt auf einem 120 Å-Material synthetisiert werden.

### 4.3. Oberflächenaktivierung

Im Abschnitt 4.1 (S. 65) zeigten Säulen, die mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 in Kontakt gekommen sind, eine signifikant höhere chromatographische Kapazität als Säulen, die nur mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 in Berührung kamen. Der pH-Wert hat in diesem Fall keinen Einfluss auf das Auftreten der höheren Kapazität, da beide Eluenten auf pH 7,0 eingestellt wurden. Auch die höhere Konzentration des TRIS-Puffers scheidet als Erklärung aus. Demzufolge scheint der Phosphatpuffer die Oberfläche der stationären Phase zu aktivieren und die Kapazität zu erhöhen.

Zunächst wurde eine CHN-Analyse einer neu synthetisierten stationären Phase durchgeführt (Tab. 4.3). Diese Phase wurde dann in eine Standardsäulenhardware mit 2 mm i.D. gepackt und mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 bei einem Fluss von 250 µL min<sup>-1</sup> für 1,5 Stunden gespült. Danach wurde die stationäre Phase dieser Säule wieder ausgepackt und mittels CHN-Analyse erneut untersucht. In Tab. 4.3 sind die Ergebnisse gegenübergestellt.

**Tab. 4.3 CHN-Analyse einer Polyethyleniminphase direkt nach der Synthese und nach dem Kontakt mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0.**

	ProntoSIL-120 Å-5 µm	
PEI-Anteil in der Synthese (w/v)	30 %	
EDGE-Anteil in der Synthese (v/v) **	5 %	
CHN-Analyse wurde durchgeführt	direkt nach der Synthese	nach Spülen mit 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0 <sup>(B)</sup>
C/N	3,44	3,56
%C	9,28	8,02
%N	2,70	2,26
Bedeckungsgrad N [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(a)</sup>	6,60	5,49
Bedeckungsgrad C [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(a)</sup>	28,42	24,22
Bedeckungsgrad N [µmol g <sup>-1</sup> ] <sup>(a)</sup>	1979	1648

<sup>(a)</sup> Berechnung siehe Abschnitt 2.4.1

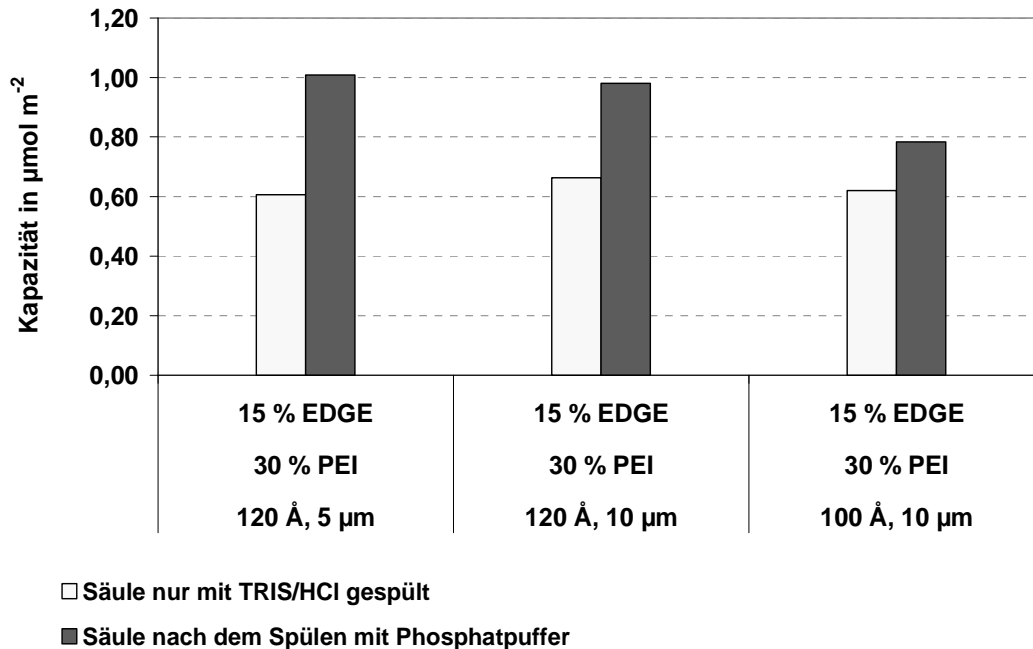
<sup>(B)</sup> CHN-Analyse der stationären Phase, die mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 in Kontakt war.

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der stationären Phase nimmt durch den Kontakt mit Phosphatpuffer signifikant ab. Daraus kann geschlossen werden, dass ein Teil des PEI-Coatings heruntergewaschen wird. Demnach sollte auch die chromatographische Kapazität abnehmen. Jedoch lassen die Ergebnisse der Frontanalyse mit Nitrat aus dem vorhergehenden Abschnitt (Tab. 4.2, S. 68) vermuten, dass das Spülen der Säulen mit Phosphatpuffer die chromatographische Kapazität erhöht. Um dies näher zu untersuchen, wurden drei repräsentative Säulen mit unterschiedlichen Trägermaterialien (ProntoSIL-120 Å-10 µm, -120 Å-5 µm, -100 Å-10 µm), aber dem gleichen Syntheseansatz (30 % PEI, 15 % EDGE) ausgewählt, und diese durch eine Frontanalyse mit Nitrat jeweils vor und nach dem einstündigem Spülen der Säulen mit



5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 untersucht (Abb. 4.6). Die Eluenten für diese Kapazitätsbestimmungen waren dabei identisch.



**Abb. 4.6** Gegenüberstellung chromatographisch zugänglicher Kapazität vor und nach dem einstündigen Spülen der drei Säulen (2,0 mm i.D.) mit 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 bei  $250 \mu\text{L min}^{-1}$ . Die Kapazität wurde mittels Frontanalyse mit  $\text{NaNO}_3$  bestimmt (Beispieldurchbruchskurve Abb. 4.7a).

Wider Erwarten nimmt die chromatographische Kapazität nach dem Spülen mit Phosphatpuffer tatsächlich signifikant zu (Abb. 4.6 und Abb. 4.7a). Dennoch zeigt im Gegensatz zu den normierten k-Werten der 100 Å-10 μm-Ansatz eine geringere Kapazität als der Ansatz auf dem 120 Å-10 μm-Material (Abb. 4.1, S 69). Alle Säulen wurden eine Stunde mit Phosphatpuffer gespült, es ist möglich, dass die Spülzeit für die hohe Kapazität der 100 Å-Phase zu kurz war um die gesamte Oberfläche zu aktivieren. Dennoch muss nun eine Erklärung gefunden werden, warum die chromatographische Kapazität zunimmt, obwohl der Stickstoffgehalt der stationären Phase abnimmt und sich die k-Werte trotz der höheren Kapazität nicht ändern (Abb. 4.7b).

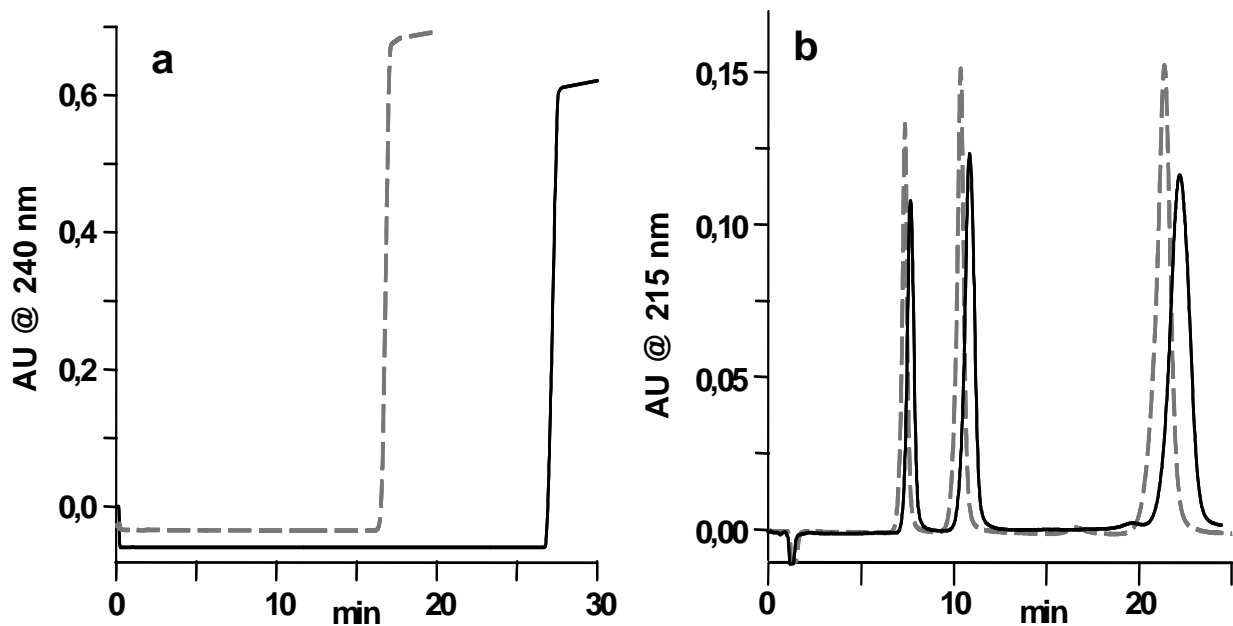


Abb. 4.7 (a) Durchbruchmessung mit  $\text{NaNO}_3$ , (b) Trennung von Nitrit, Nitrat und Iodid, 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % ACN,  $250 \mu\text{L min}^{-1}$  (einzelne Parameter der Chromatogramme siehe Tab. 4.4), vor (— —) und nach (—) dem einstündigen Spülen mit 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0. Synthese auf ProntoSIL-120 Å-5  $\mu\text{m}$ , 125 x 2,0 mm i.D..

Im Vergleich der Stickstoffbedeckungsgrade mit der chromatographischen Kapazität wird deutlich, dass nur 10 bis 20 % der Aminogruppen wirklich dem Ionenaustausch zugänglich sind. Während der Phasensynthese und des Säulenpackens kommt die stationäre Phase nicht mit Puffer in Kontakt. Daher werden die Aminogruppen des Polyethylenimins beim ersten Kontakt mit Puffer protoniert, also geladen. Diese Ladung ist abhängig vom pH-Wert des Puffers, welcher aber in diesem Fall für Dihydrogenphosphat- und TRIS/HCl-Puffer immer auf 7,0 eingestellt wurde. Dennoch erhöht der Phosphatpuffer die chromatographische Kapazität, der TRIS/HCl-Puffer dagegen nicht. Phosphat ist im Vergleich zur TRIS ein kleines Molekül und kommt daher besser an für TRIS schwerer bis gar nicht zugängliche Aminogruppen heran, um diese zu protonieren, was die Zunahme der Kapazität erklärt. Die Abnahme der Bedeckungsgrade laut CHN-Analyse (Tab. 4.3) hingegen deutet auf einen Auswascheffekt von Polyethylenimin bzw. dem Quervernetzer hin. Dadurch können im besten Fall wieder mehr Aminogruppen dem Ionenaustausch zugänglich sein, weil die Ordnung der Phasenoberfläche durch das Entfernen überschüssiger Polymerrückstände erhöht wird, was wiederum eine veränderte Adsorptions- und Diffusionskinetik für die Analytmoleküle zur Folge hätte. Im Falle der hier untersuchten Phasen wurden zwar Polymerrückstände heruntergewaschen (Tab. 4.3), dadurch sind aber sterisch mehr Aminogruppen dem Ionenaustausch zugänglich (Abb. 4.6, Abb. 4.7a). In Tab. 4.4 sind die Retentionszeiten, Symmetriefaktoren, Peakbreiten und

Bodenzahlen der Trennung aus Abb. 4.7b vor und nach dem Spülen mit Phosphatpuffer gegenübergestellt.

**Tab. 4.4** Gegenüberstellung der Retentionszeiten, Symmetriefaktoren, Peakbreiten und Bodenzahlen vor und nach der Oberflächenaktivierung mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0. Parameter der Trennung von Nitrit, Nitrat und Iodid aus Abb. 4.7b.

	<b>ProntoSIL-120 Å-5 µm</b>	
<b>PEI-Anteil in der Synthese (w/v)</b>	<b>30 %</b>	
<b>EDGE-Anteil in der Synthese (v/v)**</b>	<b>15 %</b>	
<b>Oberflächenaktivierung durch 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0</b>		
	<b>vor der Aktivierung</b>	<b>nach der Aktivierung</b>
<b>Retentionszeit Nitrit [min]</b>	7,37	7,75
<b>Retentionszeit Nitrat [min]</b>	10,39	10,94
<b>Retentionszeit Iodid [min]</b>	21,38	22,28
<b>Symmetriefaktor Nitrit</b>	0,93	1,00
<b>Symmetriefaktor Nitrat</b>	0,88	0,94
<b>Symmetriefaktor Iodid</b>	0,83	0,96
<b>Peakbreite in 50 % Peakhöhe Nitrit [min]</b>	0,28	0,40
<b>Peakbreite in 50 % Peakhöhe Nitrat [min]</b>	0,39	0,58
<b>Peakbreite in 50 % Peakhöhe Iodid [min]</b>	0,80	1,17
<b>Bodenzahl Nitrit</b>	3819	2088
<b>Bodenzahl Nitrat</b>	4027	1996
<b>Bodenzahl Iodid</b>	3955	1999

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

Es ist eine leichte, aber nicht eindeutige Zunahme der Retentionszeiten durch das Spülen mit Phosphatpuffer zu beobachten, obwohl die Stickstoffbedeckungsgrade abnehmen. Daher scheint es wahrscheinlich, dass zwar Material ausgewaschen wird, aber gleichzeitig auch eine höhere Anzahl an Aminogruppen durch Phosphat aktiviert werden können. Vor dem Spülen mit Phosphatpuffer betrug die durchschnittliche Bodenhöhe der Säule 30 µm, was einer nicht optimalen, aber akzeptablen Packungsqualität der Säule entspricht. Dies lässt darauf schließen, dass die gecoateten Kieselgelteilchen in einer relativ dichten Anordnung in die Säule gepackt wurden. Da die Säule nach dem Spülen nicht aus- und wieder neu gepackt wurde, haben sich die Bodenzahlen verschlechtert und das Packungsbett muss sich verändert haben. Die

Abnahme der Böden und Zunahme der Peakbreiten kann damit auf eine Veränderung im Packungsbett durch die vorher erwähnten Auswascheffekte zurückgeführt werden.

#### **4.4. Schlussfolgerung**

In den vorangegangenen Abschnitten wurden verschiedene Ansätze zur Synthese eines Anionenaustauschers auf Basis von Polyethylenimin entwickelt, welcher zur Stabilisierung mit Ethandioldiglycidylether quervernetzt wurde (Abschnitt 3, Abschnitt 4.1). Es konnte gezeigt werden, dass mittels Phosphatpuffer die Oberfläche des Anionenaustauschers aktiviert wird (Abschnitt 4.3). Dadurch wurde die chromatographische Kapazität erhöht, ungebundene Polymerrückstände werden von der Phase gewaschen. Weiterhin wurden die Syntheseansätze auf zwei verschiedenen Porengrößen auf ihre Massentransporteigenschaften untersucht (Abschnitt 4.2).

Es hat sich gezeigt, dass die Synthese eines Ansatzes mit 30 % Polyethylenimin (w/v) und 15 % Ethandioldiglycidylether in methanolischer Lösung die gewünschten Kapazitäten und besseren Massentransporteigenschaften auf ProntoSIL-120 Å aufwies. Für eine kommerzielle Handhabbarkeit müssen die bisher erzielten Ergebnisse für Synthesen mit größeren Ansätzen bestätigt werden. So wird nun im folgenden Abschnitt der Syntheseansatz von bisher 1,5 g bis 6 g Kieselgel auf 30 g Kiesel erhöht. Trägermaterial für die so genannten Masterbatches soll auf Grund der besseren Massentransporteigenschaften ein ProntoSIL-120 Å mit 5 µm-Partikeln sein. Die Oberflächenaktivierung der stationären Phase mit Phosphatpuffer sollte aus praktischen Gründen vor dem Säulen-Packen erfolgen.

## **5. Upscaling der Synthese auf 5 µm-120Å-Trägermaterial**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass ein Syntheseansatz mit 30 % Polyethylenimin und 15 % Ethandioldiglycidylether (Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel, Herstellerangabe) die erwünschten Kapazitäten und gleichzeitig gute Massentransporteigenschaften erreicht. Bisher wurden die stationären Phasen in Ansätzen mit 1,5 g bis 6 g Kieselgel synthetisiert. Nun soll dieser Ansatz auf eine größere Menge ProntoSIL-120 Å mit 5 µm-Partikeln übertragen werden.

### **5.1. Synthese und Oberflächenaktivierung**

Für die Synthese der zwei 30 g-Ansätze wurden nicht nur die Polymer- und Quervernetzergehalte, sondern auch die Größe der verwendeten Glasgefäße angepasst. Die Vorgehensweise war identisch mit den entsprechenden vorhergehenden Ansätzen. Der Einfachheit halber werden im Folgenden die zwei Syntheseansätze mit Masterbatch 1 (MB 1) und Masterbatch 2 (MB 2) bezeichnet.

Beide Masterbatches wurden unter identischen Bedingungen, aber, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt. Es wurde nur der Waschschrift nach der Synthese variiert. Der Masterbatch 1 wurde wie bisher über einer Nutsche gewaschen und im Trockenschrank getrocknet (MB 1a). Um die Oberflächenaktivierung zu gewährleisten, wurde der Masterbatch 1 nach dem Trocknen ebenfalls in 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 mit 50 % Methanol für sieben Stunden auf einem Flaschenschüttler inkubiert und ebenso mit Wasser über einer Nutsche gewaschen. Danach wurde eine Säule mit diesem Batch gepackt. Mittels Frontanalyse vor und nach dem Spülen der Säule mit Phosphatpuffer wurde die Oberflächenaktivierung (Abschnitt 4.3, S. 75) untersucht. Direkt nach der Synthese und dem ursprünglichen Waschen des Masterbatches 2 über einer Nutsche wurde für die CHN-Analyse ein kleiner Teil entnommen (Masterbatch 2a, (MB 2a)). Die übrige Phase wurde in 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 aufgeschlämmt und auch hier wurde ein Teil für die CHN-Analyse entnommen (Masterbatch 2b, (MB 2b)).

Danach wurde die restliche Phase in 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 mit 50 % Methanol für sieben Stunden auf einem Flaschenschüttler inkubiert und anschließend mit Wasser über einer Nutsche gewaschen. Diese Phase wird im Folgenden als Masterbatch 2 bezeichnet und für alle weiteren Charakterisierungen herangezogen. Die Ergebnisse der CHN-Analyse dieser Phasen sind in Tab. 5.1 gegenübergestellt.

Tab. 5.1 CHN-Analyse vor und nach der Oberflächenaktivierung der zwei Masterbatches mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0. Synthesansatz mit 30 % PEI und 15 % EDGE (Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)).

	Masterbatch 1		Masterbatch 2		
Waschschritte der stationären Phase nach der Synthese	direkt nach der Synthese	nach Trocknen der Phase, Inkubation für 7 h im Phosphatpuffer <sup>(B)</sup>	direkt nach der Synthese	über Nutsche mit Phosphatpuffer gewaschen <sup>(A)</sup>	direkt nach Synthese Inkubation für 7 h im Phosphatpuffer <sup>(B)</sup>
	MB 1a	MB 1	MB_2a	MB 2b	MB 2
C/N	5,78	5,86	5,76	5,60	6,22
%C	11,97	12,04	12,27	12,04	9,54
%N	2,07	2,05	2,13	2,15	1,53
Bedeckungsgrad N [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(a)</sup>	5,03	5,00	5,18	5,23	3,71
Bedeckungsgrad C [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(a)</sup>	37,76	38,01	38,84	38,03	29,30

<sup>(a)</sup> Berechnung siehe Abschnitt 2.4.1

<sup>(A)</sup> Phosphatpuffer entspricht 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0

<sup>(B)</sup> Inkubation in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 + 50 % Methanol (v/v)

Für die Synthese der Masterbatches mit 30 % Polyethylenimin (w/v) und 15 % Ethandioldiglycidylether (v/v) in methanolischer Lösung wurden die Polymer- und Quervernetzermenge, das Volumen der methanolischen Lösung wie auch die verwendeten Gefäßvolumina der größeren Kieselgelmenge angepasst. Dennoch entsprechen die in der Synthese erreichten Stickstoff-Bedeckungsgrade denen eines kleinen 10 %-Polyethyleniminbatch (Tab. 5.1, MB 1a und MB 2a), obwohl die Bedeckungsgrade des Kohlenstoffs einem 15 %-igen Quervernetzeransatz entsprechen (vergl. Tab. 3.1, S. 58 und Tab. 4.1, S. 66). Im Gegensatz zu den vorhergehenden Synthesen erfolgte die Oberflächenaktivierung nicht in der gepackten Säule, sondern mit dem gesamten Batch. Das kurze Aufschlänmen der Phase in Phosphatpuffer und das direkte Absaugen über eine Nutsche verändern die theoretische und chromatographische Kapazität nicht (siehe MB 2b in Tab. 5.1 und Tab. 5.2). Das Schütteln der Phase (MB 2) in Phosphatpuffer für sieben Stunden direkt nach der Synthese verringert den Stickstoffbedeckungsgrad um 30 %. Die chromatographische Kapazität erhöht sich dagegen nicht sehr stark (MB 2, Tab. 5.2). Dieser Effekt wurde schon in Abschnitt 4.3 (S. 75) näher beschrieben. Der Masterbatch 1 dagegen zeigt auch nach sieben Stunden Schütteln der Phase (MB 1) in Phosphatpuffer keine Verringerung der theoretischen Kapazität (Tab. 5.1), wobei sich die

chromatographische Kapazität aber erhöht (Tab. 5.2). Die Unterschiede in den Ergebnissen beider Batches werden durch den Zeitpunkt der Oberflächenaktivierung hervorgerufen. Der Masterbatch 2 wurde direkt nach der Synthese dem Phosphatpuffer ausgesetzt. Während des Quervernetzens befindet sich die Polymerphase für 16 h in methanolischer Lösung, in welcher das Polyethylenimin zu quellen beginnt. Im gequollenen Zustand wird die polymerbeschichtete Kieselgelphase stärker durch Phosphatpuffer ausgewaschen. Offensichtlich stabilisiert das Trocknen der quervernetzten Polyethylenimin-Phase das Coating zusätzlich, da für den Masterbatch 1 auch nach sieben Stunden Schütteln in Phosphatpuffer keine Änderung in der CHN-Analyse aufgetreten ist. Denkbar wäre, dass das Quervernetzen weiterhin fortgesetzt wird und so die Auswascheffekte verringert werden. Um zu überprüfen, ob Unterschiede zwischen einer Aktivierung in der Säule und eines ganzen Ansatzes auftreten, wurde eine Säule mit dem Masterbatch 1a gepackt und mittels Frontanalyse vor und nach dem Spülen mit Phosphatpuffer untersucht (MB 1a, Tab. 5.2). Auch hier findet eine Erhöhung der chromatographischen Kapazität statt, welche mit der des aktivierten Ansatzes vergleichbar ist.

**Tab. 5.2 Frontanalyse der Masterbatches. Gegenüberstellung der verschiedenen Waschschriffe der zwei Syntheseansätze.**

	Masterbatch 1			Masterbatch 2			
	MB 1a		MB 1	MB 2a	MB 2b	MB 2	
Säule für die Frontanalyse wurde gepackt...	direkt nach der Synthese		nach Trocknen der Phase und Inkubation für 7 h im Phosphatpuffer <sup>(c)</sup>	direkt nach der Synthese	über Nutsche mit Phosphatpuffer gewaschen <sup>(b)</sup>	direkt nach Synthese Inkubation für 7 h im Phosphatpuffer <sup>(c)</sup>	
	Säule vor dem Spülen mit Phosphatpuffer	Säule nach dem Spülen mit Phosphatpuffer <sup>(a)</sup>					
Chromatographische Kapazität [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(A)</sup>	0,44	0,60	0,53	0,47	0,47	0,57	0,48
Theoretische Kapazität [µmol m <sup>-2</sup> ] <sup>(B)</sup>	5,03		5,00	5,18	5,23	3,71	

<sup>(A)</sup> Bestimmt mittels Frontanalyse mit NaNO<sub>3</sub>

<sup>(B)</sup> Bedeckungsgrad für Stickstoff, bestimmt mittels CHN-Analyse

<sup>(a)</sup> Säule 1 h mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 gespült

<sup>(b)</sup> Phosphatpuffer entspricht 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0

<sup>(c)</sup> Inkubation in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 + 50 % Methanol (v/v)

Trotz der geringeren chromatographischen Kapazität des Masterbatches 2 zeigt dieser die höheren k-Werte für Iodid, Nitrat und Nitrit im Vergleich zum Masterbatch 1 unter identischen Bedingungen (Abb. 5.1). Erst nach der Oberflächenaktivierung durch das Schütteln beider Ansätze für sieben Stunden in Phosphatpuffer wurden die k-Werte der

kleinen Anionen angeglichen. Dieses Phänomen überrascht angesichts der Ergebnisse der CHN- und Frontanalyse.

Der Masterbatch 2 besitzt einen viel geringeren prozentualen Stickstoffgehalt. Mittels Phosphatpuffer könnten aus sterischen Gründen mehr Aminogruppen aktiviert worden sein. Im Masterbatch 1 hingegen liegt ein höherer Stickstoffgehalt vor. Offensichtlich sind hier aber nicht alle Aminogruppen aktiviert worden. Im Vergleich miteinander müssten auf beiden Phasen durch die zuvor beschriebenen Aktivierungsmöglichkeiten eine gleiche Anzahl Amino-Gruppen aktiviert werden, was unwahrscheinlich ist. Warum die großen Differenzen beider Batches in chromatographischer und theoretischer Kapazität dennoch zu vergleichbaren Retentionsfaktoren führen, kann an dieser Stelle leider nicht geklärt werden.

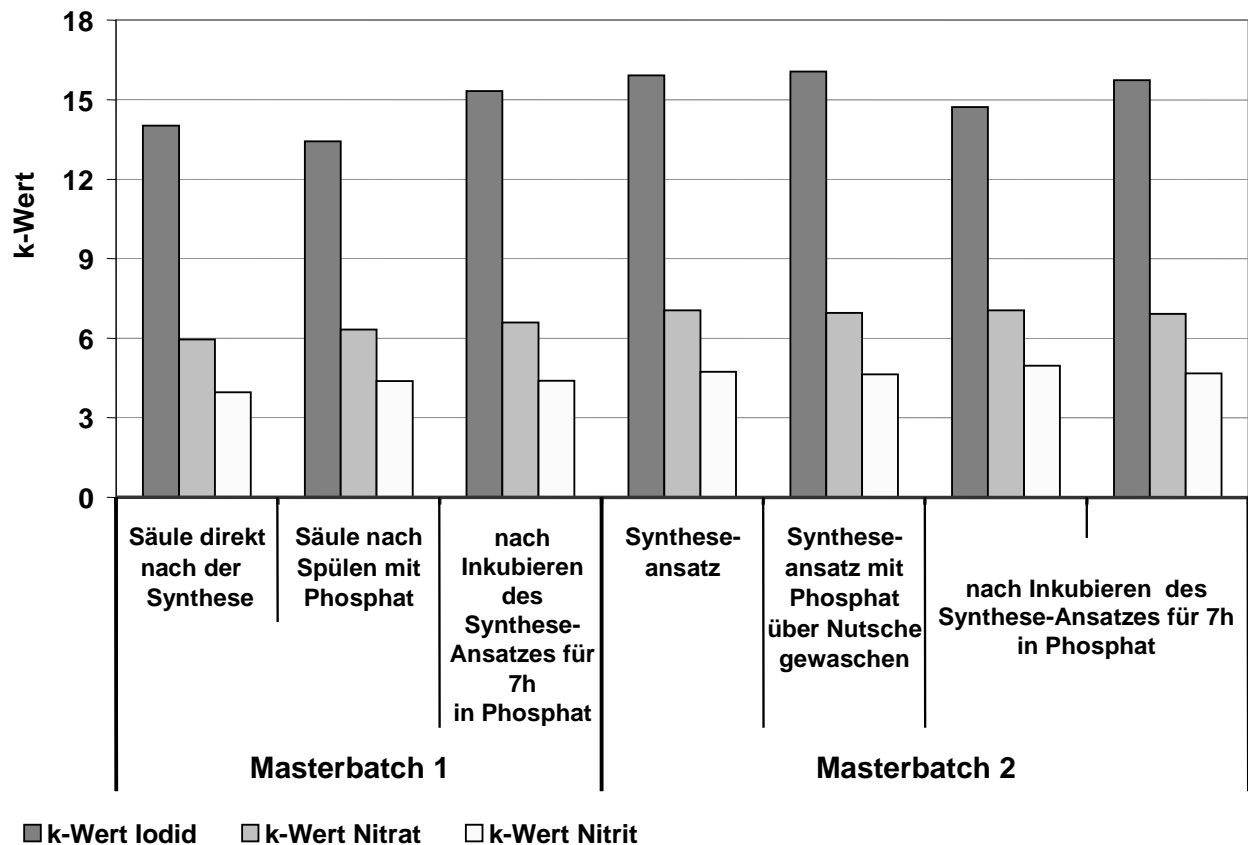


Abb. 5.1 Vergleich der k-Werte von Iodid, Nitrat und Nitrit vor und nach der Oberflächenaktivierung der zwei Masterbatches mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0. 125 x 2,0 mm i.D., 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % ACN, 250 µL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 215 nm, Waters Alliance.

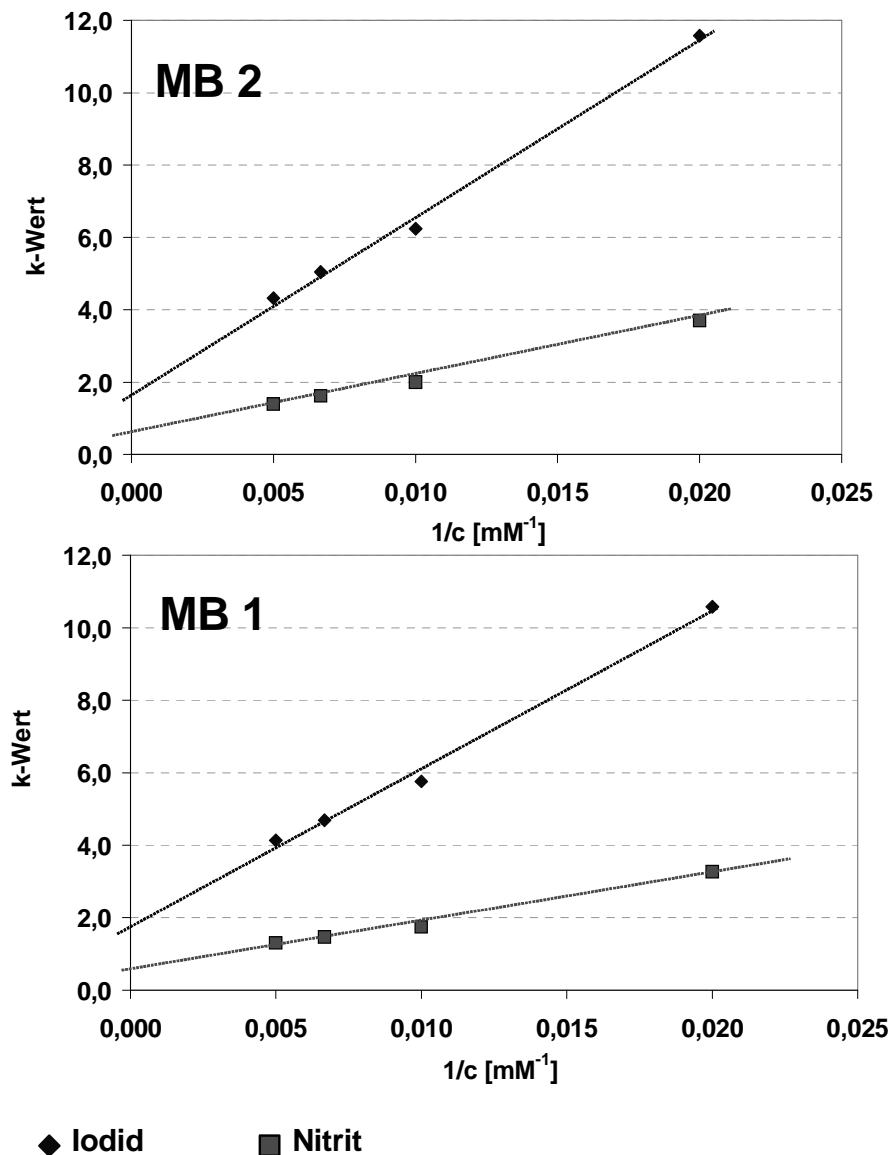


## **5.2. Chromatographische Phasencharakterisierung**

Neben der chromatographischen und theoretischen Kapazität eines Ionenaustauschers sind auch die Resthydrophobie und die Massentransporteigenschaften von Bedeutung. Daher wurden beide Masterbatches auch auf diese Eigenschaften hin untersucht.

### **5.2.1. Ionenaustausch und Hydrophobie**

In der Ionenaustauschchromatographie hat die Ionenstärke des Eluenten einen entscheidenden Einfluss auf die Retention der Analyten. Ein hoher Salzgehalt in der mobilen Phase führt zu einer stärkeren Verdrängung der Analyten von der stationären Phase, was kleinere Retentionsfaktoren zur Folge hat. Da die meisten modifizierten Kieselgelphasen auch Kohlenstoff enthalten, kann neben dem Ionenaustausch noch ein weiterer Retentionsmechanismus, vorwiegend ein Umkehrphasenmechanismus, vorliegen. Durch die Abhängigkeit des Retentionsfaktors eines Analyten vom Salzgehalt der mobilen Phase kann die Resthydrophobie einer Ionenaustauscherphase bestimmt werden. Der  $k$ -Wert in Abhängigkeit von der inversen Salzkonzentration ist eine typische Auftragung, die Aussagen zur Resthydrophobie der Phase zulässt. Weiterhin kann dadurch überprüft werden, ob es sich wirklich unter den gewählten Bedingungen um einen Ionenaustauschmechanismus für die Analyten handelt. Ist dies der Fall, muss eine lineare Abhängigkeit des Retentionsfaktors von der reziproken Salzkonzentration vorliegen. Die Auftragung über die inverse Salzkonzentration lässt eine Extrapolierung auf eine unendlich hohe Salzkonzentration zu, was dem Schnittpunkt der Gerade mit der  $y$ -Achse bei  $c^{-1} = 0$  entspricht (Abb. 5.2). Für den Fall, dass die Retention ausschließlich auf Ionenaustausch beruht, verläuft die Gerade durch den Ursprung, da durch die hohe Salzkonzentration die Analyten keine Retention aufweisen würden. Wenn der Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse bei einem  $k$ -Wert größer Null erfolgt, muss ein weiterer Retentionsmechanismus vorliegen. Daher kann dieser Schnittpunkt als ein Maß für die Resthydrophobie der Phase interpretiert werden. Für beide Masterbatches sind diese Auftragungen in Abb. 5.2 gegenübergestellt.

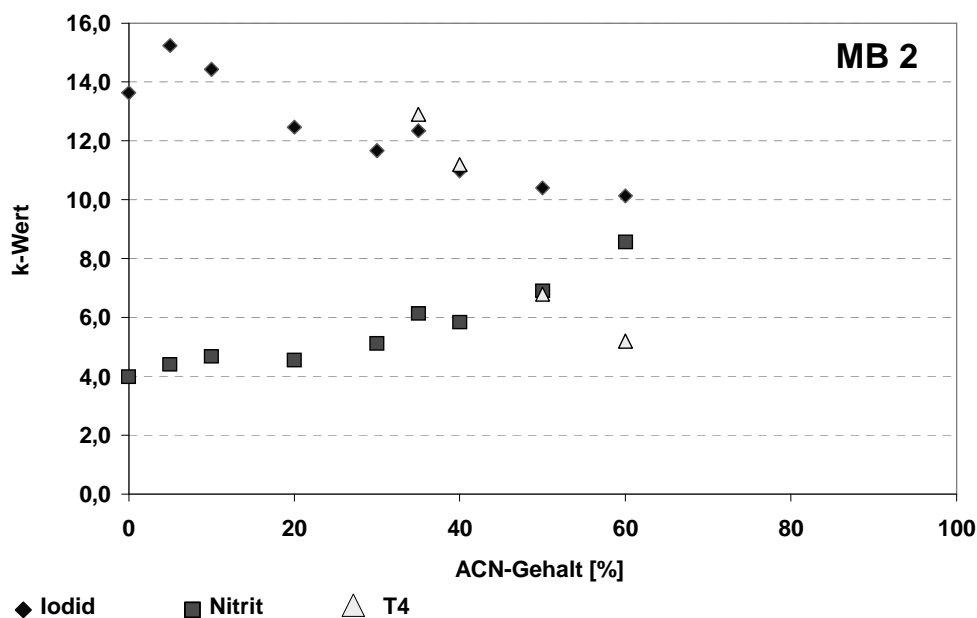


**Abb. 5.2 Retentionsfaktor in Abhängigkeit von der inversen Salzkonzentration.** Isokratische Trennung von Nitrit und Iodid mit jeweils 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM NaCl in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % ACN, 250 µL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 225 nm. MB 1 und MB 2 125 x 2,0 mm.

Auf Grund der linearen Abhängigkeit der Retentionsfaktoren für Nitrit und Iodid von der inversen Salzkonzentration kann davon ausgegangen werden, dass hier Ionenaustausch der Hauptretentionsmechanismus ist (Abb. 5.2). Dennoch zeigen beide Masterbatches Resthydrophobie. Die Geraden von Nitrit und Iodid beider Masterbatches schneiden die y-Achse bei einem k-Wert kleiner zwei. Nitrit scheint aber weniger stark mit der stationären Phase über hydrophobe Wechselwirkungen zu interagieren als Iodid. Die Stellung der beiden Anionen in der Hofmeister-Reihe [57] stützt dieses Ergebnis.

Die Umkehrphasenchromatographie basiert auf solvophoben Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase. Hierbei führt eine Erhöhung des

Organikgehaltes des Eluenten zu einer Erhöhung der Elutionskraft. Um zu überprüfen, ob Nitrit und Iodid wirklich hydrophobe Wechselwirkungen aufweisen, wurde deren Retentionsfaktor in Abhängigkeit von der Acetonitrilkonzentration untersucht. Als dritter Analyt wurde für diese Untersuchung Thyroxin (T4) ausgewählt. Die Molekülstruktur von T4 weist ein Kohlenstoffgrundgerüst wie auch eine Carbonsäuregruppe auf, wodurch neben den ionischen auch hydrophobe Wechselwirkungen möglich sind. Der Retentionsfaktor von T4 sollte demnach eine starke Abhängigkeit der Acetonitrilkonzentration zeigen. In Abb. 5.3 sind die Abhängigkeiten der Retentionsfaktoren von Nitrit, Iodid und T4 vom Acetonitrilgehalt dargestellt.



**Abb. 5.3 Retentionsfaktor in Abhängigkeit von der Acetonitrilkonzentration.** Isokratische Trennung von Nitrit, Iodid und T4 mit jeweils 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % und 60 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, 250 µL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 225 nm. MB 2, 125 x 2,0 mm.

Die Retentionsfaktoren von Iodid und T4 nehmen mit der Erhöhung des Acetonitrilgehaltes des Eluenten ab. Wie erwartet zeigt T4 eine stärkere Abhängigkeit der Retention vom Anteil an organischem Lösemittel, was auf stärkere hydrophobe Wechselwirkungen des kohlenstoffreichen Gerüsts mit der stationären Phase zurückgeführt werden kann. Iodid hingegen besitzt zwar kein Kohlenstoffgerüst, kann aber auch im Gegensatz zu Nitrit über hydrophobe Wechselwirkungen retardieren (Hofmeister-Reihe [57]). Nitrit scheint bei höheren Acetonitrilgehalten eine größere Affinität zur stationären Phase zu haben, was die Erhöhung des Retentionsfaktors mit dem Anstieg des Acetonitrilgehaltes erklärt. Dieser solvophobe Effekt wird beim Betrachten der Hofmeister-Reihe [57] bestätigt. Nitrit gehört zu den wenig bis gar nicht

hydrophoben Verbindungen, wodurch keine bzw. geringe Affinitäten zum organischen Eluenten bestehen. Dadurch hält sich Nitrit eher an der polareren und hydrophileren Oberfläche der stationären Anionenaustauscherphase auf als in der hydrophoben mobilen Phase.

Die Ergebnisse bestätigen damit die Vermutung aus dem vorhergehenden Abschnitt (Abschnitt 4.2, S. 70), dass auf Grund des untypischen Aussehens der H-u-Kurve (Abb. 4.3a) neben dem Ionenaustausch noch ein weiterer Retentionsmechanismus vorliegt. Wie in Abb. 5.3 deutlich wird, handelt es sich dabei um hydrophobe Wechselwirkungen.

### **5.2.2. Massentransport**

Eine weitere wichtige Eigenschaft neben der Hydrophobie und der Kapazität ist der Massentransport kleiner und höhermolekularer Anionen. Im Folgenden wird der Massentransport beider Masterbatches mit Nitrit, Nitrat, Iodid, Thyroxin (T4) und Aminonaphthalensulfonsäure (Abk.: SO<sub>3</sub>) verglichen (Abb. 5.4). Wie zu erwarten sind die Anstiege des Massentransportterms auf dem hier verwendeten 5 µm-Material im Vergleich zu den H-u-Kurven des 10 µm-Trägermaterials (Abb. 4.3, S. 72 und Abb. 4.4, S. 74) deutlich geringer. Dennoch zeigt auch hier T4 den größten Anstieg des C-Terms (Tab. 5.3). Wie bereits gezeigt wurde (Abschnitt 5.2.1), retardiert T4 auch über hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Das Vorhandensein eines weiteren Retentionsmechanismus' kann einen starken Einfluss auf das Verhalten des Massentransports der Analyten haben. Die H-u-Kurve von Iodid weist dagegen für ein 5 µm-Trägermaterial einen untypischen Kurvenverlauf (Abb. 5.4) auf. Die höheren Lineargeschwindigkeiten haben offensichtlich keinen Einfluss auf den Massentransport von Iodid, was eigentlich eher bei einem unporösen Trägermaterial zu erwarten wäre. Die Ursache für dieses Verhalten kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Möglich wäre auch hier das Vorhandensein eines weiteren Retentionsmechanismus' neben dem Ionenaustausch. Beide Masterbatches zeigen für die hier untersuchten Substanzen trotz der Unterschiede in den Bedeckungsgraden (Tab. 5.1, S. 82) vergleichbare Abhängigkeiten des Massentransports von der Lineargeschwindigkeit (Tab. 5.3).

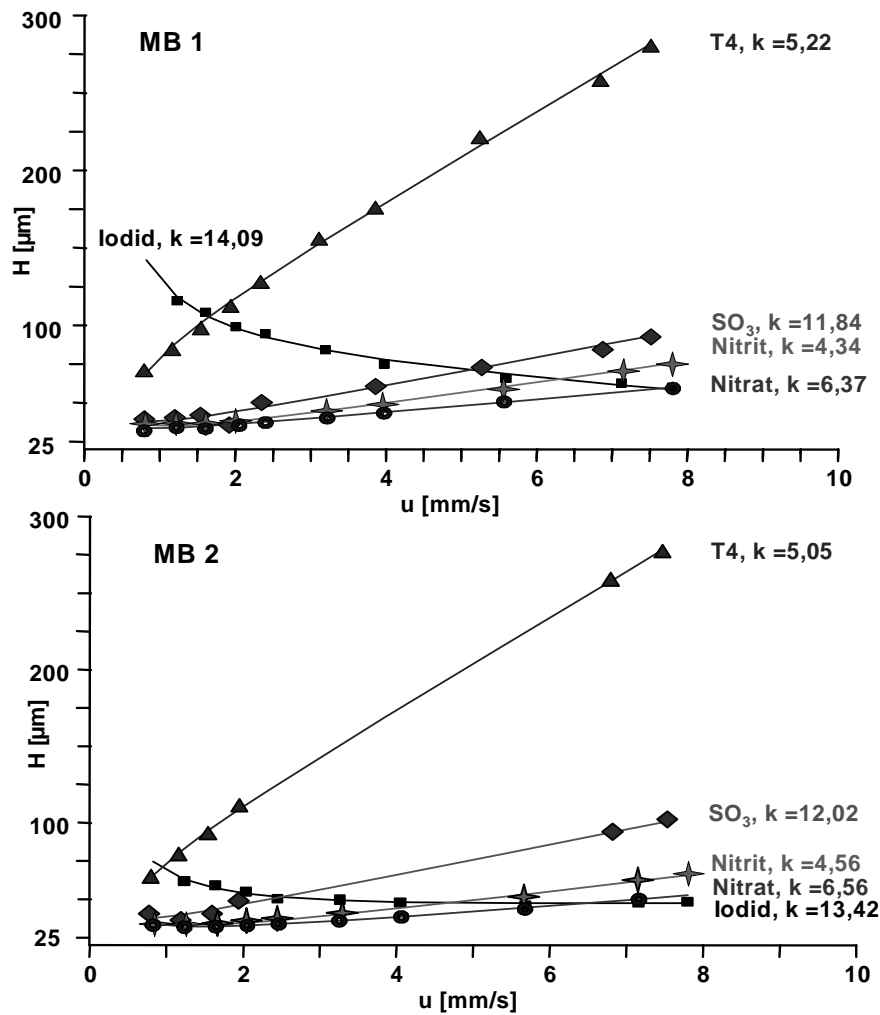


Abb. 5.4 H-u-Kurven des Masterbatch 1 (MB 1) und Masterbatch 2 (MB 2). ● Nitrat, ◆ Nitrit, ▲ T4, ◆ Aminonaphthalensulfonsäure (SO<sub>3</sub>), ■ Iodid, van Deemter-Parameter siehe Tab. 5.3  
 10 % bzw. 50 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, UV @ 225 nm, 125 x 2,0 mm i.D., Flüsse: 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 900, 1000, 1200 µL min<sup>-1</sup>

Tab. 5.3 Gegenüberstellung der van Deemter-Parameter beider Masterbatches für kleine Anionen (Nitrit, Nitrat, Iodid) und höhermolekulare Anionen mit Kohlenstoffgrundgerüst (T4, Aminonaphthalensulfonsäure). H-u-Kurven siehe Abb. 5.4.

	Masterbatch 1				Masterbatch 2			
	k-Wert	A-Term (a)	B-Term (a)	C-Term (a)	k-Wert	A-Term (a)	B-Term (a)	C-Term (a)
Nitrit	4,34	19,82	8,08	6,96	4,56	16,78	11,18	6,08
Nitrat	6,37	25,89	3,56	4,34	6,56	20,86	8,71	3,92
Iodid	14,09	76,97	55,68	-3,25	13,42	37,31	30,42	0,83
T4	5,22	70,23	-19,28	28,60	5,05	57,83	-13,68	29,57
AminoNaphSO <sub>3</sub>	11,84	22,63	6,03	9,30	12,02	25,55	3,28	9,94

(a) Bestimmt mit Origin-Fit der Gleichung  $H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$

Die Bandenverbreiterung hin zu größeren Retentionsfaktoren innerhalb einer isokratischen Trennung auf Grund von Diffusionsvorgängen ist hinreichend bekannt. Daher sollten immer die van-Deemter-Parameter gleicher k-Werte miteinander verglichen werden, was aber den Vergleich der hier bestimmten Parameter mit der Literatur erschwert. Ohmacht und Halász [14] untersuchten 1981 kommerziell erhältliche 10 µm- und 5µm-Kieselgel-Trägermaterialien und bestimmten dabei unter anderem für 5 µm-Partikel die van-Deemter-Parameter. Die Retentionsfaktoren ihrer untersuchten Analyten lagen zwischen 0,0 und 2,7, also deutlich unter den hier erreichten k-Werten. Demnach werden die van-Deemter-Parameter der hier untersuchten Masterbatches größer sein. Ohmacht und Halász bestimmten für einen Retentionsfaktor um 2,7 Werte für den Massenübergangsterm zwischen 2,7 und 4,0. Hier wurden für beide Batches bei einem k-Wert von zum Beispiel 12 (vergl. Aminonaphthalensulfonsäure, Tab. 5.3) Massenübergangsterme von 9 bis 10 ermittelt. Das lässt vermuten, dass die Massentransporteigenschaften beider Masterbatches mit denen kommerziell erhältlicher stationärer Phasen basierend auf 5 µm-Partikeln vergleichbar sind.

### **5.3. Stabilitätsmessungen**

Bisher wurde ausschließlich das chromatographische Verhalten der Masterbatches näher untersucht. Für einen HPLC-Nutzer ist jedoch auch von Bedeutung, unter welchen Bedingungen die Säule betrieben werden kann. Dabei sind die chemische Stabilität des Coatings und die Stabilität des Packungsbettes entscheidend. Kieselgelphasen sind im Allgemeinen in einem pH-Bereich von 2,5 bis 8 stabil. Oberhalb von pH 8 löst sich das Kieselgel auf. Unterhalb von pH 2 beginnt bei silanmodifizierten stationären Phasen die Rückreaktion zu Kieselgel und dem entsprechenden Silan. In der Ionenaustauschchromatographie haben der pH-Wert, die Pufferkonzentration und die Ionenstärke einen bedeutenden Einfluss auf die Trennung der Analyten. Daher ist die pH-Stabilität der stationären Phase entscheidend. Während der ersten Synthesen (Abschnitt 3.2, S. 60) hat sich gezeigt, dass Phosphatpuffer schon bei einem pH-Wert von 7,0 das Kieselgel angreift. Daher werden die Polyethylenimin-Phasen auf die Stabilität im Dauerbetrieb bei pH 7,0 mit TRIS/HCl und bei pH 3,0 - 3,2 mit Essigsäure untersucht.

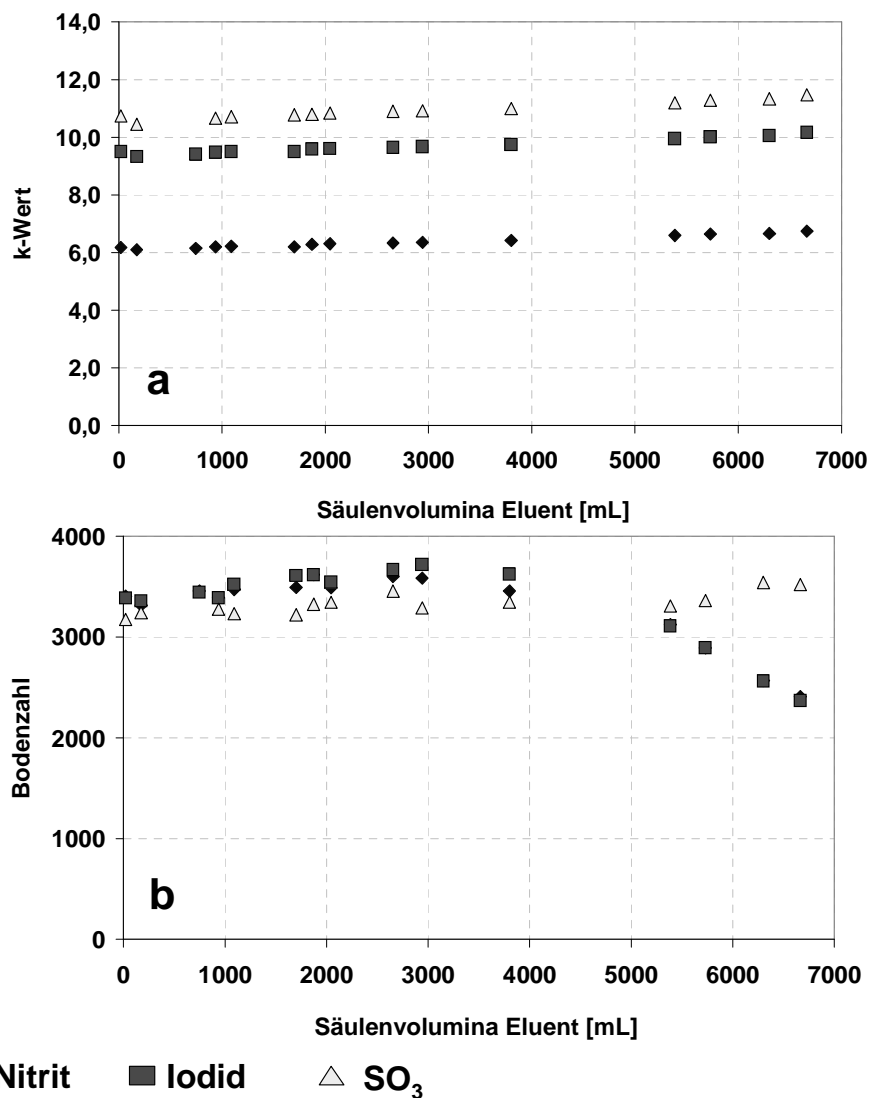
Wie in Abschnitt 3.2 (S. 60) schon erläutert, können auf Grund der k-Werte und Bodenzahlen Aussagen über die chemische und mechanische Stabilität einer

stationären Phase innerhalb der gewählten Testbedingungen gemacht werden. Eine Abnahme der Retentionsfaktoren lässt sich auf das Ablösen bzw. Abwaschen des Coatings zurückführen. Dadurch wäre die untersuchte Phase chemisch nicht stabil. Eine starke Abnahme der Bodenzahlen lässt sich auf Veränderungen im Packungsbett zurückführen, wodurch die Phase mechanisch nicht stabil wäre. Das Auflösen des Kieselgels hat eine Abnahme der mechanischen Stabilität auf Grund der Instabilität des Coating-Netzwerks zur Folge (Abschnitt 3.2, S. 60).

### **5.3.1. Stabilität bei pH 7,0 mit TRIS/HCl**

In Abschnitt 3.2 (S. 60) hat sich gezeigt, dass ein pH-Wert von 7 für die Kieselgelstabilität bereits kritisch sein kann. Der in Abschnitt 3.2 diskutierte Erklärungsansatz basierte auf der Erhöhung des pH-Wertes an der Oberfläche der Kieselgelporen. In den Poren, die ca. 40 % des Säulenvolumens einnehmen, wird die mobile Phase als stehend betrachtet, es findet nur Diffusion von Molekülen statt. Dadurch werden die Poren nicht kontinuierlich mit „frischem“ Eluent gespült, wodurch der Austausch der mobilen Phase verzögert erfolgt. Dadurch kann sich der pH-Wert in den Poren lokal erhöhen, was zu einer Auflösung des Kieselgels führt (Einzelheiten siehe Abschnitt 3.2, S. 60). Die Zugänglichkeit der Poren ist für das kleinere Phosphat-Ion erhöht. Ein größeres Puffermolekül könnte daher die Stabilität des Kieselgels im Vergleich zu dem Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7 verbessern. Um die Stabilität der Masterbatches bei pH 7,0 zu untersuchen, wurde daher 50 mM TRIS/HCl als Puffersystem gewählt. TRIS ist im Gegensatz zu Phosphat ein organisches Molekül, was ein weiterer Vorteil für die Kieselgelstabilität sein könnte. Für die Untersuchung der Stabilität bei pH 7,0 wurde aus Zeitgründen nur der Masterbatch 2 getestet. Wie sich später beim Stabilitätstest mit Essigsäure (Abschnitt 5.3.2) zeigen wird, unterscheiden sich beide Batches in Bezug auf die Phasenstabilität nicht.

Die Säule des Masterbatch 2 wurde kontinuierlich über den gesamten Zeitraum mit 50 % Acetonitril in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 gespült. In verschiedenen zeitlichen Abständen wurden einmal die Aminonaphthalensulfonsäure und ein Gemisch aus Nitrit und Iodid injiziert. Während der gesamten Versuchsdauer wurde zusätzlich der Druckabfall der Säule beobachtet. Die k-Werte und Bodenzahlen der Analyten in Abhängigkeit der Säulenvolumina an Eluent sind in Abb. 5.5 dargestellt.



**Abb. 5.5 Stabilitätstest bei pH 7,0 des Masterbatch 2 (125 x 2,0 mm). (a) k-Werte und (b) Bodenzahlen in Abhängigkeit von den Säulenvolumina an Eluent.** 50 % Acetonitril in 50 mM TRIS/HCl (pH 7,0), Injektion von Aminonaphthalensulfonsäure (SO<sub>3</sub>) und einem Gemisch aus Nitrit und Iodid, HP1100, UV-Detektion @ 215 nm, 250 µL min<sup>-1</sup>.

Die Retentionsfaktoren bleiben über den gesamten Zeitraum konstant, was die chemische Stabilität des Polyethylenimin-Coatings belegt. Wie vorher schon mit 5 mM Phosphatpuffer beobachtet wurde (Abb. 3.1, S. 61), brechen die Bodenzahlen von Nitrit und Iodid bei ca. 6000 Säulenvolumina an Eluent ein. Die Stabilität des Packungsbettes scheint mit TRIS/HCl geringfügig höher zu sein. Im Falle der Aminonaphthalensulfonsäure ist zudem in Anstieg der Bodenzahl zu erkennen. Ob sich das Kieselgel tatsächlich auflöst, wurde auch hier durch eine CHN-Analyse der ausgepackten stationären Phase überprüft (Tab. 5.4). Im Falle eines Auflösens des Kieselgels nehmen die mittels CHN-Analyse bestimmten Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte zu. Dieser Effekt sollte verstärkt im vorderen Bereich der Säule



auftreten. Die mit den Masterbatches gemessenen Ergebnisse bestätigen die Resultate aus der Phasenentwicklung (Vergl. Säulen 1 und 2 in Tab. 3.3, S. 63).

**Tab. 5.4 CHN-Analyse der ausgepackten Säule des Masterbatch 2 vor und nach dem Stabilitätstest mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0**

	direkt nach der Synthese	Säule nach Stabilitätstest <sup>(a)</sup>		
		Säulen-Anfang	Säulen-Mitte	Säulen-Ende
<b>C/N</b>	6,22	5,53	5,46	5,40
<b>%C</b>	9,54	18,76	13,30	12,91
<b>%N</b>	1,53	3,39	2,43	2,39
<b>Bedeckungsgrad N [µmol m<sup>-2</sup>]</b>	3,71	8,37	5,94	5,84
<b>Bedeckungsgrad C [µmol m<sup>-2</sup>]</b>	29,30	64,16	42,63	41,20

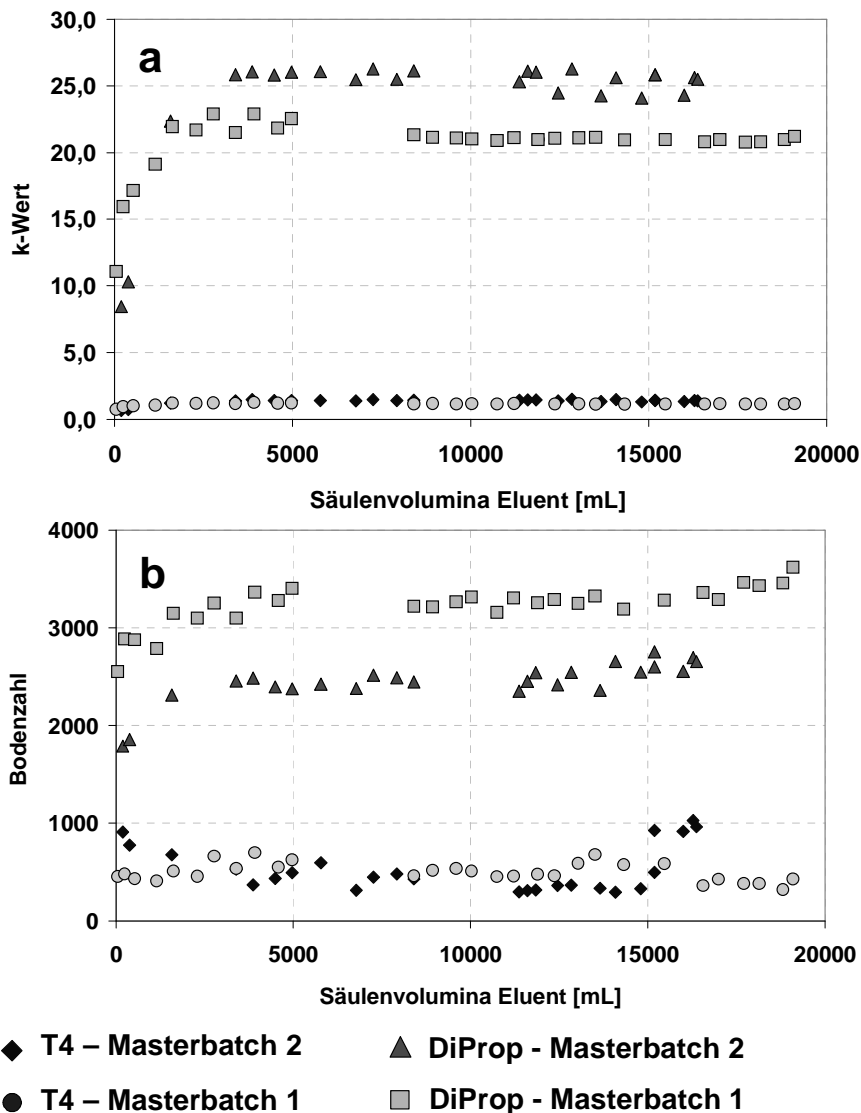
<sup>(a)</sup> Bedingungen siehe Abb. 5.5

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch im Falle eines TRIS/HCl-Puffers ein pH-Wert von 7,0 für die Polyethyleniminphase kritisch ist. Mit dem größeren TRIS-Molekül als Pufferion ist die Phase zwar stabiler, aber dennoch nicht länger als 7000 Säulenvolumina. Wie in Tab. 5.4 ersichtlich, sind nach dem Stabilitätstest die Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte viel höher, was das Auflösen des Kieselbestandes bestätigen würde. Auch hier wurde wieder ein Anstieg des Säulendrucks beobachtet, was ebenfalls ein Indikator für das Auflösen des Kieselgels ist. Am Säulenbeginn ist dabei eine stärkere Zunahme zu beobachten. Dies kann zum einen auf das Auflösen des Trägermaterials, aber auch auf Anreicherungseffekte der Analyten oder von Eluentbestandteilen am Säulenkopf zurückgeführt werden.

### **5.3.2. Essigsäure**

Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Stabilität an der oberen Grenze des pH-Bereichs der Kieselgelstabilität untersucht. Nun soll die Stabilität der Polyethyleniminphase im sauren pH-Bereich untersucht werden. Die untere pH-Wert-Grenze des Kieselgels liegt bei 2,5 bis 3,0. Daher wurde 0,1 Vol% Essigsäure als Additiv dem Eluent hinzugefügt, was einem pH-Wert von 3,0 bis 3,2 entspricht.

Hier wurde jeweils eine Säule für beide Masterbatches untersucht. Über den gesamten Zeitraum wurden die Säulen mit einem Gemisch aus Wasser/Acetonitril (60/40) mit 0,1 Vol% Essigsäure als Additiv gespült. In unterschiedlichen zeitlichen Abständen wurde ein Gemisch aus Thyroxin (T4) und Diiodothyropropionsäure (DiProp) injiziert. Die k-Werte und Bodenzahlen beider Substanzen in Abhängigkeit der Säulenvolumina an Eluent sind für den Masterbatch 1 und 2 in Abb. 5.6 dargestellt.



**Abb. 5.6 Stabilitätstest beider Masterbatches (100 x 2,0 mm). (a) k-Werte (b) und Bodenzahlen in Abhängigkeit von den Säulenvolumina an Eluent.** Wasser/Acetonitril (60/40) + 0,1 Vol% Essigsäure, Injektion eines Gemisches aus Thyroxin (T4) und Diiodothyropropionsäure (DiProp), HP1100, UV-Detektion @ 225 nm, 250 µL min<sup>-1</sup>.

Nach 17.000 bzw. 20.000 Säulenvolumina an Eluent wurden die Stabilitätsmessungen abgebrochen. Über den gesamten Zeitraum blieben die k-Werte und Bodenzahlen relativ konstant (Abb. 5.6). Die Schwankungen sind dabei unter anderem auf die Injektion mittels manuellen Injektionsventil zurück zuführen. Im Falle der Propionsäure

ist bis ca. 1600 Säulenvolumina an Eluent ein Anstieg der k-Werte zu beobachten. Da die Retentionsfaktoren danach konstant bleiben, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Auswascheffekte und Oberflächenaktivierung. Die Packungscharakterisierung der verwendeten Säule des Masterbatch 2 zeigte eine reduzierte Bodenhöhe von 6. Die Säule des Masterbatch 1 hingegen erreichte eine reduzierte Bodenhöhe von 4. Daher sollte die Packung des Masterbatch 1 stabiler sein. Auch hier wurden die stationären Phasen nach dem Stabilitätstest ausgepackt und mit Hilfe der CHN-Analyse auf mögliche Auswascheffekte hin überprüft (Tab. 5.5).

**Tab. 5.5 CHN-Analyse der ausgepackten Säule beider Masterbatches vor und nach dem Stabilitätstest mit Essigsäure**

	Masterbatch 1	Masterbatch 1 nach Stabilitätstest <sup>(a)</sup>			Masterbatch 2	Masterbatch 2 nach Stabilitätstest <sup>(a)</sup>		
	nach der Synthese	Säulen-Anfang	Säulen-Mitte	Säulen-Ende	nach der Synthese	Säulen-Anfang	Säulen-Mitte	Säulen-Ende
<b>C/N</b>	5,86	5,77	5,82	5,66	6,22	5,81	5,80	5,67
<b>%C</b>	12,04	14,36	13,92	13,58	9,54	14,97	14,63	14,11
<b>%N</b>	2,05	2,49	2,39	2,40	1,53	2,58	2,52	2,49
<b>Bedeckungsgrad N [µmol m<sup>-2</sup>]</b>	4,99	6,075	5,83	5,86	3,71	6,30	6,16	6,078
<b>Bedeckungsgrad C [µmol m<sup>-2</sup>]</b>	38,01	46,57	44,93	43,67	29,30	48,92	47,61	45,64

(a) Bedingungen siehe Abb. 5.6

Auch hier ist eine Zunahme der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte zu beobachten, die aber im Vergleich zum pH-Wert von 7 nicht so signifikant ausgeprägt ist. Diese Zunahme kann ihre Ursache in der Kieselgelaufösung, aber auch in Anreicherungseffekten haben. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die mechanische und chemische Stabilität beider Masterbatches bei einem pH-Wert von ca. 3 unter den hier gewählten Bedingungen über einen längeren Zeitraum gegeben ist.

## 5.4. Zusammenfassung

Die Verzehnfachung des 30 %igen Polyethylenimin-Syntheseansatzes (Upscaling) mit 15 % Ethandioldiglycidylether auf ProntoSIL-120 Å-5 µm erzielte nicht die vorher bei kleineren Kieselgelansätzen beobachteten Stickstoff- und Kohlenstoffbedeckungsgrade (Vergl. Tab. 5.1, S. 82 und Tab. 4.1, S. 66). Die Bedeckungsgrade, die durch das Upscaling der Synthese erreicht wurden, entsprechen denen der kleineren Ansätze mit 15 % Polyethylenimin und 5 % Ethandioldiglycidylether in Methanol. Die chromatographischen Kapazitäten zeigen nach der Oberflächenaktivierung bei pH 7,0 mit 5 mM Phosphatpuffer vergleichbare Tendenzen (Vergl. Tab. 5.2, S. 83 und Tab. 3.2, S. 59). Da auch die Volumina der in der der Synthese verwendeten Gefäße angepasst wurden, kann an dieser Stelle dieser Effekt nicht geklärt werden. Die Oberflächenaktivierung erfolgte durch Schütteln des gesamten Syntheseansatzes über sieben Stunden in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,0. Ein Ansatz (Masterbatch 1) wurde vor dem Kontakt mit Phosphatpuffer im Trockenschrank getrocknet. Der zweite Ansatz (Masterbatch 2) wurde direkt nach der Synthese dem Phosphatpuffer ausgesetzt. Der Masterbatch 2 zeigt durch diesen Prozess eine starke Abnahme der Bedeckungsgrade. Die Stickstoff- und Kohlenstoffgehalte des Masterbatches 1 hingegen verändern sich nach der Oberflächenaktivierung nicht signifikant. Die chromatographischen Kapazitäten und k-Werte beider Ansätze sind dennoch vergleichbar (Tab. 5.2, S. 83 und Abb. 5.1, S. 84). Für beide Anionenaustauscherphasen wurden die van-Deemter-Parameter kleiner anorganischer Anionen und höhermolekularer organischer Anionen, bestimmt. Beide Batches weisen keine signifikanten Unterschiede der Massentransporteigenschaften auf (C-Term, Tab. 5.3, S. 89). Die ermittelten Parameter sind mit Werten aus der Literatur vergleichbar [14]. Auch die Resthydrophobie unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 5.2, S. 86).

Stabilitätsuntersuchungen mit TRIS/HCl- und Phosphat-Puffer (Abschnitt 5.3, S. 90 und Abschnitt 3.2, S. 60) haben gezeigt, dass ein pH-Wert von 7,0 die Stabilität des Kieselgels einschränkt. Die chemische Stabilität des Coatings ist bei diesem pH-Wert dennoch gegeben. Die Phasenstabilität im unteren pH-Bereich wurde bei einem pH-Wert von 3,0 bis 3,2 mit Essigsäure untersucht. Unter diesen Bedingungen ist die Stabilität des Coatings und des Packungsbettes auch nach 20.000 Säulenvolumina, was einem Dauerbetrieb von über 400 Betriebsstunden entspricht, gegeben.

## 6. Applikation des Polyethylenimin-Anionenaustauschers in verschiedenen chromatographischen Modi

In den vorhergehenden Abschnitten wurde die Synthese und Charakterisierung des Polyethylenimin-Anionenaustauschers genauer betrachtet. Zur Charakterisierung der Säulen wurden vielfach unterschiedliche HPLC-Methoden eingesetzt, wobei jedoch der Schwerpunkt der einfacheren Handhabbarkeit wegen nicht auf der Komplexität des Trennproblems lag. Im Folgenden sollen nun komplexere Probengemische auf der entwickelten Polyethyleniminphase getrennt werden. Die entwickelte stationäre Phase kann sowohl in der die Anionenaustauschchromatographie, als auch in der Normalphasenchromatographie eingesetzt werden. Durch die Resthydrophobie der Phase bietet sich zudem die Umkehrphasenchromatographie an. Im Folgenden sollen verschiedene Anwendungsbeispiele vorgestellt werden. Die in Abschnitt 6.1 und 6.2 zusammengestellten Probengemische beruhen dabei nicht auf realen Trennproblemen aus der Laborpraxis. Sie dienen lediglich dazu, die Leistungsfähigkeit der entwickelten stationären Phase gegenüber verschiedenen Analyten zu demonstrieren. Dagegen wird in Abschnitt 6.3 auf ein reales Trennproblem eingegangen, dessen Bedeutung in einem späteren Teil dieser Arbeit näher erläutert wird.

### 6.1. Normalphasenchromatographie

In der Normalphasen- oder auch Adsorptionschromatographie wird eine polare stationäre Phase in Verbindung mit einer unpolaren mobilen Phase verwendet. Typische Eluenten sind beispielsweise unpolare aliphatische Kohlenwasserstoffe. Die Zugabe von polareren Solventien wie Alkoholen oder, wie in dieser Arbeit, Estern, erhöht die Elutionsstärke des Eluenten. Für eine Trennung eines Gemisches aus Toluol und 2,6-, 2,4-, 2,5-, und 3,5-Dimethylphenol wurde n-Hexan/Ethylacetat (90/10, v/v) als mobile Phase ausgewählt (Abb. 6.1). Um den Wassergehalt der mobilen Phase und somit auch die Retentionszeiten zu kontrollieren, wurde dem Eluenten 500 ppm Wasser hinzugefügt.

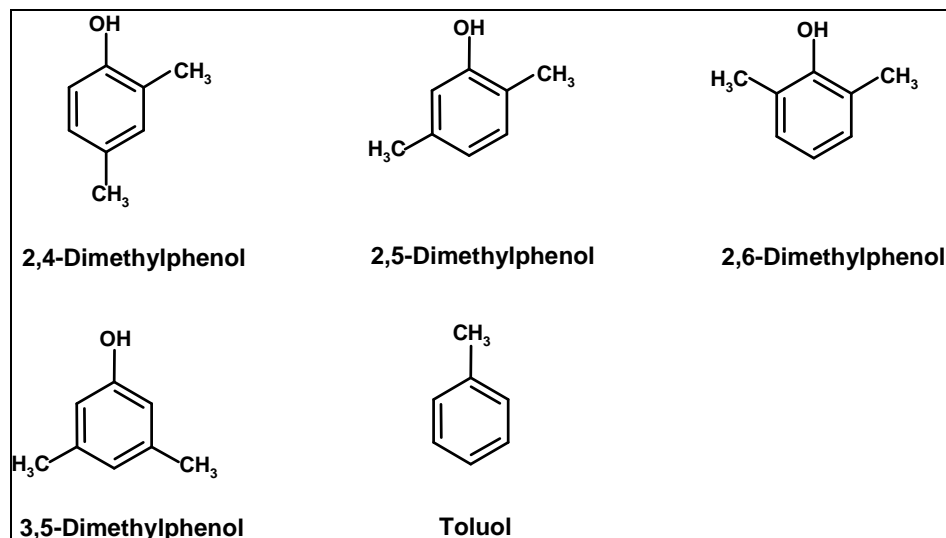
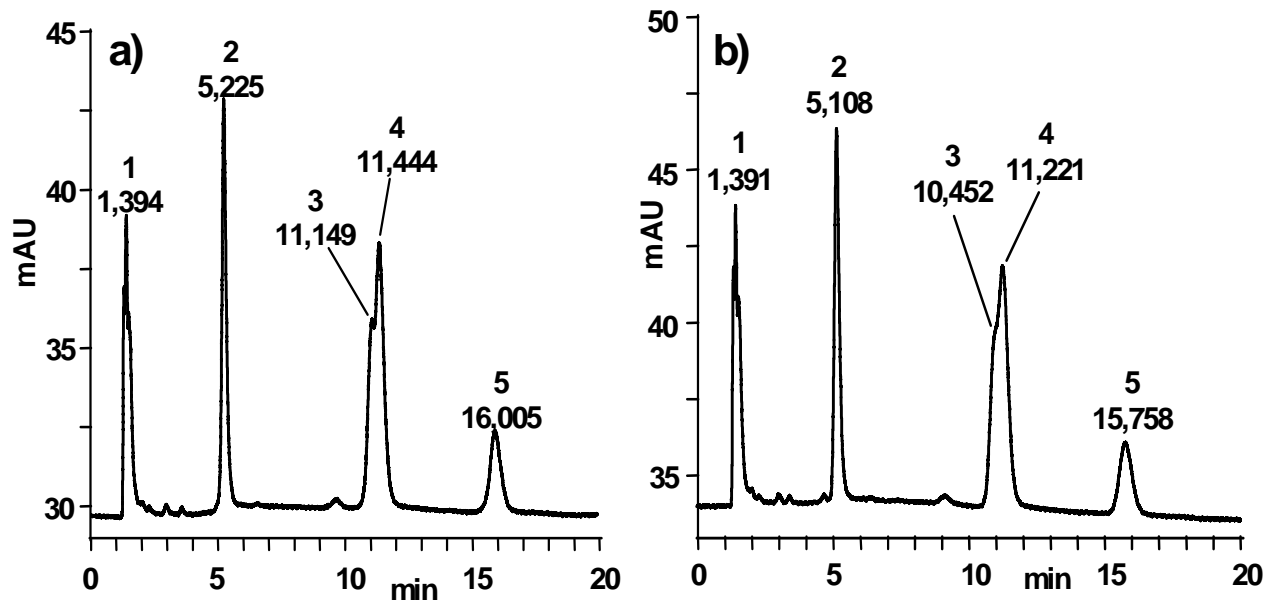


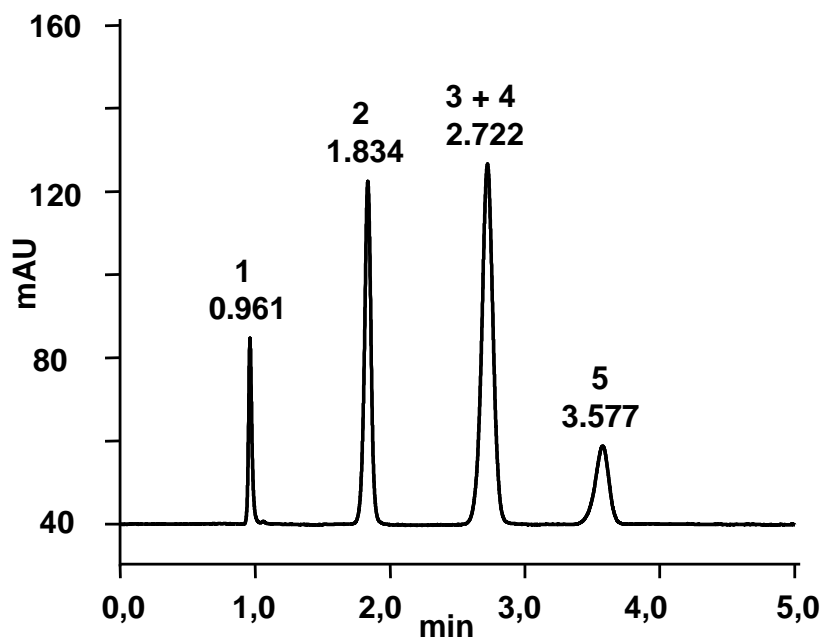
Abb. 6.1 Probengemisch der Normalphasenchromatographie.

Eine Beipieltrennung der fünf Substanzen ist auf zwei Säulen eines 10 %igen Polyethyleniminansatzes mit 5 % Quervernetzer in Abb. 6.2 gezeigt. Unter den hier gewählten Bedingungen co-eluieren 2,4- und 2,5-Dimethylphenol (Peak 3 und 4, Abb. 6.2). Dagegen können Toluol, 2,6- und 3,5-Dimethylphenol basisliniengetrennt detektiert werden. Zum Vergleich wurde das Gemisch unter gleichen Bedingungen auf einer kommerziell erhältlichen Amino-Phase (ProntoSIL-120-3-AMINO, Bischoff) injiziert (Abb. 6.3). Auf dem ersten Blick ist sofort ersichtlich, dass die Trennung auf der kommerziellen Aminophase in vier Minuten erfolgt ist. Diese Säule ist 2,5 cm kürzer. Selbst wenn man dies berücksichtigt, ist die Adsorption an der PEI-Phase deutlich höher. Auf der Polyethyleniminphase dauert eine Trennung ca. 17 Minuten. Demnach ist die Adsorption der Analyten auf der Polymerphase stärker. Die kommerzielle Aminophase basiert auf 3 µm-Partikeln, woraus schmalere Peaks resultieren. Trotz 5 µm-Partikeln ist jedoch die Polyethyleniminphase in der Lage, 2,4- und 2,5-Dimethylphenol anzutrennen. Durch ein 3 µm-Trägermaterial kann auf Grund der besseren Massentransporteigenschaften die Auflösung erhöht werden. Dies wird sicherlich nicht zu einer Basislinientrennung führen, wäre aber eine Möglichkeit der Optimierung. Die Retention erfolgt hier über die polaren Wechselwirkungen der OH-Gruppe, was die Retentionsreihenfolge gelegt. Je weniger die OH-Gruppe sterisch durch Nachbargruppen abgeschirmt wird, desto höher ist die Retention, womit 2,6-Dimethylphenol sehr früh, 3,5-Dimethylphenol hingegen als letztes eluiert.

Diese Applikation soll verdeutlichen, dass die in dieser Arbeit synthetisierten Polyethyleniminphasen auch für die Normalphasenchromatographie geeignet sind. Daher wurde an dieser Stelle auf eine weitere Optimierung verzichtet.



**Abb. 6.2** Normalphasenchromatographie. Zwei Säulen a und b eines Synthesansatzes mit 10 % PEI und 5 % EDGE auf ProntoSIL-120A-5 $\mu$ , 125 x 2,0 mm, Eluent: n-Hexan + 10% Ethylacetat (v/v) + 500 ppm Wasser, Bischoff-Pumpe, Knauer-Detektor, manuelles Injektionsventil mit 5  $\mu$ L Probenschleife, 254 nm, 250  $\mu$ L/min, Elutionsreihenfolge: Toluol, 2,6-DiMePh, 2,4-DiMePh + 2,5-DiMePh, 3,5-DiMePh (Dimethylphenole).



**Abb. 6.3** Normalphasenchromatographie einer kommerziellen Aminophase. ProntoSIL-120-3-AMINO, 3  $\mu$ m Partikel, 120A-Trägermaterial, 100 x 4,6 mm. Eluent: n-Hexan + 10% Ethylacetat (v/v) + 500 ppm Wasser. Bischoff-Pumpe, Knauer-Detektor, manuelles Injektionsventil mit 5  $\mu$ L Probenschleife, 254 nm, 1,0 mL/min, Elutionsreihenfolge: Toluol, 2,6-DiMePh, 2,4-DiMePh + 2,5-DiMePh, 3,5-DiMePh (Dimethylphenole).

## 6.2. Ionenaustauschchromatographie mit Benzoesäurederivaten

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, dass in der Ionenaustauschchromatographie die Erhöhung der Elutionskraft durch eine Erhöhung der Ionenstärke des Eluenten erreicht wird. Um die Trennleistung der Masterbatches im Ionenaustausch-Modus zu demonstrieren, wurden 13 Derivate der Benzoesäure bzw. Substanzen mit einer ähnlichen Molekülstruktur ausgewählt (Abb. 6.4). Die Elution der Substanzen erfolgte mit einem Natriumchlorid-Gradienten in einem 50 mM TRIS/HCl gepufferten Eluentensystem bei pH 7,0. Das Gemisch wurde auf beiden Masterbatches unter identischen Bedingungen getrennt (Abb. 6.5).

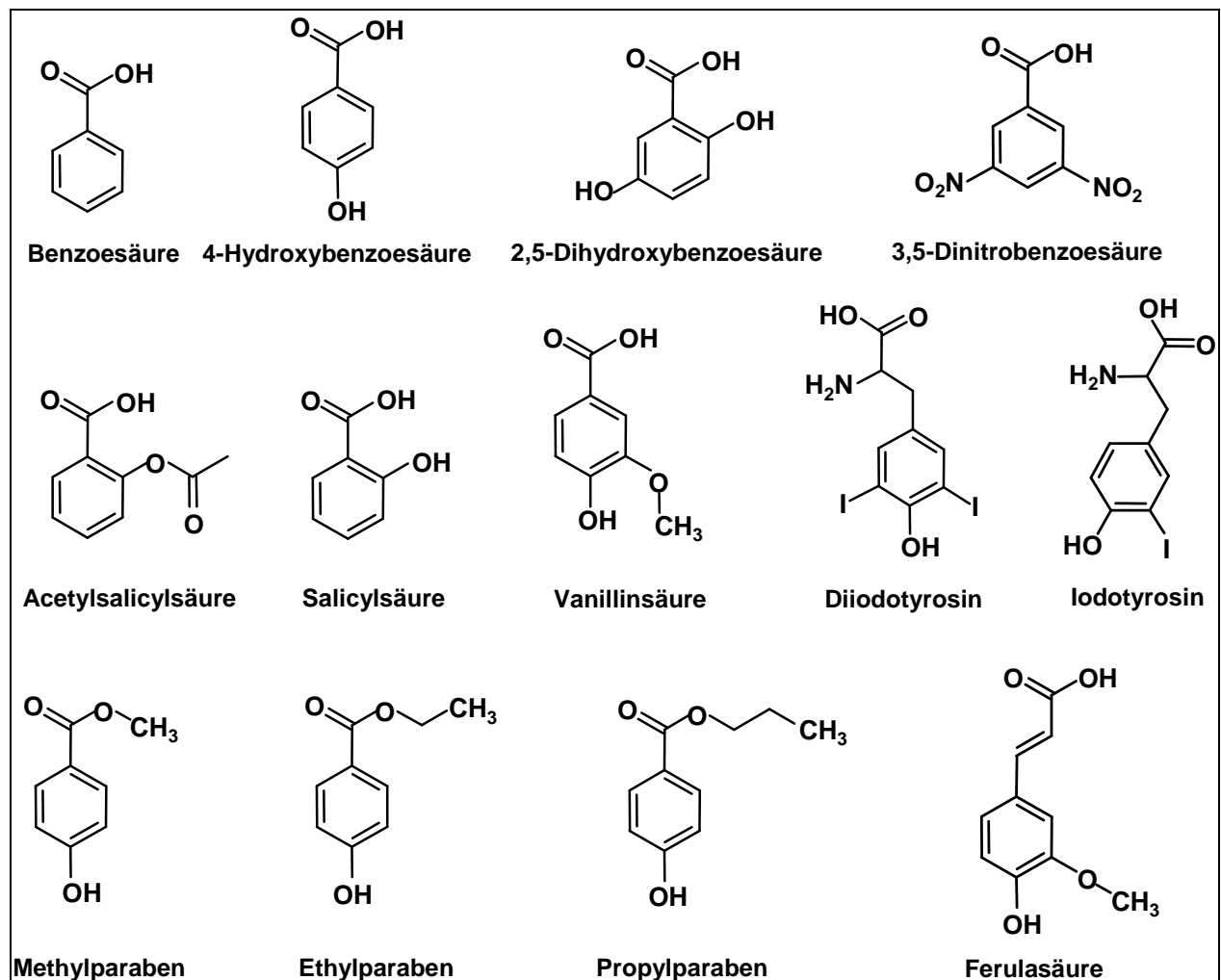
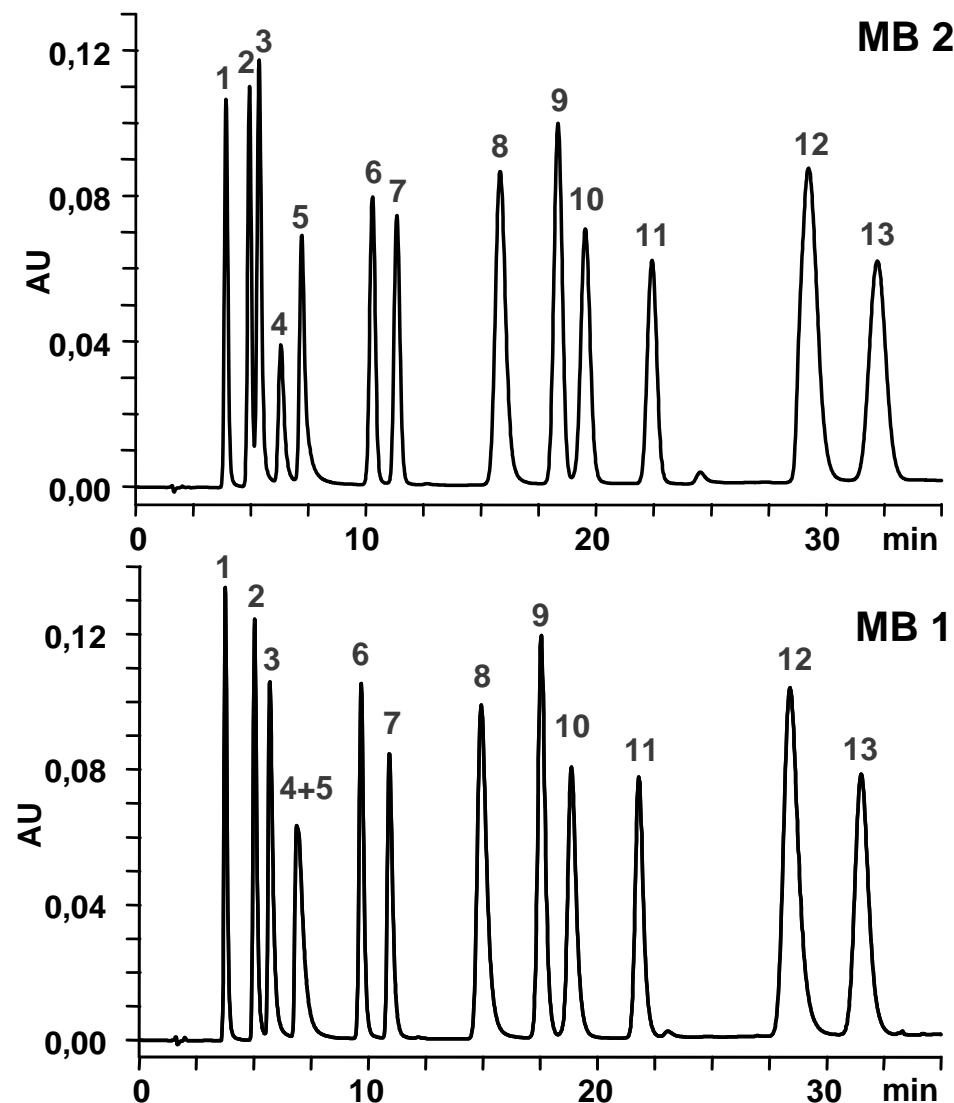


Abb. 6.4 Probengemisch der Benzoesäurederivate.





**Abb. 6.5** Trennung von Benzoessäure-Derivaten mittels Ionenaustauschchromatographie auf einer Säule des Masterbatch 1 (MB 1) und Masterbatch 2 (MB 2), 150 x 4,6 mm i.D. (Werte siehe Tab. 6.1). Gradient in 32 min von 0 - 150 mM NaCl in 50mM TRIS/HCl pH 7,0, 1 mL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 240 nm.

(1) 3-Iodo-L-Tyrosin, (2) Methylparaben, (3) Ethylparaben, (4) Propylparaben, (5) Acetylsalicylsäure, (6) Dinitrobenzoessäure, (7) Benzoessäure, (8) 3,5-Diiodo-L-Tyrosin, (9) 4-Hydroxybenzoessäure, (10) Vanillinsäure, (11) Salicylsäure, (12) Ferulasäure, (13) Dihydroxybenzoessäure.

Der Polyethylenimin-Anionenaustauscher ist zur Trennung der Benzoessäurederivate geeignet (Abb. 6.5). Auf dem Masterbatch 2 können alle dreizehn Substanzen in dem Salzgradienten in 35 min getrennt detektiert werden. Auf dem Masterbatch 1 hingegen co-eluieren Propylparaben und Acetylsalicylsäure (Peak 4 und 5, Abb. 6.5). Wie auch in vorhergehenden Messungen schon beobachtet, eluieren die Benzoessäurederivate auf dem Masterbatch 1 geringfügig früher, nur die Parabene eluieren später (vergl. Tab. 6.1). Daher scheinen sich beide Masterbatches in ihren Selektivitäten speziell in Bezug auf die Parabene zu unterscheiden. Dies deutet auf eine höhere hydrophobe Retention

des Masterbatch 1 hin, was auch in der CHN-Analyse (12,04 %C im MB 1 und 9,54 %C im MB 2, siehe Tab. 5.1, S. 82) bestätigt wird.

**Tab. 6.1 Retentionszeiten und Auflösungen der Benzoesäurederivate auf beiden Masterbatches. Chromatogramme siehe Abb. 6.5.**

Peak #	Substanz	Retentionszeiten [min] Mittelwerte aus drei Injektionen			Auflösung Mittelwerte aus drei Injektionen		
		Masterbatch 2	Masterbatch 1	Abweichung von MB 1 [%]	Peak-paar	Masterbatch 2	Masterbatch 1
1	3-Iodo-L-Tyrosin	3,95	3,75	5,00	1/2	3,40	4,92
2	Methylparaben	4,98	5,03	-0,99	2/3	1,25	2,10
3	Ethylparaben	5,39	5,70	-5,69	3/4	2,38	2,10
4	Propylparaben	6,35	6,93	-9,11	4/5	2,14	1,00
5	Acetylsalicylsäure	7,02	6,93	1,32	5/6	7,07	5,95
6	Dinitrobenzoesäure	10,06	9,73	3,29	6/7	2,25	3,19
7	Benzoesäure	11,13	10,98	1,30	7/8	6,81	6,84
8	3,5-Diiodo-L-Tyrosin	15,73	14,94	5,03	8/9	3,30	4,00
9	Hydroxybenzoesäure	18,22	17,61	3,34	9/10	1,64	2,12
10	Vanillinsäure	19,46	18,93	2,70	10/11	3,77	4,58
11	Salicylsäure	22,16	21,95	0,92	11/12	6,24	7,47
12	Ferulasäure	29,14	28,25	3,05	12/13	2,16	2,89
13	Dihydroxybenzoesäure	32,10	31,36	2,32			

In der Packungscharakterisierung zeigte sich, dass die hier verwendete Säule des Masterbatch 1 eine reduzierte Bodenhöhe von 2,8, die Säule des Masterbatch 2 hingegen von 4 erreicht. Daher sind auf dem Masterbatch 2 breitere Peaks zu beobachten, was eine Verringerung der Auflösung zweier Peaks zur Folge hat. In Tab. 6.1 sind die erreichten Auflösungen und Retentionszeiten für beide stationären Phasen gegenübergestellt (Chromatogramme siehe Abb. 6.5). Die Retentionszeiten des Masterbatch 1 weichen im Allgemeinen um maximal 5 % von denen des Masterbatch 2 ab.

Es kann zusammengefasst werden, dass die hier synthetisierten Anionenaustauscher auch für die Trennung komplexer Gemische kleinerer Moleküle durch Ionenaustauschchromatographie geeignet sind.

### 6.3. Trennung des Standardgemisches aus synthetischen Thyroxin-Derivaten

3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin oder auch Thyroxin ist eines der Schilddrüsenhormone, die im menschlichen Organismus produziert werden. Diese Hormone enthalten Iod, das mit der Nahrung aufgenommen werden muss. In so genannten iodarmen Regionen können verstärkt Mangelerscheinungen auftreten. Durch die Schilddrüse werden lebenswichtige Funktionen des menschlichen Organismus reguliert. Daher ist schon seit langer Zeit die Synthese der beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin (T<sub>4</sub>) und 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin (T<sub>3</sub>) notwendig. Die chemische Produktion dieser Wirkstoffe unterliegt strengen Regularien, die unter anderem auch Reinheitsuntersuchung einschließen. Hier soll als Beispiel für eine weitere Anwendung der Polyethylenimin-Phasen, ein reales Trennproblem in Form eines Standardgemisches aus Thyroxin-Derivaten (Strukturen siehe Abb. 6.6) getrennt werden. Der Problematik des verwendeten Standardgemisches und der Schilddrüsenhormon-Proben selbst wird in einem späteren Kapitel (Kapitel 3, S. 106 ff) größere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

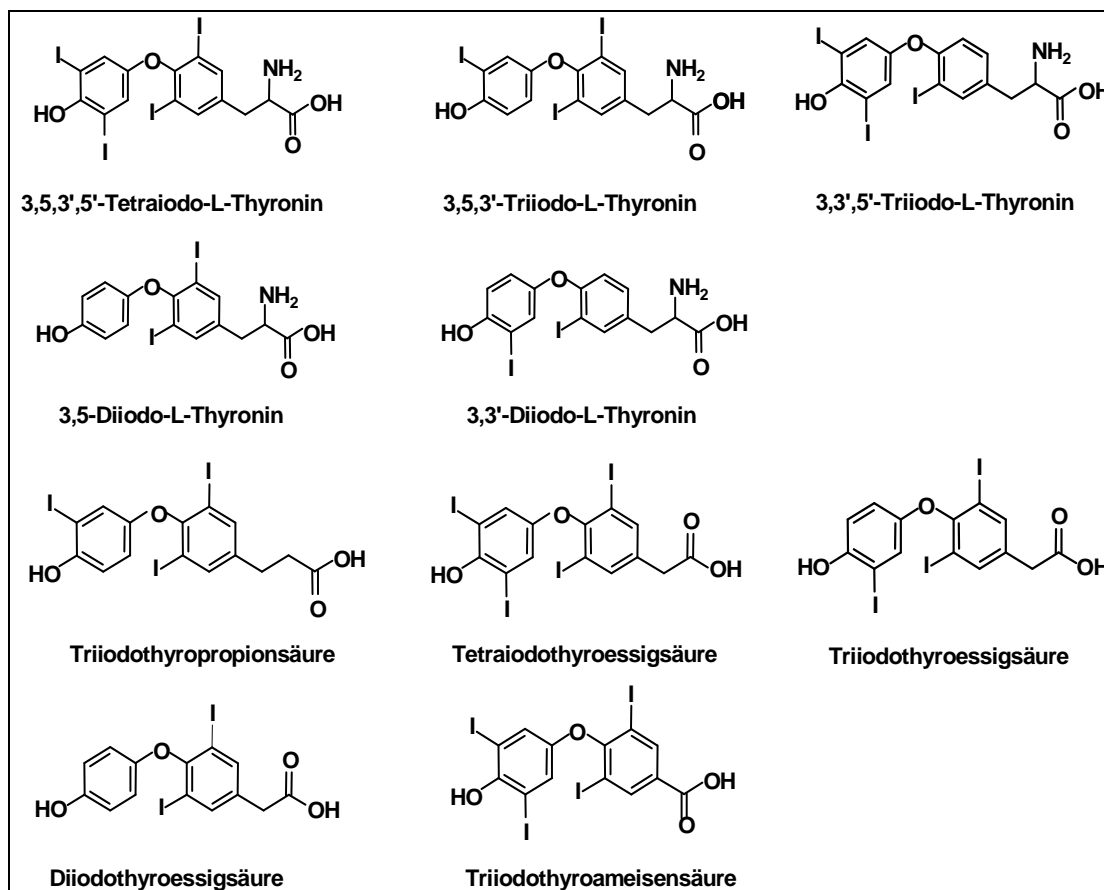
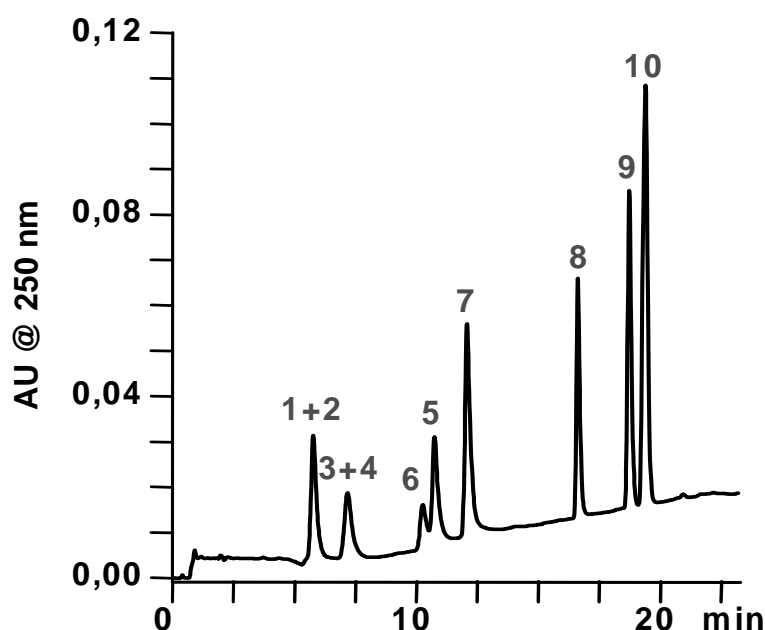


Abb. 6.6 Substanzen des verwendeten Standard aus Thyroxin-Derivaten.

Mit einem Acetonitril-Gradienten in Wasser, wobei beiden Eluenten jeweils 0,1 % Ameisensäure zugegeben wurde, war es möglich, acht von zehn Substanzen des Standardgemisches innerhalb von 20 min aufzutrennen (Abb. 6.7). Die Isomere des Diiodothyronin (3,5- und 3,3'-Diiodo-L-Thyronin) und Triiodothyronin (3,5,3'- und 3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin) können auf dem PEI-Anionenaustauscher nicht getrennt werden, weil sowohl Hydrophobie als auch Masse/Ladungsverhältnis dieser Substanzen sehr ähnlich sind.



**Abb. 6.7 Trennung des Standardgemisches aus Thyroxin-Derivaten auf einer Säule des Masterbatch 2.** 5 min isokratisch mit 5 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, Gradient in 20 min von 5 % bis 60 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % Ameisensäure

Der pH-Wert des Trennsystems lag durch die Ameisensäure, die den Eluenten als Additiv zugegeben wurde, bei 2,5 bis 3,0. Demnach könnte die Elution der Thyroxin-Derivate auch über Ionenaustausch erfolgen. Innerhalb der Hydrophobie-Untersuchung in Abschnitt 5.2.1 (S. 85) konnte jedoch gezeigt werden, dass T4 vor allem in Abhängigkeit des Organikgehaltes eluiert wird (Abb. 5.3). Diese Art der Elution wird in der Umkehrphasenchromatographie genutzt und basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase. Demnach könnte die Polyethylenimin-Phase auch als Umkehrphase eingesetzt werden. In einem späteren Abschnitt wird die Trennung des Standardgemisches mit anderer Problemstellung optimiert werden.

## 7. Zusammenfassung

Basierend auf den Arbeiten von Alpert und Regnier war es möglich, einen Anionenaustauscher durch Ummanteln (Coaten) von porösen Kieselgelteilchen herzustellen.

Es wurden der Einfluss des Polyethylenimingehtes und des Quervernetzergeshtes auf die theoretische und chromatographische Kapazität, wie auch auf den Massentransport verschiedener Trägermaterialien unterschiedlicher Porengrößen untersucht. Es stellte sich heraus, dass unter den hier gewählten Synthesebedingungen ein Ansatz mit 30 % Polyethylenimin und 15 % Ethandioldiglycidylether in methanolischer Lösung die besten Ergebnisse zeigt. Die erreichten Massentransporteigenschaften und Ionenaustauschkapazitäten dieser Polymerphasen sind mit denen kommerzieller Anionenaustauscher vergleichbar. Daher wurde versucht, die Synthese auf größeren Ansätzen zu reproduzieren, wobei leider nicht die vorher erreichten Kapazitäten erzielt wurden. Die Stabilität der entwickelten stationären Anionenaustauscher-Phase wurde bei pH-Werten von 7,0 und 3,0 bis 3,3 untersucht. Dabei zeigte sich, dass der obere pH-Bereich kritisch für die Kieselgelstabilität, aber nicht für das Coating ist. Im unteren pH-Bereich konnte eine hohe Stabilität (über 400 Betriebsstunden) gegenüber den hier gewählten Eluentenbedingungen beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Oberfläche des Anionenaustauschers mit einem Phosphatpuffer nach der Synthese aktiviert werden kann.

Bisher wurden die Polyethyleniminphasen hauptsächlich in der Protein- bzw. in der Oligonukleotidanalytik eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die PEI-Phasen für die Trennung organischer niedermolekulare Verbindungen sowie anorganischer Anionen geeignet sind. Neben den Eigenschaften als Ionenaustauscher konnten noch hydrophobe Wechselwirkungen festgestellt werden. Daher sind die in dieser Arbeit synthetisierten stationären Phasen für Trennungen im Normalphasenmodus, im Ionenaustauschmodus, aber auch im Umkehrphasenmodus geeignet.

# Kapitel 3

---

## **Strukturaufklärung von Abbauprodukten synthetischer Schilddrüsenhormone mittels Umkehrphasenchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie**

**„Die Masse an Auswahl garantiert nicht das Finden.“**

Damaris Wieser, deutsche Lyrikerin und Dichterin

## 1. Literaturüberblick und Zielsetzung

Schilddrüsenhormone beeinflussen wichtige Körperfunktionen, wie zum Beispiel den Sauerstoffverbrauch in den Zellen, den Energiestoffwechsel (Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen), die Funktion des Herz-Kreislauf-Systems und des Magen-Darm-Traktes. Diese Hormone beeinflussen auch Wachstums- und Differenzierungsvorgänge, wobei diese vor allem bei Neugeborenen die geistige Entwicklung einschließt.

Die natürliche Synthese der zwei iodhaltigen Schilddrüsenhormone Liothyronin (T3, Abb. 1.1) und Levothyroxin (T4, Abb. 1.1) erfolgt in der schmetterlingsförmigen Schilddrüse, die sich zu beiden Seiten der Luftröhre im Bereich des Kehlkopfs befindet.

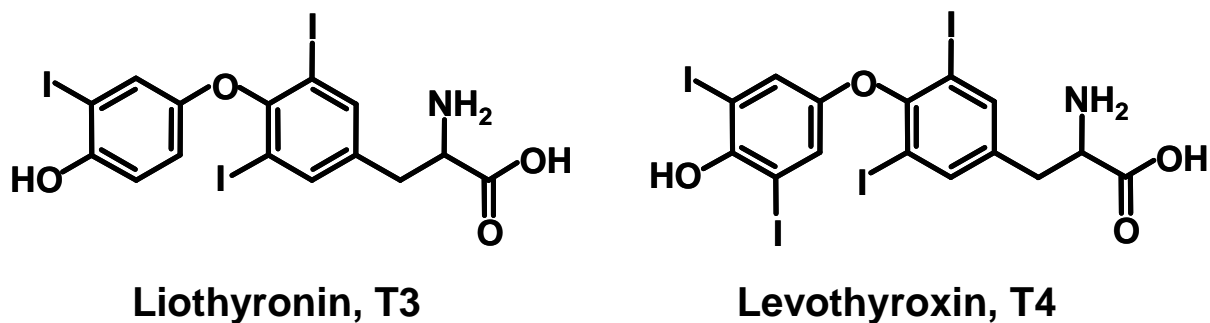


Abb. 1.1 Strukturen der zwei Schilddrüsenhormone.

Die vorrangig pharmakologisch wirksame Substanz ist Liothyronin (T3), die allerdings nur eine geringe Halbwertszeit besitzt. Der von der Schilddrüse hergestellte Depotstoff Levothyroxin (T4) ist unter physiologischen Bedingungen stabiler und wird bei Bedarf vom Körper in kurzer Zeit enzymatisch in das benötigte T3 umgewandelt.

Eine gesunde Schilddrüse gibt pro Tag etwa 10 µg T3 und 100 µg T4 ab. Die zwei Hormone werden durch Transportproteine im Organismus verteilt, so dass sich weniger als 1% der Hormone in freier Form im Blut befinden. Pharmakologisch aktiv sind nur die freien Formen, wobei T3 deutlich stärker wirksam ist als T4.

Wie zuvor schon erwähnt, handelt es sich im Falle der Hormone um iodhaltige Substanzen, worin sich auch die Notwendigkeit ihrer chemischen Synthese begründet. Iod ist ein essentielles Spurenelement, das nicht vom Körper produziert werden kann. Es muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Wie viele andere Länder weltweit, zählt auch Deutschland zu den so genannten Iodmangelgebieten. In diesen Gebieten treten oft Mangelerscheinungen auf, die auf eine Schilddrüsenunterfunktion

zurückgeführt werden können, und medikamentös behandelt werden müssen. Der tägliche Iodbedarf beträgt laut Deutscher Gesellschaft für Ernährung e.V. für Kinder und ältere Menschen 180 µg, für Jugendliche und Erwachsene mittleren Alters 200 µg. Um dieses Defizit auszugleichen, werden synthetisch hergestelltes Liothyronin und Levothyroxin oral verabreicht. Die technische Synthese der Schilddrüsenhormone ist schon seit Ende der Zwanziger Jahre bekannt [58-62].

Heute unterliegt die Synthese pharmazeutischer Wirkstoffe strengen Regularien (GMP, Good manufacturing practice). Durch Behörden werden für jeden Wirkstoff Randbedingungen festgelegt, die eingehalten werden müssen. Zum einen muss die Enantiomerenreinheit gewährleistet sein. Die erforderlichen analytischen Enantiomerentrennverfahren für Schilddrüsenhormone sind bereits mehrfach in der Vergangenheit realisiert worden [63-65].

Neben der Enantiomerenreinheit müssen auch Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden, wobei die einzelnen Wirkstoffe unter definierten Bedingungen gelagert aber auch gestresst werden. Ausgewertet werden dann unter anderem Abbauprofile, wobei zum einen die Abnahme des Wirkstoffgehaltes und zum anderen die Zunahme von Abbauprodukten relevant sind. Meist erfolgt diese Analyse mit Methoden, die speziell auf diese Trennproblematik hin entwickelt wurden.

Heutzutage kommen vorwiegend flüssigchromatographische Methoden, gekoppelt mit UV-Detektion (HPLC-UV) und, in neuerer Zeit, mit Massenspektrometrie (HPLC-MS) zum Einsatz. Dabei sind für die Schilddrüsenhormone sowohl Trennungen an hydrophoben C18-Umkehrphasen (RP) als auch an vergleichsweise polaren Nitrilphasen beschrieben. Darüber hinaus sind RP-HPLC-Methoden mittlerweile als robuste Methoden zur Qualitätskontrolle in einschlägigen Prüfvorschriften etabliert, so beispielsweise in der US Pharmacopeia [66] und der European Pharmacopoeia [67]. Von den zahlreichen Publikationen sind im Folgenden einige beispielhaft vorgestellt.

Won untersuchte 1992 an einer Cyanosilica-Phase das Abbauverhalten von Levothyroxin (T<sub>4</sub>) unter diversen Umgebungsbedingungen [68]. Levothyroxin wurde in Lösung und in Pulverform durch verschiedene pH-Werte und Temperaturen chemisch gestresst. Während Abbauprodukte allgemein durch Dünnschichtchromatographie (TLC) getrennt und unbekannte Spots nach Isolierung aus dem TLC-Material mittels Elektronenionisations-(EI)-MS und NMR-Spektroskopie charakterisiert wurden, entstanden Kinetikstudien zum Levothyroxinabbau mittels HPLC-UV bei einer Detektionswellenlänge von 225 nm. Dabei zeigte sich, dass Levothyroxin unter sauren



Bedingungen sehr viel schneller zum Abbau unter Iodabspaltung neigt als im alkalischen Milieu.

Andre, Domanig et al. führten 1996 ähnliche Studien mit Liothyronin (T3) durch [69]. Die HPLC-UV-Messungen wurden mittels einer Gradientenelution mit Triethylammoniumphosphat/Acetonitril bei pH 3 an einer Silica-C18-Phase durchgeführt. HPLC-MS-Messungen an derselben stationären Phase gelangen mit Wasser/Acetonitril-Gradienten mit Essigsäure zur pH-Einstellung unter Verwendung eines Thermospray-Interfaces. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte dabei im negativen Modus. Zur HPLC-MS-Auswertung zogen die Autoren bevorzugt das extrahierte Massenchromatogramm bei  $m/z$  254 heran, da alle iodierten Spezies mit mehr als zwei Iodatomen stets ein charakteristisches Fragment dieser Masse besaßen, was auf die Bildung von freiem Iod unter den gewählten Fragmentierungsbedingungen zurückgeführt wurde. Die Signalintensität des intakten Moleküls nahm mit steigender Zahl an Iodatomen ab. Die bei weitem am häufigsten beobachtete Fragmentierungsreaktion in der Gasphase war der Verlust ein oder mehrerer Iodatome als Iodwasserstoff oder molekulares Iod. Als dritte, jedoch schon deutlich seltener auftretende Fragmentierungsreaktion war eine Decarboxylierung der Aminosäure zu beobachten. Dieselben Reaktionstypen führen auch unter thermischer oder acider Belastung der Substanz zur Bildung chromatographisch trennbarer Nebenprodukte. Darüber hinaus konnten Abbauprodukte detektiert werden, deren Strukturvorschläge unter anderem eine oxidative Desaminierung zur Milchsäure oder eine Reduktion der Aminosäure bis hin zu Thyroethan nahelegen.

Ein deutlich empfindlicheres Detektionsprinzip zur Gehaltsbestimmung in Tabletten, bei dem allerdings jegliche Substanzinformation verloren geht, wählten Kannamkumarath et al. 2004, indem sie eine RP-HPLC-Methode an einer Nitrilphase mit induktivgekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) verbanden [70]. Zwar wird die Analytsubstanz bei der Ionisierung zerstört, die Messung der Iodatommassenspur erlaubt jedoch eine sehr selektive und zugleich hochempfindliche Detektion (Nachweisgrenze für T3 von  $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$  und für T4 von  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Die Analytik von Levothyroxin bzw. Liothyronin in biologischen Proben wie Humanserum ist eine andere Herausforderung. Hier ist nicht mehr, wie in der Reinheitskontrolle, die Basislinientrennung aller Analyten notwendig. Für Messungen des Schilddrüsenhormonspiegels in Humanproben ist die selektive Bestimmung des gewünschten Hormons von Interesse. 2000 berichteten Samanidou et al. [71] von einer

HPLC-UV-Methode zur Bestimmung von T3 und T4 in Blutserum und in Urin nach Anreicherung und Matrixentfernung durch Festphasenextraktion. Die erzielten Nachweisgrenzen bei 240 nm Detektionswellenlänge betragen 1 ng T3 bzw 2 ng T4. Diese Ergebnisse wurden 2005 dahingehend verbessert, dass in einem chromatographischen Lauf mehr Analyten von Interesse (T0 – T4, Diiodotyrosin, Tyrosin u.a.) getrennt werden können und durch eine verbesserte SPE-Probenvorbereitung die Nachweisgrenzen signifikant verringert werden konnten (z.B. auf 0,02 ng L<sup>-1</sup> T4 in Serum und Urin ) [72].

Tai, Bunk et al. entwickelten 2004 eine Referenzmethode zur quantitativen Bestimmung von Liothyronin in Humanserum unter Verwendung von Tandem-Massenspektrometrie [73]. Nach Anreicherung und Extraktion von T3 aus Serum mittels SPE erfolgte die Substanztrennung an einer C18-Phase im Wasser/Methanol-Gradienten und anschließender Detektion nach Elektrosprayionisierung im positiven Modus und *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) und Quantifizierung unter Einbeziehung der Isotopenverdünnungsanalyse.

Aufgabe dieser Arbeit war die Identifizierung von unbekanntem Abbauprodukten der synthetischen Schilddrüsenhormone, die zuvor teilweise starkem thermischen Stress ausgesetzt wurden. Durch diese Stressung sollten die Konzentrationen möglicher relevanter Abbauprodukte in kürzester Zeit stark erhöht werden, um für eine HPLC-MS-Analyse in der Probe ausreichend konzentriert vorzuliegen.

Ziel war es zunächst, eine bereits bestehende HPLC-UV-Methode zur Reinheitskontrolle in eine mit der Massenspektrometrie kompatible HPLC-Methode zu transferieren. Dies erfordert insbesondere die Umstellung auf mit der Massenspektrometrie kompatible Eluenten, ohne eine signifikante Umkehr in der Elutionsreihenfolge der Analyten und Verschiebungen der Retentionszeiten hervorzurufen. Durch die Kopplung der entwickelten HPLC-UV-Methode mit der Flugzeitmassenspektrometrie sollten plausible Strukturvorschläge für möglichst alle detektierten Peaks im Massenchromatogramm ausgearbeitet werden.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1. Geräte und Instrumente

Alle HPLC-Trennungen wurden auf einem binären Hochdruckgradientensystem HP1100, bestehend aus einer Pumpe G1312A, einem Entgaser G1322A, einem Festwellenlängendetektor G1314A mit Semi-Micro-Cell (5  $\mu$ L Zellvolumen) und einem Autosampler G1313A, durchgeführt. Als Steuerungssoftware und zur Datenauswertung wurde Chromeleon™ der Vers. 6.70 verwendet. Dieses HPLC-System wurde mit den entsprechenden Massenspektrometern gekoppelt. Dabei handelt es sich zum einen um eine Quadrupol-Ionenfalle des Typs Esquire-HCT der Firma Bruker Daltonics. Für dieses Massenspektrometer wurden die Elektrosprayionisierung (ESI) sowie die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) eingesetzt. Die Datengenerierung erfolgte mit der Steuerungssoftware Bruker Daltonics Control der Version 5.1 und die Datenauswertung mit Bruker Daltonics Data Analysis der Version 3.1. Die Detektion mit der Flugzeitmassenspektrometrie (TOF-MS) wurde mit einem micrOTOF der Firma Bruker Daltonics durchgeführt. Für dieses Gerät stand nur die Ionisierung über Elektrospray zur Verfügung. Die Datengenerierung erfolgte hier über die Steuerungssoftware micrOTOF control der Version 1.0 (Bruker Daltonics). Die Datenauswertung der Systemtests erfolgte mit Data Analysis Version 3.3 (Bruker Daltonics). Die Auswertung der Massenspektren der gestressten Proben erfolgte mit Data Analysis Version 4.0 alpha (Bruker Daltonics).

### 2.2. verwendete Chemikalien und Probenvorbereitung

Methanol und Acetonitril (HPLC, gradient grade) waren von Sigma Aldrich. Wasser wurde einer Reinstwasseranlage Modell Pure Lab Genetic Ultra von Elga entnommen. Essigsäure Suprapur® 100 %, Ameisensäure 98-99 % (p.a.) und Natriumhydroxid (p.a.) wurden bei Merck, Kaliumdihydrogenphosphat und Ammoniumacetat bei Fluka bestellt. 3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin (r-T3), 3,5,3'-Triiodothyropropionsäure (TriProp) wurden bei Sigma Aldrich bestellt. 3,5-Diiodo-L-Thyronin (T2), 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin (T3), 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin (T4), 3,5-Diiodothyroessigsäure (DiAc), 3,5,3'-Triiodothyroessigsäure (TriAc), 3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure (TetraAc) und 3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure (TetraFA) wurden von Peptido GmbH synthetisiert. Das Standard- bzw. Referenzgemisch (Abb. 2.1, Tab. 2.1) wurde von

Peptido GmbH als 300 bis 500 ppm ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Stammlösung in einer alkalischen Methanollösung (400 mg Natriumhydroxid in 500 mL Wasser + 500 mL Methanol) zur Verfügung gestellt.

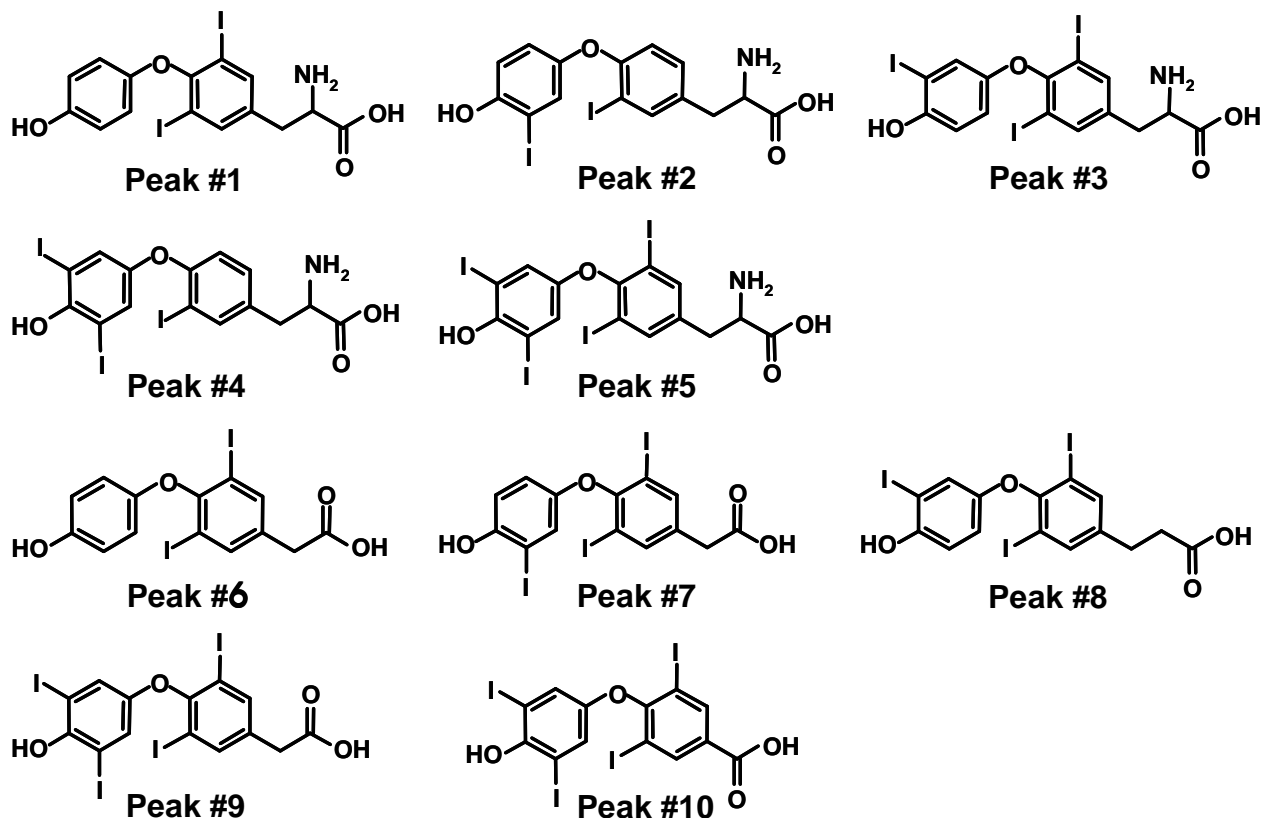


Abb. 2.1 Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung. (weitere Informationen Tab. 2.1)

Tab. 2.1 Übersicht der Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung und deren monoisotopischen  $[\text{M-H}]^-$ -Spezies. Strukturen sind in Abb. 2.1 dargestellt.

Peak #	Referenzsubstanzen	verwendete Abkürzung	theoretische monoisotopische Masse der $[\text{M-H}]^-$ -Spezies
1	3,5-Diiodo-L-Thyronin	T2	523,886117
2	3,3'-Diiodo-L-Thyronin	r-T2	523,886117
3	3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin	T3	649,782760
4	3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin	r-T3	649,782760
5	3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin	T4	775,679403
6	3,5-Diiodothyroessigsäure	DiAc	494,859568
7	3,5,3'-Triiodothyroessigsäure	TriAc	620,756211
8	3,5,3'-Triiodothyropropionsäure	TriProp	634,771861
9	3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure	TetraAc	746,652854
10	3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure	TetraFA	732,637204

Die Probenvorbereitung erfolgte für alle Proben gleich. Für die Stammlösung wurden jeweils  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  eingewogen und in einer alkalischen Methanollösung (400 mg Natriumhydroxid in 500 mL Wasser + 500 mL Methanol) gelöst. Für die HPLC-Messungen wurden das Standardgemisch wie auch die Stammlösung der Proben 1:10 in Eluent A/B (30:70, v:v) verdünnt. Eine nähere Erläuterung der in dieser Arbeit verwendeten Proben ist in Tab. 2.2 aufgelistet. Die Proben wurden von der Peptido GmbH, Bexbach thermisch gestresst und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

**Tab. 2.2. Übersicht aller Proben, die in dieser Arbeit verwendet wurden, deren nähere Erläuterungen und Abkürzungen.**

	Verwendung	Kurze Beschreibung
T4	Kalibrierung der Massenachse, Einstellung der Geräteparameter	ungestresst und nicht verunreinigt
	Strukturaufklärung möglicher Abbauprodukte	gelagert bei 40°C für 6 Monate, danach für 1h bei 60°C im Trockenschrank
T3	Kalibrierung der Massenachse, Einstellung der Geräteparameter	ungestresst
T2	Kalibrierung der Massenachse, Einstellung der Geräteparameter	ungestresst

### 2.2.1. Bezugsnachweis

Nähere Informationen zu den Herstellern verwendeter Chemikalien und Instrumente sind nachfolgend aufgelistet.

**Tab. 2.3 Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien und Instrumente.**

Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	Deisenhofen	Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deisenhofen	Deutschland
Merck KgaA	Darmstadt	Deutschland
Fisher Scientific	Schwerte	Deutschland
Riedel de Haën (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	Deisenhofen	Deutschland
Peptido GmbH	Bexbach	Deutschland
Grace-Vydac	Worms	Deutschland
Bruker Daltonics	Bremen	Deutschland
YMC	Kyoto	Japan

### 2.3. Verwendete Säulenhardware und Instrumente

Die HPLC-MS-Messungen zur Strukturaufklärung wurden auf dem HP1100-microTOF-System durchgeführt. Für diese Trennungen wurde eine YMC-Pack Pro C18, 150 x 1 mm i.D. Säule, die mit 3  $\mu\text{m}$ -120 Å Partikeln durch Grace-Vydac gepackt wurde, verwendet. Die Vorversuche zur Ionisierung wurden auf einer YMC-Pack Pro C18, 150 x 4,6 mm mit 5  $\mu\text{m}$ -120 Å-Partikeln von YMC durchgeführt.

### 2.4. Verwendete HPLC-Methoden

#### 2.4.1. Herstellen der verwendeten Eluenten

Das verwendete Eluentensystem für die Standard-HPLC-Methode setzte sich aus 4,5 mM Phosphatpuffer (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) zusammen. Zur Herstellung des 4,5 mM Phosphatpuffers (pH 2,0-2,5) wurden 135  $\text{mg L}^{-1}$  Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) und 250  $\mu\text{L L}^{-1}$  85 %ige Phosphorsäure in Wasser gelöst.

Für die entwickelte Ameisensäuremethode wurden Wasser als mobile Phase A und Acetonitril als mobile Phase B verwendet. Beiden Eluenten wurden jeweils 0,1 Vol% Ameisensäure zugegeben.

Für die APCI-Messungen wurde zusätzlich eine Ammoniumacetatmethode, unter Verwendung von 10 mM Ammoniumacetat (pH 6,5-7,0) als Eluent A und reinem Acetonitril als Eluent B, eingesetzt.

Alle verwendeten Eluenten wurden jeweils für 15 min im Ultraschallbad entgast.

#### 2.4.2. Verwendeter Gradient für alle HPLC-Messungen

Für alle HPLC-Messungen wurde das gleiche Gradientenprogramm eingesetzt. Nur die Flussrate wurde dem verwendeten Säulendurchmesser angepasst. Für einen Säuleninnendurchmesser von 4,6 mm wurden 900  $\mu\text{L min}^{-1}$  und für einen 1,0 mm-Durchmesser 50  $\mu\text{L min}^{-1}$  verwendet. Das eingesetzte Gradientenprogramm ist nachfolgend aufgelistet:

Tab. 2.4 Gradientenprogramm der HPLC-Messungen

Zeit [min]	Eluent B [%]	Temperatur
0,00 bis 5,00	30	Raumtemp.
bis 42,00	70	Raumtemp.
bis 57,00	70	Raumtemp.
bis 59,00	30	Raumtemp.
bis 65,00	30	Raumtemp.

## 2.5. HPLC-MS-Methoden

Die Kopplung des HPLC-Systems mit dem Massenspektrometer wurde über einen passiven Fluss-Split über ein T-Stück und Druckabfallkapillaren realisiert. Die 4,6 mm i.D.-Säulen arbeiten bei einem Fluss von  $900 \mu\text{L min}^{-1}$ . Dieser Fluss wurde nach dem UV-Detektor auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  ins Massenspektrometer gesplittet.

Für die Messungen mit der 1,0 mm-i.D.-Säule wurde der Detektorausgang direkt mit dem Massenspektrometer verbunden. Der Hauptfluss von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  wurde zwischen Pumpe und Injektionsventil über einen passiven Flusssplit auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  Säulenfluss gesplittet.

Für die Kopplung mit dem Ionenfallenmassenspektrometer erfolgten alle HPLC-Trennungen auf einer Säule mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm. Vor dem Flugzeitmassenspektrometer erfolgten die Trennungen auf einer 1,0 mm-Säule.

Die Bedingungen für die einzelnen HPLC-Messungen wurden bereits in Kapitel 2.4 näher beschrieben. In diesem Kapitel wird daher nur auf die Bedingungen der massenspektrometrischen Detektion eingegangen.

### 2.5.1. HPLC-negativ-ESI-MS mit der Ameisensäuremethode

Die Detektion mit der negativen Elektrosprayionisierung erfolgt in einem Masse-zu-Ladungsbereich ( $m/z$ -Bereich) von 100 bis 2000  $m/z$  für die Ionenfallenmassenspektrometrie und 300 bis 2000  $m/z$  für die Flugzeitmassenspektrometrie.

Die Geräteparameter der Ionenfalle wurden durch Direktinfusion einer  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Thyroxin-Lösung in Wasser/Acetonitril (70/30, v/v) mit 0,1 Vol% Ameisensäure auf maximale Signalintensität des Masse-zu-Ladungsverhältnisses 775,7 ( $m/z$ ) des deprotonierten T4 optimiert.

Die Geräteparameter des Flugzeitmassenspektrometers wurden durch Direktinfusion eines Gemisches aus T4, T3 und T2 mit jeweils  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  in Wasser/Acetonitril

(70/30, v/v) mit 0,1 Vol% Ameisensäure auf maximale Signalintensität der einfach deprotonierten Ionen bei  $m/z$  775,6794,  $m/z$  649,7832 und  $m/z$  523,8969 optimiert.

### **2.5.2. HPLC-neg/posAPCI-MS mit der Ameisensäuremethode**

Für die APCI-Ionisierung wurde der Detektorausgang direkt mit dem Massenspektrometer verbunden. Daher erfolgte die Detektion im APCI-Modus bei  $900 \mu\text{L min}^{-1}$  in einem Bereich von 100 bis 2000  $m/z$ . Die Geräteparameter des Ionenfallenmassenspektrometers wurden durch Direktinfusion einer  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Thyroxin-Lösung in Wasser/Acetonitril (70/30, v/v) mit 0,1 Vol% Ameisensäure auf maximale Signalintensität des  $m/z$  775,7 des deprotonierten Ions und  $m/z$  777,6 des protonierten Ions optimiert.

### **2.5.3. HPLC-neg/posAPCI-MS mit der Ammoniumacetatmethode**

Auch hier erfolgte die Detektion im APCI-Modus bei  $900 \mu\text{L min}^{-1}$  in einem Bereich von 100 bis 2000  $m/z$ . Bei dieser Flussrate wurde der Detektorausgang direkt mit dem Massenspektrometer verbunden. Die Geräteparameter des Ionenfallenmassenspektrometers wurden durch Direktinfusion einer  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Thyroxin-Lösung in 10 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (70/30, v/v) auf maximale Signalintensität 775,7  $m/z$  des deprotonierten Ions und 777,6  $m/z$  des protonierten Ions optimiert.



### 3. Transfer der Phosphatpuffermethode zwischen den zwei Laboratorien

Zunächst musste die von Peptido für die Qualitätskontrolle der Wirkstoffe verwendete Phosphatpuffermethode auf das in dieser Arbeit verwendete HPLC-System übertragen werden. Dies ist relevant, da unbekannte Peaks in den detektierten UV-Chromatogrammen der Peptido GmbH in Saarbrücken identifiziert und zugeordnet werden sollen. Daher soll nun gezeigt werden, dass die erzielten Retentionszeiten eines Standardgemisches beider verwendeter HPLC-Systeme miteinander korrelieren. Dafür können unter anderem relative Retentionszeiten genutzt werden. Relative Retentionszeiten sind unabhängig von dem verwendeten HPLC-System, wenn das gleiche Phasenmaterial verwendet wird. Die detektierten Retentionszeiten der Analyten ( $t_{R \text{ Analyt}}$ ) werden auf die Retentionszeit eines bekannten Analyten ( $t_{R \text{ Bezug}}$ ) normiert und so in relative Retentionszeiten ( $t_{R \text{ rel}}$ ) umgewandelt.

#### Formel 23 Bestimmung relativer Retentionszeiten

$$t_{R \text{ rel}} = \frac{t_{R \text{ Analyt}}}{t_{R \text{ Bezug}}}$$

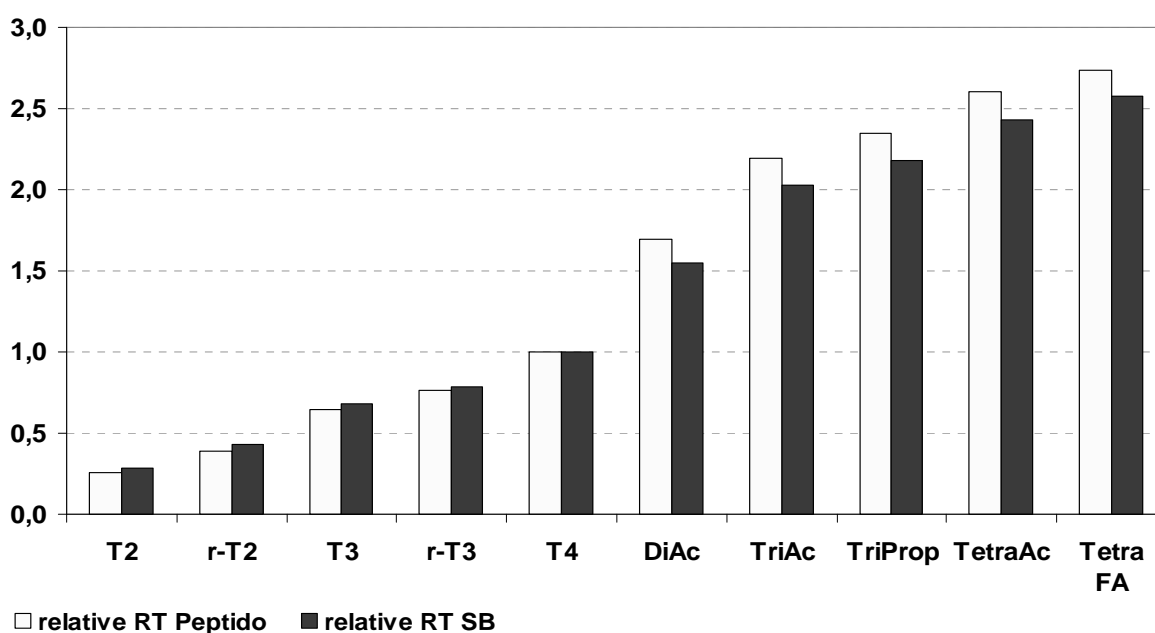
Um die in Saarbrücken detektierten Peaks mit denen der Peptido GmbH vergleichen zu können, wurde die Phosphatpuffermethode in Saarbrücken auf dem HP 1100-System wiederholt. Die Trennungen wurden auf einer YMC C18 Pro Säule mit 4.6 mm i.D. und 5  $\mu\text{m}$  Partikeln mit dem Gemisch der zehn Standardsubstanzen nachgestellt. Die relativen und die absoluten Retentionszeiten aus Saarbrücken (SB) sind in nachfolgender Tab. 5.1 denen von Peptido gegenüberstellt.

Es sind kleinere Unterschiede innerhalb der relativen Retentionszeiten, welche auf T4 bezogen wurden, erkennbar, die für Substanzen, die im linearen Gradienten eluieren, größer sind (Abb. 3.1). Dies kann auf die zwei verschiedenen Gradientensysteme zurückgeführt werden. In Saarbrücken wurde ein Hochdruckgradientensystem, bei Peptido dagegen ein Niederdruckgradientensystem verwendet. Wenn die relativen Retentionszeiten auf das später eluierende TetraAc bezogen werden (Tab. 5.1), sind die Abweichungen der relativen Retentionszeiten für die im Gradienten eluierenden Substanzen geringer.

Zusammenfassend betrachtet, ist die Phosphatpuffermethode mit einer mittleren relativen Standardabweichung von 5 % innerhalb der zwei Laboratorien übertragbar.

**Tab. 3.1. Gegenüberstellung der Retentionszeiten und relativen Retentionszeiten des Standardgemisches bezogen auf T4 mit der Phosphatpuffermethode in Saarbrücken (SB) und von Peptido.** Bedingungen für Saarbrücken: YMC C18 Pro 150 x 4.6 i.D.; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer pH 2.0 - 2.5, Gradient von 30-70 % Acetonitril in 38 min, 900 µL min<sup>-1</sup>; UV @ 225 nm. (Strukturen siehe Abb. 2.1)

Substanz		Retentionszeiten [min]		relative Retentionszeiten bezogen auf T4		relative Retentionszeiten bezogen auf TetraAc	
		Peptido	SB	Peptido	SB	Peptido	SB
T2	3,5-Diiodo-L-Thyronin	3,26	3,89	0,27	0,25	0,10	0,12
r-T2	3,3'- Diiodo-L-Thyronin	4,99	6,08	0,43	0,39	0,15	0,18
T3	3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin	8,31	9,96	0,70	0,65	0,25	0,28
r-T3	3,3',5'- Triiodo-L-Thyronin	9,81	11,31	0,79	0,77	0,29	0,32
T4	3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin	12,81	14,27	1,00	1,00	0,38	0,41
DiAc	3,5-Diiodothyroessigsäure	21,69	22,24	1,56	1,69	0,65	0,64
TriAc	3,5,3'-Triiodothyroessigsäure	28,10	28,70	2,01	2,19	0,84	0,83
TriProp	3,5,3'-Triiodothyropropionsäure	30,11	30,70	2,15	2,35	0,90	0,90
TetraAc	3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure	33,40	34,17	2,40	2,61	1,00	1,00
Tetra FA	3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure	35,09	36,39	2,55	2,74	1,05	1,06



**Abb. 3.1 Gegenüberstellung der relativen Retentionszeiten (relative RT) bezogen auf die Retentionszeit von T4 des Standardgemisches in der Phosphatpuffermethode in Saarbrücken (SB) und von Peptido.** Bedingungen für Saarbrücken: YMC C18 Pro 150 x 4.6 i.D.; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer pH 2.0 - 2.5, Gradient von 30-70 % Acetonitril in 38 min, 900 µL min<sup>-1</sup>; UV @ 225 nm.

## 4. Einfluss verschiedener Ionisierungsmodi

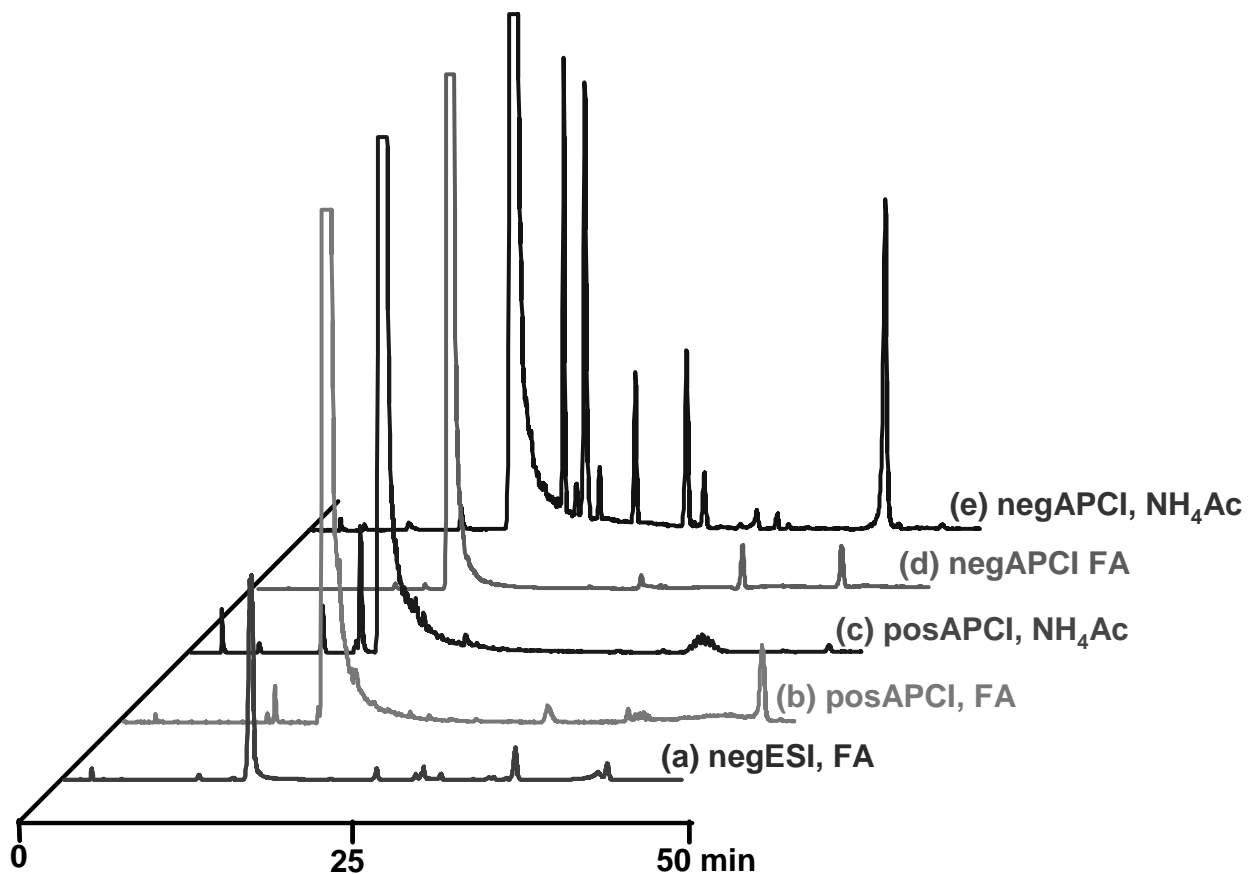
In diesem Abschnitt soll untersucht werden, inwieweit die Analyten in den Schilddrüsenhormonproben mittels Massenspektrometrie detektiert werden können. Zunächst wurde überprüft, unter welchen Bedingungen diese Analyten die höchsten Intensitäten im Massenspektrum und Massenchromatogramm aufweisen.

Mittels Massenspektrometrie können Analyten protoniert im positiven Modus oder deprotoniert im negativen Modus detektiert werden. Die Schilddrüsenhormone bzw. deren Abbauprodukte sind ganz allgemein betrachtet phenolische Verbindungen, die in beiden Modi detektiert werden können. Im Falle der vorliegenden Analyten handelt es sich überwiegend um mittel- bis unpolare Substanzen, wodurch diese mittels Elektrosprayionisierung (ESI) und chemischer Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) detektiert werden können.

In diesem Abschnitt werden die Empfindlichkeit und Effizienz der ESI und APCI im positiven und negativen Modus untersucht, speziell die Signalintensität und das Hintergrundrauschen. Bei ersten Vorversuchen konnte mittels positiver Elektrosprayionisierung nicht das vollständige Peakspektrum der Proben detektiert werden (hier nicht gezeigt). Daher wird im Folgenden die positive ESI nicht weiter betrachtet.

Für das Ionenfallenmassenspektrometer standen eine APCI- und eine ESI-Quelle zur Verfügung. Daher wurde das HP1100-System mit der Ionenfalle (HCT, Bruker Daltonics) gekoppelt, um den Einfluss der verschiedenen Ionisierungsmodi auf die Massendetektion der Schilddrüsenhormone und Abbauprodukte zu untersuchen. Es wurde die Wirkung von 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure auf die Massendetektion im negativen und positiven APCI- und im negativen ESI-Modus untersucht. Die detaillierten Bedingungen sind in den Abschnitten 2.4 (S. 114) und 2.5 (S. 115) beschrieben. Zum Zeitpunkt dieser Studie stand das Gemisch der zehn Standardsubstanzen noch nicht zur Verfügung. Daher wurden diese Untersuchungen mit einer Thyroxin-Probe (T4-Probe) durchgeführt. Die Basispeakchromatogramme der T4-Probe unter den einzelnen Ionisierungsmodi sind in Abb. 4.1 gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass Thyroxin mit 95 % bis 99 % den Hauptanteil der Wirkstoffprobe darstellt. Jedoch sind die zum Teil unbekanntes und geringer konzentrierten Neben- bzw. Abbauprodukte für die nachfolgenden Strukturaufklärungen relevant. Abb. 4.1 demonstriert, dass die hier untersuchten Ionisierungsmodi mit den einzelnen HPLC-Methoden kompatibel sind. Die

höchsten Intensitäten in den Basispeakchromatogrammen konnte mittels negativer APC-Ionisierung mit Ammoniumacetat als HPLC-Eluent beobachtet werden.



**Abb. 4.1 Vergleich von APCI und ESI für die massenspektrometrische Detektion.**

YMC C18 Pro 150 x 4.6 mm i.D.; isokratische Elution für 5 min mit 30 % Acetonitril in (a), (b), (d) Wasser mit 0,1% Ameisensäure (FA), (c), (e) 10 mM Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac), pH 7,0. danach Elution innerhalb eines Gradienten von 30-70 % Acetonitril (c), (e) bzw. Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure (a), (b), (d) in 38 min, 900  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; negative-ESI- (a), negative APCI- (d), (e) positive APCI-Detektion (b), (c), m/z 400-2000. HP1100/Esquire HCT.

Beim näheren Betrachten der Signal-zu-Rauschen-Werte in den detektierten Massenspektren werden durch Ammoniumacetat im HPLC-Eluentensystem im positiven wie auch im negativen APCI-Modus die größten Werte erzielt (Abb. 4.2). Es wurden hier repräsentativ nur zwei m/z-Werte von Probennebenkomponenten mit geringerer Konzentration dargestellt, welche aber die Tendenz des gesamten Probenspektrums widerspiegeln. Demnach scheint eine APCI unter 10 mM Ammoniumacetat die empfindlichere Ionisierungsmethode für diese Analyten zu sein.

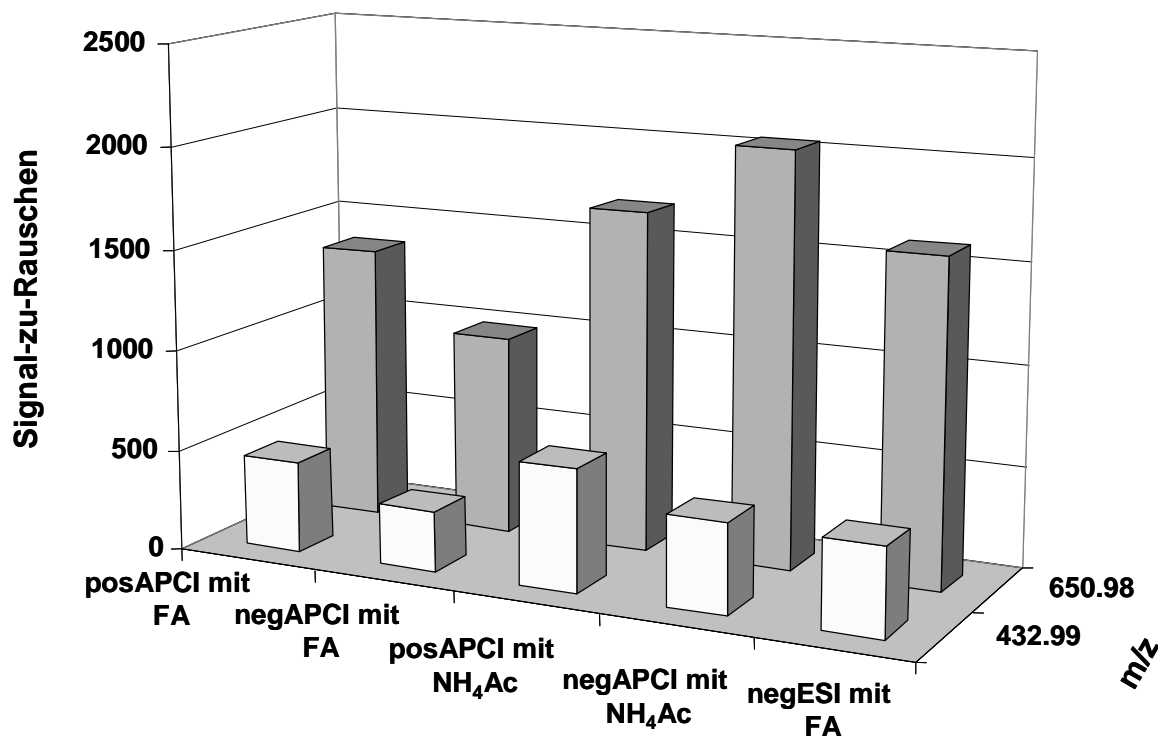


Abb. 4.2 Gegenüberstellung der Signal-zu-Rauschen-Werte von ausgewählten  $m/z$  bei verschiedenen Ionisierungsmodi (APCI und ESI) in detektierten Massenspektren. Daten aus Messungen von Abb. 4.1.

In dieser Arbeit sollte die Strukturaufklärung der unbekanntes Probennebenprodukte mit Hilfe der exakten Massenmessungen erfolgen. Dies kann mit einem Flugzeitmassenspektrometer realisiert werden. Jedoch stand für das in dieser Arbeit verwendete micrO-TOF von Bruker keine APCI-Quelle zur Verfügung. Im Basispeakchromatogramm ( Abb. 4.1) scheint die Elektrosprayionisierung die geringsten Intensitäten aufzuweisen. Der Wirkstoffpeak wird jedoch auch nicht so stark überladen detektiert, wodurch Nebenprodukte nicht durch den Hauptpeak überlagert werden. Weiterhin sind die unter ESI ermittelten Signal-zu-Rauschen-Werte vergleichbar mit denen der APCI (Abb. 4.2).

## 5. Übertragung der Phosphatpuffermethode auf die MS-kompatible Ameisensäuremethode

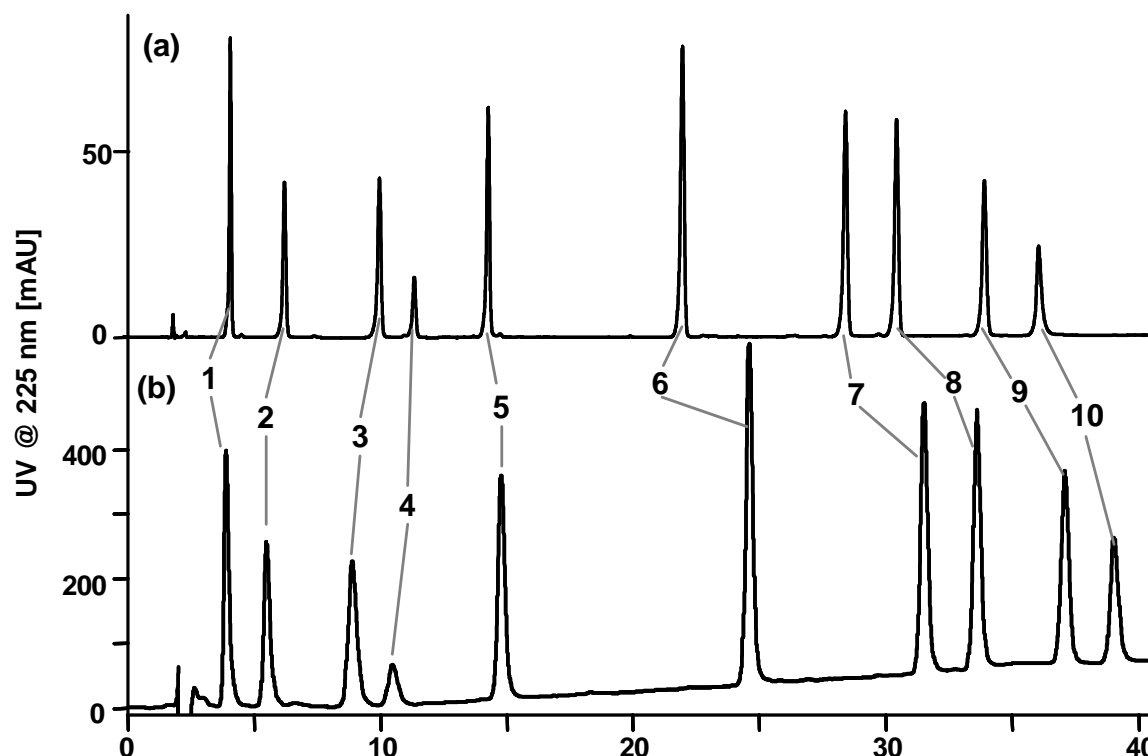
Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Analyten unter Elektrospray (ESI) wie auch chemischer Ionisierung (APCI) unter Atmosphärendruck ionisiert und im negativen mittels APCI auch im positiven Modus detektiert werden können.

Die Zuordnung möglicher Strukturen soll mittels der Flugzeitmassenspektrometrie erfolgen. In dieser Arbeit stand ein micrOTOF von Bruker zur Verfügung, wofür aber keine APCI-Quelle vorhanden war. Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die negative Elektrosprayionisierung mit einem Wasser/Acetonitril-Eluentensystem versetzt mit Ameisensäure mit APCI vergleichbare Signal-zu-Rauschen-Werte erreicht. Zusätzlich wird durch die ESI der Wirkstoffpeak nicht so stark überladen detektiert, wodurch Nebenprodukte nicht durch den Hauptpeak überlagert werden. Daher wird nun die Phosphatpuffermethode auf die Ameisensäuremethode übertragen, um exakte Massen mit der negativen ESI-Flugzeitmassenspektrometrie zu detektieren. Die Übertragung der Methode ist nötig, da Phosphatpuffer mit der Massenspektrometrie nicht kompatibel ist.

Um die Methode zu transferieren, wurde das Gradientenprogramm beibehalten und nur das Eluentensystem geändert. Das ursprüngliche Eluentensystem enthält neben Acetonitril als organische Komponente 4,5 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert zwischen 2,0 und 2,5. Innerhalb der neuen MS-kompatiblen HPLC-Methode wird ein Wasser/Acetonitrilgradient verwendet, wobei beide Eluenten mit jeweils 0,10 Vol% Ameisensäure versetzt wurden. Weiterhin wurde der innere Durchmesser der Trennsäule von 4,6 mm auf 1,0 mm verringert, wodurch der Fluss von ursprünglich  $900 \mu\text{L min}^{-1}$  auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  reduziert werden musste, um bei vergleichbarer Lineargeschwindigkeit zu arbeiten. Um diesen Fluss über die Trennsäule zu realisieren, wurde über einen passiven Flussplit der Hauptfluss von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  bereits zwischen Pumpe und Injektionsventil auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  gesplittet. Auf Grund des reduzierten Säulenflusses ist nun eine direkte Verbindung des Detektorausganges mit dem Massenspektrometer möglich.

Zunächst wurde überprüft, inwieweit die Phosphatpuffermethode auf die Ameisensäuremethode übertragen werden kann. Dafür wurde das Gemisch der zehn Standardsubstanzen mittels der zwei Eluentensysteme aufgetrennt (Abb. 5.1),

anschließend wurden die resultierenden absoluten und relativen Retentionszeiten verglichen (Tab. 5.1).



**Abb. 5.1** Gegenüberstellung einer Trennung des Standardgemisches mit der Phosphatpuffermethode (a) und der Ameisensäuremethode (b). (a) YMC C18 Pro 150 x 4,6 i.D.; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer pH 2,0 – 2,5, Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 38 min, 15 µL inj., 900 µL min<sup>-1</sup>; (b) YMC C18 Pro 150 x 1 mm; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 0,10 % Ameisensäure, 38 min Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 0,10% Ameisensäure, 50 µL min<sup>-1</sup>; 50 µL inj.; UV @ 225 nm; (Strukturen siehe Abb. 2.1)

**Tab. 5.1.** Absolute und relative Retentionszeiten (bezogen auf T4) des Standardgemisches mit der Phosphatpuffer- und Ameisensäuremethode (Bedingungen siehe Abb. 5.1).

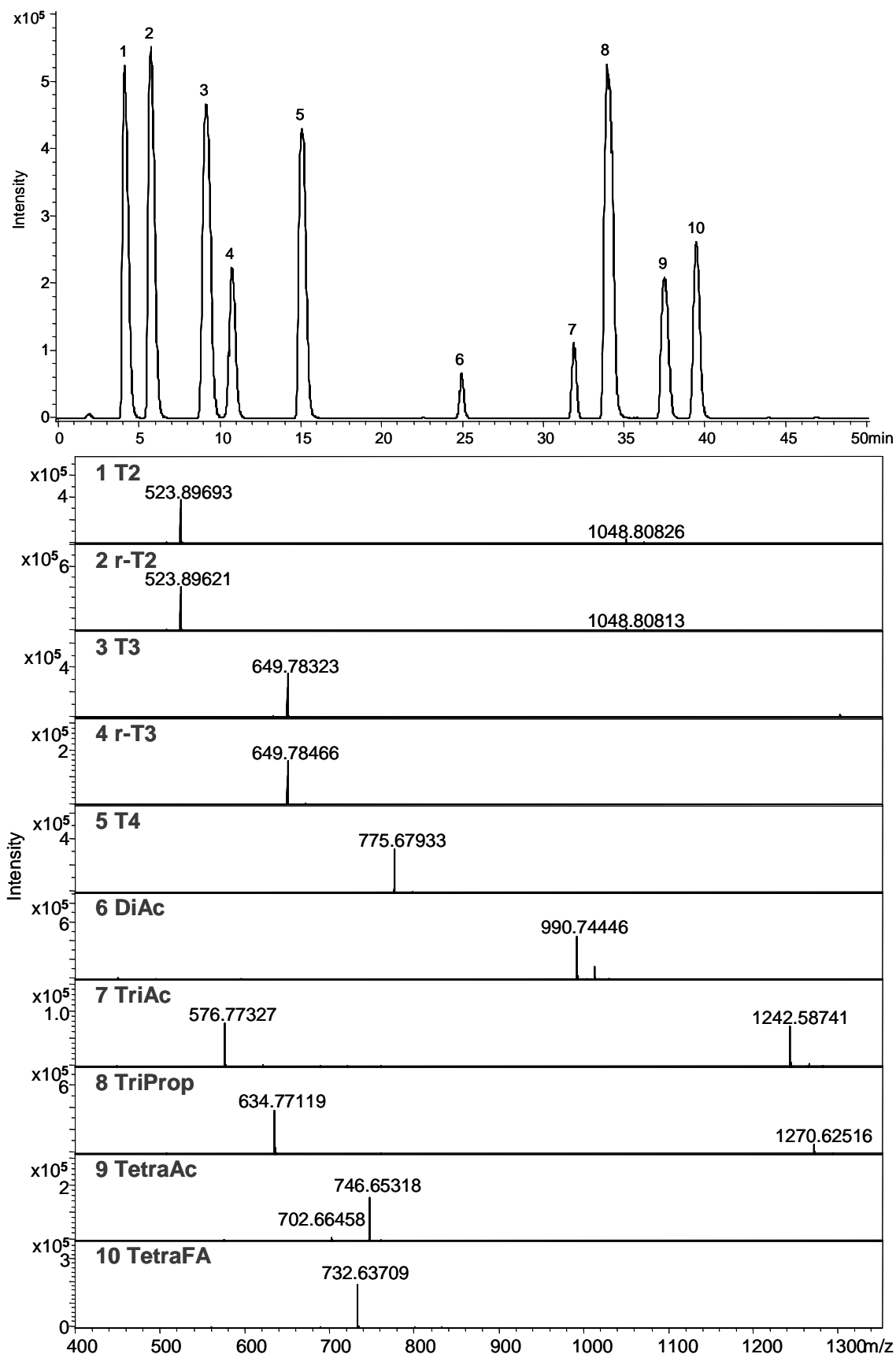
Substanz		Retentionszeit [min]		relative Retentionszeiten bezogen auf T4	
		Phosphatpuffermethode	Ameisensäuremethode	Phosphatpuffermethode	Ameisensäuremethode
T2	3,5-Diiodo-L-Thyronin	3,89	3,78	0,27	0,26
r-T2	3,3'- Diiodo-L-Thyronin	6,08	5,48	0,43	0,37
T3	3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin	9,96	9,05	0,70	0,62
r-T3	3,3',5'- Triiodo-L-Thyronin	11,31	10,65	0,79	0,72
T4	3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin	14,27	14,71	1,00	1,00
DiAc	3,5-Diiodothyroessigsäure	22,24	24,50	1,56	1,67
TriAc	3,5,3'-Triiodothyroessigsäure	28,70	31,33	2,01	2,13
TriProp	3,5,3'-Triiodothyropropionsäure	30,70	33,38	2,15	2,27
TetraAc	3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure	34,17	36,85	2,39	2,50
Tetra FA	3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure	36,39	39,04	2,55	2,65

Die Phosphatpuffermethode konnte mit Erfolg auf die Ameisensäuremethode übertragen werden. Die Retentionszeiten sind zwischen den beiden Methoden vergleichbar. Die Ameisensäuremethode kann mit der Massenspektrometrie gekoppelt werden, wobei die detektierten Retentionszeiten der zehn Standardsubstanzen im Basispeakchromatogramm (BPC) mit denen der UV-Detektion korrelieren.

Dennoch spiegelt das detektierte Basispeakchromatogramm das UV-Chromatogramm bezüglich der Peakintensitäten nicht vollständig wider. Die Responsfaktoren der Substanzen unterscheiden sich innerhalb der UV- und Massendetektion, was Unterschiede in den Peakintensitäten zur Folge hat. Der Responsfaktor innerhalb der UV-Detektion hängt maßgeblich vom Extinktionskoeffizienten der Substanzen ab. Im Falle der Massendetektion dagegen spielt die Ionisierbarkeit der Substanzen eine entscheidene Rolle für die Empfindlichkeit. Daher weist das Basispeakchromatogramm (Abb. 5.2) der Standardsubstanzen eine andere Intensitätsverteilung als das UV-Chromatogramm bei 225 nm (Abb. 5.1b) auf. UV- und ESI-MS-Detektion funktionieren nach völlig unterschiedlichen Prinzipien, und keines der beiden Verfahren erlaubt eine absolut universelle Detektion. Dadurch können durchaus Substanzen im Massenspektrometer detektiert werden, die im UV-Chromatogramm nicht sichtbar sind und umgekehrt. Zusätzlich besitzt die Ameisensäure, welche als Eluentadditiv eingesetzt wird, in einem Bereich von 200 bis 235 nm eine starke Eigenabsorption, was die Detektion gering konzentrierter Probennebenprodukte erschwert und sogar verhindern kann. Die gewählte Wellenlänge von 225 nm stellte dabei den besten Kompromiss zwischen möglichst guter Absorption der Analyten und geringer Hintergrundabsorption dar.

An dieser Stelle kann nun zusammengefasst werden, dass eine MS-kompatible HPLC-Methode entwickelt werden konnte, die für die Detektion der Schilddrüsenhormone und deren Abbauprodukte mittels negativer Elektrosprayionisierung geeignet ist, und eine Zuordnung der Peaks des Basispeakchromatogramms zu denen der Phosphatpuffer-HPLC-Methode erlaubt.





**Abb. 5.2 Basispeakchromatogramm und Massenspektren des Standardgemisches mit der Ameisensäuremethode.** YMC C18 Pro 150 x 1 mm; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 0,10 % Ameisensäure, 38 min Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 0,10% Ameisensäure, 50  $\mu\text{L min}^{-1}$ , negative ESI-TOF-MS, m/z 400-2000.

## 6. Strukturidentifizierungen am Beispiel einer T4-Probe

Das Erstellen eines Verunreinigungsprofils (engl. impurity profiling) gestresster Wirkstoffproben ist nicht trivial. Die Verunreinigungen bzw. Abbauprodukte sind meist unbekannt. Für pharmazeutische Wirkstoffe ist es jedoch vorgeschrieben, Abbauprodukte ab einem bestimmten Flächenprozentanteil zu charakterisieren, was deren Identifizierung notwendig macht.

Die Flugzeitmassenspektrometrie ermöglicht die Bestimmung exakter Massen mit einer Genauigkeit bis zu 5 ppm. Anhand dieser detektierten exakten Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) und deren Isotopenverteilungen können chemische Summenformeln berechnet werden. Weiterhin ist es möglich, die Doppelbindungsäquivalente dieser Summenformel zu ermitteln, die den Grad der ungesättigten Strukturelemente in einem Molekül beschreiben. Dies kann mathematisch mit Softwareunterstützung gelöst werden. Im Falle der Schilddrüsenhormone ist die softwareunterstützte massenspektrometrische Strukturaufklärung nicht trivial. Schilddrüsenhormone und deren Abbauprodukte enthalten neben Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- und Wasserstoffatomen auch Iodatome in ihrem Molekülgerüst. Im Massenspektrometer wird zum einen die monoisotopische Masse, welche aus den exakten Massen der häufigsten Isotope ermittelt wird, und zum anderen die Massen der übrigen vorkommenden Isotope detektiert. Im Falle des Kohlenstoffatoms kommt das Isotop C-12 mit 98,9 % am häufigsten vor und trägt somit zum monoisotopischen Peak (Abb. 5.2,c erster Peak) bei; das Isotop C-13 ist ein natürlich vorkommendes Isotop mit einer Häufigkeit von 1,1 % und trägt stark zur Intensität des ersten Isotopenpeaks (Abb. 5.2,c zweiter Peak) bei. Im Vergleich mit den Massenspektren einer Iod enthaltenden Substanz (Abb. 5.2,a und b) wird deutlich, dass der erste Isotopenpeak der iodierten Verbindung mit nur 17 % der Intensität des monoisotopischen Peak viel kleiner ist. Iod ist ein Element, welches, im Gegensatz zum Kohlenstoffatom, keine natürlichen schwereren Isotope aufweist und daher auch nicht zur Isotopenverteilung beiträgt. Zusätzlich ist Iod mit einer molaren Masse von  $126,9 \text{ g mol}^{-1}$  ein relativ schweres Element und hat somit einen hohen Anteil an der Intensität des monoisotopischen Peaks (Abb. 5.2,a und b). Im Vergleich wären zehn Kohlenstoffatome nötig, um die Masse eines Iodatoms zu erreichen. Im Falle der Schilddrüsenhormone und deren Abbauprodukte können in einem Molekül bis zu vier Iodatome vorhanden sein, welche somit den Hauptbeitrag zur gesamten Molekülmasse

leisten. Diese starke Gewichtung des ersten Isotopensignals erschwert die softwareunterstützte Summenformelbestimmung erheblich, da in kommerziellen Programmen solche isotopenreine Elemente wie Iod meist nur unzureichend berücksichtigt werden.

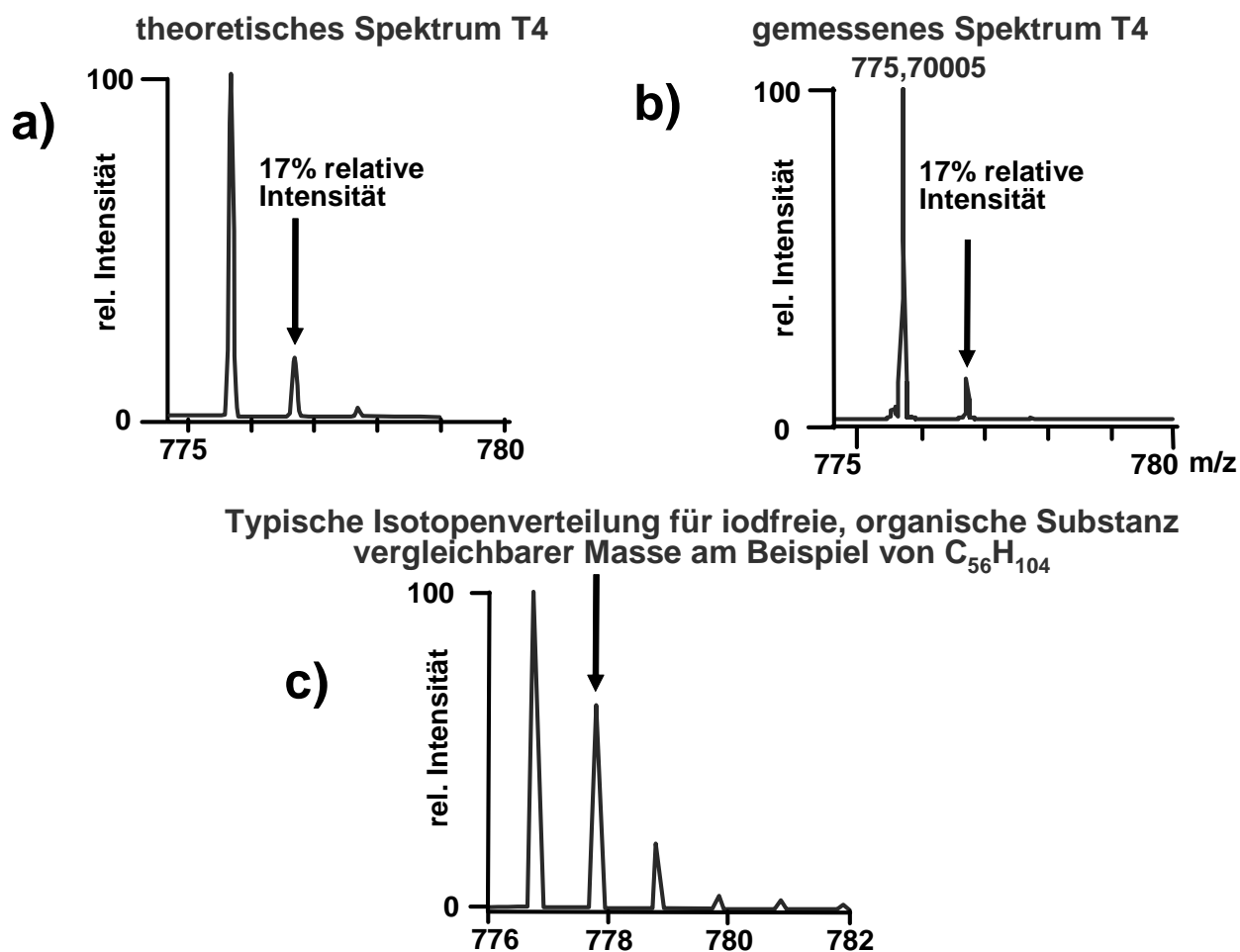


Abb. 6.1 Theoretisches (a) und gemessenes (b) Massenspektrum von Thyroxin (T4) und typisches Massenspektrum eines Kohlenstoffwasserstoffs C<sub>56</sub>H<sub>104</sub> mit einer vergleichbaren Masse (c).

Mit Hilfe der Isotopenverteilung und der exakten Massen können Vorschläge möglicher Strukturen ausgearbeitet werden. Es ist jedoch ausdrücklich festzuhalten, dass es auf diesem Weg nicht möglich ist, die räumlich Anordnungen von Atomen oder funktionellen Molekülbausteinen innerhalb eines Moleküls zu ermitteln. Weiterhin können oft trotz der detektierten exakten Masse im Rahmen der Messungenauigkeit mehrere funktionelle Gruppen in Betracht kommen. So kann beispielsweise nicht zwischen der Masse einer Aldehydgruppe oder der Masse einer Ethylgruppe unterschieden werden, da der Messfehler des Massenspektrometers in der Regel für eine solche Entscheidung zu groß ist.

## **6.1. Vorgehen der Strukturidentifizierung**

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die ursprüngliche Phosphatpuffermethode ein vergleichbares Peakmuster zeigt wie die für die HPLC/MS-Analyse verwendete Ameisensäuremethode. Diese Information ist für die spätere Übertragung der ausgearbeiteten Strukturvorschläge auf die bereits validierte Phosphatpuffermethode sehr wichtig.

Die Ausarbeitung möglicher Strukturvorschläge der detektierten Substanzpeaks in den thermisch gestressten Wirkstoffproben basiert auf den mittels HPLC-neg-ESI-TOF-MS generierten Massenspektren und –chromatogrammen.

Im Folgenden soll nun das Vorgehen zur Ausarbeitung von Strukturformeln anhand einer gestressten T4-Probe exemplarisch näher erläutert werden. Eine Diskussion aller gefundenen Strukturvorschläge würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, deshalb sind die Resultate der übrigen Proben tabellarisch im Anhang zusammengefasst.

### **6.1.1. Ausarbeitung möglicher Strukturen ausgehend von Thyroxin**

Beim näheren Betrachten der Molekülstruktur von Thyroxin (T4) können durch Überlegungen Strukturen möglicher Abbauprodukte bzw. Synthesenebenprodukte ausgearbeitet werden. In Abb. 6.2 sind einige Strukturbeispiele und Nebenreaktionen dargestellt. Prinzipiell sind die ausgearbeiteten Strukturen, die vier Iodatome aufweisen, auch analog mit nur drei oder zwei Iodatomen vorstellbar. Das Grundgerüst in der Molekülstruktur von Thyroxin sind die zwei Phenylringe, die über eine Etherbrücke miteinander verbunden sind. Dieses Grundgerüst verhält sich durch die Resonanzstabilisierung der Aromaten eher inert gegenüber einem thermischen Abbau, wodurch bei Abbau- bzw. Nebenprodukten Veränderungen bevorzugt an der Seitenkette zu erwarten sind (Abb. 6.2). Es kann zum einen die Amino- wie auch die Carbonsäuregruppe abgespalten bzw. ersetzt oder die Kette verkürzt werden. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der nachfolgend gezeigten bzw. vorgeschlagenen Thyroxin-Derivate bezieht sich vorwiegend auf die vorliegende Seitenkette und Anzahl der Iodatome, wobei die Bezeichnung „Thyro-„ für die zwei etherverlinkten Phenylringe steht. Daher sind unter anderem Carbonsäure-, Amin-, Keton-, Aldehyd- und Säureamid-Derivate unterschiedlicher Kettenlänge aber auch Milchsäurederivate möglich. Auf Grund der Synthese sind aber auch Tyrosinderivate sowie Esterprodukte denkbar.

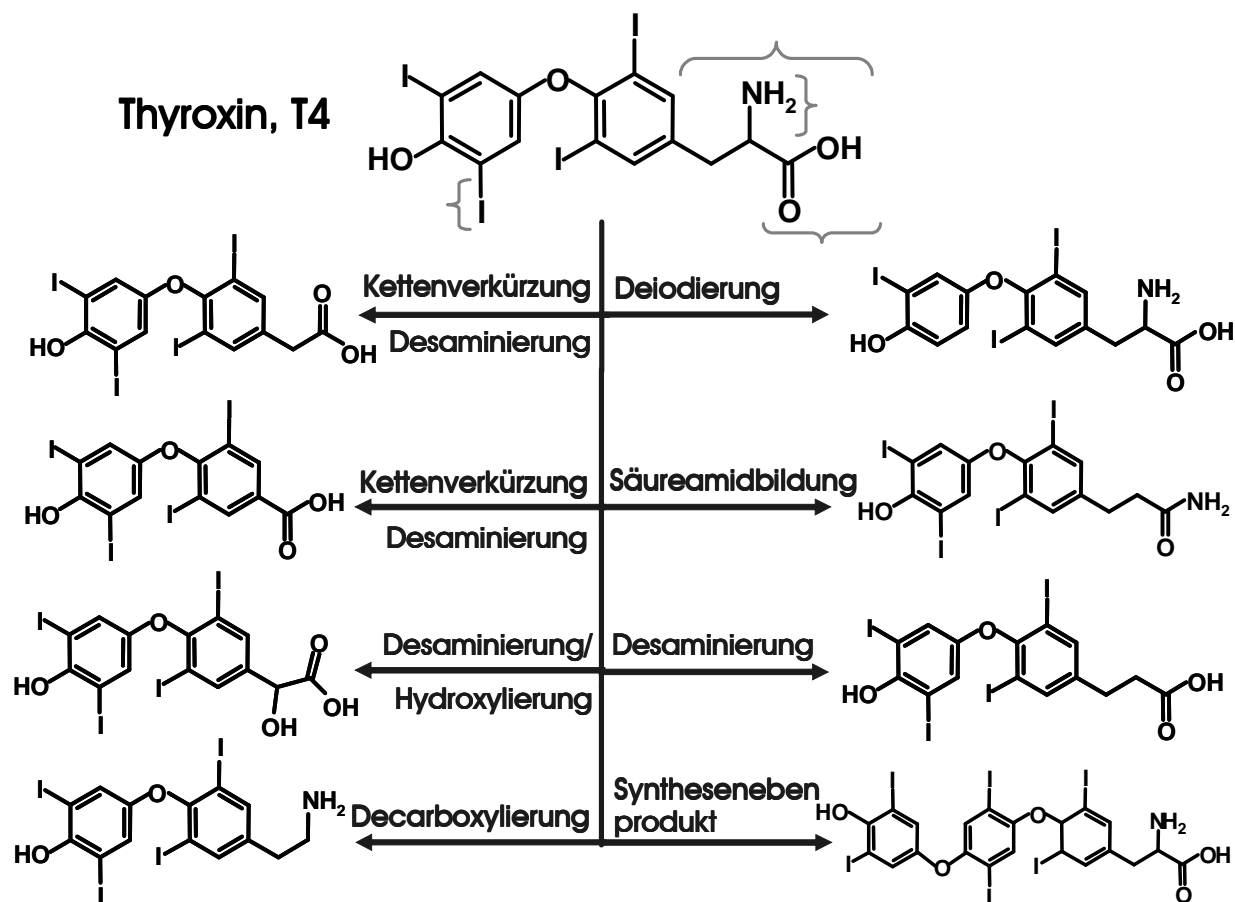


Abb. 6.2 Beispiele möglicher Strukturen von Abbauprodukten bzw. Synthesenebenprodukten ausgehend von Thyroxin (T4).

Anhand dieser entwickelten Strukturen kann deren theoretische exakte Masse bzw. ihr Masse-zu-Ladungsverhältnis berechnet und mit den gemessenen Masse-zu-Ladungsverhältnissen verglichen werden. Je geringer die Abweichung (hier in ppm angegeben) zwischen theoretischer und gemessener Masse ist, umso wahrscheinlicher liegt tatsächlich diese Struktur vor.

### 6.1.2. Softwareunterstützte Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung kann mathematisch unterstützt werden. Hier wurde die massenspektrometrische Auswertung mit Hilfe der DataAnalysis-Software von Bruker durchgeführt. Diese Software verfügt über eine zusätzliche Funktion, den so genannten SmartFormula 3D, die auf Basis der detektierten Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) und Isotopenverteilungen Vorschläge für mögliche Summenformeln und deren Doppelbindungsäquivalente berechnet. Diese Vorschläge sind aber ausschließlich mathematische Resultate, die chemisch nicht plausibel oder unmöglich sein können.

Daher muss jede prognostizierte Summenformel auf chemische Plausibilität hin überprüft werden.

Die Software liest das m/z der monoisotopischen Masse ein. Auf Basis der exakten m/z- und Intensitätsverhältnisse der monoisotopischen bzw. Isotopen-Peaks werden mögliche Summenformeln berechnet.

Zur Intensität des monoisotopischen Peaks trägt die Anzahl der am häufigsten natürlich vorkommenden Isotope bei. Daher wird der monoisotopische Peak auch meist als intensivster Peak detektiert, wobei dessen m/z auch dem m/z der detektierten Substanz entspricht. Im Falle des Kohlenstoffatoms wären dies  $^{12}\text{C}$ -, für Stickstoff  $^{14}\text{N}$ - und für Sauerstoff  $^{16}\text{O}$ -Isotope. Das exakte m/z des monoisotopischen Peaks kann mit zahlreichen Atomkombinationen, die einer Summenformel entsprechen, erreicht werden. Um diese umfassende Auswahl an Kombinationen weiter eingrenzen zu können, beziehen Software-Tools auch die Intensitäten der Isotopenpeaks in die Simulationen mit ein. Zur Intensität des ersten Isotopenpeaks tragen alle Atome eines Moleküls bei, in dessen Molekülaufbau ein Atom mit einem Isotop ausgetauscht wurde, welches um ein Neutron schwerer ist. Im Falle eines kohlenstoffenthaltenden Moleküls, wäre ein  $^{12}\text{C}$ -Isotop gegen ein  $^{13}\text{C}$ -Isotop ausgetauscht, welches dann um ein m/z zum monoisotopischen Peak verschoben detektiert wird, wenn es sich um einfach geladenes Ionen handelt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,1 % kommen  $^{13}\text{C}$ -Isotope natürlich vor. Software-Tools beziehen die natürliche Häufigkeitswahrscheinlichkeit und die Besetzungswahrscheinlichkeit im Molekül in ihre Berechnungen ein, wodurch die umfangreiche Auswahl eingeschränkt wird. Der Vergleich und das Übereinstimmen von berechneten mit detektierten m/z- und Intensitätsverhältnissen lässt ein Ranking innerhalb der Summenformelvorschläge zu.

In dem Software-Tool SmartFormula können Atome und Atomanzahlen in Häufigkeitsbereichen vorgeben werden, was die Treffergenauigkeit erhöht. Der angegebene SigmaRank entspricht dem Grad der Übereinstimmung von gemessenem und theoretischem Isotopenmuster und m/z. Weiterhin kann die Suche durch die Angabe des Toleranzbereiches eingeschränkt werden, da hier nur Summenformelvorschläge unterbreitet werden, deren m/z innerhalb dieses Toleranzbereiches vom gemessenen m/z abweicht. Zusätzlich kann für die Suche die Stickstoffregel angewandt werden. Diese Regel besagt, dass ein Molekül, welches eine gerade Molekülmasse aufweist, kein oder eine gerade Anzahl, im Fall einer ungeraden Molekülmasse dagegen eine ungerade Anzahl Stickstoffatome enthält. Der

SmartFormula gibt nicht nur den SigmaRank, die Abweichung vom theoretischen m/z und ein theoretisches Massenspektrum an, sondern auch Doppelbindungsäquivalente (DBE), welche aus den Summenformeln berechnet werden können und den Grad an ungesättigten Strukturelementen innerhalb eines Moleküls widerspiegelt. Um eine Doppelbindung innerhalb eines Moleküls zu schaffen, müssen zwei Wasserstoffatome eliminiert werden. Das einfachste Beispiel hierfür ist ein Ethanmolekül (Abb. 6.3a), welches sechs Wasserstoffatome und keine Doppelbindung aufweist und somit auch keine DBE. Ethen leitet man formal aus Ethan (Abb. 6.3b) ab, indem zwei Wasserstoffatome entfernt werden und eine Doppelbindung entsteht, wodurch Ethen ein DBE aufweist. Thyroxin (Abb. 6.3c) dagegen besitzt neun Doppelbindungsäquivalente, wobei ein Aromatenring allein vier DBEs besitzt. Das Thyroxin-Molekül besteht aus zwei Phenylringen, welche demnach acht DBEs entsprechen, und einem doppelgebundenen Sauerstoff, welcher einem DBE entspricht, woraus insgesamt neun Doppelbindungsäquivalente für diese Molekülstruktur resultieren.

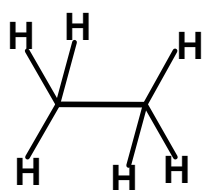
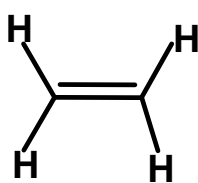
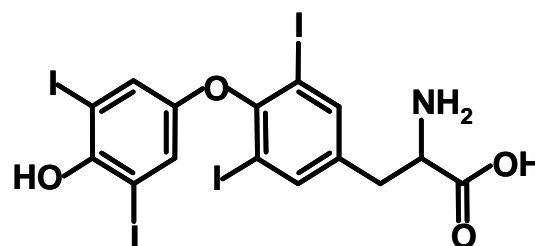
**a) Ethan, 0 DBE****b) Ethen, 1 DBE****c) Thyroxin, 9 DBE**

Abb. 6.3 Zusammenhang von Molekülaufbau und Doppelbindungsäquivalenten (DBE) am Beispiel von Ethan (a), Ethen (b) und Thyroxin (c).

Durch die Kombination von Ausarbeitung möglicher Molekülstrukturen auf dem Papier mit einer softwareunterstützten Summenformelberechnung, wurde die Identifizierung unbekannter Peaks in gestressten Wirkstoffproben in dieser Arbeit vorgenommen.

## 6.2. Korrelation der Massenspektren einer thermisch gestressten T4-Probe mit möglichen Strukturen

Wie zuvor bereits erläutert, erfolgt die Zuordnung möglicher Strukturen durch den Vergleich von detektierten und theoretischen Masse-zu-Ladungsverhältnissen der parallel ausgearbeiteten Strukturen. Zusätzlich dienen die berechneten Summenformeln und die dazugehörigen Doppelbindungsäquivalente als weitere Bestätigung. Beispielhaft soll nun das Vorgehen der Strukturaufklärung anhand einer thermisch gestressten Thyroxin-Wirkstoffprobe diskutiert werden.

In der hier gezeigten Probe konnten insgesamt 20 Peaks im Basispeakchromatogramm detektiert werden (Abb. 6.2.1). Diese Probe wurde zum einen thermisch stark gestresst und zum anderen für die HPLC/MS-Analyse stark überladen injiziert, um die NebenkompONENTEN ausreichend detektieren zu können.

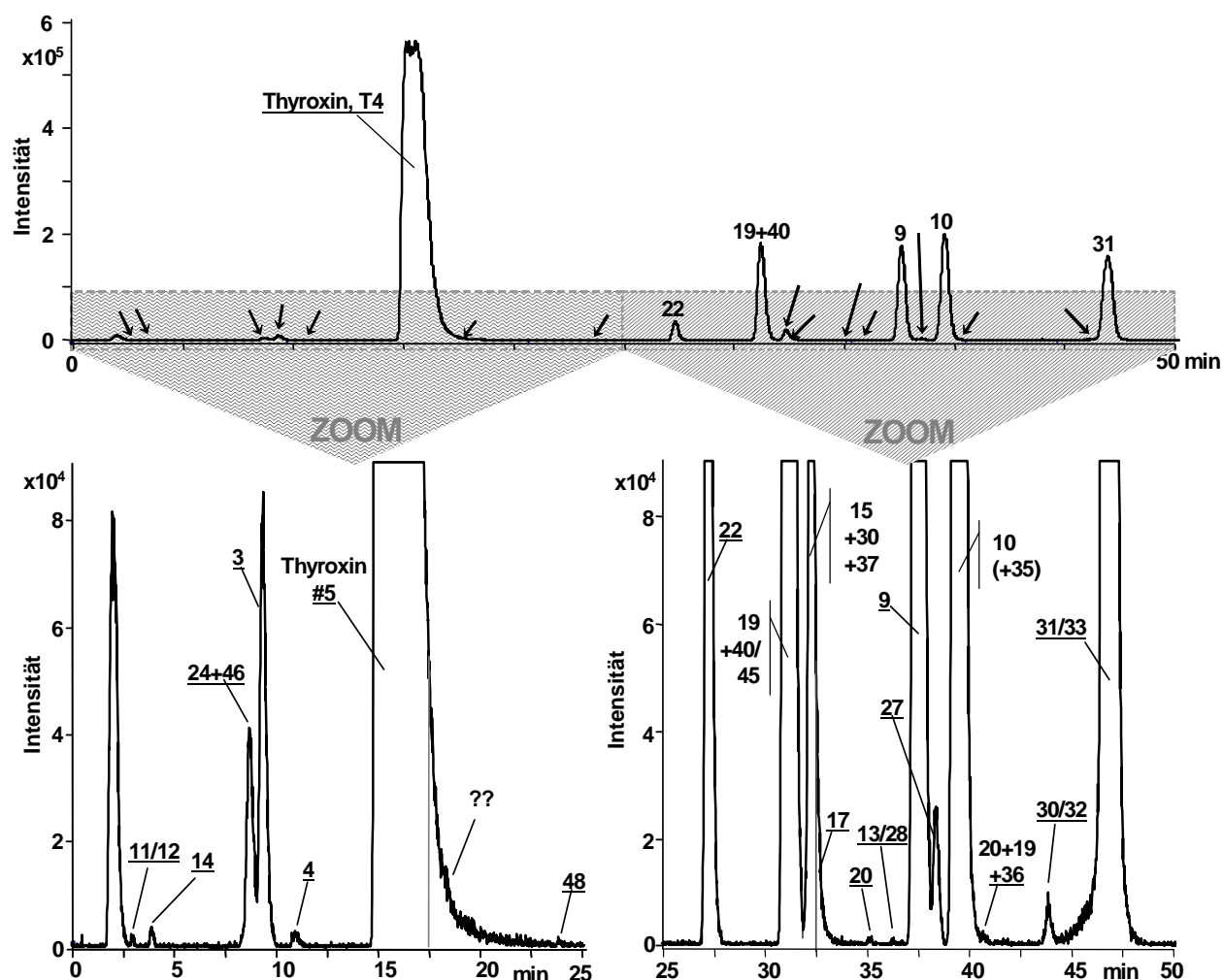


Abb. 6.2.1 Basispeakchromatogramm ungezoomt (oben) und gezoomt (unten) einer thermisch gestressten Thyroxinprobe. YMC C18 Pro 150 x 1 mm; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 0,10 % Ameisensäure, 38 min Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 0,10% Ameisensäure, 50  $\mu\text{L min}^{-1}$ , negative ESI-TOF-MS,  $m/z$  400-2000.



Die Beschriftung der detektierten Peaks in Abb. 6.2.1 zeigt die Nummerierung der Strukturvorschläge, die im Anhang zu finden ist. Die Strukturen der Peaknummern eins bis zehn (#1 bis #10) entsprechen den Substanzen des Standardgemisches. Vor der Auswertung der Massenspektren wurde die Massenachse mit Hilfe der theoretischen Massen der Ionen von Thyroxin (T4), Thyronin (T3), Tetraiodothyroameisensäure (TetraFA) und Tetraiodothyroessigsäure (TetraAc) kalibriert. Nachfolgend sind die Massenspektren, welche unter den einzelnen Peaks im Basispeakchromatogramm (Abb. 6.2.1) detektiert wurden, nach steigender Retentionszeit aufgelistet und die entsprechenden Peakzuordnungen mit zugehörigen Strukturvorschlägen dargestellt. Alle detektierten Ionen lagen als einfach negativ geladene Spezies vor. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass im direkten Vergleich immer die theoretischen und detektierten Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) und nicht die daraus resultierenden Massen miteinander verglichen wurden. Die theoretischen  $m/z$  wurden mit Hilfe der Softwarefunktion „Isotope Pattern“ in der DataAnalysis-Software von Bruker simuliert.

Zunächst soll das Massenspektrum des Masse-zu-Ladungsverhältnisses 431,89719 näher betrachtet werden (Abb. 6.2.2). Im direkten Vergleich mit den theoretischen  $m/z$  der zuvor ausgearbeiteten Strukturvorschläge kann es sich hierbei zum einen um Diiodotyrosin (Abb. 6.2.2, #11), aber auch um (Hydroxy-Diiodophenyl)-aminobutanol handeln (Abb. 6.2.2, #12). Beim Betrachten der Abweichung von den theoretischen  $m/z$  scheint es sich mit einer Abweichung von 86 ppm nicht um Diiodotyrosin zu handeln.

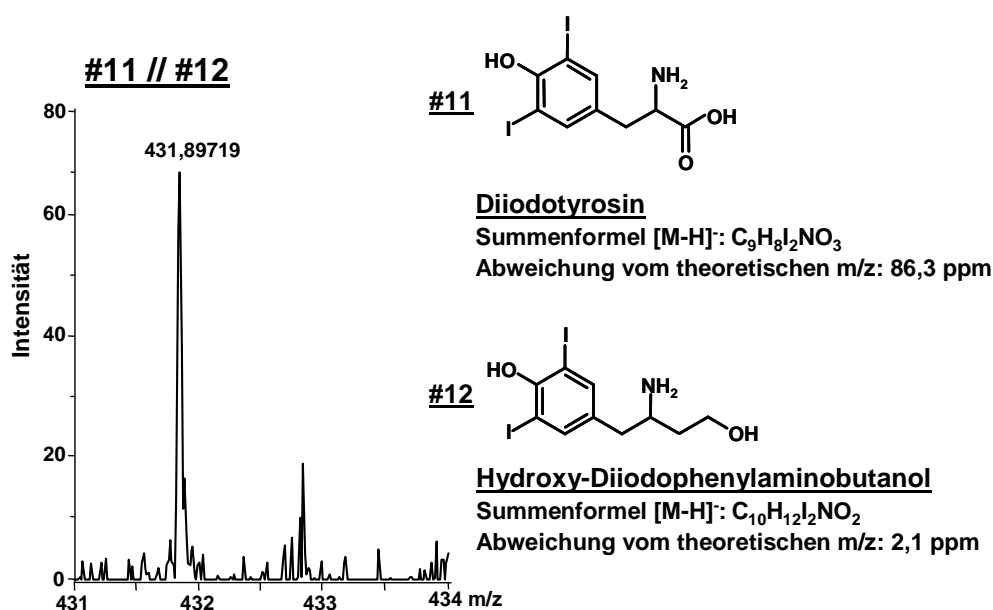


Abb. 6.2.2 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #11/#12 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Um eine genauere Aussage treffen zu können, wurde daher eine Diiodothyrosinstandardlösung mit HPLC-UV zeitnah unter identischen Bedingungen untersucht. Es konnte in der Probe bei einer Retentionszeit von 2,4 min ein Peak des  $m/z$  431,84973 im Massenspektrometer detektiert werden (Abb. 6.2.3, a+b), wobei die Delayzeit zwischen Massenspektrometer und HPLC in diesem Versuch auf mindestens 0,5 min reduziert wurde, um die Retentionszeiten zwischen UV- und MS-Detektion miteinander vergleichen zu können. Die Diiodotyrosinstandardlösung zeigte ebenfalls einen Peak im UV-Chromatogramm bei 2,4 min (Abb. 6.2.3, c) sowie ein vergleichbares Massenspektrum innerhalb eines Direktinfusionsexperiments (Abb. 6.2.3, d). Die Substanz Hydroxy-Diiodophenylaminobutanol ist im Vergleich zu Diiodotyrosin viel hydrophober. Die Trennung der Analyten in dem hier verwendeten Umkehrphasen-Trennsystem basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen, daher sollte (Hydroxy-Diiodophenyl)-aminobutanol (Abb. 6.2.2, #12) unter diesen Bedingungen später als Diiodotyrosin (Abb. 6.2.2, #1) eluieren. Somit liefert die chromatographische Analyse eine zusätzliche Information zur Strukturentwicklung, während die Massenspektrometrie allein die Frage nach der Substanz nicht eindeutig beantworten kann.

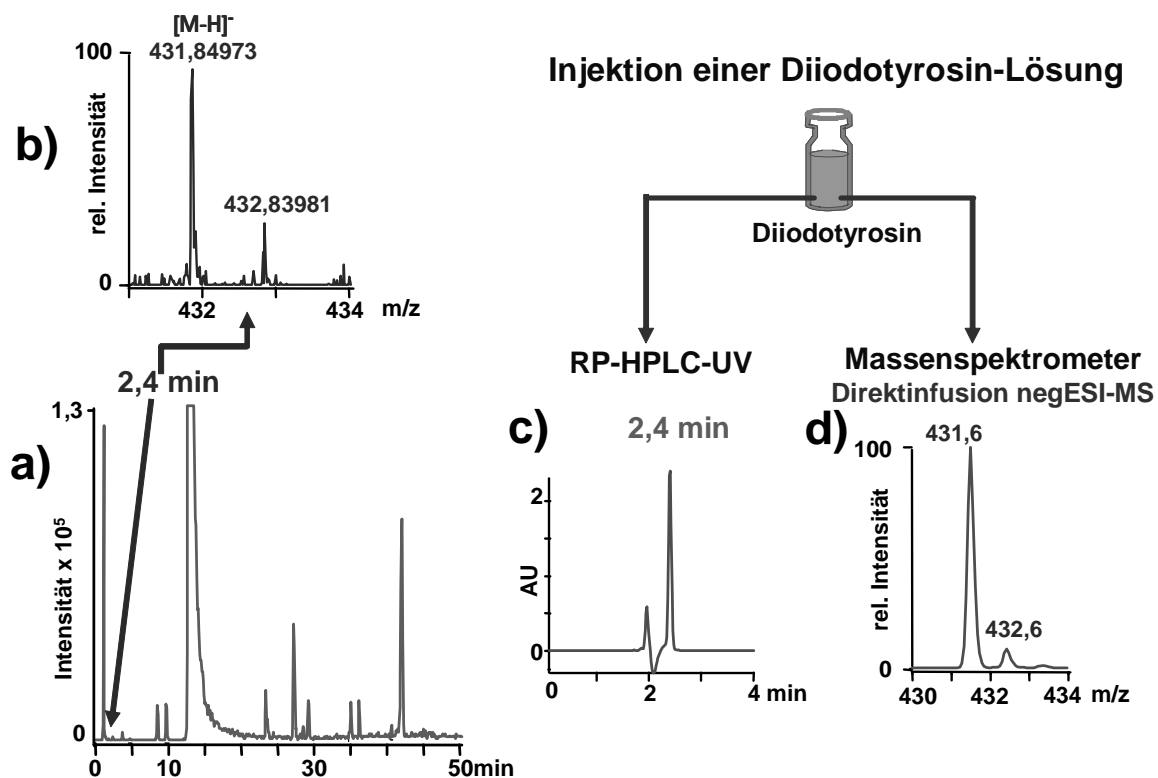


Abb. 6.2.3 Identifizierung des detektierten  $m/z$  431,84973 (Abb. 6.2.2) bei 2,4 min im Basispeakchromatogramm (Abb. 6.2.1) als Diiodotyrosin. a) Basispeakchromatogramm einer T4-Probe, Bedingungen siehe Abb. 6.2.1, b) detektiertes Massenspektrum unter dem Peak bei 2,4 min, c) Injektion einer Diiodotyrosinlösung in das Trennsystem aus Abb. 6.2.1, d) Direktinfusion der Diiodotyrosinlösung, Detektion im negativen Elektrospraymodus.

Zusammenfassend betrachtet handelt es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit um Diiodotyrosin. Die größere Abweichung kann auf die interne Kalibrierung der Massenachse zurückgeführt werden. Diese erfolgte mit vier bekannten Standardsubstanzen, die auch in der Probe gefunden wurden (T3, T4, TetraAc, TetraFA) und die molaren Massen von 600 bis 800 g mol<sup>-1</sup> aufweisen. Diiodotyrosin liegt mit einer molaren Masse von 400 g mol<sup>-1</sup> deutlich unterhalb des Massenbereichs der vier Standardsubstanzen, was einen größeren Fehler in der Massenkalisierung zu Folge hat.

Bei einer Retentionszeit von 3,9 min konnte das m/z von 760,68332 extrahiert werden (Abb. 6.2.4). Es könnte sich hierbei um Tetraiodothyropropionsäure handeln, wobei aber die Abweichung von 19,5 ppm recht hoch ist. Die Carbonsäuren im Standardgemisch eluieren allerdings bei Retentionszeiten über 20 min. Auch Triiodothyropropionsäure (TriProp) kann erst nach 33 min detektiert werden. Wie die Retentionsreihenfolge von DiAc und TriAc zeigt, nimmt die Hydrophobie eines Moleküls mit steigender Zahl an Iodsubstituenten zu. Daher ist Tetraiodothyropropionsäure eher bei höheren Retentionszeiten zu erwarten, auch wenn in diesem Fall ein Strukturisomer vorliegen sollte. Mit einem SigmaRank von sieben wurde jedoch mit dem SmartFormula-Tool die Summenformel C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>I<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (Abb. 6.2.4) gefunden. Obwohl aus chromatographischer Sicht Einwände gegen diese Struktur bestehen, konnte kein plausiblerer Vorschlag für diese Substanz als Tetraiodothyropropionsäure entwickelt werden.

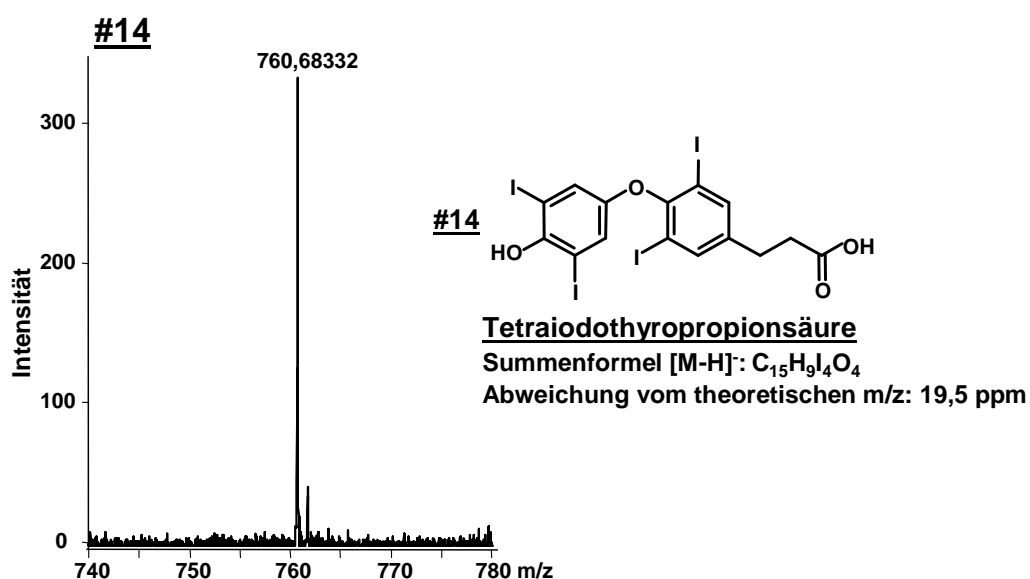


Abb. 6.2.4 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #14 im zuvor gezeigten Basispeak-chromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Unter dem Peak #24 + #46 bei 8,7 min konnten zwei m/z-Verhältnisse detektiert werden (Abb. 6.2.5), wobei das m/z 731,69071 (Abb. 6.2.5, #24) eine signifikant höhere Intensität als das m/z 802,73993 (Abb. 6.2.5, #46) aufweist. Im Falle des m/z 731,69071 handelt es sich vermutlich um Tetraiodothyroethylamin (Abb. 6.2.5, #24), was die Abweichung vom theoretischen m/z von 1,6 ppm auch unterstreicht.

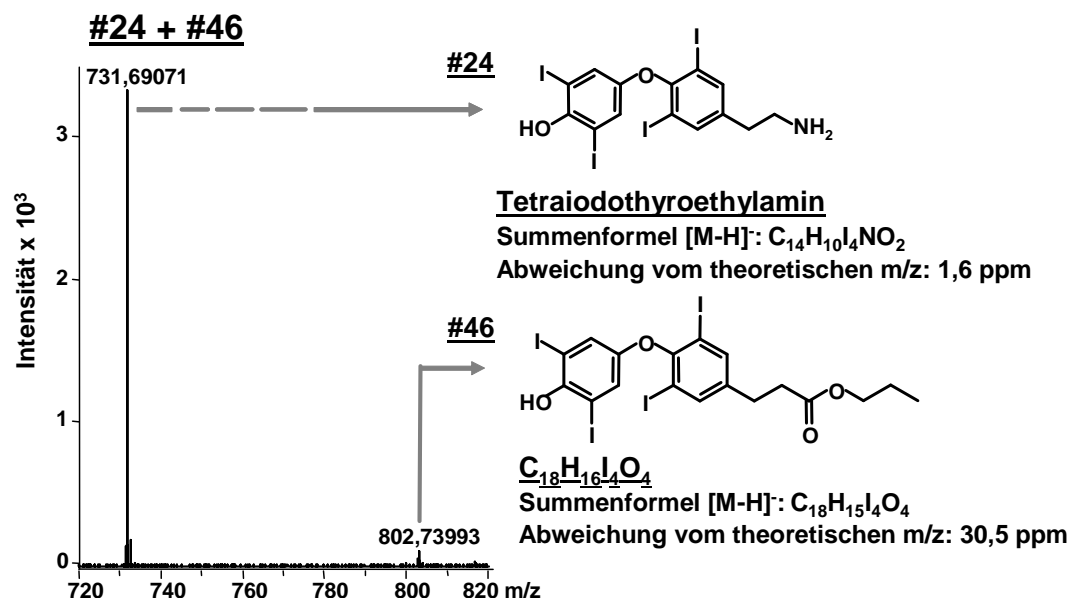


Abb. 6.2.5 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #24 + #46 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Die Suche mit dem SmartFormula ergab auf dem SigmaRank eins einen Treffer mit der Summenformel C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>I<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, deren Struktur 8,5 Doppelbindungsäquivalente aufweist. Die vorgeschlagene Struktur für Tetraiodoethylamin in Abb. 6.2.5, #24 besitzt zwei Phenylringe, die acht Doppelbindungsäquivalenten entsprechen. Hier wird das einfach negativ geladene Ion detektiert, wodurch ein halbes Doppelbindungsäquivalent wegen rechnerisch fehlender Absättigung des Anions mit Wasserstoff zu den theoretischen Doppelbindungsäquivalenten addiert werden muss. So handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Tetraiodothyroethylamin. Es soll jedoch nicht verschwiegen werden, dass der gezeigte Propylester (#46) auch auftreten kann, wenn während der T4-Synthese einmal n-Propanol als Lösungsmittel zum Einsatz kam. Die geringere Abweichung von 1,6 ppm lässt allerdings Tetraiodothyroethylamin als wahrscheinlicher erscheinen.

Auf Grund des Standardgemisches, welches auch T3 und r-T3 enthält, konnten die Peaks #3 und #4 (Abb. 6.2.6) diesen zwei Substanzen zugeordnet und durch die detektierten Massenspektren als diese identifiziert werden. Die sehr geringe

Abweichung zwischen theoretischer und experimentell bestimmter Masse erklärt sich in diesem Fall dadurch, dass die Massenachse zuvor intern unter anderem auf T3 kalibriert wurde.

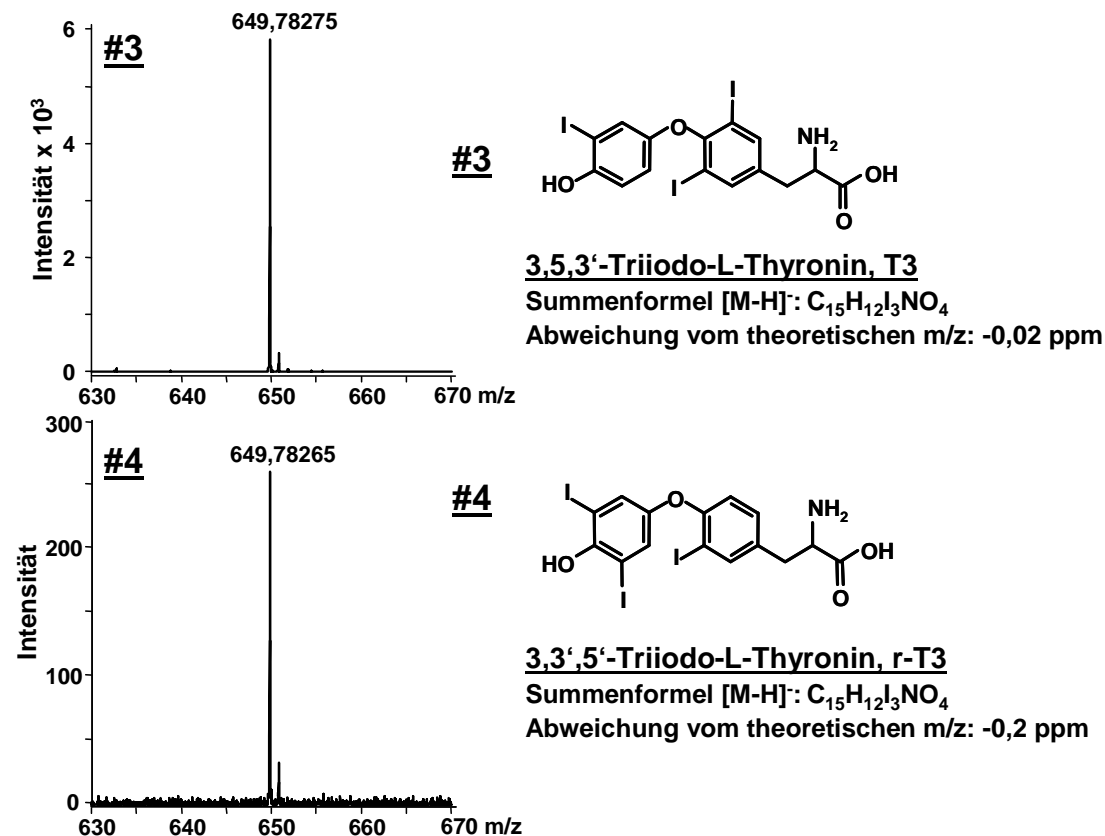


Abb. 6.2.6 Detektiertes Massenspektrum unter den Peaks #3 und #4 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Auf Grund des zuvor injizierten Standardgemisches können beide Substanzen als T3 und r-T3 identifiziert werden.

Im auslaufenden Peak des stark überladenen Thyroxins konnte das m/z 1119,6213 extrahiert werden (Abb. 6.2.7). Es war mit den bisherigen Kenntnissen, auch unter Verwendung des SmartFormula, nicht möglich, diesem m/z eine Struktur zuzuordnen. Die Abweichungen von den theoretischen m/z waren größer als 150 ppm. Dass mit Unterstützung des SmartFormula keine wahrscheinliche Summenformel ausgearbeitet werden konnte, kann wiederum auf den Bereich der internen Kalibrierung der Massenachse von 600 bis 800 m/z zurückgeführt werden. Das detektierte m/z liegt weit außerhalb dieses Kalibrierbereichs, was eine größere Unsicherheit des detektierten m/z zur Folge hat.

Da zudem mit steigender Molekularmasse einer Verbindung innerhalb der Messunsicherheit eines TOF-MS für eine detektierte Masse deutlich mehr Atomkombinationen rechnerisch möglich werden, sinkt die Vorhersagegenauigkeit

dieser Art der Summenformelbestimmung oberhalb von Molmassen von 800 bis 1000 g mol<sup>-1</sup> zusätzlich erheblich.

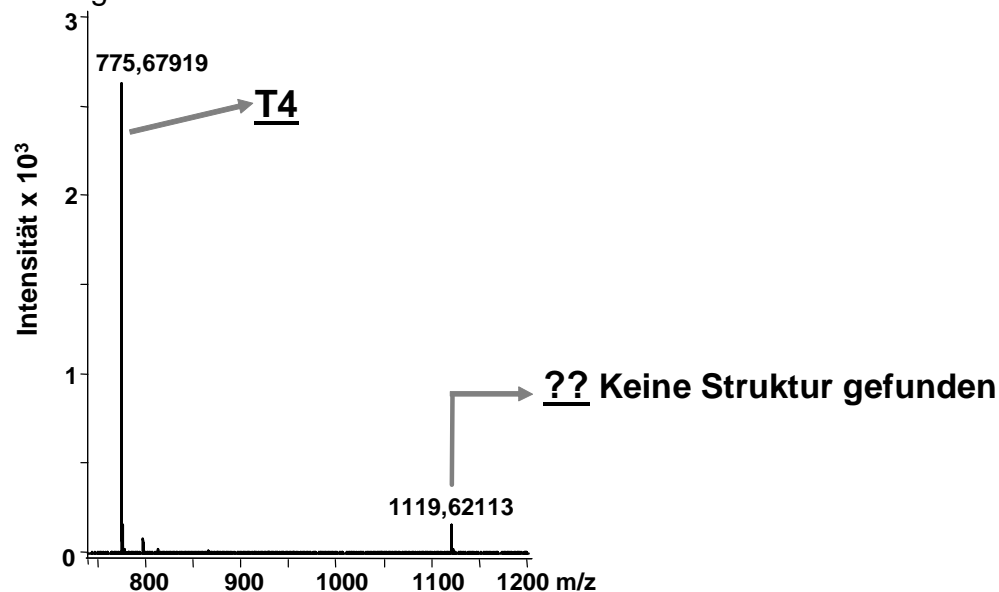


Abb. 6.2.7 Detektiertes Massenspektrum unter dem auslaufenden T4-Peak im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Für die Masse 1119,62113 konnten zu diesem Zeitpunkt keine Strukturvorschläge unterbreitet werden.

Das m/z 817,71286 konnte bei 23,8 min extrahiert werden. Mit Hilfe des SmartFormula konnten keine Summenformeln gefunden werden, die realistisch erscheinen. Mit einer Abweichung von 16,5 ppm kann es sich um die zuvor ausgearbeitete Struktur Abb. 6.2.8, #48 handeln. Diese Verbindung würde beispielsweise während der Synthese durch Veresterung von T4 mit dem Lösungsmittel n-Propanol entstehen.

**#48**

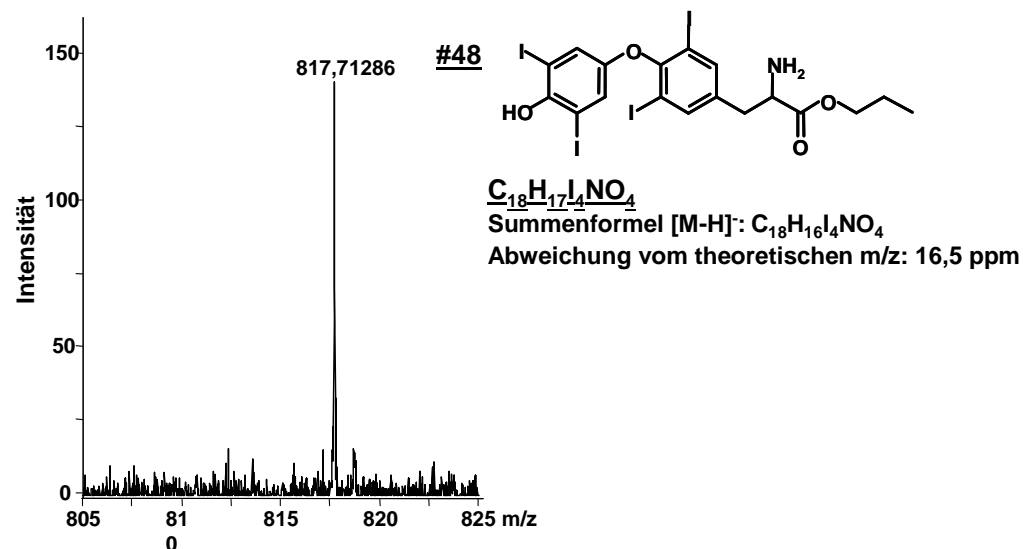


Abb. 6.2.8 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #48 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Ein Tetraiodothyromilchsäureamid kann bei 27,3 min detektiert (Abb. 6.2.9) werden. Mit einer Abweichung des detektierten vom theoretischen  $m/z$  von 5,2 ppm liegt diese Substanz mit großer Wahrscheinlichkeit vor. Der SmartFormula gibt auf dem ersten SigmaRank-Platz die Summenformel  $C_{14}H_8I_4NO_4$  mit 9,5 Doppelbindungsäquivalenten (DBE) an, wobei 0,5 DBE auf den formalen Elektronenüberschuss der vorliegenden anionischen Form der Substanz zurückgeführt werden. Die vorgeschlagene Struktur des Tetraiodothyromilchsäureamids (Abb. 6.2.9, #22) weist zwei aromatische Ringe auf, die insgesamt acht DBE entsprechen. Der doppelt gebundene Sauerstoff der Seitenkette entspricht einem weiteren DBE. Zudem erfüllt das Neutramolekül mit einer geraden molekularen Masse die Stickstoffregel. So korreliert die hier gezeigte Struktur ebenfalls mit den Ergebnissen des SmartFormula, was eine weitere Bestätigung des Milchsäureamides ist.

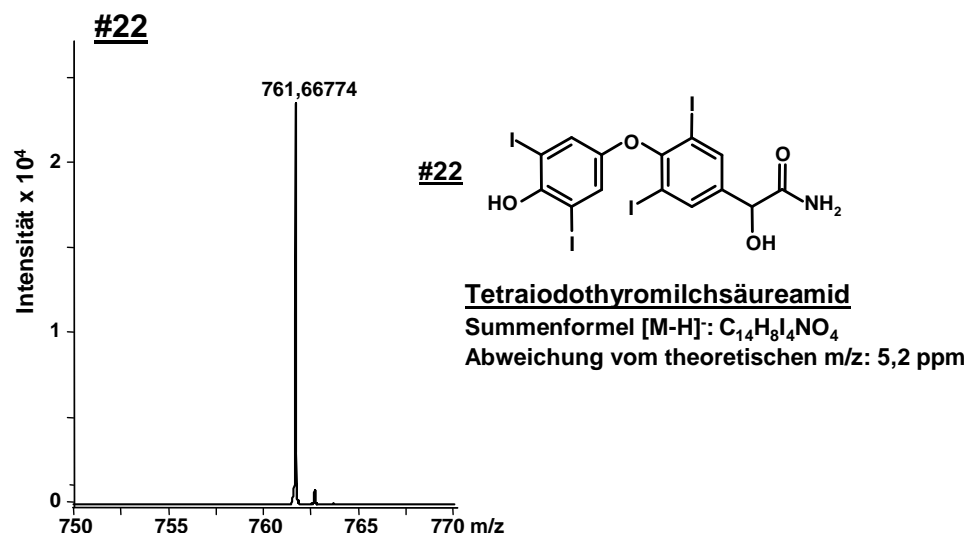


Abb. 6.2.9 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #22 im zuvor gezeigten Basispeak-chromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Unter dem Peak bei einer Retentionszeit von 31,1 min wurden die  $m/z$ -Verhältnisse 745,66852 und 803,68235 detektiert (Abb. 6.2.10). Auf dem SigmaRank eins wurde für das  $m/z$  745,66852 die Summenformel  $C_{14}H_8I_4NO_3$  mit 9,5 DBE vorgeschlagen. Der vorgeschlagenen Struktur #19 in Abb. 6.2.10 entsprechen 9 DBE, wobei hier ebenfalls Anionen detektiert wurden und daher 0,5 DBE addiert werden müssen. Die Abweichung von dem theoretischen  $m/z$  von -0,4 ppm lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um Tetraiodothyroessigsäureamid handelt (Abb. 6.2.10, #19). Für das zweite detektierte  $m/z$  wurden zwei Strukturvorschläge ausgearbeitet (Abb. 6.2.10, #40, #45), wobei die Abweichung vom theoretischen  $m/z$  des Esterproduktes (#45) mit -35,3 ppm signifikant größer ist wie die des Ameisensäure-Adduktes (#40) mit 10,0 ppm. Der

SmartFormula schlägt auf dem SigmaRank eins die Summenformel  $C_{16}H_{10}I_4NO_3$  mit 10,5 DBE vor, was dem Strukturvorschlag #40 in Abb. 6.2.10 entspricht. Die geringere Abweichung zwischen Messergebnis und theoretischen Strukturvorschlag spricht somit eher für das Anhydrid #40, wohingegen die Esterstruktur #45 chemisch plausibler ist, da das Anhydrid bei wässriger Aufarbeitung hydrolysieren sollte. Diese Diskrepanz kann ohne weitere strukturaufklärende Verfahren (NMR etc.) nicht geklärt werden.

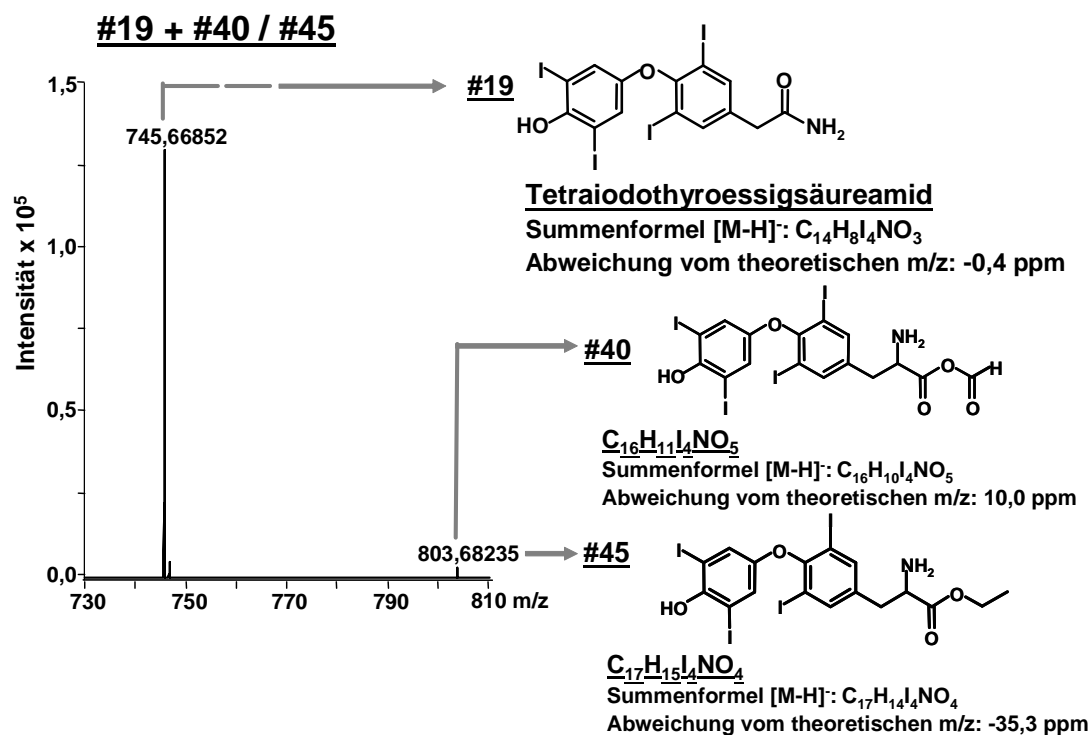


Abb. 6.2.10 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #19 + #40/#45 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Bei 32,3 min wurden die m/z-Verhältnisse 762,65131, 590,74999 und 462,86258 detektiert (Abb. 6.2.11).

Zunächst soll das m/z 762,65131 (Abb. 6.2.11, #15) näher betrachtet werden. Mit einer Abweichung des theoretischen m/z-Verhältnisse von 4,6 ppm handelt es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um Tetraiodothyromilchsäure. Auf dem SigmaRank eins wurde vom SmartFormula die Summenformel  $C_{15}H_7I_4O_5$  mit 9,5 DBE vorgeschlagen. Beim näheren Betrachten der Struktur des vorgeschlagenen Milchsäurederivates sind wieder zwei aromatische Ringe, welche acht DBE entsprechen, und ein doppelgebundener Sauerstoff der Seitenkette, welcher einem weiteren DBE entspricht, vorhanden. Die 0,5 DBE müssen wiederum noch addiert werden, da die Tetraiodothyromilchsäure als Anion detektiert wurde. Die Bildung von



Milchsäurederivaten ist eine bereits bekannte Nebenreaktion, was diesen Strukturvorschlag ebenfalls wahrscheinlich macht.

Beim  $m/z$  590,74999 beträgt die Abweichung vom theoretischen  $m/z$  der vorgeschlagenen Struktur des Triiodothyroaldehyd 7,4 ppm (Abb. 6.2.11, #30). Für dieses  $m/z$  gibt der SmartFormula auf dem SigmaRank eine Summenformel  $C_{13}H_6I_3O_3$  mit 9,5 DBE an. Auch hier sind mit der vorher diskutierten Tetraiodothyromilchsäure identische Strukturelemente vorhanden, wodurch der hier gezeigte Triiodothyroaldehyd ebenfalls 9,5 DBE aufweist. Dies würde für die Anwesenheit des Triiodothyroaldehydes sprechen. Es stellt sich an dieser Stelle nur die Frage, ob es sich hierbei um eine Coelution des Milchsäure- und Aldehydderivates handelt, oder ob es sich um Fragmente handelt, die erst während der Elektrosprayionisierung im Massenspektrometer entstehen. Prinzipiell können in der Gasphase des Massenspektrometers auch Strukturelemente abgespalten werden. Demnach müsste von der Tetraiodothyromilchsäure ein Iod-Atom und die Carbonsäurefunktion als  $CO_2$  abgespalten werden und sich ein doppelgebundener Sauerstoff an der vorherigen OH-Gruppe ausbilden, was wiederum eher unwahrscheinlich ist. Diese Abspaltungen sollten insgesamt eher eine kationische Gruppe ausbilden, die im negativen Modus nicht im Massenspektrometer nicht detektierbar ist. Daher ist anzunehmen, dass es sich hierbei tatsächlich um eine Coelution zweier verschiedener Substanzen handelt.

Das dritte detektierte  $m/z$  462,86258 (Abb. 6.2.11, #37) kann mit einer Abweichung vom theoretischen  $m/z$  von -15,5 ppm der zuvor ausgearbeiteten Struktur des Hydroxydiiodophenyl-hydroxystyrylether zugeordnet werden. Die etwas höhere Abweichung kann wiederum auf den schon mehrmals erwähnten Kalibrierbereich der Massenachse (von 600 bis 800  $m/z$ ) zurückgeführt werden. Mit Hilfe des SmartFormula wurde keine sinnvolle Summenformel gefunden, was ebenfalls auf den Kalibrierbereich zurückgeführt werden kann. Auch bei diesem Strukturvorschlag ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich hierbei des Hydroxydiiodophenyl-hydroxystyrylether um ein Gasphasenprodukt handelt. Somit würden bei 32,3 min drei Substanzen coeluiieren.

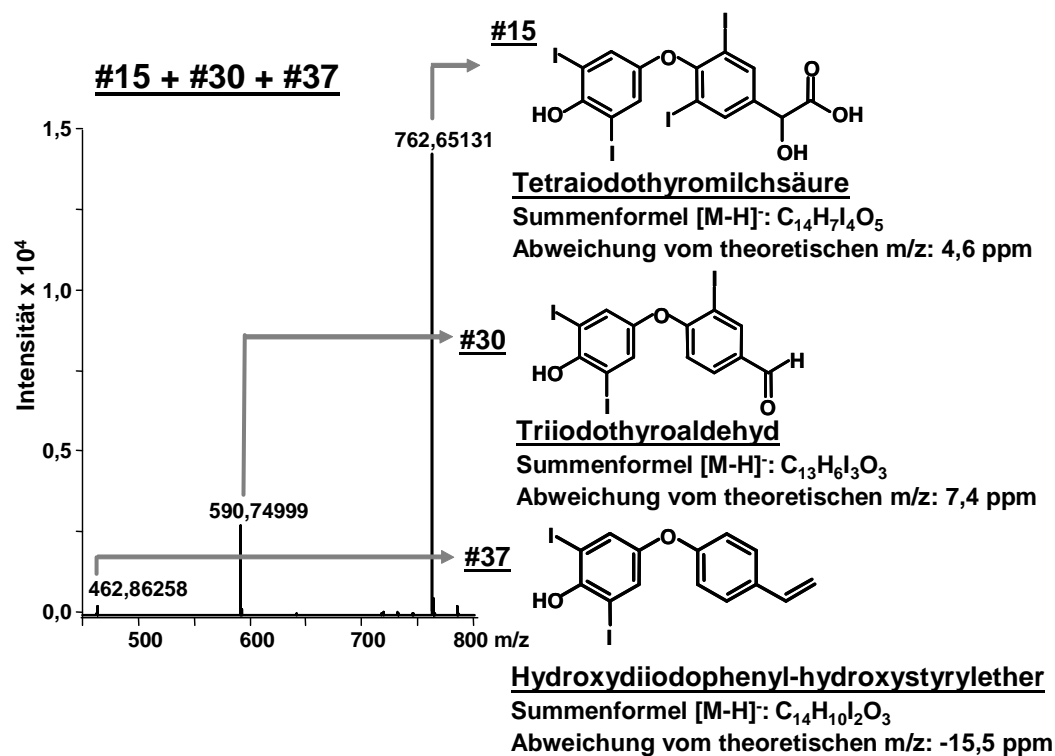


Abb. 6.2.11 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #15 + #30 + #37 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Innerhalb des auslaufenden 32,4 min-Peak konnte das m/z 731,65348 extrahiert werden (Abb. 6.2.12). Mit einer Abweichung vom theoretischen m/z von 0,4 ppm handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die vorgeschlagene Struktur des Tetraiodothyroameisensäureamids. Auch das SmartFormula-Softwaretool gibt dessen Summenformel C<sub>13</sub>H<sub>6</sub>I<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> mit 9,5 DBE auf dem SigmaRank eins an, was mit dem vorgeschlagenen Struktur (Abb. 6.2.12, #17) übereinstimmt. Folglich handelt es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um das abgebildete Tetraiodothyroameisensäureamid.

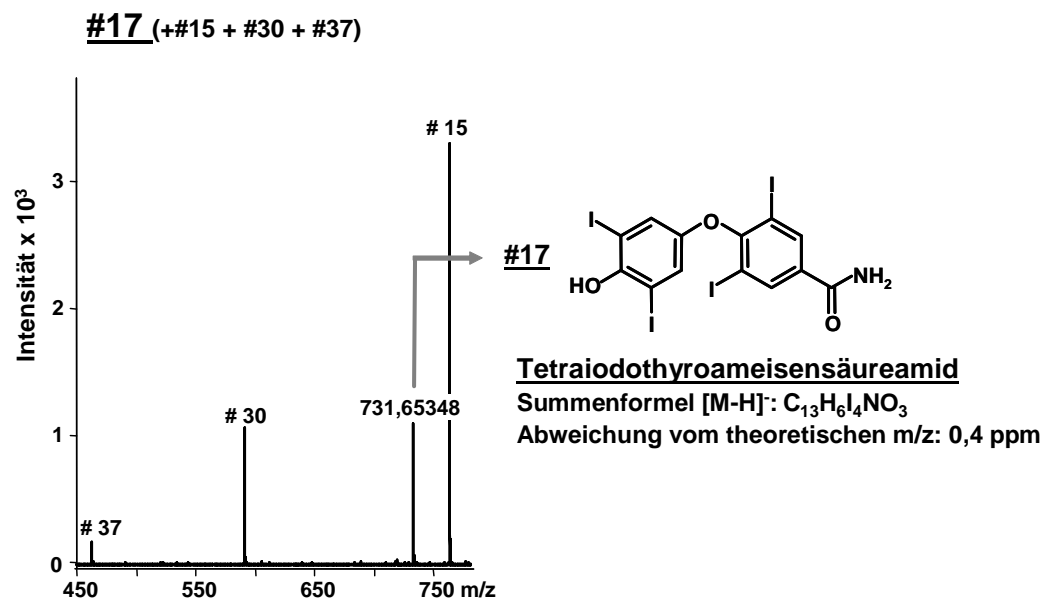


Abb. 6.2.12 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #17 im zuvor gezeigten Basispeak-chromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. Die Strukturen #15, #30, #37 sind in Abb. 6.2.11 gezeigt.

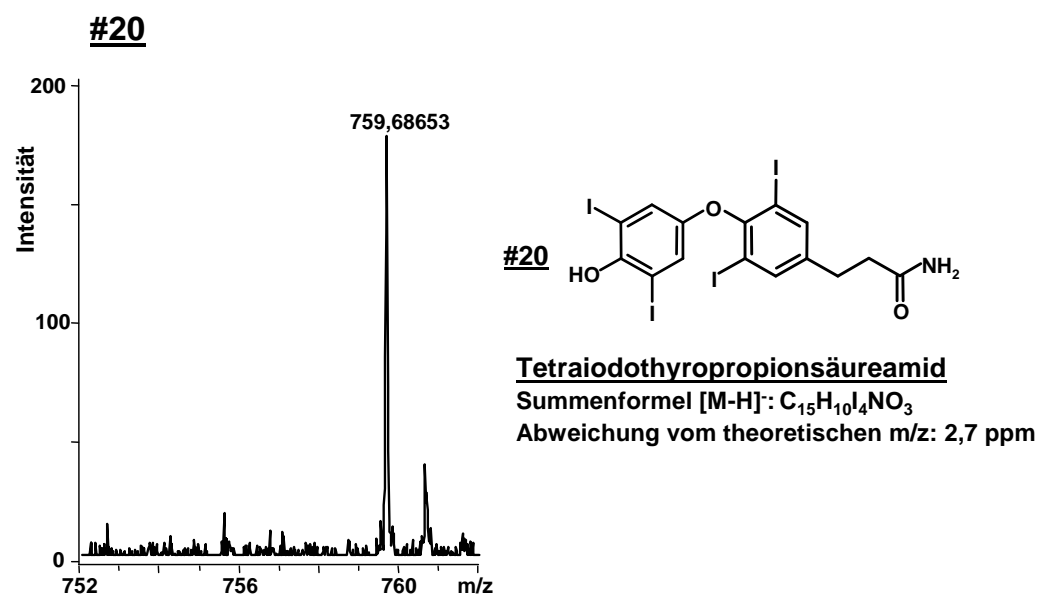


Abb. 6.2.13 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #20 im zuvor gezeigten Basispeak-chromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Bei 35,2 min wurde das m/z 759,68653 detektiert (Abb. 6.2.13). Der SmartFormula berechnet die Summenformel C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>I<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> mit 9,5 DBE auf dem SigmaRank eins. Diese Summenformel entspricht der vorgeschlagenen Struktur des Tetraiodothyropropionsäureamids (Abb. 6.2.13, #20), dessen Abweichung vom theoretischen m/z 2,7 ppm beträgt. Auch die DBE von 9,5 stimmen mit dieser Struktur überein, was eine weitere Bestätigung der Anwesenheit des Tetraiodothyropropionsäureamids ist.

Bei einer Retentionszeit von 36,3 min wurde das  $m/z$  606,74076 extrahiert (Abb. 6.2.14). Aus dem Pool der zuvor ausgearbeiteten Strukturvorschläge kann es sich bei dieser Substanz zum einen um Triiodothyroameisensäure (Abb. 6.2.14, #13), aber auch um den Triiodothyroethanol (Abb. 6.2.14, #28) handeln. Beim näheren Betrachten der Abweichungen von den theoretischen  $m/z$ -Verhältnissen handelt es sich eher nicht um den Alkohol, da dessen Abweichung mit -59,6 ppm viel größer ist als die des Ameisensäurederivates mit 0,3 ppm. Der SmartFormula schlägt auf dem SigmaRank eins die Summenformel  $C_{13}H_6I_3O_4$  mit 9,5 DBE vor, was ebenfalls der Struktur des Ameisensäurederivates (Abb. 6.2.14, #13) entspricht. Daher handelt es bei der hier detektierten Substanz mit großer Wahrscheinlichkeit um Triiodothyroameisensäure.

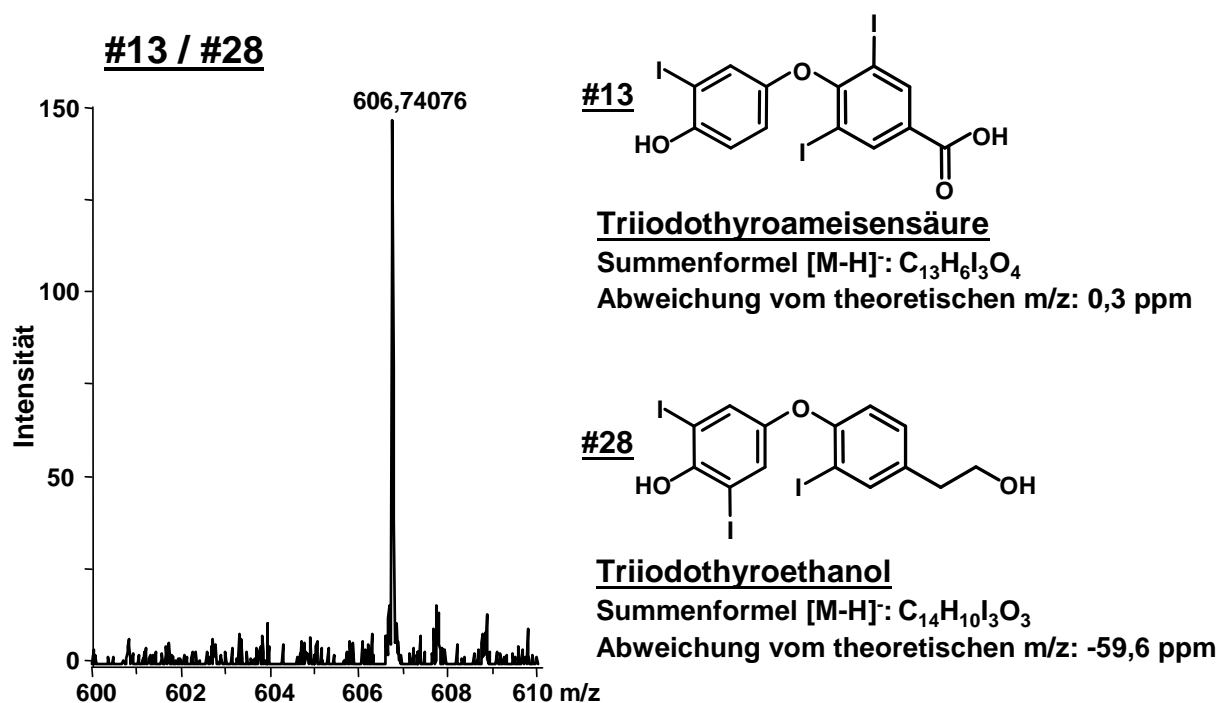
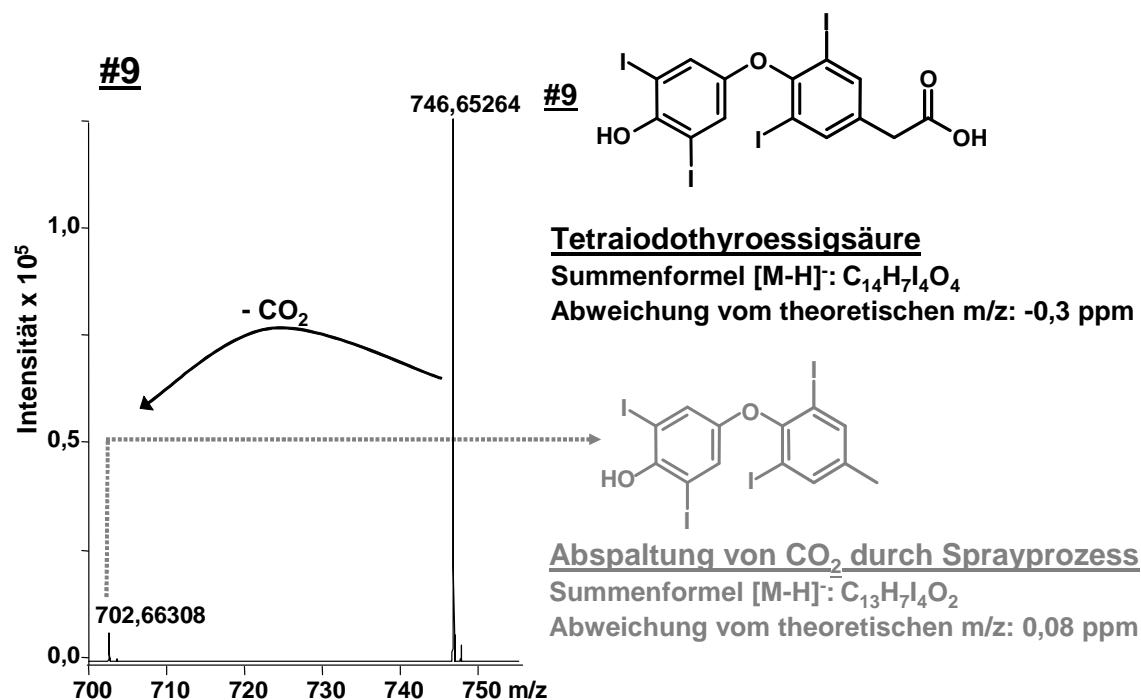


Abb. 6.2.14 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #13/#28 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Das Massenspektrum bei 37,5 min zeigt Tetraiodothyroessigsäure (Abb. 6.2.15), die auch im Standardgemisch vorhanden ist. Daher ist hier die Strukturzuordnung ohne Schwierigkeiten möglich. Auch das  $m/z$  702,66308 wurde bereits im Massenspektrum der Standardsubstanz detektiert. Durch  $CO_2$ -Abspaltung in der Gasphase kann die Tetraiodothyroessigsäure in ein Ethanderivat umgewandelt werden. Da dieser Prozess in der Gasphase während der Ionisierung erfolgt, handelt es sich beim  $m/z$  702,66308 auch nicht um eine Substanz, die coeluiert.



**Abb. 6.2.15** Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #9 im zuvor gezeigten Basispeak-chromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. Auf Grund des zuvor injizierten Standardgemisches kann diese Substanz als Tetraiodothyroessigsäure identifiziert werden.

Unter dem Peak #27 in Abb. 6.2.1 auf Seite 132 wurde das m/z 718,65834 detektiert. Der SmartFormula schlägt hierfür die Summenformel C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>I<sub>4</sub>O<sub>3</sub> mit 8,5 DBE vor. Dies entspricht der Struktur #27 Abb. 6.2.16, die ebenfalls 8 DBE aufweist. Da Tetraiodothyromethanol (Abb. 6.2.16, #27) als Anion im negativen Modus detektiert wird, müssen noch 0,5 DBE addiert werden, um die Gesamt-DBE der vorgeschlagenen Struktur zu bestimmen. Mit einer Abweichung vom theoretischen m/z von 0,6 ppm handelt es sich bei der hier detektierten Substanz mit großer Wahrscheinlichkeit um Tetraiodothyromethanol.

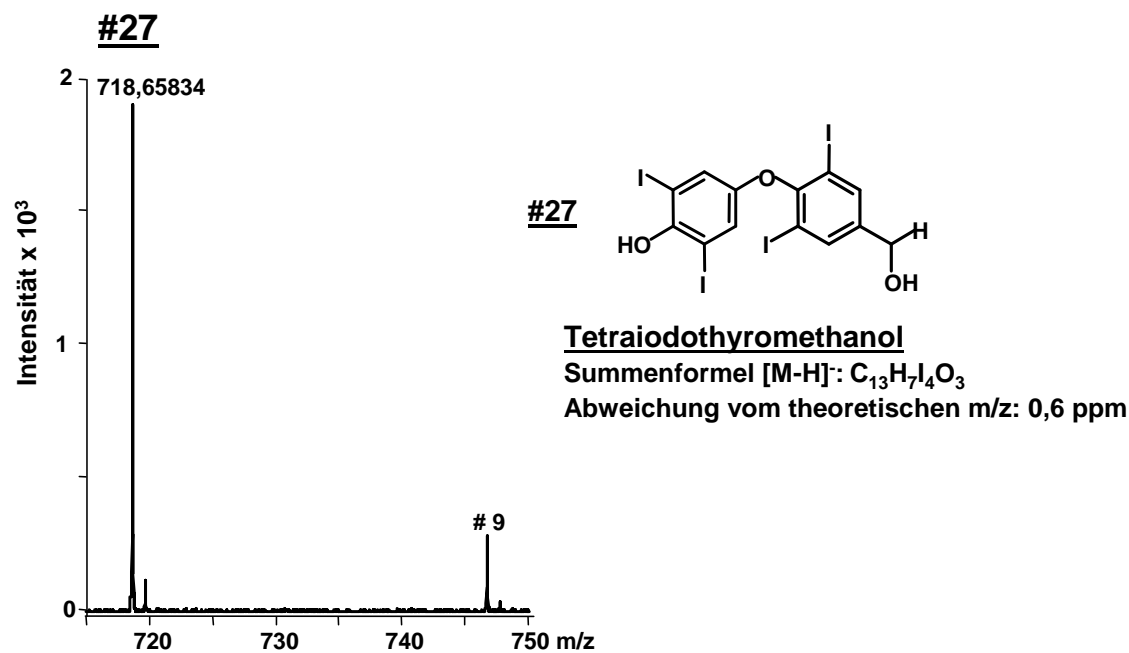
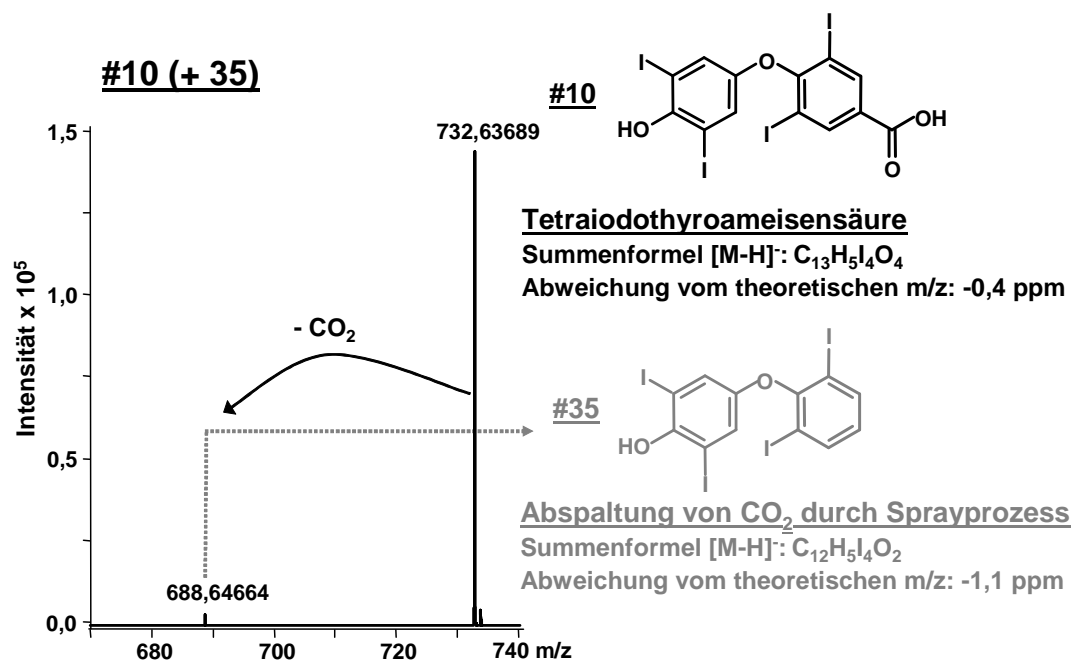


Abb. 6.2.16 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #27 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Das Massenspektrum bei 39,4 min zeigt Tetraiodothyroameisensäure (TetraFA, Abb. 6.2.17), die ebenfalls im Standardgemisch vorhanden ist. Daher kann das hier detektierte m/z 732,63689 (Abb. 6.2.17, #10) auch als identifiziert angesehen werden. Ein weiteres m/z (Abb. 6.2.17, #35) konnte unter dem Peak im Massenchromatogramm detektiert werden. Der SmartFormula hat für dieses m/z die Summenformel C<sub>12</sub>H<sub>5</sub>I<sub>4</sub>O<sub>2</sub> mit 8,5 DBE vorgeschlagen, was der Struktur #35 in Abb. 6.2.17 entspricht. Dieses m/z 688,64664 wurde auch im Massenspektrum der Standardsubstanz extrahiert. Dies lässt auch hier die Vermutung zu, dass es sich hierbei nicht um eine coeluiierende Substanz, sondern ein Produkt handelt, welches durch CO<sub>2</sub>-Abspaltung in der Gasphase gebildet wird.



**Abb. 6.2.17** Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #10 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. Auf Grund des zuvor injizierten Standardgemisches kann diese Substanz als Tetraiodothyroameisen identifiziert werden.

Im Massenspektrum unter dem Peak bei 40,7 min konnten die drei m/z-Verhältnisse 759,68459 (Abb. 6.2.18, #20), 745,67364 (Abb. 6.2.18, #19) und 704,64339 (Abb. 6.2.18, #36) detektiert werden. Mit Hilfe des SmartFormula-Tools konnte nur für das m/z 759,68459 ein chemisch sinnvoller Summenformelvorschlag erarbeitet werden. Mit einer Abweichung vom theoretischen m/z von 0,1 ppm handelt es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Tetraiodothyropropionsäureamid. Dieses Propionsäureamid wurde auch schon bei einer Retentionszeit von 35,2 min detektiert (Abb. 6.2.13, Seite 143). Es können in diesem Fall Strukturisomere vorliegen, die sich zum Beispiel in der Position der Iodatome im Molekül unterscheiden. Mit Hilfe der Massenspektrometrie kann nicht zwischen Isomeren unterschieden werden, da diese mit identischen m/z-Verhältnissen detektiert werden. Jedoch ist es möglich diese Isomere chromatographisch aufzutrennen, was auch schon im Standardgemisch mit T2 / r-T2 und T3 / r-T3 gezeigt wurde.

Auch im Falle des zweiten m/z 745,67364 kann es sich um ein Strukturisomer des Tetraiodothyroessigsäureamids handeln (Abb. 6.2.18, #19), da dieses zuvor auch bei 31,1 min detektiert wurde. Mit einer Abweichung vom theoretischen m/z von 6,4 ppm, kann es sich tatsächlich um das Tetraiodothyroessigsäureamid handeln.

Beim dritten m/z 704,643369 (Abb. 6.2.18, #36), welches unter diesem Peak bei 40,7 min identifiziert wurde, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Di-(Diiododihydroxyphenyl)-ether.

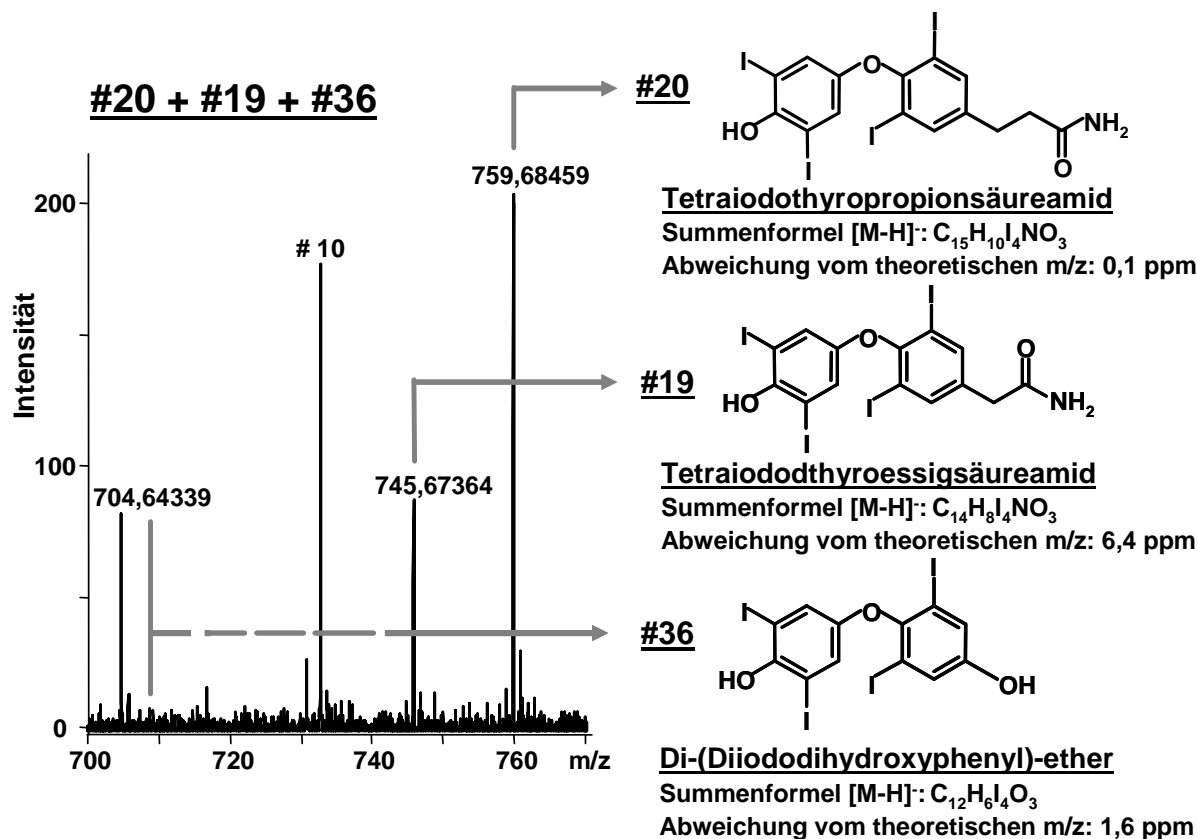


Abb. 6.2.18 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #20 + #19 + #36 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

Die Identifizierung der letzten zwei Peaks im Massenchromatogramm in Abb. 6.2.1 auf Seite 132 erfolgt analog. In beiden Fällen kann es sich um ein Ethanderivat (Abb. 6.2.19, #32 und Abb. 6.2.20, #33) oder ein Aldehydderivat (Abb. 6.2.19, #30 und Abb. 6.2.20, #31) handeln. Beide Derivate haben die gleiche nominelle Masse, unterscheiden sich aber in ihrer exakten Masse und der Zahl der Doppelbindungsäquivalente. Die detektierten Anionen der Ethanderivate besitzen 8,5 und die der Aldehydderivate 9,5 Doppelbindungsäquivalente. Die Abweichung der theoretischen m/z-Werte des Triiodothyroethans (Abb. 6.2.19, #32) und des Tetraiodothyroethans (Abb. 6.2.20, #31) sind größer als 50 ppm und daher weniger wahrscheinlich. Dagegen ist die Abweichung des Triiodothyroaldehydes (Abb. 6.2.19, #30) mit 7,7 ppm und die des Tetraiodothyroaldehydes (Abb. 6.2.20, #31) mit -3,0 ppm gering. Der SmartFormula hat in beiden Fällen auf dem ersten SigmaRank die Summenformeln der Aldehydderivate vorgeschlagen, was ebenfalls das Vorliegen des



Triiodothyraldehydes (Abb. 6.2.19, #30) und des Tetraiodothyraldehydes (Abb. 6.2.20, #31) bestätigt.

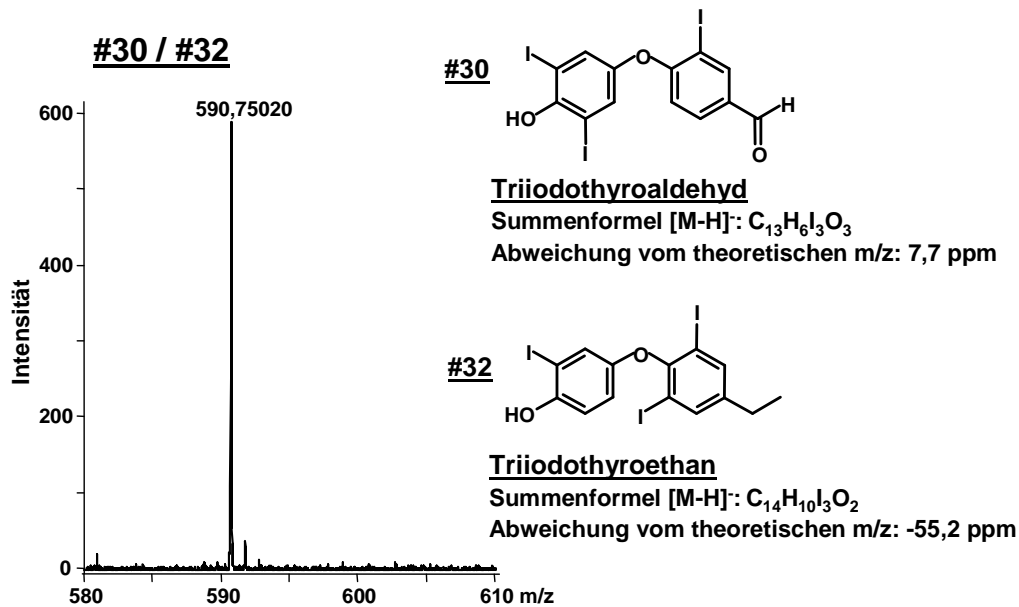


Abb. 6.2.19 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #30/#32 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

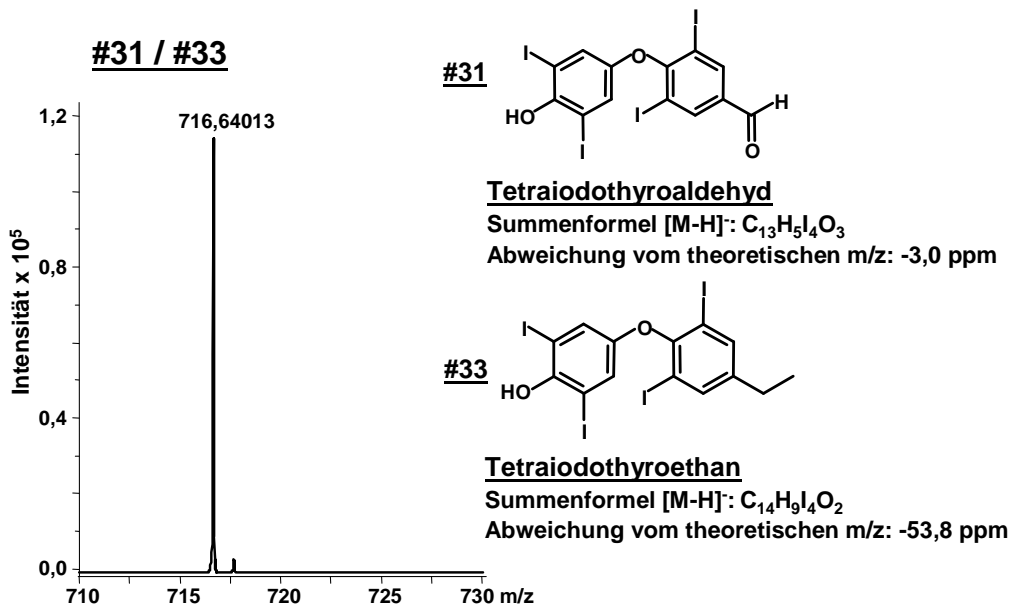
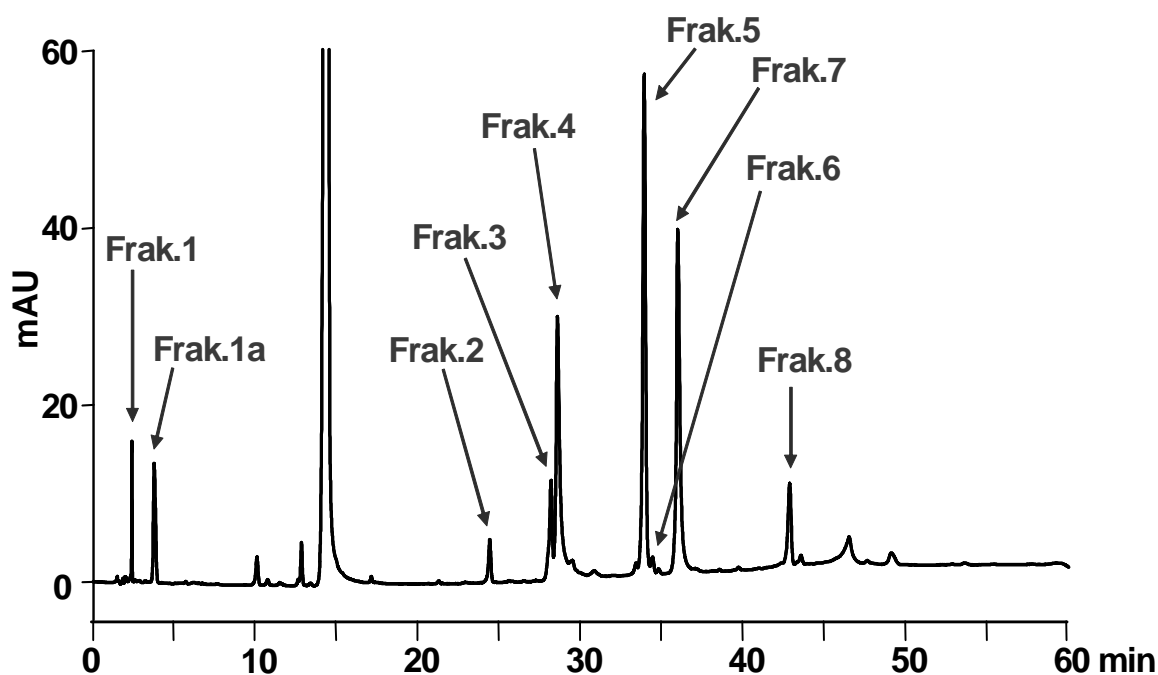


Abb. 6.2.20 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #31/#33 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 132. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt.

### 6.3. Peakfraktionierung und Identifizierung der Fraktionen mit HPLC/TOF-MS

Peakfraktionierung ist eine Möglichkeit, die Korrelation zwischen den UV-Messungen der Phosphatpuffermethode und die UV/MS-Messungen der Ameisensäuremethode zu verifizieren. Es wurden neun Peaks (Abb. 6.3.1) der thermisch gestressten Thyroxin-Probe aus der Phosphatpuffermethode heraus fraktioniert. Die Auswahl der Peaks wurde von der Peptido GmbH vorgegeben, wobei es sich um relevante Verunreinigungen handelt. Die Trennung mit der Phosphatpuffermethode wurde auf einer YMC C18 Pro mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm durchgeführt. Die neun Peaks wurden über sechs HPLC-Läufe hinweg gesammelt. In Abb. 6.3.1 ist ein UV-Chromatogramm der thermisch gestressten Thyroxin-Probe dargestellt. Die fraktionierten Peaks sind mit der entsprechenden Fraktionsnummer gekennzeichnet.



**Abb. 6.3.1 UV-Chromatogramm mit den fraktionierten Peaks einer thermisch gestressten T4-Probe.** YMC C18 Pro 150 x 4,6 mm i.D.; mobile Phase, 5 min isokratische Elution in 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer, 38 min Gradient von 30-70 % Acetonitril, 900  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV @ 225 nm.

Eine Herausforderung ist die hohe Verdünnung der einzelnen Fraktionen, welche durch den hohen Säulenfluss auf Grund des Innendurchmessers von 4,6 mm resultiert. Das Gesamtvolumen von 1400  $\mu\text{L}$  pro Fraktion wurde mittels eines *Eppendorf-Concentrators* auf 150  $\mu\text{L}$  bis 250  $\mu\text{L}$  reduziert. Ein Volumen von jeweils 100  $\mu\text{L}$  dieser aufkonzentrierten Fraktionen wurde auf eine YMC C18 Pro mit einem

Innendurchmesser von 1,0 mm unter Verwendung der modifizierten Ameisensäuremethode reinjiziert.

In der modifizierten Ameisensäuremethode für die HPLC-MS-Analyse der Fraktionen wurde auch hier Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B), jeweils versetzt mit 0,1 Vol% Ameisensäure, verwendet. Nur das Gradientenprogramm wurde geändert (Tab. 6.1). Zunächst erfolgte eine isokratische Elution mit 10 % Acetonitril, um die Phosphatsalze aus der Fraktionierung zu eluieren bevor die Analyten im Massenspektrometer detektiert werden. Dies ist nötig, da die Phosphatsalze die Massendetektion negativ beeinflussen können. Nach dieser isokratischen Stufe erfolgte die Elution der fraktionierten Analyten in einem Gradienten, der mit der ursprünglichen Ameisensäuremethode vergleichbar ist (Tab. 6.1). Die Massendetektion erfolgte unter den bisherigen Bedingungen und ist im Experimentellen Teil Kapitel 2.5.2, Seite 116 beschrieben.

**Tab. 6.1 Gradientenprogramm der HPLC-MS-Messungen der Fraktionen.**

<b>Zeit [min]</b>	<b>Eluent B [%]</b>	<b>Fluss [<math>\mu\text{L min}^{-1}</math>]</b>	<b>Temperatur</b>
0,00 - 3,00	10	50	Raumtemp.
- 8,00	30	50	Raumtemp.
- 45,00	70	50	Raumtemp.
- 51,00	70	50	Raumtemp.
- 54,00	10	50	Raumtemp.

Nachfolgend soll nun näher auf die einzelnen Fraktionen eingegangen werden, wobei der Übersichtlichkeit halber hier nur die Massenchromatogramme der Fraktionen 1a und 1 dargestellt wurden. Innerhalb der ersten zehn Minuten konnte der Phosphatpuffer, welcher in den einzelnen Proben auf Grund der ursprünglichen fraktionierten Methode enthalten war, eluiert werden (Abb. 6.3.2). So werden Phosphatpuffer und die Analyten ausreichend getrennt voneinander detektiert, womit die Massendetektion durch störende Puffersalze nicht beeinflusst oder behindert wird.

Unter dem Peak 1a, welcher bei 3,95 min in der Phosphatpuffermethode fraktioniert wurde, konnte kein Massenspektrum detektiert werden (Abb. 6.3.2). Falls es sich hierbei um einen schwer bzw. nicht ionisierbaren Analyten handelt, wird dieser massenspektrometrisch nicht erfasst. Die hohe Verdünnung des Peaks, welche aus dem Fraktionierungslauf resultiert, verringert die Empfindlichkeit zusätzlich. Zu diesem Zeitpunkt kann dem Peak 1a (Abb. 6.3.1, S. 150) keine Masse zugeordnet werden.

## Fraktion 1a

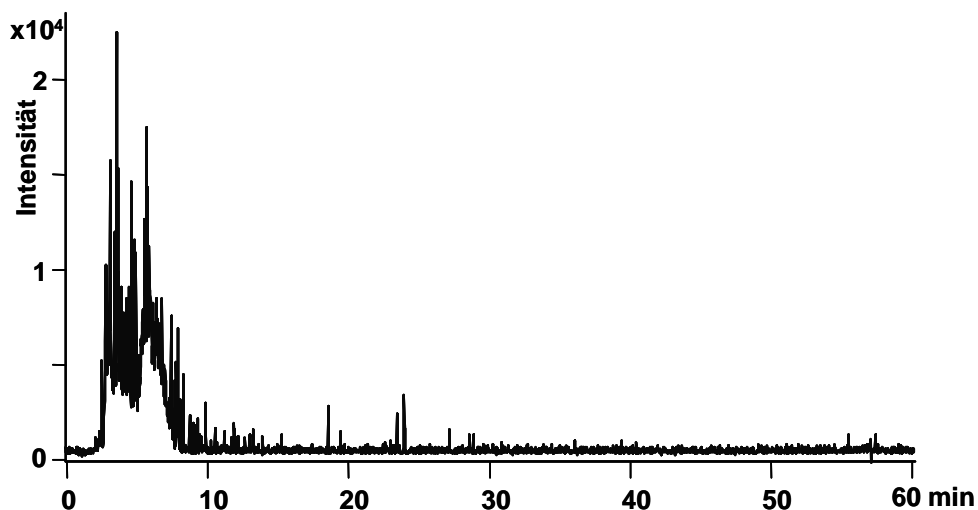


Abb. 6.3.2 Basispeakchromatogramm der Fraktion 1a. Es konnte kein Massenspektrum detektiert werden. YMC C18 Pro 150 x 1 mm i.D.; 3 min isokratische Elution in 10 % Acetonitril und 5,0 min in 30 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 37 min-Gradient von 30-70 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 50  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; negESI-TOF.

Im Basispeakchromatogramm der Fraktion #1 (Abb. 6.3.3) konnte ein Peak mit dem  $m/z$  431,85738 detektiert werden, welches im Abschnitt 6.2 auf Seite 132 dem Diiodothyrosin zugeordnet wurde (Abb. 6.2.2, S. 133 und Abb. 6.2.3, S. 134).

## Fraktion 1

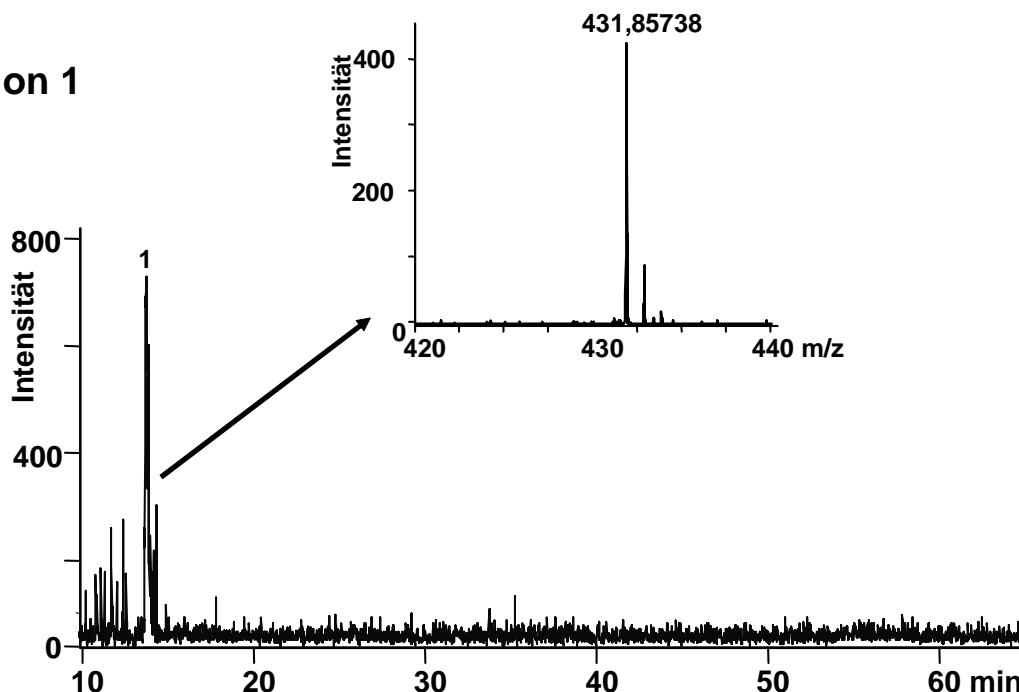


Abb. 6.3.3 Basispeakchromatogramm mit extrahiertem Massenspektrum der Fraktion 1, die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten. YMC C18 Pro 150 x 1 mm i.D.; 3 min isokratische Elution in 10 % Acetonitril und 5,0 min in 30 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 37 min-Gradient von 30-70 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 50  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; negESI-TOF.

Alle weiteren Basispeakchromatogramme und Massenspektren der einzelnen Fraktionen sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang zu finden. Die detektierten m/z-Verhältnisse aller Fraktionen sind in Tab. 6.2 den Retentionszeiten der Peaks in der Phosphatpuffermethode zugeordnet. Die Tabelle Tab. 6.2 fasst das Ergebnis der Peakfraktionierung zusammen.

**Tab. 6.2 Übersicht der detektierten Massen innerhalb der einzelnen Fraktionen ausgewählter Peaks einer gestressten Thyroxin-Probe (Korrelation zwischen Peaks und Fraktionsnummer Abb. 6.3.1, S.150).** Fraktionierung erfolgte innerhalb der Phosphatpuffermethode. HPLC/MS-Detektion unter Verwendung der Ameisensäuremethode.

UV-Chromatogramm @ 225 nm in der Phosphatpuffermethode (Abb. 6.3.1, S. 150)		detektierte Peaks im korrespondierenden Basispeakchromatogramm mit negESI-TOF-MS			
Fraktions- nummer #	Retentions- zeit [min]	Peak #	Retentions- zeit [min]	detektierte m/z	Zuordnung
<b>1a</b>	3,95	kein Peak im Basispeakchromatogramm detektiert			
<b>1</b>	2,42	1	13,86	431,88738	#11 - Diiodothyrosin
<b>2</b>	24,38	1	39,77	761,69919	#22 - Tetraiodothyromilchsäureamid #38 - Tetraiodothyrohydroxypropanamin
<b>3</b>	28,15	1	43,71	745,69472	#19 - Tetraiodothyroessigsäureamid
		2	46,34	664,77125	keine Zuordnung möglich
<b>4</b>	28,72	1	46,42	762,68105	#15 - Tetraiodothyromilchsäure
				590,76100	#30 - Triiodothyroaldehyd
		2	50,44	491,82316	keine Zuordnung möglich
				509,85106	Diiodothyrohydroxypropanamin
				619,74948	Triiodothyroessigsäure
<b>5</b>	33,90	1	50,27	746,67625	#9 - Tetraiodothyroessigsäure
		2	52,75	665,75609	keine Zuordnung möglich
<b>6</b>	34,40	kein Peak im Basispeakchromatogramm detektiert			
<b>7</b>	36,02	1	52,96	732,65351	#10 - Tetraiodothyroameisensäure
<b>8</b>	42,83	1	30,19	522,34101	keine Zuordnung möglich
		2	57,49	716,66884	#31 – Tetraiodothyroaldehyd

Die Massenachse der detektierten Spektren konnten nicht intern kalibriert werden, da kein T3, T4, TetraAc und TetraFA in den einzelnen Fraktionen enthalten war. Demzufolge sind signifikant größere Abweichungen der theoretischen und detektierten m/z-Verhältnisse zu erwarten. Daher wurden die Abweichungen nicht in Tab. 6.2

aufgelistet. In Fraktion #1 wurde auch in der Phosphatpuffermethode das Diiodotyrosin identifiziert. In Fraktion zwei können zwei mögliche Strukturen (#22 und #38) dem detektierten m/z zugeordnet werden, wobei das Tetraiodothyrohydroxypropanamin (#38) die geringere Abweichung vom theoretischen m/z aufweist. In dem HPLC-MS-Lauf der gestressten T4-Probe wurde unter diesem Peak ein vergleichbares m/z detektiert, welches aber als Tetraiodothyromilchsäureamid identifiziert wurde (Abb. 6.2.9, S. 139). Da für diese Messungen eine interne Kalibrierung der Massenachse durchgeführt werden konnte, handelt es sich bei Fraktion #2 mit größerer Wahrscheinlichkeit um das Milchsäureamid. In den weiteren Fraktionen wurden zum Teil m/z-Verhältnisse detektiert, die in der vorherigen HPLC-MS-Analyse der gestressten T4-Probe nicht gefunden wurden. Dabei kann es sich um Verunreinigungen aus dem Phosphatpuffersystem handeln, in welchem die Fraktionierung durchgeführt wurde, oder aber auch, um Anreicherungen bzw. Verunreinigungen, die durch den Wechsel der verschiedenen Probengefäße eingebracht wurden.

Zusammenfassend betrachtet, konnte mit Hilfe der Fraktionierung gezeigt werden, dass die relevanten Peaks der gestressten Thyroxin-Probe, die mit der Phosphatpuffermethode im UV-Chromatogramm bei 225 nm detektiert wurden, durch die HPLC-MS-Analyse mit der Ameisensäuremethode den Substanzen Diiodotyrosin, Tetraiodothyroameisensäure, Tetraiodothyroessigsäure, Triiodothyroaldehyd und Tetraiodothyroaldehyd sowie die Tetraiodothyromilchsäure und das Tetraiodothyromilchsäureamid zugeordnet werden konnten. Folglich können die Peakmuster beider HPLC-Methoden miteinander verglichen werden, was eine Zuordnung der hier unterbreiteten Strukturvorschläge der HPLC-MS-Analyse den Peaks im Chromatogramm der Phosphatpuffermethode ermöglicht.

## 7. Zusammenfassung

Es konnte eine HPLC-Methode zur Identifizierung von Abbauprodukten der synthetischen Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) bzw. Liothyronin (T3) entwickelt werden, die mit der Massenspektrometrie (MS) kompatibel ist. Ausgangspunkt war dabei eine bereits zur Qualitätskontrolle eingesetzte HPLC-UV-Methode, die wegen des verwendeten Phosphatpuffers jedoch nicht MS-kompatibel ist. Die Retentionszeiten und Elutionsreihenfolgen der Analyten der in dieser Arbeit entwickelten Ameisensäuremethode sind mit denen der ursprünglichen Phosphatpuffermethode vergleichbar. Die entwickelte Ameisensäuremethode konnte erfolgreich mit der Massenspektrometrie gekoppelt werden. Die Ausarbeitungen der Strukturvorschläge in dieser Arbeit basieren auf der Messung exakter Massen und Isotopenverteilungen, welche mit der Flugzeitmassenspektrometrie durchgeführt wurden.

Einen entscheidenden Einfluss auf die massenspektrometrische Detektion hat die Ionisierung der Analyten. Daher wurden zunächst die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) im positiven und negativen Modus und die Elektrosprayionisierung (ESI) im negativen Modus einander gegenübergestellt. Das Verhältnis des  $m/z$ -Signals zum Rauschen (S/N) ausgewählter Peaks im Massenspektrum wurde miteinander verglichen, wobei die negative APCI-Ionisierung die höchsten S/N-Werte erreicht. Die negative ESI zeigte zwar geringere Signalintensitäten, dennoch wurde der Wirkstoffpeak im Massenspektrum nicht so stark überladen, wodurch eine Überlagerung durch den Wirkstoff reduziert wird. Dadurch sind die S/N-Werte der negativen ESI mit denen der APCI vergleichbar. Aus diesen und apparativen Gründen wurden alle Daten, die in dieser Arbeit zur Ausarbeitung von Strukturvorschlägen herangezogen wurden, mit der negativen ESI generiert.

Die positive ESI hat schon in Vorversuchen gezeigt, dass unter diesen Bedingungen nicht alle Analyten im Massenspektrometer detektiert werden können und wurde daher nicht weiter verfolgt.

Die Ausarbeitung der Strukturvorschläge erfolgte primär durch Ableitung aus bekannten chemischen Reaktionen ausgehend von der Struktur des Thyroxins (T4) bzw. Liothyronin (T3). Es wurden die theoretischen Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) mit den detektierten verglichen und die Abweichung in ppm betrachtet. Zusätzlich wurde

zur Bestätigung der Zuordnung ein Software-Tool herangezogen, welches basierend auf exakten  $m/z$  und Isotopenverteilungen Summenformelvorschläge berechnet.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass in dieser Arbeit keine quantitativen Aussagen über die detektierten Nebenpeaks getroffen werden. Zum einem handelt es sich um unbekannte Substanzen, wodurch keine Standardsubstanzen zur Verfügung standen. Zum anderen unterschieden sich die Analyten stark in ihrem Ionisierungsverhalten, was einen entscheidenden Einfluss auf den Responsfaktor und damit auf die Peakintensität im Massenchromatogramm hat. Das primäre Ziel war die Ausarbeitung von Strukturvorschlägen, wodurch nur die detektierten  $m/z$  und nicht die Peakflächen betrachtet wurden.

Es standen in dieser Arbeit mikronisierte T4-Proben und nicht mikronisierte T4- und T3-Proben zur Verfügung, welche unter verschiedenen Bedingungen thermisch gestresst wurden. Im Anhang Seite A-32 und Folgende sind die detektierten  $m/z$  und die Zuordnung der einzelnen Proben aufgelistet.

Diese Massenlisten zusammengefasst betrachtet, konnte in allen T4-Proben wie auch den T3-Proben Diiodotyrosin, Triiodothyroaldehyd und Tetraiodothyroaldehyd sowie T3 und T4 detektiert werden. Ein Milchsäurederivat konnte in allen T4-Proben identifiziert werden. Dagegen konnte für das  $m/z$  1119 keine Zuordnung getroffen werden, was unter anderem auch auf die Kalibrierung der Massenachse zurückgeführt werden kann (Abb. 6.2.7, S. 138). Tetraiodothyroameisensäure und -essigsäure sind auch im Standardgemisch enthalten. Für diese zwei Substanzen konnten Abspaltungsprodukte, welche während des Ionisierungsprozesses entstehen, beobachtet werden. In der ungestressten mikronisierten T4-Probe wurde im Gegensatz zu allen weiteren Proben kein r-T3 detektiert. In T3-Proben konnten neben T3 und r-T3 auch T2 und r-T2 identifiziert werden. In den T4-Proben wurden  $m/z$  detektiert, die größer als 800 sind, wobei es sich um Veresterungsprodukte handeln dürfte.

Alle T4-Proben zeigen ein vergleichbares Abbauprofil in den Massenspektren, wobei auch zwischen mikronisierten und nicht mikronisierten Proben keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden.

Der direkte Vergleich zwischen T3- und T4-Proben zeigt vergleichbare Abbaureaktionen bei beiden Hormonen. Dies kann aus der Tatsache gefolgert werden, dass für die Verunreinigungen der T3-Proben Strukturvorschläge ausgearbeitet werden konnten, die denen in den T4-Proben sehr ähnlich sind und sich zum Teil nur um ein Iodatom im Molekülgerüst unterscheiden.



# Kapitel 4

---

## **Methodenentwicklung durch Optimierung stationärer Phasen für synthetische Schilddrüsenhormon- Proben**

**(Stationary Phase Optimized Liquid Chromatography, (POPLC™))**

**„Vereinfache das Komplizierte und kompliziere nicht das Einfache.“**

Papst Johannes XXIII., (1881 - 1963)

## 1. Literaturüberblick und theoretischer Hintergrund

Die Entwicklung von HPLC-Methoden zur Trennung komplexer Probengemische erfolgt meist durch Testen unterschiedlicher stationärer Phasen mit verschiedenen Selektivitäten unter Optimierung der mobilen Phase. Meist steht dem Anwender ein Pool mit einer begrenzten Anzahl an stationären Phasen zur Verfügung. Auf der Säule mit dem viel aussichtsreichsten Ergebnis wird die Trennung durch Modifizieren der mobilen Phase meist durch eine Gradientenelution optimiert [74-79]. Dieser Weg der Methodenentwicklung in der HPLC kann auch durch den Einsatz entsprechender Software unterstützt werden. Snyder nahm 1978 eine Einteilung verschiedener Lösungsmittel vor [80], die 1983 von Kirkland und Glajch durch das Lösungsmittelstärke-Prisma für Multilösungsmittel-Elutionen erweitert wurde [74]. Das „PRISMA“-Modell wurde von Nyiredy, Kallenbach-Tölke und Sticher für die Optimierung in der Dünnschichtchromatographie angewandt [81, 82]. Durch die in diesen Arbeiten diskutierten Hintergründe und Zusammenhänge können unter anderem Retentionsfaktoren vorhergesagt werden [83], was die Basis für eine computerunterstützte Optimierung der mobilen Phase ist. Glajch et al. variierten systematisch die mobile und stationäre Phase, um eine isokratische Trennung von Aminosäurederivaten zu erreichen [84].

Der entgegengesetzte Ansatz, eine HPLC-Methode zu entwickeln bzw. zu optimieren, liegt im Kombinieren verschiedener stationärer Phasen. Auch hier kann das „PRISMA“-Modell angewandt werden, um die richtige Auswahl an Selektivitäten zu treffen. Jede homogene stationäre Phase besitzt für ein gegebenes Trennproblem eine bestimmte Selektivität. Komplexe Probengemische weisen einen großen chromatographischen Elutionsbereich auf und können meist nicht oder nur mit langen Analysenzeiten auf einer einzelnen homogenen stationären Phase ausreichend getrennt werden. Der große dynamische Bereich einer Probe wird durch eine große Variabilität der chemischen Eigenschaften der Substanzen hervorgerufen. So kann zum Beispiel die Trennung eines Gemisches aus Säuren und stark hydrophoben Verbindungen, die auch zum Teil in Form von Isomeren vorliegen, den Anwender vor eine große Herausforderung stellen. Durch die Kombination von stationären Phasen mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen können neue Selektivitäten erreicht werden, die mit einer einzelnen homogenen Phase nicht möglich wären. Dies kann eine Lösung für anspruchsvolle Trennprobleme sein.

Doch wie können die verschiedenen stationären Phasen miteinander kombiniert werden? Zum einen können die entsprechenden HPLC-Säulen in Reihe hintereinander geschaltet werden [85-87]. Die Nachteile dieser Kopplungsmöglichkeit sind die Totvolumina und die daraus resultierende Bandenverbreiterung, die durch die Verbindungen zwischen den einzelnen Säulen vergrößert werden. Ein anderer Ansatz ist, die verschiedenen stationären Phasen in eine einzige Säule zu packen [84]. Doch gerade das Packen ist nicht trivial, da sich die chemischen Eigenschaften der einzelnen Phasen voneinander unterscheiden und folglich auch verschiedene Packvorschriften nötig sind. Möglich ist aber auch das Kombinieren einzelner Säulensegmente [2, 88, 89].

Nyiredy übertrug das PRISMA-Modell auf die Optimierung der stationären Phasen und bezeichnete dieses Prinzip der Methodenentwicklung als „stationary phase selectivity optimized liquid chromatography“ (SOS). Dieses Konzept konnte umgesetzt werden, indem eine totvolumenfreie Kopplung von Säulensegmenten entwickelt wurde, die kommerziell unter dem Namen POPLC™ (Bischoff Analysetechnik und -geräte GmbH) erhältlich ist. In diesem segmentierten Säulensystem (POPLink-System) werden die einzelnen Teile durch ein männlich-weiblich-Stecksystem ohne Effizienzverlust miteinander verbunden. Mit Hilfe der dazugehörigen Software (POPLC-Optimizer), die auf dem PRISMA-Modell basiert, werden die Berechnungen zur Optimierung unterstützt [2].

### **1.1. Das „PRISMA“-Modell für die Optimierung stationärer Phasen**

Wie vorher schon erwähnt, kann durch Kombination verschiedener stationärer Phasen, die sich stark in ihren Selektivitäten unterscheiden, fast jede gewünschte Selektivität erreicht werden, um komplexe Probengemische aufzutrennen. Einen Ansatz der Optimierung bietet das PRISMA-Modell, welches ursprünglich für die Optimierung der mobilen Phase angewandt wurde [81].

Die Übertragung dieses Modells auf stationäre Phasen ist möglich, da sich Retentionszeiten additiv verhalten, wenn verschiedene stationäre Phasen miteinander kombiniert werden. So kann das Optimierungsproblem auch mathematisch betrachtet und durch geeignete Computerprogramme gelöst werden. Dies bedeutet, dass „nur“ das richtige Verhältnis und somit die richtige Kombination entsprechender stationärer Phasen gefunden werden muss, die das Trennproblem lösen. Dafür wird das PRISMA-Modell [2] genutzt. In Abb. 1.1 ist solch ein Prisma dargestellt. Die Schenkel des

Prismas repräsentieren die einzelnen stationären Phasen, wobei die Schenkelhöhen der Retentionsstärke eines Analyten auf der eingesetzten stationären Phase entsprechen. Wenn drei stationäre Phasen betrachtet werden, spannen diese eine Dreiecksfläche auf (Abb. 1.1, rechts). Innerhalb dieser Fläche gibt es eine „optimale“ Retentionsstärke für diesen Analyten, die durch eine Kombination der drei Phasen erreicht werden kann [POPLC-Broschüre, [www.poplc.de](http://www.poplc.de)]. Jeder Punkt auf der Dreiecksfläche ist als Linearkombination der verschiedenen Anteile von A, B und C darstellbar und kann dadurch berechnet werden. Eine Trennung von zwei Komponenten kann somit über die Optimierung der einzelnen Retentionszeiten und den zugehörigen Bodenzahlen bzw. Peakbreiten rechnerisch vorhergesagt werden.

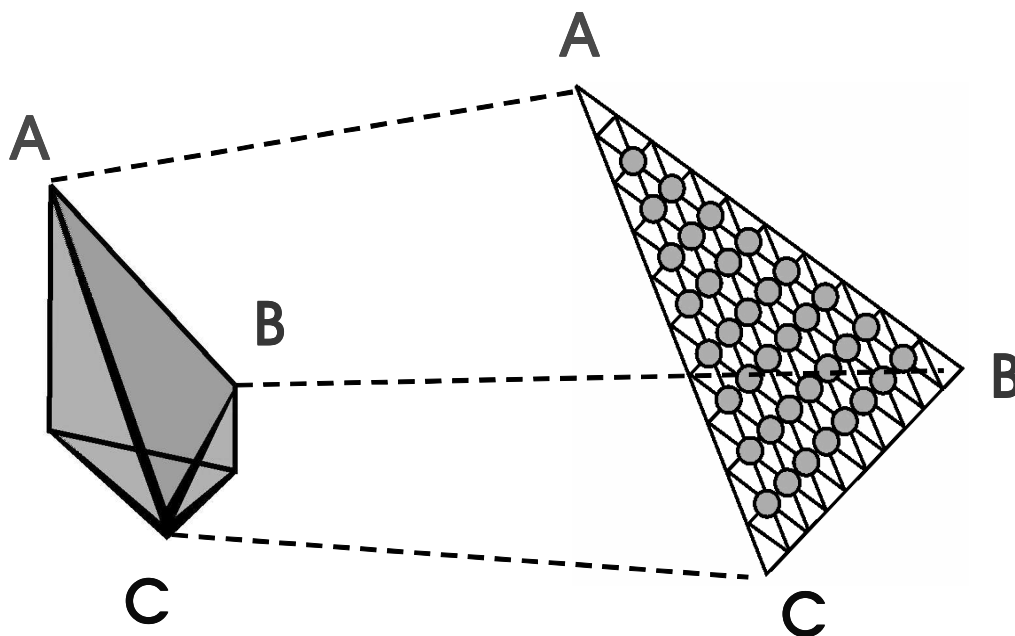


Abb. 1.1 PRISMA-Modell (links) für die Eigenschaften (z.B. Selektivität) dreier verschiedener stationärer Phasen A, B und C (rechts) unter identischen Elutionsbedingungen.

Das Prinzip ist apparativ einfach umsetzbar, die praktische Vorgehensweise ist schematisch in Abb. 1.2 (stat. Phase A, B, C) dargestellt. Man beginnt zunächst mit der Bestimmung der Retention der Analyten auf jeder einzelnen homogenen stationären Phase bei einer isokratischen Zusammensetzung der mobilen Phase. Dabei unterscheiden sich die Selektivitäten der stationären Phasen stark voneinander, es ist meist nicht möglich, das Gemisch unter isokratischen Bedingungen auf einer einzigen homogenen Phase zu trennen. Die erreichten Retentionszeiten aller Analyten auf den jeweiligen Phasen werden in das entsprechende Computerprogramm eingegeben. Dieses berechnet auf Basis des PRISMA-Modells und der Gesetzmäßigkeit, dass Retentionszeiten additiv sind, die Kombination der stationären Phasensegmente, die

nötig sind um das Probengemisch in dieser isokratischen mobilen Phase aufzutrennen. Dann werden die entsprechend vorgeschlagenden Säulen-Segmente miteinander verbunden, wobei die Reihenfolge der Säulensegmente keinen Einfluss auf das Trennproblem haben sollte. Unter den vorher gewählten isokratischen Bedingungen der Basismessungen wird das Probengemisch auf die zusammengesetzte Säule injiziert und kann getrennt werden.

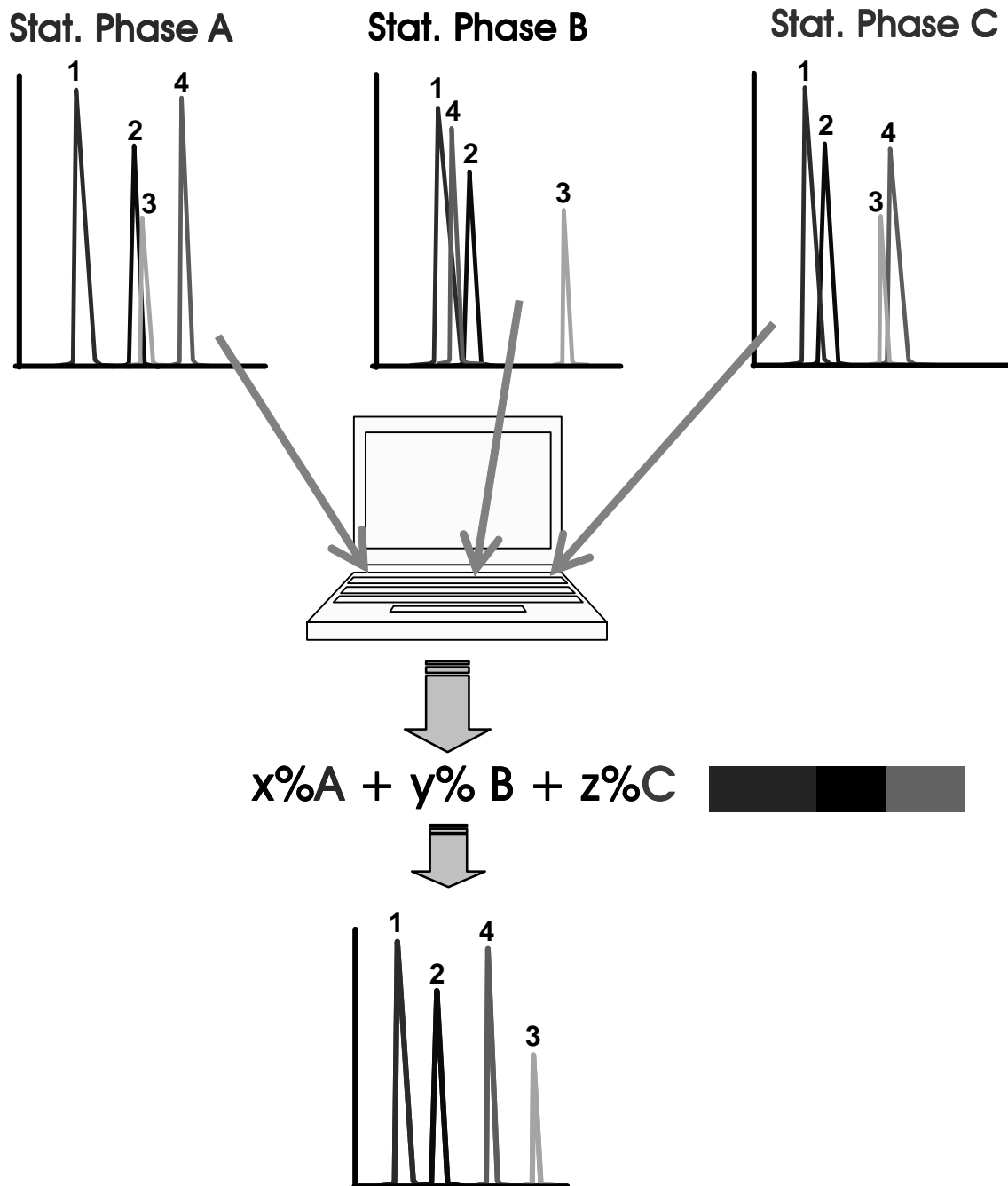


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Vorgehensweise in der Optimierung der stationären Phase mit dem POPLC-System, basierend auf dem PRISMA-Modell am Beispiel von drei stationären Phasen A, B und C.

Die verwendeten stationären Phasen sollten sich in ihren chemischen Modifikationen stark voneinander unterscheiden, um durch die Kombination ein breites Selektivitätsspektrum zu erreichen. In dieser Arbeit wurde ein POPLC-System mit fünf verschiedenen stationären Phasen verwendet, deren folgende Beschreibung der POPLC-Broschüre entnommen wurde. Zum einen ist eine Octadecyl-Silica-Phase enthalten, welche eine klassische C18-Phase mit Endcapping ist und auf der eine Trennung auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen erzielt wird. Die Triacetyl-Silica-Phase besitzt kein Endcapping, zeichnet sich aber durch eine hohe molekulare Formerkennung (engl. shape selectivity) aus. Auf der Phenyl-Silica-Phase (ebenfalls mit Endcapping) erfolgt die Trennung der Analyten hauptsächlich über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Das Cyanopropyl-Silica ist eine stark polare Phase, die zwar ein Endcapping aufweist, aber deren hydrophobe Wechselwirkungen stark reduziert sind. Die fünfte stationäre Phase ist ein Octadecyl-Silica mit eingebetteten polaren Gruppen, auf der saure Analyten eine stärkere Affinität zur stationären Phase haben als basische.

## **1.2. Zielsetzung**

Kapitel 3 dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Strukturaufklärung von Abbau- bzw. Nebenprodukten thermisch gestresster Schilddrüsenhormonproben. Dabei handelt es sich um relativ komplexe Probengemische, deren Substanzen mit UV- und massenspektrometrischer Detektion identifiziert und charakterisiert wurden. Thermisch gestresste Thyroxin-Proben weisen eine große Heterogenität chemischer Strukturen auf. Da es sich vorwiegend um Abbau- oder Synthesenebenprodukte handelt, ist die Grundstruktur der unbekannt Substanzen der des Hauptproduktes (hier T4) sehr ähnlich. Die Strukturen unterscheiden sich vorwiegend in der Anzahl an Iodatomen und/oder im Aufbau der Seitenkette des Moleküls. Eine volle Analyse einer thermisch gestressten T4-Probe auf der Standard-Säule YMC C18 Pro benötigt trotz einer Gradientenelution auf Grund der chemischen Probenheterogenität über 60 min. Diese Methode soll im Folgenden als Referenzmethode bzw. -messung bezeichnet werden. Ziel ist es, unter Anwendung des Konzepts der Optimierung stationärer Phasen (POPLC™) die Analysendauer, wenn möglich unter isokratischen Bedingungen, zu reduzieren.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1. Geräte und Instrumente

#### 2.1.1. HPLC-Instrumente

Die Optimierung der stationären Phasen wie auch die Messungen auf den optimierten stationären Phasen wurden auf einem Niederdruckgradientensystem der Firma Waters, Alliance 2695, mit einem Diodenarray-Detektor DAD 996 durchgeführt. Als Steuerungssoftware und zur Datenauswertung wurde Empower™ 2 genutzt.

Die Standard-Referenz-Messung auf einer klassischen Microbore-Säule wurden auf einem binärem Hochdruckgradientensystem von Agilent HP1100, bestehend aus einer Pumpe G1312A, einem Entgaser G1322A, einem Festwellenlängendetektor G1314A mit Semi-Micro-Cell (5 µL-Zelle) und einem Autosampler G1313A durchgeführt. Als Steuerungssoftware und zur Datenauswertung wurde Chromeleon™ der Version 6.70 eingesetzt.

#### 2.1.2. Massenspektrometer und gekoppelte Systeme

Für die Standard-Referenz-Messung auf einer klassischen stationären C18-Phase wurde das binäre Hochdruckgradientensystem HP1100 direkt mit einem ESI-Flugzeitmassenspektrometer (TOF) micOTOF der Firma Bruker Daltonics gekoppelt. Die Datengenerierung erfolgte hier über die Steuerungssoftware micOTOF control der Version 1.0 (Bruker Daltonics). Die Datenauswertung der Systemtests erfolgte mit Data Analysis Version 3.3 (Bruker Daltonics).

Für die Basismessungen (Methodenentwicklung) wurde das Alliance-System mit einer ESI-Quadrupol-Ionenfalle von Bruker Daltonics (Esquire-LC) gekoppelt. Die Datengenerierung erfolgte hier über die Steuerungssoftware von Bruker Daltonics, Esquire Control Version 4.5. Die Datenauswertung der Systemtests erfolgte mit Data Analysis Version 3.3 (Bruker Daltonics).

Für die Messungen mit den optimierten stationären Phasen wurde das Alliance-System über eine Standard-ESI-Quelle mit dem Flugzeitmassenspektrometer micOTOF von Bruker Daltonics verbunden. Auch hier war die Steuerungssoftware micOTOF control



Version 1.0 von Bruker Daltonics. Die Datenauswertung erfolgte ebenfalls mit der Data Analysis der Version 3.3 (Bruker Daltonics).

Für die Basismessungen und Messungen mit den optimierten stationären Phasen wurde der Detektorausgang des Alliance-Systems über einen passiven Flussplit mit dem Massenspektrometer verbunden.

## **2.2. verwendete Chemikalien und Probenvorbereitung**

Methanol und Acetonitril (HPLC gradient grade) waren von Sigma Aldrich. Wasser wurde einer Reinstwasseranlage Model Pure Lab Genetic Ultra von Elga entnommen. Essigsäure Suprapur<sup>®</sup> 100 %, Ameisensäure 98-99 % (p.a.) und Natriumhydroxid (p.a.) wurden bei Merck bestellt.

3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin (r-T3) und 3,5,3'-Triiodothyropropionsäure (TriProp) wurden bei Sigma Aldrich bestellt. 3,5-Diiodo-L-Thyronin (T2), 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin (T3), 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin (T4), 3,5-Diiodothyroessigsäure (DiAc), 3,5,3'-Triiodothyroessigsäure (TriAc), 3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure (TetraAc) und 3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure (TetraFA) wurden von Peptido GmbH synthetisiert. Das Standard- bzw. Referenzgemisch (Abb. 2.1, Tab. 2.1) wurde von Peptido GmbH als 300 bis 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Stammlösung in einer alkalischen Methanollösung (400 mg Natriumhydroxid in 500 mL Wasser + 500 mL Methanol) zur Verfügung gestellt.

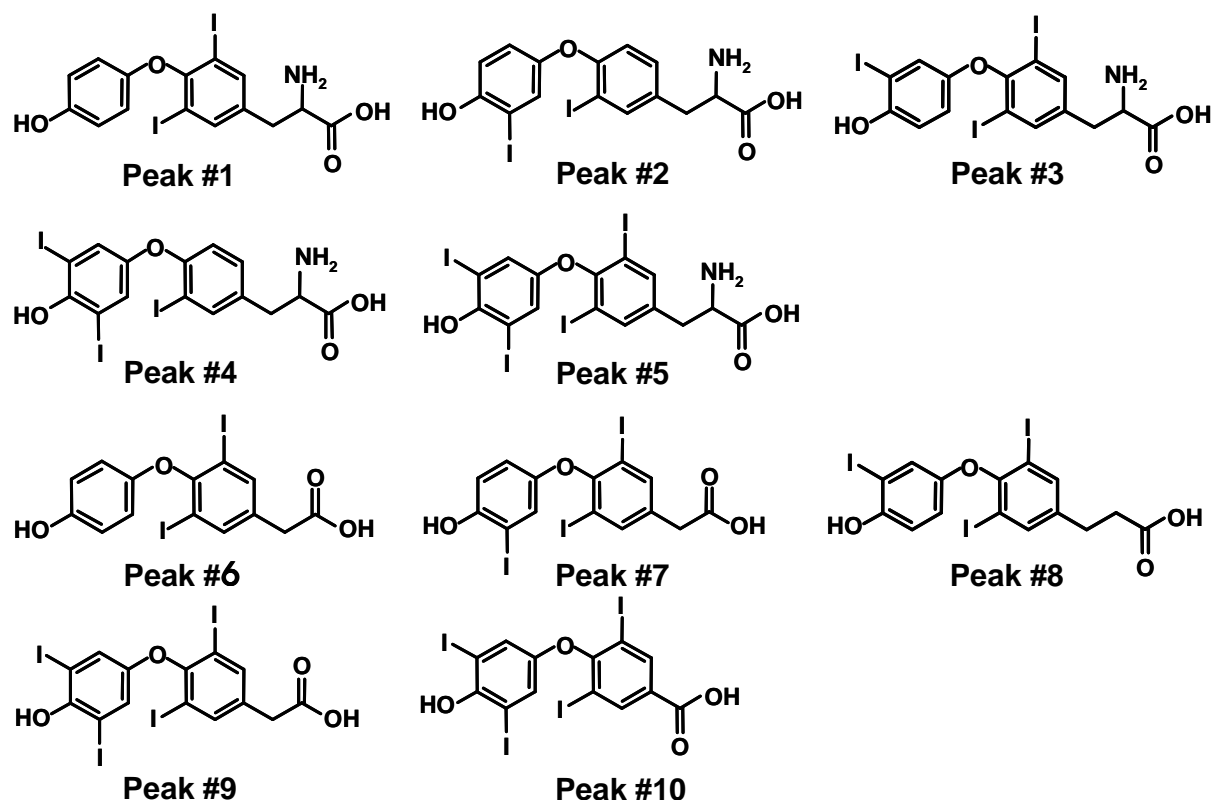


Abb. 2.1 Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung (weitere Informationen Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Übersicht der Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung und deren monoisotopische  $[M-H]^-$ -Spezies. Strukturen sind in Abb. 2.1 dargestellt.

Peak #	Referenzsubstanzen	verwendete Abkürzung	theoretische monoisotopische Masse der $[M-H]^-$ -Spezies
1	3,5-Diiodo-L-Thyronin	T2	523,886117
2	3,3'-Diiodo-L-Thyronin	r-T2	523,886117
3	3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin	T3	649,782760
4	3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin	r-T3	649,782760
5	3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin	T4	775,679403
6	3,5-Diiodothyroessigsäure	DiAc	494,859568
7	3,5,3'-Triiodothyroessigsäure	TriAc	620,756211
8	3,5,3'-Triiodothyropropionsäure	TriProp	634,771861
9	3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure	TetraAc	746,652854
10	3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure	TetraFA	732,637204

Die Probenvorbereitung erfolgte für alle Proben gleich. Für die Stammlösung wurden jeweils  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  der Probe und jeweils 300 bis  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  der Standardsubstanzen eingewogen und in einer alkalischen Methanollösung (400 mg Natriumhydroxid in 500 mL Wasser + 500 mL Methanol) gelöst. Für die HPLC-Messungen wurden das Standardgemisch wie auch die Stammlösung der Proben 1:10 in Wasser bzw. Acetonitril - Wasser (30:70, v:v) mit 0,10 % Essigsäure verdünnt.

### 2.2.1. Bezugsnachweis

Nähere Informationen zu den Herstellern verwendeter Chemikalien und Instrumente sind nachfolgend aufgelistet.

**Tab. 2.2 Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien und Instrumente.**

Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	Deisenhofen	Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deisenhofen	Deutschland
Merck KgaA	Darmstadt	Deutschland
Fisher Scientific	Schwerte	Deutschland
Riedel de Haën (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)	Deisenhofen	Deutschland
Bischoff Analysentechnik und -geräte	Leonberg	Deutschland
Peptido GmbH	Bexbach	Deutschland
Grace-Vydac	Worms	Deutschland
Bruker Daltonics	Bremen	Deutschland

### 2.3. Verwendete Säulenhardware und Instrumente

Die Standard-Referenz-HPLC-MS-Messung wurde auf dem HP1100-micrOTOF-System durchgeführt. Für die Trennung wurde eine YMC-Pack Pro C18 150 x 1 mm i.D. Säule (3  $\mu\text{m}$ -Partikeln, 120 Å-Porengröße) gepackt von Grace-Vydac verwendet.

Die Optimierung der stationären Phase wurde auf dem Alliance-System durchgeführt. Da die Substanzen des Standardgemisches nicht als Einzelsubstanzen zur Verfügung standen, erfolgte die Zuordnung der Chromatogrammpeaks mittels Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometrie (Esquire-LC). Für die Optimierung wurde das POPLink Säulensystem der Firma Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH (POPLC<sup>TM</sup>) verwendet. Dieses baukastenartige Säulensystem enthält fünf verschiedene stationäre Phasen mit unterschiedlichen Selektivitäten. In diesem System sind Säulensegmente von jeweils 10, 20, 40, 60 und 80 mm Länge eines Octadecyl-Silica

(SH), Triacetyl-Silica (C30), Phenyl-Silica (PH), Cyanopropyl-Silica (CN) und ein Octadecyl-Silica mit polaren eingebetteten Gruppen (EPS) enthalten. Der Innendurchmesser aller Säulensegmente beträgt 3,0 mm. Basismaterial für alle stationären Phasen ist 5 µm ProntoSIL mit einer Porengröße von 100 Å. Nur das Trägermaterial der C30-Phase basiert auf 5 µm, 200 Å ProntoSIL. In diesem POPLink-System können die einzelnen Segmente über ein totvolumenfreies Männlich-weiblich-Stecksystem miteinander verbunden werden (Abb. 2.2).

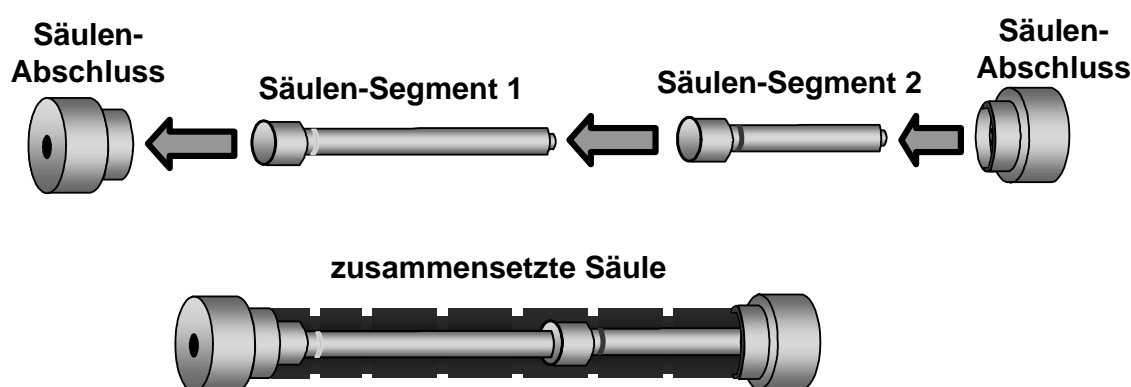


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des POPLink Systems zum Zusammenfügen von Säulensegmenten.

## 2.4. Chromatographische und massenspektrometrische Bedingungen

Die Standard-Referenz-HPLC-Methode basiert auf einer isokratischen Stufe für 5 min bei einem Acetonitrilgehalt von 30 % in Wasser. Dieser Stufe folgt ein 38 min-Gradient von 30 % bis 70 % Acetonitril in Wasser. Beiden Eluenten wurde 0,1 % Ameisensäure zugegeben. Die Trennungen auf der Säule YMC C18 Pro der Dimension 150 x 1,0 mm i.D. erfolgten bei einem Fluss von  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ . Dafür wurde der Hauptfluss von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  vor dem Injektionsventil des HP1100-Systems auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  mittels eines passiven Flusssplits geteilt. Die UV-Detektion erfolgte bei 225 nm. Für die massenspektrometrische Detektion wurde der Detektorausgang direkt mit dem Massenspektrometer (micrOTOF) verbunden.

Die Basismessungen zur Bestimmung der Retentionsfaktoren erfolgten auf den einzelnen homogenen stationären Phasen durch Injektion des Standardgemisches unter isokratischen Bedingungen. Dafür wurden Säulen mit 100 mm Länge verwendet, die aus jeweils einem 20 mm- und einem 80 mm-Säulen-Segment zusammengesetzt wurden. Ein Wasser-Acetonitril-Gemisch (50:50, v:v), dem 0,1 % Essigsäure zugegeben wurde, diente als Eluent für alle isokratischen Trennungen mit dem

Standard-POPLink-System (Abschnitt 3 und 4). Die Basismessungen für das POPLink-System mit einem Polyethylenimin-Anionenaustauscher (Abschnitt 5) wurden unter isokratischen Bedingungen mit einem Wasser-Acetonitril-Gemisch (60:40, v:v), welchem 0,1 % Ameisensäure zugegeben wurde, durchgeführt. Der Fluss betrug für alle Messungen  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  und wurde hinter dem Detektor durch einen passiven Split auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  ins Massenspektrometer geteilt. Die UV-Detektion der Proben wie auch der Standardsubstanzen erfolgte bei 225 nm. Die Durchflusszeit des Alliance-Systems und der einzelnen Säulen wurde durch Injektion von Uracil in 100 % Acetonitril bestimmt.

Die Trennung der thermisch gestressten Thyroxin-Probe (T4) auf der optimierten stationären Phase wurde durch einen Stufengradienten mit vier Stufen bei 25 %B für 3 min, gefolgt von 45 %B für 10 min, 50 %B für 10 min und 70 %B für 10 min bei einer Flussrate von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  verwirklicht. Eluent A war in diesem Fall Wasser mit 0,1 % Essigsäure und Eluent B Acetonitril mit 0,1 % Essigsäure. Auch hier erfolgte die UV-Detektion bei 225 nm. Zur Kopplung mit dem Flugzeitmassenspektrometer wurde der Fluss hinter dem Detektorausgang durch einen passiven Flusssplit auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  ins Massenspektrometer geteilt.

Beide verwendeten Massenspektrometer wurden im negativen Ionenmodus, in welchem auch die Detektion der Substanzen erfolgte, betrieben, die Geräteparameter optimiert und die Massenachse kalibriert.

Die Geräteparameter des Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometers wurden durch Direktinfusion eines  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Gemisches aus Tetraiodothyronin (T4), Triiodothyronin (T3) und Diiodothyronin (T2) in Wasser-Acetonitril (70:30, v:v) mit 0,10 % Essigsäure bei einem Fluss von  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  auf die Masse des Tetraiodothyronins optimiert. Die Masse-zu-Ladungs-Achse wurde mit den Massen von Tetraiodothyronin, Triiodothyronin und Diiodothyronin kalibriert. Detektiert wurde mittels negativer Elektrosprayionisierung (negESI) in einem Massenscanbereich von 300 bis 1500 m/z.

Die Feineinstellung des Flugzeitmassenspektrometers erfolgte durch Direktinfusion eines  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ -Gemisches aus Tetraiodothyronin, Triiodothyronin und Diiodothyronin in Wasser-Acetonitril (50:50, v:v) mit 0,10 % Essigsäure bei einem Fluss von  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ . Auch hier wurde die Masse-zu-Ladungs-Achse mit den Massen von Tetraiodothyronin, Triiodothyronin und Diiodothyronin kalibriert. Die optimierten Geräteparameter für die negativen ESI-TOF-MS-Detektion sind wie folgt: Massenscanbereich 300 – 1500 m/z; Aufsummierung von 20.000 Mikroskans pro

Massenspektrum; negative Ionenpolarität; capillary exit -145,2 V; high voltage capillary 3700 V; high voltage end plate offset -584 V. Die Elektrospraybedingungen waren: Dry-Temperature, 200 °C; Nebulizer-Gas, 4,5 bar; Dry-Gas, 6 L min<sup>-1</sup>.

Während der Trennung im Stufengradienten wurden die Sprayparameter für jede einzelne isokratische Stufe angepasst (siehe Tab. 2.3).

**Tab. 2.3 Übersicht der angepassten Sprayparameter für jede isokratische Stufe des Stufengradienten für die Trennung einer thermisch gestressten T4-Probe auf der optimierten stationären Phase.**

Gradienten-Stufe	Acetonitrilgehalt in Wasser (v/v) + 0,1 % Essigsäure	Druck des Nebulizer-Gases	Flussrate des Dry-Gases
1	25 %	4,5 bar	7,0 L min <sup>-1</sup>
2	45 %	4,7 bar	6,5 L min <sup>-1</sup>
3	50 %	4,5 bar	6,0 L min <sup>-1</sup>
4	70 %	3,5 bar	5,5 L min <sup>-1</sup>

### 3. Methodenentwicklung durch Optimierung der stationären Phase

#### 3.1. Basismessungen auf den homogenen Phasen

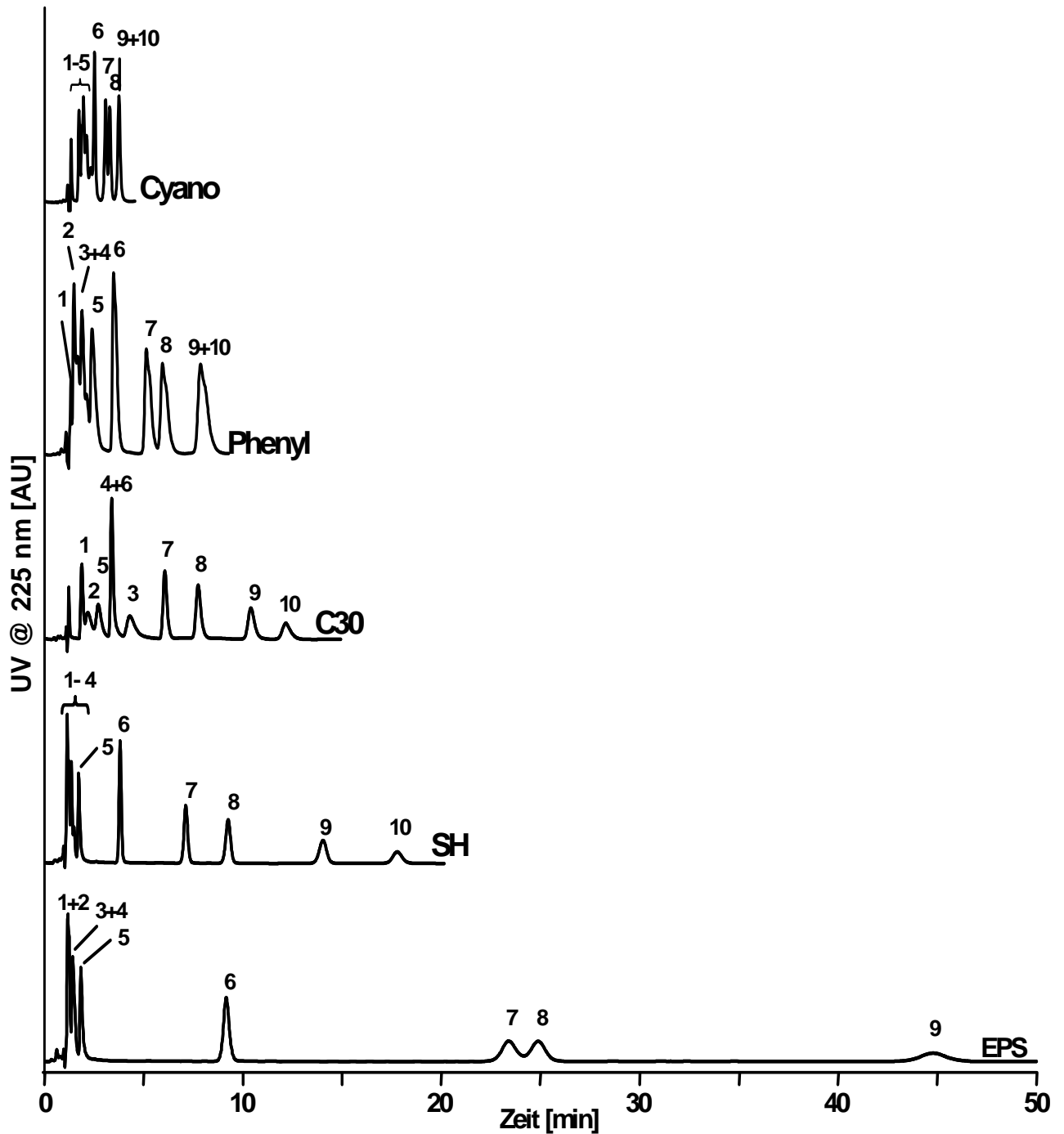
Diese Auswahl der zehn Standardsubstanzen (Abschnitt 2.2, Abb. 2.1, S. 166, Tab. 2.1, S. 166) spiegelt nur einen Teil möglicher Abbau- bzw. Nebenprodukte thermisch gestresster T4-Proben wider. Dennoch decken diese zehn Standardsubstanzen bereits den Großteil der Bandbreite an Strukturmerkmalen und Hydrophobie der Komponenten von thermisch gestressten Thyroxin-Proben ab. Daher erfolgte die Methodenentwicklung mit diesem Standardgemisch, welches sich zum einen aus Diiodothyronin (T2, Peak #1) und den zwei Schilddrüsenhormonen Liothyronin (T3, Peak #3) und Thyroxin (T4, Peak #5) sowie den zwei Stellungsisomeren reversed-T2 (rT2, Peak #2) und reversed-T3 (rT3, Peak #4) zusammensetzt. Diese fünf Verbindungen unterscheiden sich in der Anzahl an Iodatomen im Molekül. Die anderen fünf Substanzen (Peak #6 bis #10) sind Carbonsäuren, deren Seitenkettenlänge variiert.

Die Standardmischung wurde auf den fünf einzelnen homogenen stationären Phasen des POPLink-Systems injiziert, unter isokratischen Bedingungen in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch (50/50, v/v), welches mit 0,1 Vol% Essigsäure versetzt wurde, getrennt und bei 225 nm detektiert. Die Zuordnung der Peaks im UV-Chromatogramm erfolgte über die Bestimmung der Massen, indem der Detektorausgang über einen passiven Flusssplit mit dem Ionenfallenmassenspektrometer (Esquire-LC) verbunden wurde. Die Substanzen wurden mit negativer Elektrospray-Ionisierung bei einem Fluss von  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  ohne Fragmentierung detektiert. In Abb. 3.1, Seite 173 sind die UV-Chromatogramme der einzelnen stationären Phasen dargestellt. Wie zu erwarten war, ist es unter den hier gewählten Bedingungen nicht möglich, das Standardgemisch auf einer der homogenen Phasen zu trennen. Dennoch sind die verschiedenen Selektivitäten der fünf Trägermaterialien deutlich zu erkennen. Auf der Phase mit eingebetteten polaren Gruppen (Abb. 3.1, EPS) zeigen die Carbonsäuren (Peak #6 bis #10) die größten Retentionszeiten, wobei zwischen Tetraiodothyroessigsäure (Peak #9) und Tetraiodothyroameisensäure (Peak #10) die höchste Selektivität auftritt, da die letzte Substanz auch nach 70 min nicht eluiert werden konnte. Die klassische C18-Phase (Abb. 3.1, SH) zeigt akzeptable Selektivitäten für die Carbonsäuren, die fünf

Hormone dagegen (Peak #1 bis #5) können nicht basisliniengetrennt werden. Die Carbonsäuren liegen im essigsauren Medium kaum bzw. undissoziiert vor und weisen daher die stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen mit der RP-Phase auf. Die ampholytischen Hormone sind im essigsauren Eluenten hingegen über die protonierbare Aminofunktion kationisch, was die hydrophobe Retention und Selektivität auf der C18-Phase deutlich verringert. Die SH-Phase ist mit der YMC C18 Pro, die für die Referenzmessung verwendet wurde, in Bezug auf die Hydrophobie und Selektivitäten vergleichbar. Beim Betrachten aller Trennungen auf den einzelnen homogenen Phasen können die Substanzen des Standardgemisches, auch die früh eluierenden Hormone (Peak #1 bis #5), innerhalb von 15 min auf der C30-Phase (Abb. 3.1, C30) fast basisliniengetrennt werden, obwohl die Selektivitäten der Carbonsäuren im Vergleich zur SH-Phase geringer sind. Die Retentionszeiten und damit auch die Selektivitäten auf der Phenyl- (Abb. 3.1, Phenyl) wie auch auf der Cyano-Phase (Abb. 3.1, CN) sind sehr gering, wobei die Tetraiodothyroessigsäure (Peak #9) und Tetraiodothyroameisensäure (Peak #10) coeluieren. Die Cyano-Phase zeigt die kleinsten Auflösungen zwischen den einzelnen Substanzen, was auf Grund des geringen Kohlenstoffgehaltes zu erwarten war.

Unter den hier gewählten Eluentenbedingungen ist es demnach nicht möglich, das Standardgemisch im isokratischen Modus auf einer der fünf homogenen Phasen vollständig aufzutrennen (Abb. 3.1).





**Abb. 3.1** Isokratische Trennung der Standardmischung aus zehn Substanzen auf den fünf stationären Phasen. Verwendete stationäre Phasen in der Säulendimension, 100 x 3.0 mm Cyanopropyl-Silica (CN), Phenyl-Silica (PH), Triacontyl-Silica (C30), Octadecyl-Silica (SH), Octadecyl-Silica mit eingebetteten polaren Gruppen (EPS); Isokratische Elution mit Wasser/Acetonitril (50/50, v/v) + 0,10 % Essigsäure; 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; Injektionsvolumen 50  $\mu\text{L}$ ; UV-Detektion @ 225 nm; Peakzuordnung im negativen ESI-Modus (nicht gezeigt). Peakidentifikation in Tab. 2.1, S. 166.

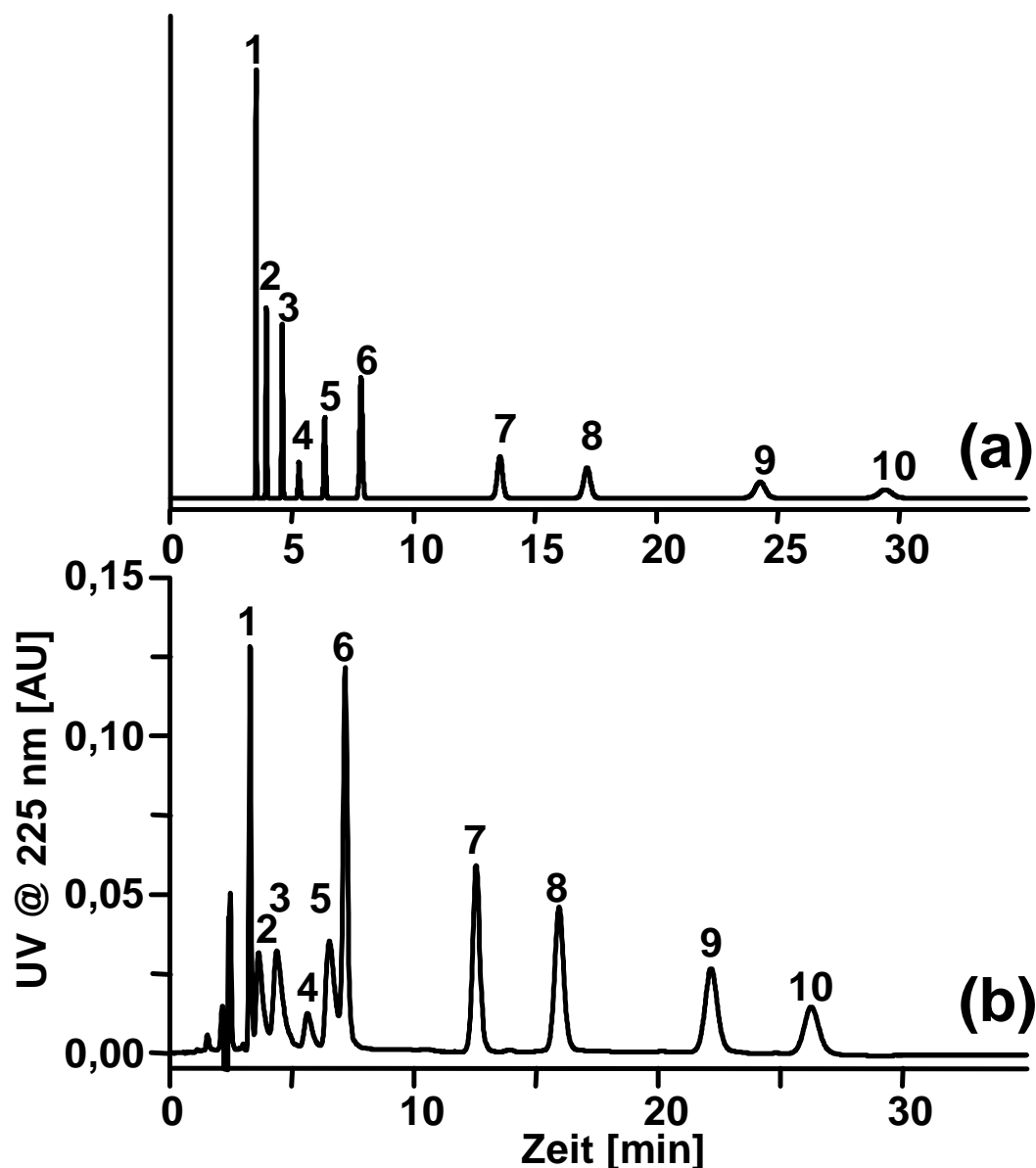
### 3.2. Optimierung der stationären Phase

Die POPLC-Optimizer-Software berechnet auf Basis des PRISMA-Modells [2] über die Retentionszeiten und Selektivitäten der Substanzen auf den fünf einzelnen stationären Phasen die optimale Kombination der entsprechenden Phasensegmente, mit der eine isokratische Trennung der Substanzen unter den gewählten Bedingungen erreicht wird. In das Optimizer-Programm müssen für die Berechnungen die Ergebnisse der Basismessungen, also die Durchflusszeiten der einzelnen Säulen wie auch die Retentionszeiten der einzelnen Analyten auf den jeweiligen Phasen, eingegeben werden. Weiterhin müssen die Bodenzahlen angegeben werden, was wahlweise in Form einer gemittelten oder einer individuellen Bodenzahl erfolgen kann. Die gemittelte Bodenzahl entspricht dem Mittelwert der erreichten Böden aller Substanzpeaks auf einer Säule. Im Falle der individuellen Bodenzahl wird für jeden Analyten die auf der entsprechenden stationären Phase erreichte Bodenzahl individuell eingegeben. Die Peakbreiten der Substanzpeaks und die Bodenzahlen hängen ursächlich miteinander zusammen, wodurch über die Eingabe der Böden auch die Tendenzen der Peakbreiten in die Berechnung einfließen. Dies ist relevant, da Substanzen, die in breiten Peaks eluieren, bei gleicher Selektivität mit geringerer Auflösung getrennt werden als schmale Peaks. Daher können sich die Ergebnisse für die Zusammensetzung der optimierten stationären Phase zwischen der Angabe der gemittelten und individuellen Böden unterscheiden. Prinzipiell führen die Berechnungen unter Einbeziehung der individuellen Böden zu einer realistischeren Simulation der Peakauflösungen als bei der Verwendung der gemittelten Böden. Daher wurden hier die Bechnungen mit den idividuellen Bodenzahlen der Basismessungen durchgeführt.

In die Optimizer-Software wurden die Durchflusszeiten, die Retentionszeiten und individuellen Bodenzahlen der Basismessungen (Abschnitt 3.1) eingegeben. Für die Berechnung der Säulenzusammensetzung wurden eine maximale Auflösung von 2,0, eine maximale Säulenlänge von 250 mm und eine maximale Analysenzeit von 30 min als Randbedingungen gewählt. Das vorhergesagte Ergebnis mit der besten Auflösung (Abb. 3.2a) soll mit einer 220 mm langen Säule, die aus einem 90 x 3 mm i.D. Triacetyl-Silica-, einem 80 x 3 mm i.D. Octadecyl-Silica- und einem 50 x 3 mm i.D. Cyanopropyl-Silica-Segment zusammengesetzt ist, erreicht werden.

Für die endgültige Säulenzusammensetzung wurden ein 10 mm C30-, ein 80 mm C30-, ein 80 mm SH-, ein 10 mm CN- und ein 40 mm CN-Säulensegment in dieser Reihenfolge miteinander kombiniert, wobei die Segment-Reihenfolge theoretisch keinen

Einfluss auf die Trennleistung der Säule und die Retentionszeiten der Analyten hat. Auf der optimierten stationären Phase wird eine isokratische Trennung der zehn Standardsubstanzen in Wasser-Acetonitril (50/50, v/v), versetzt mit 0,1 % Essigsäure, innerhalb von 30 min bei einem Fluss von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  vorhergesagt. Abb. 3.2 stellt das simulierte (Abb. 3.2a) und das gemessene UV-Chromatogramm (Abb. 3.2b) der zehn Standardsubstanzen gegenüber.



**Abb. 3.2 Vergleich des simulierten (a) und gemessenen (b) UV-Chromatogramms der Standardmischung auf der optimierten Säulensegment-Kombination.** Säule, 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN); isokratische Elution mit Wasser-Acetonitril (50/50, v/v) + 0,1 % Essigsäure,  $500 \mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm. Peakidentifizierung in Tab. 2.1.

Wie in Abb. 3.2b gezeigt, ist eine isokratische Trennung der Standardsubstanzen innerhalb von 30 min auf der optimierten Säule möglich. Auf der optimierten Säule

eluieren die Analyten früher als vorhergesagt wurde. Dieser Effekt wird im Falle der Carbonsäuren (Peak #6 bis #10) besonders deutlich. Die absoluten und relativen Abweichungen (Tab. 3.1) zeigen einen steigenden Trend zu größeren Retentionszeiten hin. Eine Korrelation zwischen Richtung bzw. Ausmaß der Abweichung und der chemischen Struktur der Analyten kann nicht festgestellt werden. Alle Carbonsäuren, aber auch die Mehrzahl der Hormone außer T4 und r-T3, weisen eine geringere Retention als vorhergesagt auf. Eine einfache Erklärung, die auf zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann, scheidet daher aus. Eine Ursache dieser Abweichungen kann nicht eindeutig geklärt werden.

Tab. 3.1 Vergleich der vorhergesagten und gemessenen Retentionszeiten der optimierten Säule. Chromatogramme Abb. 3.2.

Peak #	Substanz	Retentionszeit [min]		Abweichung	
		vorhergesagt	gemessen <sup>(a)</sup>	absolut <sup>(b)</sup> [min]	relativ <sup>(c)</sup> [%]
1	T2	3,53	3,27	-0,26	7,44
2	r-T2	3,95	3,72	-0,23	5,88
3	T3	4,60	4,44	-0,16	3,49
4	r-T3	5,30	5,88	0,58	-11,02
5	T4	6,35	6,82	0,47	-7,33
6	DiAc	7,85	7,40	-0,45	5,71
7	TriAc	13,56	12,76	-0,80	5,91
8	TriProp	17,14	16,12	-1,02	5,96
9	TetraAc	24,27	22,33	-1,94	7,98
10	TetraFA	29,42	26,70	-2,72	9,26
<b>Mittelwert der Beträge</b>				0,86 <sup>(d)</sup>	7,00 <sup>(d)</sup>

(a) Mittelwert aus 10 Injektionen

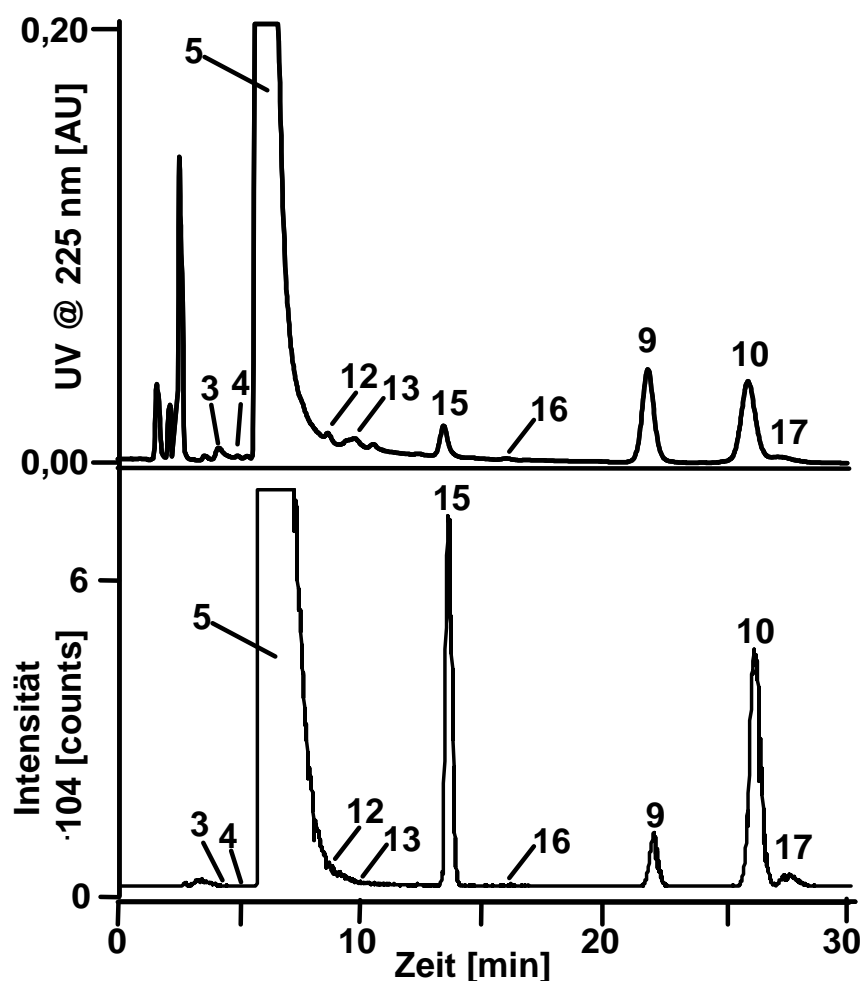
(b) Differenz zwischen vorhergesagter und gemessener Retentionszeit

(c) Berechnung:  $\left( \frac{\text{absoluteDifferenz}}{\text{vorhergesagte Retentionszeit}} \right) * 100\%$

(d) Mittelwert der Beträge der Zahlenwerte

Durch die Optimierung der stationären Phase konnte die Analysenzeit des Standardgemisches von vorher 40 min in der Gradientenelution unter Referenzbedingungen auf 28 min unter isokratischen Bedingungen reduziert werden. Die vollständige Trennung einer thermisch gestressten Thyroxin-Probe hingegen kann unter den hier gewählten isokratischen Bedingungen auf der optimierten Säule nicht erreicht

werden (Abb. 3.3). Das Standardgemisch, das für die Optimierung herangezogen wurde, schließt durch die strukturelle Variabilität der Substanzen zwar einen großen Teil, aber nicht den vollständigen chromatographischen Bereich der Probe ein. Der umfassende Ansatz zur Optimierung der stationären Phase würde voraussetzen, dass alle zu trennenden Substanzen in der Optimizier-Software erfasst werden. Bei komplexen Probengemischen mit unbekanntem Inhaltsstoffen ist dies schwer zu realisieren. Im folgenden Abschnitt soll daher versucht werden, die Elutionsbedingungen für eine Probentrennung anzupassen.



**Abb. 3.3** Trennung einer thermisch gestressten Thyroxin-Probe unter isokratischen Bedingungen auf der optimierten Säule. 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN); isokratische Elution mit Wasser-Acetonitril (50/50, v/v) + 0,1 % Essigsäure, 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm und massenpektrometrische Detektion im negativen ESI-Modus mit TOF-MS.

### 3.3. Erweiterung der isokratischen Methode für eine thermisch gestresste Thyroxin-Probe

Die chromatographische Trennung von Abbau- bzw. Nebenprodukten in thermisch gestressten Wirkstoffproben stellt eine Herausforderung dar. Der Wirkstoff selbst ist mit 95 % bis 99 % der Hauptbestandteil der Probe. Um die Nebenprodukte zu detektieren, muss meist die Säule mit dem Wirkstoff überladen werden, was starke Peakverbreiterung und –asymmetrie zur Folge hat. In Abb. 3.4a ist ein typisches UV-Chromatogramm einer thermisch gestressten Thyroxin-Probe unter den Gradientenelutionsbedingungen der etablierten Referenzmethode dargestellt. Um die Nebenprodukte zu identifizieren, muss das Chromatogramm stark vergrößert werden (Abb. 3.4b).

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass es unter isokratischen Bedingungen nicht möglich ist, alle Komponenten der gestressten Thyroxin-Probe innerhalb von 30 min zu detektieren (Abb. 3.3, S. 177). Durch die Referenzmessung dieser Probe (Abb. 3.4) im Gradientenmodus ist bekannt, dass die Komponenten bei Acetonitrilgehalten zwischen 30 % und 70 % eluiert werden. Auf der phasenoptimierten Säule eluieren letztere unter den isokratischen Bedingungen erst nach über 70 min. Zusätzlich werden durch die Überladung der Säule mit Thyroxin weitere Nebenkomponenten überlagert oder verdrängt. Die stationäre Phase wurde mit dem Standardgemisch optimiert, welches, wie Abb. 3.4b zeigt, nicht den vollständigen chromatographischen Bereich der gestressten Thyroxin-Probe einschließt. Daher soll nun versucht werden, die isokratische Methode so zu erweitern, dass auch die unbekanntes Probenbestandteile erfasst werden können.

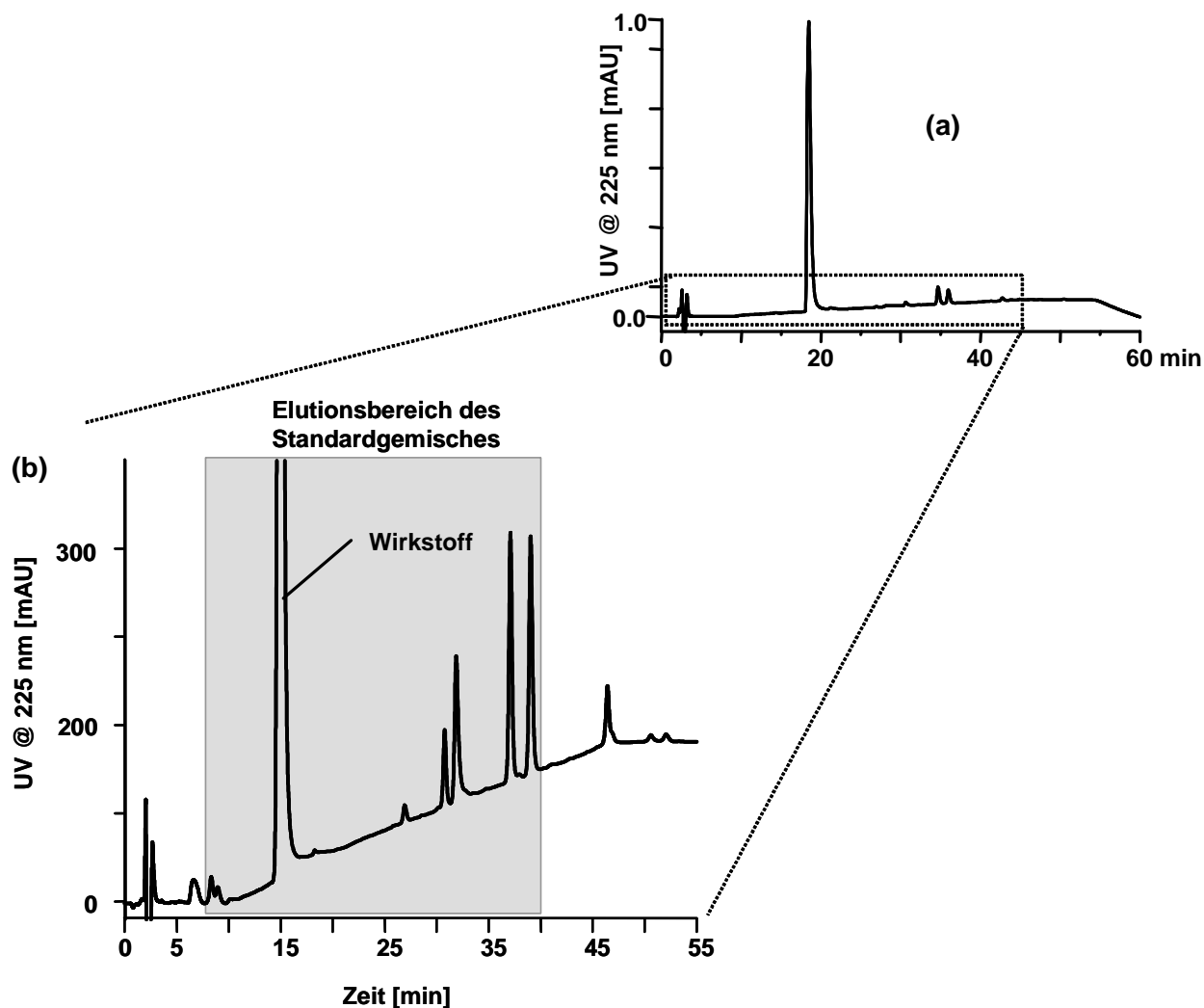


Abb. 3.4 UV-Chromatogramm der Referenzmessung einer thermisch gestressten Thyroxinprobe (a) und vergrößert (b). Der Elutionsbereich des Standardgemisches wurde grau hinterlegt.

Die Substanzen, die im grau hinterlegten Fenster in Abb. 3.4b eluieren, können auf der phasenoptimierten Säule unter isokratischen Bedingungen mit 50 % Acetonitril innerhalb von 30 min detektiert werden (vergl. Abb. 3.3, S. 177). Um die Substanzen vor und nach diesem Elutionsfenster zu erfassen, ist ein Stufengradient mit vier isokratischen Stufen geeignet. Durch eine Stufe mit 25 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure können Substanzen, die vor dem Wirkstoffpeak eluieren, erfasst werden. Eine weitere Stufe bei 45 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure separiert den Wirkstoffpeak von Analyten, die in der nachfolgenden Stufe bei 50 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure eluieren. Analyten, die erst bei höheren Organikgehalten eluieren, werden innerhalb der letzten Stufe bei 70 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure detektiert. Durch den Stufengradient kann die gestresste Thyroxin-Probe immer noch innerhalb von 35 min getrennt werden (Abb. 3.5b).

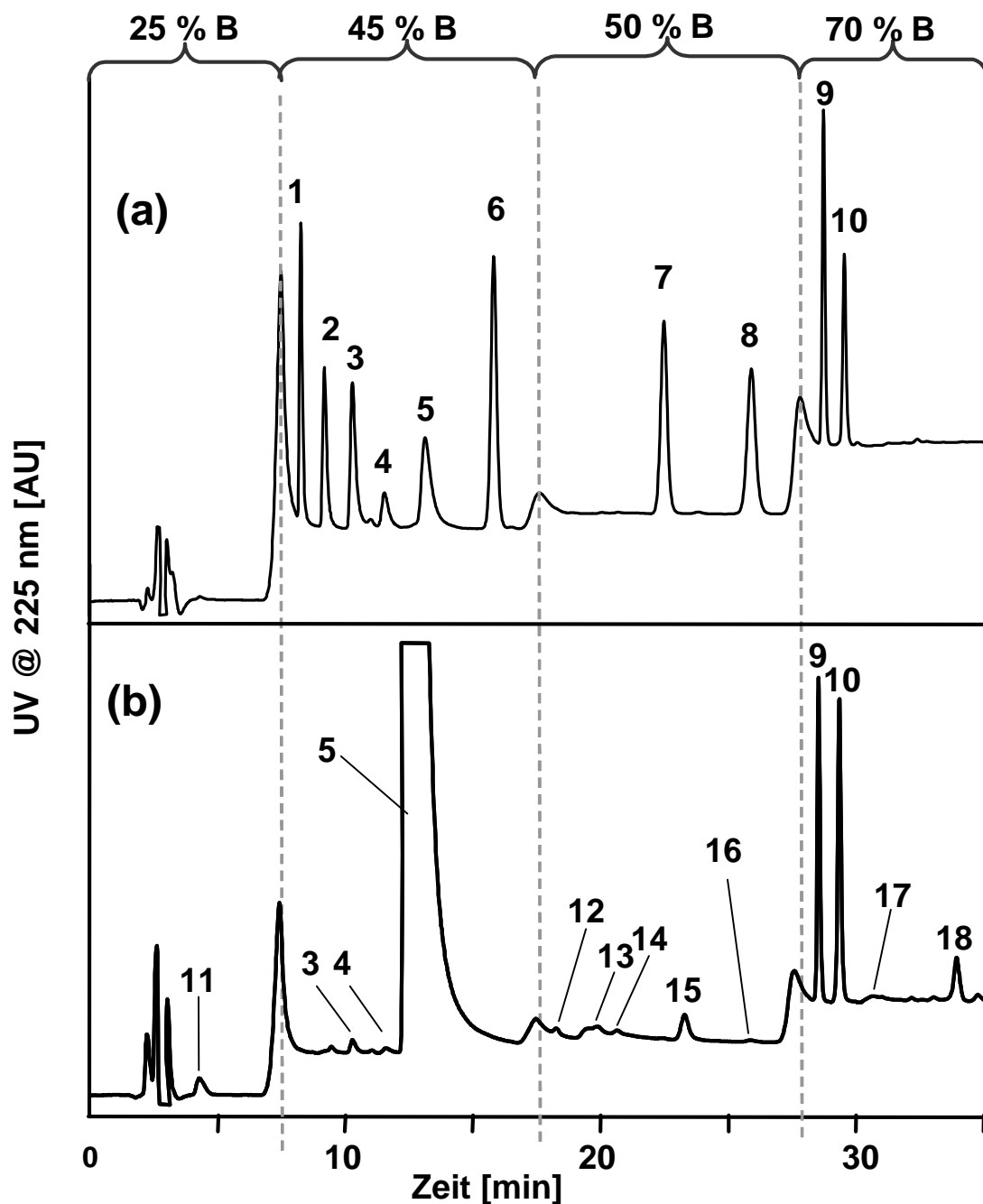


Abb. 3.5 UV-Chromatogramm des Standardgemisches (a) und der thermisch gestressten Thyroxin-Probe (b) im Stufengradienten auf der phasenoptimierten Säule. Die Gradientenstufen wurden eingezeichnet (Delayzeit des HPLC-Systems wurde dafür berücksichtigt). Säule 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN); Stufengradient mit 25 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure für 3 min, 45 % für 10 min, 50 % für 10 min, 70 % für 10 min; 500  $\mu\text{l min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm.

Durch die Anpassung der isokratischen Methode auf die vier Elutionsbereiche der thermisch gestressten Thyroxin-Probe können mehr Nebenproduktpeaks im UV-Chromatogramm detektiert werden. Im direkten Vergleich mit der isokratischen Trennung handelt es dabei um die Substanz 11, die bei einem geringeren Acetonitrilgehalt eluiert, die Substanz 14, welche nach dem Thyroxinpeak eluiert und



18, welche erst durch die Stufe mit 70 % Acetonitril innerhalb von 35 min eluiert werden konnte.

Die Analysendauer der thermisch gestressten Thyroxin-Probe konnte dadurch von 60 min auf einer klassischen C18-Säule auf 35 min unter Anwendung eines Stufengradienten auf der optimierten Säule, die sich aus drei stationären Phasen 90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN zusammensetzt, reduziert werden. Die Reduzierung der Analysenzeit hat aber meist auch eine Verringerung der Peakauflösung zur Folge. Um dies näher zu betrachten, wurden die Auflösungen der Substanzpeaks des Standardgemisches innerhalb der Trennung im Stufengradienten und unter isokratischen Bedingungen auf der optimierten Säule sowie unter Referenzbedingungen im linearen Gradienten auf der Standardsäule in Tab. 3.2 gegenübergestellt.

**Tab. 3.2 Gegenüberstellung der Auflösungen der Standardsubstanzen auf der phasenoptimierten Säule unter isokratischen und Stufengradient-Bedingungen und der Referenzmethode auf der Standardsäule mit Gradientelution.**

		Auflösung der Standardsubstanzen		
		phasenoptimierte Säule (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN) x 3,0 mm i.D.		Standard- Referenz-Säule YMC C18 pro 150 x 1,0 mm i.D.
Peak #		isokratisch	4-Stufen- gradient	linearer Gradient in 38 min
1 / 2	T2/rT2	1,16	3,83	4,00
2 / 3	rT2/T3	1,37	3,40	6,32
3 / 4	T3/rT3	2,05	3,00	2,43
4 / 5	rT3/T4	1,43	2,78	7,27
5 / 6	T4/DiAc	1,43	4,94	19,79
6 / 7	DiAc/TriAc	1,20	1,49	13,78
7 / 8	TriAc/TriProp	5,55	6,37	4,08
8 / 9	TriProp/TetraAc	7,74	6,98	6,55
9 / 10	TetraAc/TetraFA	4,02	3,59	3,42
Mittelwert		2,88	4,04	7,52
Analysenzeit		26 min	28 min	40 min

Auf Grund der verkürzten Analysenzeit ist die mittlere erzielte Auflösung der Standardsubstanzen im linearen Gradienten der Referenzmessung mit 7,5 fast doppelt so

groß wie auf der optimierten Säule im isokratischen Modus und im Stufengradient. Beim näheren Betrachten der einzelnen Auflösungen im Stufengradient wird deutlich, dass diese nicht so stark variieren wie innerhalb der anderen zwei Methoden. Die isokratische Methode zeigt wie erwartet die kleinsten Auflösungen, da die stationäre Phase für die Trennung der Standardsubstanzen unter diesen Bedingungen optimiert wurde. Die Tabelle zeigt dennoch deutlich, dass durch diese Phasenoptimierung unnötig große Auflösung reduziert wurde. Trotz der Halbierung der Trenndauer sind alle kritischen Peakpaare basisliniengetrennt. Im Falle der Peakpaare TriAc/TriProp sowie TetraAc/TetraFA konnte die Auflösung gegenüber der Referenzmethode sogar verbessert werden.

Um Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Trennungen auf der optimierten Säule, die aus mehreren Segmenten zusammengesetzt wurde, machen zu können, wurden die Standardabweichungen der Retentionszeiten der Standardsubstanzen über 10 Injektionen bestimmt (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Standardsubstanzen mit UV-Detektion bei 225 nm auf der phasenoptimierten Säule unter isokratischen Elutionsbedingungen und im Stufengradient.

		Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten auf der phasenoptimierten Säule (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN) x 3,0 mm i.D.					
		Retentionszeiten der isokratischen Trennung			Retentionszeiten der Trennung im Stufengradienten		
Peak #		Mittelwert <sup>(a)</sup> [min]	Standardabweichung [min]	relative Standardabweichung [%]	Mittelwert <sup>(a)</sup> [min]	Standardabweichung [min]	relative Standardabweichung [%]
1	T2	3,27	0,03	1,06	8,09	0,02	0,25
2	rT2	3,72	0,01	0,40	9,13	0,03	0,32
3	T3	4,44	0,02	0,56	10,26	0,04	0,36
4	rT3	5,88	0,03	0,49	11,65	0,05	0,42
5	T4	6,82	0,02	0,35	13,28	0,06	0,44
6	DiAc	7,40	0,07	0,92	15,23	0,04	0,28
7	TriAc	12,76	0,15	1,20	21,55	0,05	0,22
8	TriProp	16,12	0,21	1,27	25,04	0,97	3,86
9	TetraAc	22,33	0,28	1,25	27,71	0,02	0,06
10	TetraFA	26,70	0,37	1,39	28,53	0,02	0,07
<b>Mittelwert</b>			0,12	0,89		0,13	0,63

(a) Mittelwert aus 10 Injektionen

Die relativen Standardabweichungen der Retentionszeiten zeigen einen steigenden Trend zu größeren Retentionszeiten hin, wobei eine mittlere Standardabweichung von 0,89 % erreicht wurde. Dagegen streuen die Retentionszeiten im Stufengradient nicht so stark.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die Optimierung der stationären Phase die bestehende Referenzmethode in Bezug auf Analysendauer und Trennleistung verbessert werden konnte, wobei die optimierte stationäre Phase nicht nur unter konstanten isokratischen Bedingungen eingesetzt werden kann. Für Trennungen komplexer Probengemische kann das Potential der optimierten Phase in Verbindung mit stufenweiser Elutionsstärkeanpassung erhöht werden.

## 4. Kopplung mit der Flugzeitmassenspektrometrie

Für die chromatographische Analyse synthetischer Wirkstoffproben müssen Nebenkomponenten detektiert werden, die in sehr geringen Konzentrationen in den Proben enthalten sind. Dabei handelt es sich meist um Abbau- oder Synthesenebenprodukte, die sich strukturell ähneln. Um unbekannte Peaks in einem UV-Chromatogramm bekannten Strukturen zuzuordnen, kann die HPLC mit der Massenspektrometrie gekoppelt werden. Die Herausforderung hierbei ist, eine HPLC-Methode zu entwickeln, die die Detektion der gering konzentrierten Nebenprodukte ermöglicht, ohne dass diese vom Wirkstoffpeak überlagert werden, und die zusätzlich kompatibel zu Massenspektrometrie ist. In der hier verwendeten Probe nimmt der Wirkstoff Thyroxin 95 - 99 % der totalen Peakflächen innerhalb eines UV-Chromatogramms ein. Weiterhin können Peaks im Massenspektrometer detektiert werden, die nicht im UV-Detektor erfasst werden, was natürlich auch umgekehrt möglich ist. Auch die detektierten Peakintensitäten unterscheiden sich zwischen den beiden Detektionsmethoden.

Im vorherigen Abschnitt wurde mittels Optimierung der stationären Phase zunächst die optimale Zusammensetzung der stationären Phase ermittelt, mit der das Standardgemisch der Schilddrüsenhormone unter isokratischen Bedingungen in kürzester Zeit aufgetrennt werden kann. Um die Auftrennung einer gestressten Thyroxin-Probe zu erzielen, wurde die isokratische Methode durch einen Stufengradienten mit Stufen bei 25, 45, 50 und 70 % Acetonitril erweitert. Nun soll die massenspektrometrische Detektion der Nebenprodukte durch Kopplung der vorher optimierten Trennsäule (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN) der Dimension 220 x 3,0 mm i.D. mit der Flugzeit-Massenspektrometrie verbessert werden.

Um die HPLC mit der Elektrospray-Massenspektrometrie zu koppeln, müssen die Sprayparameter an die verwendeten Flussraten und Eluentenzusammensetzung angepasst werden, um ein stabiles Elektrospray und niedrige Detektionslimits zu erreichen. Auf Grund der konstanten Eluentenzusammensetzung über den gesamten Detektionszeitraum hinweg ist eine isokratische HPLC-Methode im Gegensatz zu einer Gradientelution dabei von Vorteil, da die Spraystabilität und das Ausmaß der Trocknung stark von der Eluentenzusammensetzung abhängen, welche sich innerhalb einer Gradientenelution fortwährend ändert. Nachteil einer isokratischen Methode ist die Peakverbreiterung zu höheren Retentionszeiten hin, da damit auch eine Verringerung

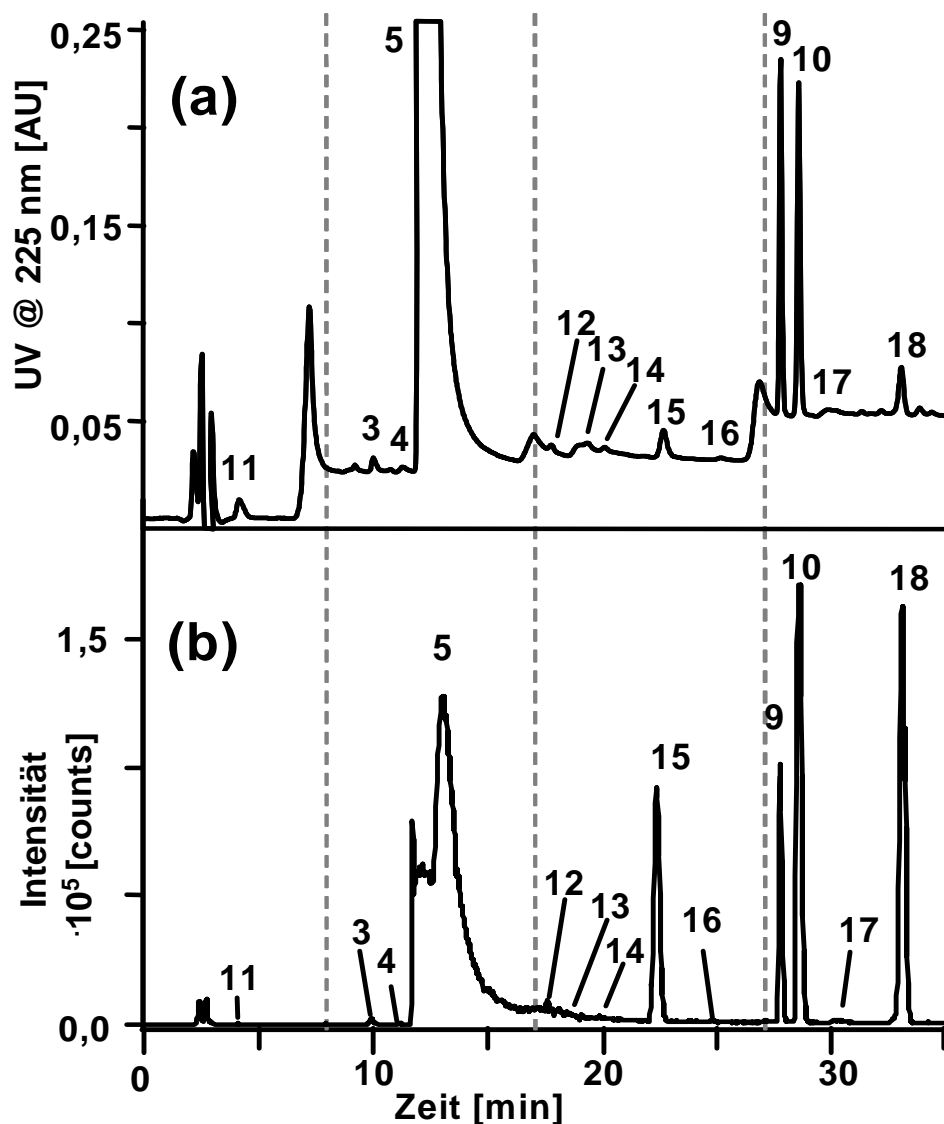
der Konzentration im Peakmaximum einhergeht. Um die massenspektrometrischen Detektionslimits der gering konzentrierten Nebenprodukte in der Thyroxin-Probe auf der phasenoptimierten Säule zu minimieren, können die Sprayparameter auf die Eluentzusammensetzungen der einzelnen isokratischen Gradientenstufen angepasst werden. Ein weiterer Vorteil des Stufengradienten ist die geringere Bandenverbreiterung, was auch höhere Konzentrationen im Peakmaximum zur Folge hat.

Die Geräteparameter des Massenspektrometers wurden für jede isokratische Stufe durch Direktinfusion eines Gemisches aus jeweils  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  Tetraiodothyronin, Triiodothyronin und Diiodothyronin, die im Eluent mit dem entsprechenden Acetonitrilgehalt (25, 45, 50 und 70 % Acetonitril) gelöst wurden, optimiert. Die Elektrospray-Parameter, die für jede isokratische Stufe angepasst wurden, sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

**Tab. 4.1 Übersicht der angepassten Sprayparameter für jede isokratische Stufe des Stufengradienten zur Trennung einer thermisch gestressten T4-Probe auf der optimierten stationären Phase.**

Gradienten-Stufe	Acetonitrilgehalt in Wasser (v/v) + 0,1 % Essigsäure	Druck des Nebulizer-Gases	Flussrate des Dry-Gases
1	25 %	4,5 bar	7,0 L min <sup>-1</sup>
2	45 %	4,7 bar	6,5 L min <sup>-1</sup>
3	50 %	4,5 bar	6,0 L min <sup>-1</sup>
4	70 %	3,5 bar	5,5 L min <sup>-1</sup>

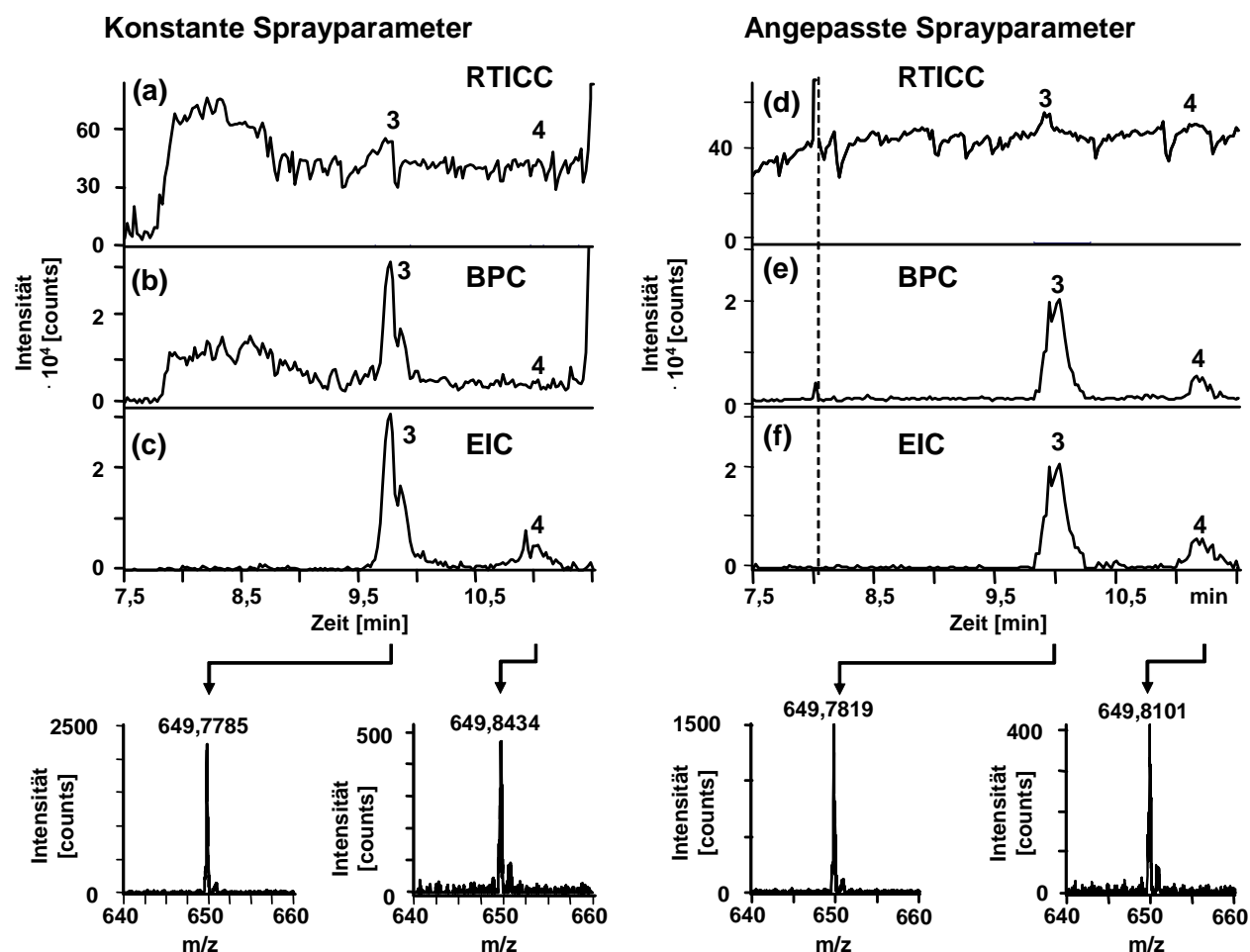
Die Quellenparameter nehmen zu höheren Acetonitrilgehalten hin ab. Eluenten mit einem hohen Acetonitrilgehalt können auf Grund der geringeren Oberflächenspannung leichter in die Gasphase überführt werden, was geringere Drücke des Vernebelungs- und Trocknungsgases erfordert. Durch vorprogrammierbare, abgegrenzte Zeitfenster, die definierte Geräteparameter enthalten, können die optimierten Quellenparameter separat für jede Elutionsstufe festgelegt werden. Abb. 4.1 stellt das UV- und Basispeakchromatogramm (BPC) mit optimierten Sprayparametern der thermisch gestressten Thyroxin-Probe gegenüber. Unter den Stufengradientbedingungen können im Gegensatz zur isokratischen Methode zusätzlich die Substanzpeaks 11, 14 und 18 detektiert werden, wobei die Substanzpeaks 4 und 14 nur auf Grund der optimierten Sprayparameter detektiert werden.



**Abb. 4.1 UV-Chromatogramm (a) und Basispeak-Chromatogramm (b) einer thermisch gestressten Thyroxin-Probe mit Stufengradientelution.** Phasenoptimierte Säule, 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 m SH + 50 mm CN); Acetonitril in Wasser versetzt mit 0,10 % Essigsäure, Stufengradient mit 25 % Acetonitril für 3 min, 45 % für 10 min, 50% für 10 min, 70% für 10 min; 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm und massenspektrometrische Detektion im negativen ESI-Modus.

Wie zuvor erwähnt, ist eine konstante Eluentenzusammensetzung für die Elektrosprayionisierung (ESI) von Vorteil. Für eine Trennung im Stufengradienten können die Sprayparameter separat für jede isokratische Stufe angepasst werden. Um den Einfluss der optimierten Sprayparameter näher zu untersuchen, wurden zwei Trennungen der gestressten Thyroxin-Probe unter chromatographisch identischen Bedingungen im Stufengradient getrennt und mittels ESI-TOF-MS detektiert, wobei die Detektion im Massenspektrometer für eine Trennung unter stufenweise angepassten Sprayparametern (Tab. 4.1) und für die andere unter konstanten Sprayparametern erfolgte. Für letztere wurden die Parameter auf einen konstanten Acetonitrilgehalt von

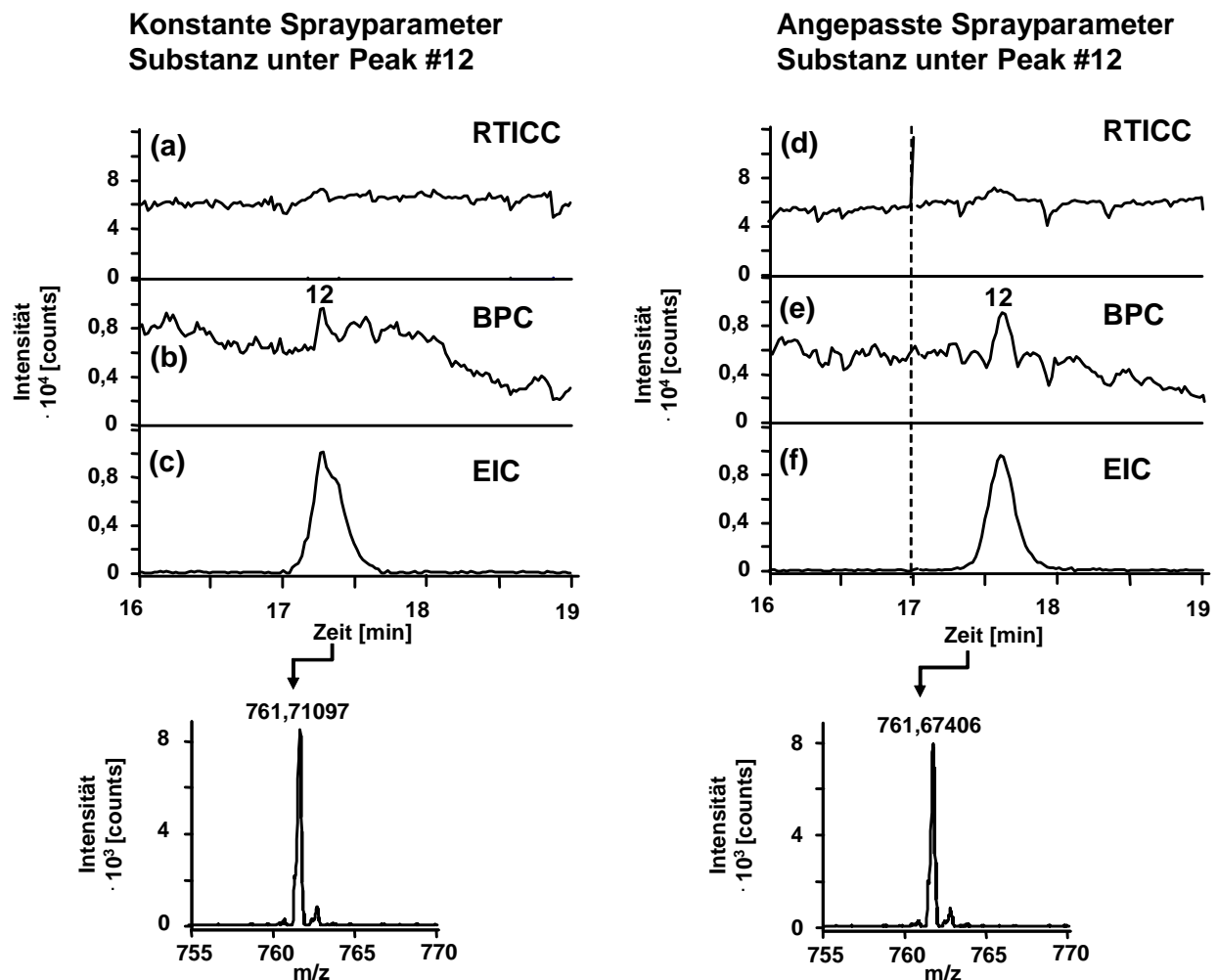
50 % optimiert. Um den Einfluss deutlicher zu machen, wurden für die Gegenüberstellung vorwiegend Nebenprodukte betrachtet, die in geringen Konzentrationen in der Probe enthalten waren bzw. mit einer geringen Signalintensität im Massenspektrometer detektiert wurden (Abb. 4.2 und Abb. 4.3).



**Abb. 4.2 Vergleich der massenspektrometrischen Detektion von T3 (#3) und rT3 (#4) mit angepassten (d–f) und nicht angepassten Sprayparametern (a–c) in der Thyroxin-Probe.** Sprayparameter (a–b) auf Eluent mit 50 % Acetonitril optimiert, (d–f) optimiert auf isokratische Stufe (Tab. 4.1), Chromatographische Bedingungen (Abb. 4.1), - - - Wechsel der Sprayparameter der 25 %-igen auf die 45 %-ige Acetonitrilstufe.

Abb. 4.2 zeigt die Massenchromatogramme unter konstanten (a - c) und optimierten (d - f) Elektro spraybedingungen für jeweils einen Ausschnitt von 7,5 bis 10,5 min aus dem Elutionsfenster von T3 (Peak #3) und rT3 (Peak #4). Unter konstanten Spraybedingungen kann rT3 weder im rekonstruierten Totalionenstromchromatogramm (RTICC, reconstructed total ion current chromatogram) (Abb. 4.2a) noch eindeutig im Basispeakchromatogramm (BPC) (Abb. 4.2b) detektiert werden. Dagegen kann im BPC unter optimierten Bedingungen eindeutig ein Peak (Abb. 4.2e) identifiziert werden. Erst innerhalb des extrahierten Ionenchromatogramms (EIC) ist es unter konstanten Spraybedingungen möglich, rT3 zu detektieren (Abb. 4.2c). T3 (Peak #3) ist höher

konzentriert in der Probe enthalten und kann daher mit und ohne angepasste Sprayparameter detektiert werden. Der Basisliniensprung in Abb. 4.2a und b entsteht durch den Wechsel der Eluentenzusammensetzung von 25 % auf 45 % Acetonitril, was durch die Anpassung der Sprayparameter auf den höheren Acetonitrilgehalt verhindert werden kann (Abb. 4.2d und e). Die Verbindung #12 eluiert bei 50 % Acetonitril. Für die Detektion unter konstanten Spraybedingungen wurden die Sprayparameter auf diesen Acetonitrilgehalt optimiert. Daher kann diese Verbindung unter konstanten (Abb. 4.3b) wie auch optimierten Ionisationsbedingungen (Abb. 4.3e) im Basispeakchromatogramm identifiziert werden. Jedoch ist eine Identifizierung im RTICC unter beiden Bedingungen nicht möglich (Abb. 4.3a, d).



**Abb. 4.3** Vergleich der massenspektrometrischen Detektion von Verbindung #12 mit angepassten (d–f) und nicht angepassten Sprayparametern (a–c). Sprayparameter (a–b) auf Eluent mit 50 % Acetonitril optimiert, (d–f) optimiert auf isokratische Stufe (Tab. 4.1), Chromatographische Bedingungen (Abb. 4.1), – – – Wechsel der Sprayparameter der 45 %-igen auf die 50 %-ige Acetonitrilstufe.

Gering konzentrierte Substanzen können zum Teil nur identifiziert werden, wenn sich die Peaks auch vom Rauschen abheben. Durch die Anpassung der Sprayparameter auf die Eluentzusammensetzungen der einzelnen isokratischen Stufen, sollte das



Untergrundrauschen in den Massenchromatogrammen und Massenspektren verringert werden. Daher sollen nun die Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse unter konstanten und angepassten Spraybedingungen einiger ausgewählter Substanzen näher betrachtet werden (Tab. 4.1). Aus den vorhergehenden Abb. 4.2 und Abb. 4.3 ist ersichtlich, dass die absoluten Signalintensitäten einzelner Substanzpeaks unter beiden Bedingungen vergleichbar sind. Daher führt das Reduzieren des Rauschens auf Grund der Anpassung der Sprayparameter zu höheren Signal-zu-Rauschen-Verhältnissen. Viele Substanzen sind nicht im RTICC detektierbar und ihre Masse ist unbekannt, was die Nutzung extrahierter Ionenchromatogramme schwer möglich macht, daher wird die Identifizierung der Substanzpeaks vorwiegend innerhalb der Basispeakchromatogramme erfolgen. Die Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse der fünf ausgewählten Substanzpeaks in Tab. 4.1 zeigen durch die Anpassung der Sprayparameter die größeren Verhältnisse. Innerhalb der Massenspektren ist keine Verbesserung der Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse durch die Anpassung der Sprayparameter zu beobachten. Jedoch können Substanzpeaks nur identifiziert werden, wenn sich diese im Basepeakchromatogramm auch eindeutig vom Rauschen unterscheiden (vergl. T3 und r-T3). Dies ist besonders wichtig, wenn unbekannte Proben untersucht werden sollen.

**Tab. 4.1 Einfluss der Sprayparameter-Anpassung auf die Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse einiger ausgewählter Verbindungen einer gestressten Thyroxin-Probe in der massenspektrometrischen Detektion.**

Substanz	Signal-zu-Rauschen mit und ohne Anpassung der Sprayparameter							
	RTICC <sup>a)</sup>		BPC <sup>b)</sup>		EIC <sup>c)</sup>		Massenspektrum	
	angepasst <sup>d)</sup>	nicht angepasst <sup>d)</sup>	angepasst <sup>d)</sup>	nicht angepasst <sup>d)</sup>	angepasst <sup>d)</sup>	nicht angepasst <sup>d)</sup>	angepasst <sup>d)</sup>	nicht angepasst <sup>d)</sup>
<b>T3 (#3)</b>	1,3	n.d. <sup>e)</sup>	15,0	7,4	41,0	58,7	60,0	99,0
<b>r-T3 (#4)</b>	n.d.	n.d.	3,5	0,6	11,4	14,7	14,0	15,2
<b>#12</b>	1,3	1,0	5,0	0,20	83,7	74,1	168,0	158,7
<b>TetraAc (#9)</b>	10,7	24,5	432	195	653	781	1686	1231
<b>#17</b>	n.d. <sup>e)</sup>	n.d. <sup>e)</sup>	3,8	4,2	10,0	5,8	7,8	12,9

<sup>a)</sup> rekonstruiertes Totalionenstromchromatogramm

<sup>b)</sup> Basispeak Chromatogramm

<sup>c)</sup> extrahiertes Ionenstromchromatogramm

<sup>d)</sup> Sprayparameter wurden an den Acetonitrilgehalt angepasst

<sup>e)</sup> nicht detektierbar

## **4.1. Zusammenfassung**

In diesem Kapitel wurde gezeigt, wie die Optimierung stationärer Phasen genutzt werden kann, um eine HPLC-Trennung von Thyroxinproben zu beschleunigen und die massenspektrometrische Detektion zu verbessern. Als Ausgangspunkt wurden Basismessungen mit einem Standardgemisch unter isokratischen Bedingungen mit Wasser-Acetonitril (50/50) versetzt mit 0,1 % Essigsäure durchgeführt, um die optimale Säulenzusammensetzung zu finden. Durch die Optimizier-Software des POPLC-Systems wurde die optimale Säulenzusammensetzung zur Trennung des Standardgemisches unter isokratischen Bedingungen berechnet. Die simulierten Retentionszeiten auf dieser Säule der Dimension 220 x 3,0 mm i.D., die sich aus 90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN zusammensetzt, sind mit einer mittleren absoluten Abweichung von 0,9 min reproduzierbar. Durch Optimierung der stationären Phase konnte die Analysendauer einer thermisch gestressten Thyroxin-Probe um ca. 50 % reduziert werden, was aber einen Verlust der Peakauflösung gegenüber der Referenzmethode zur Folge hat.

Da die Thyroxin-Probe einen größeren chromatographischen Elutionsbereich aufweist als das Standardgemisch, wurde die isokratische Methode durch einen Stufengradient erweitert. In Abb. 4.4 sind die UV-Chromatogramme des Standardgemisches unter Referenzbedingungen auf einer 150 x 1,0 mm i.D. YMC-C18-Pro und auf der optimierten Säule unter isokratischen Bedingungen sowie im Stufenfengradient gegenübergestellt.

Durch Anpassung der Ionenquellenparameter an jede isokratische Stufe des Stufengradienten konnte die massenspektrometrische Detektion der zum Teil gering konzentrierten Nebenprodukte der gestressten Thyroxin-Probe verbessert werden.

Die Optimierung der stationären Phase ist eine wirksame Möglichkeit der Methodenentwicklung, die auch für komplexe Probengemische eingesetzt werden und den Einsatz der massenspektrometrischen Detektion erleichtern bzw. verbessern kann.

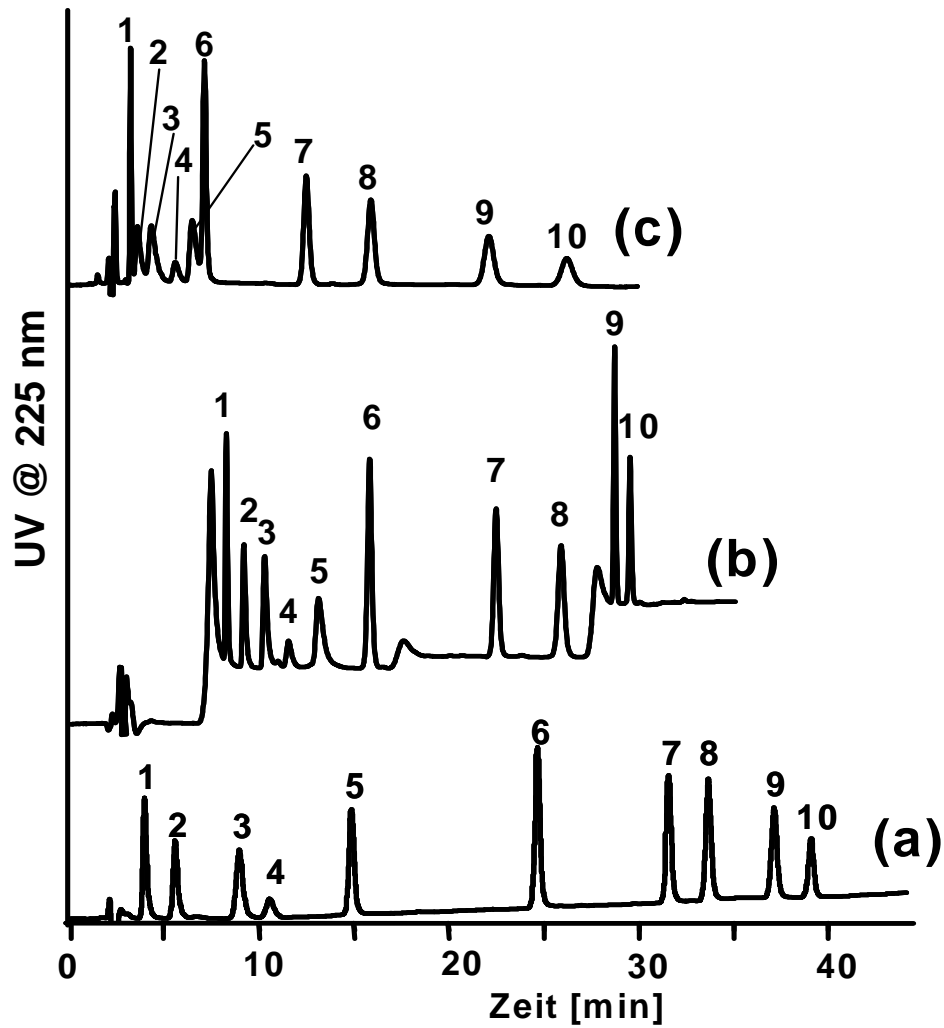


Abb. 4.4 Optimierung der stationären Phase mit dem Standardgemisch. (a) Referenzmessung, (b), (c) 220 x 3,0 mm i.D. optimierte POPLC-Säule (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN), (a) 150 x 1,0 mm i.D. YMC-C18-Pro, 30-70 % Acetonitril-Gradient in 0,1 % Ameisensäure (b) isokratische Elution mit 50% Acetonitril in 0,1 % Essigsäure; (c) Stufengradient mit 3 min/25 %, 10 min/45 %, 10 min/50 %, 10 min/70 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure.

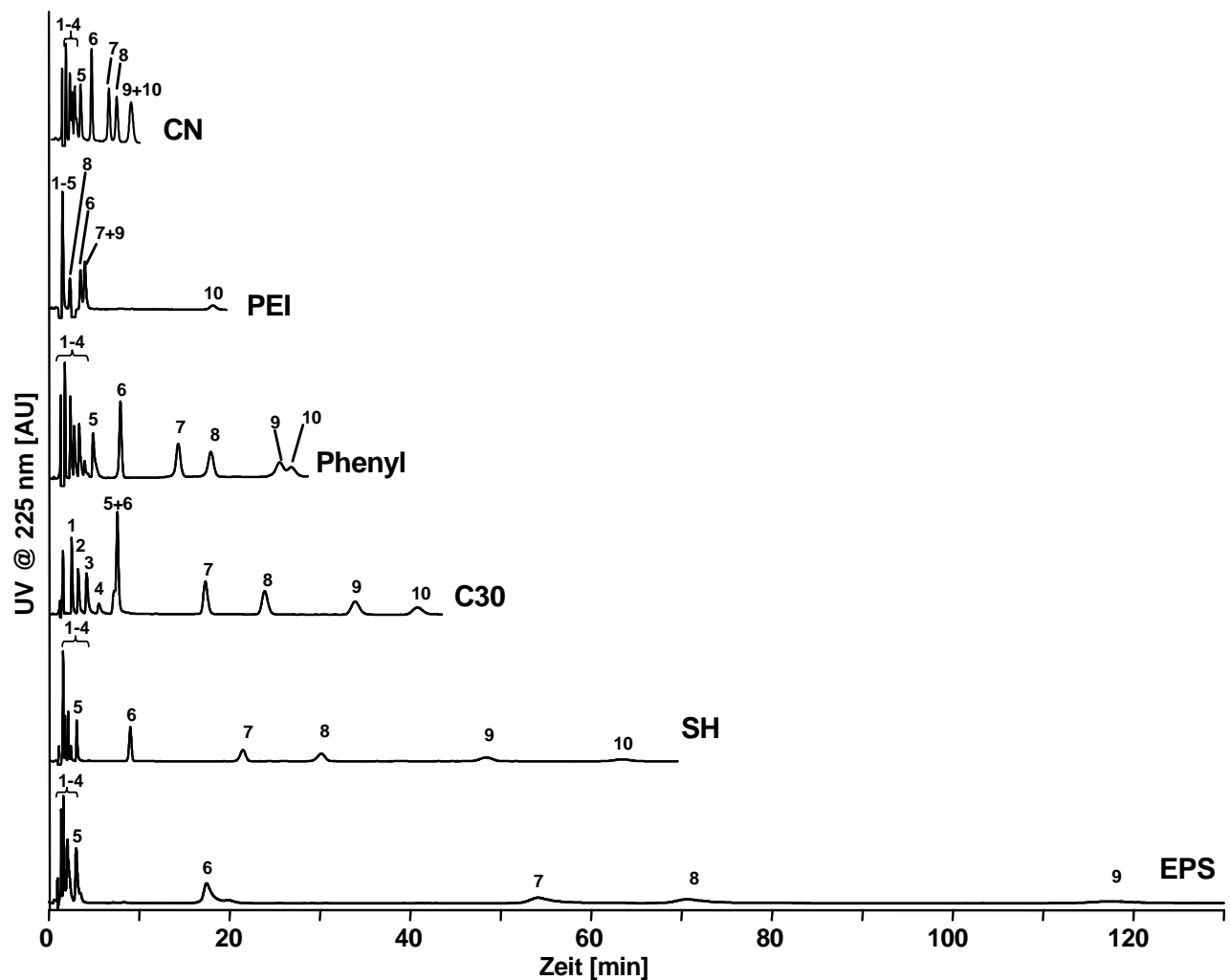
## **5. Optimierung stationärer Phasen mit einem Polyethylenimin-Anionenaustauscher**

In Kapitel 2 dieser Arbeit wurde ein Anionenaustauscher auf Basis von Polyethylenimin (PEI) für Trennungen niedermolekularer Verbindungen entwickelt. Es wurde gezeigt, dass diese PEI-Phasen auch in der Umkehrphasenchromatographie eingesetzt werden können. In der Hydrophobie sind die in dieser Arbeit entwickelten PEI-Phasen der Cyanopropyl-Phase sehr ähnlich, sollten aber für die Trennung saurer Analyten besser geeignet sein.

Im Folgenden soll nun untersucht werden, inwieweit diese PEI-Phasen sich unter Verwendung des POPLC-Systems zur Optimierung der stationären Phase eignen. Die Trennung des Standardgemisches der Schilddrüsenhormone konnte im letzten Abschnitt durch die Optimierung der stationären Phase auf einer 220 x 3,0 mm i.D. optimierten POPLC-Säule (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN) verkürzt werden. Die Basismessungen wurden mit dem Standardgemisch, welches einen relativ großen chromatographischen Bereich auf Grund der strukturellen Variabilität aufweist, durchgeführt. Vor allem in Hinsicht auf die Carbonsäuren sollte dabei die Selektivität der PEI-Phasen einen Einfluss haben.

Die Basismessungen (Abb. 5.1) wurden auch hier unter isokratischen Bedingungen, diesmal in Wasser/Acetonitril (60/40, v/v) versetzt mit 0,10 % Ameisensäure, auf allen fünf Phasen des POPLink-Systems und auf der PEI-Phase durchgeführt (Abb. 5.1). Auch hier ist es nicht möglich, das Standardgemisch auf einer der homogenen Phase unter den hier gewählten Bedingungen vollständig aufzutrennen. Auf dem Cyanopropyl-Silica (Abb. 5.1, CN) zeigen die Standardsubstanzen die geringste Retention, was unter anderem auf die geringe Hydrophobie der Phase zurückgeführt werden kann. Dagegen kann auf der EPS-Phase auch nach 120 min das Ameisensäurederivat noch nicht eluiert werden (Abb. 5.1, EPS). Auf dem Triacontyl-Silica (Abb. 5.1, C30) ist es möglich, das Standardgemisch bis auf T4 und DiAc (Peak #5+6) innerhalb von 40 min aufzutrennen. Das Polyethylenimin-Silica (Abb. 5.1, PEI) zeigt eine hohe Selektivität für das saurere Ameisensäurederivat (Peak #10), wobei aber die weiteren neun Substanzen innerhalb von drei Peaks eluiert werden. Demnach bringt das PEI-Silica eine weitere Selektivität für saure Verbindungen in das POPLC-System ein. Die Retentionsreihenfolge der Carbonsäuren spiegelt dabei sowohl die unterschiedliche Acidität der Säuren als auch die Hydrophobie in Abhängigkeit von der Zahl der

Iodatome wieder. Das am schwächsten saure Propionsäurederivat TriProp (Peak #8) eluiert vor den Essigsäurederivaten (Peak #6 und #7), diese wiederum vor dem Ameisensäurederivat (Peak #10). Innerhalb einer Säurestärke steigt der Anteil an hydrophober Retention mit der Anzahl an Iodatomen im Molekül, so dass DiAc (#6) vor TriAc (#7) und TetraAc (#9) eluiert.



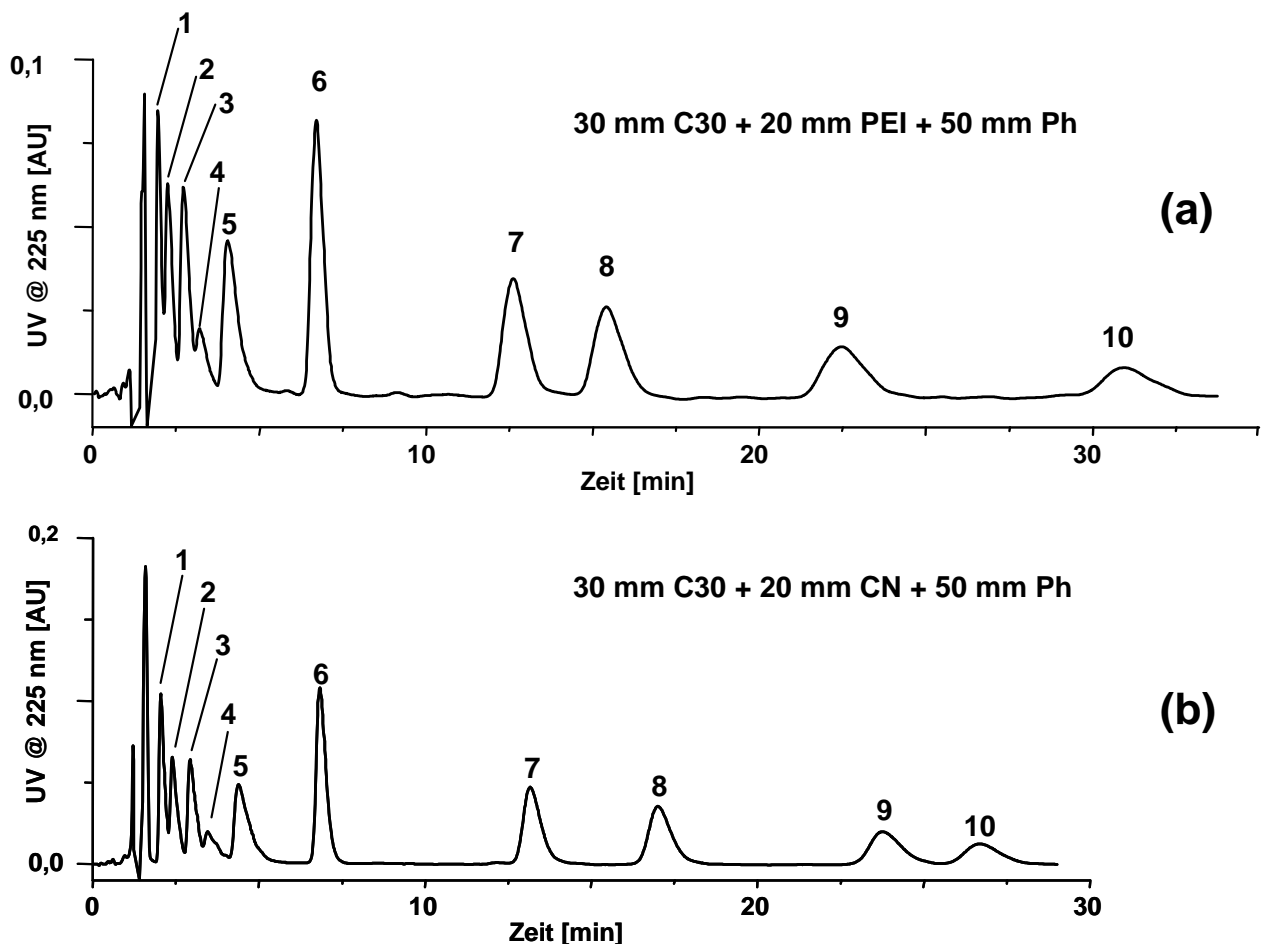
**Abb. 5.1 Isokratische Trennung des Standardgemisch auf den sechs stationären Phasen.**

Verwendete stationäre Phasen der Säulendimension 100 x 3,0 mm; Cyanopropyl-Silica (CN), Phenyl-Silica (Phenyl), Triacontyl-Silica (C30), Octadecyl-Silica (SH), Octadecyl-Silica mit polar eingebetteten Gruppen (EPS); Säulendimension 100 x 2,0 mm Polyethylenimin-Silica (PEI), Isokratische Elution mit Wasser/Acetonitril (60/40, v/v) + 0,10 % Ameisensäure; 500  $\mu\text{L min}^{-1}$  bzw. PEI mit 225  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion @ 225 nm; Peakzuordnung im negativen ESI-Modus (nicht gezeigt). Peakidentifikation in Tab. 2.1, S. 166.

Für die Berechnung der optimalen Säulenzusammensetzung wurden wie im Abschnitt zuvor die Durchflusszeiten, die Retentionszeiten und individuellen Bodenzahlen der Basismessungen in die Optimizer-Software eingegeben. Für die Berechnung der Säulenzusammensetzung wurden ebenfalls eine maximale Auflösung von 2,0, eine

maximale Säulenlänge von 250 mm und eine maximale Analysenzeit von 30 min als Randbedingungen gewählt.

Das vorhergesagte Ergebnis mit der besten Auflösung (Abb. 5.2) soll auf einer 100 mm langen Säule, die aus einem 30 x 3 mm i.D. Triacontyl-Silica-, einem 20 x 3 mm i.D. Polyethylenimin-Silica- und einem 50 x 3 mm i.D. Phenyl-Silica-Segment zusammengesetzt ist, erreicht werden. Das UV-Chromatogramm der Trennung des Standardgemisches auf dieser optimierten Säule ist in Abb. 5.2a dargestellt. Wie vorher schon erwähnt, ist die Hydrophobie der PEI-Phase mit der CN-Phase vergleichbar. Dennoch besitzt letztere eher polaren und ungeladenen Charakter im Gegensatz zum PEI-Silica, welches protonierbare Aminofunktionen mit ionischen Eigenschaften aufweist. Um den Einfluss beider Phasen zu vergleichen, wurde die Trennung (Abb. 5.2a) auf einer zusammengesetzten Säule, die an Stelle des PEI-Segmentes ein CN-Segment enthält, unter identischen Bedingungen wiederholt (Abb. 5.2b).



**Abb. 5.2** Trennung des Standardgemisches auf einer optimierten stationären Phase, die einen Polyethyleniminanionenaustauscher enthält. 100 x 3,0 mm i.D. optimierte POPLC-Säule (30 mm C30 + 20 mm PEI + 50 mm Ph) und eine optimierte POPLC-Säule, bei der die PEI-Phase durch CN ausgetauscht wurde. Isokratische Elution mit 40% Acetonitril in 0,1 % Essigsäure.

Auf der optimierten Säule mit dem Cyanopropyl-Silica-Segment kann das Standardgemisch in weniger als 30 min, auf der PEI-enthaltenden Säule in 35 min getrennt werden. Innerhalb der Elution der Hormone (Peak #1 bis #5) unterscheiden sich beide Säulen nicht signifikant voneinander. Der Einfluss des Anionenaustauschers wird erst beim näheren Betrachten der Carbonsäuren deutlich. Speziell die Tetraiodothyroessigsäure (Peak #9) und –ameisensäure (Peak #10) werden auf der Säule mit dem PEI-Segment deutlich höher aufgelöst. Die Basismessungen haben schon diese hohe Selektivität hinsichtlich des Ameisensäurederivates (Peak #10) gezeigt. Die einzelnen Selektivitäten und speziell die Auflösungen zwischen den Carbonsäuren des Standardgemisches sind in Tab. 5.1 aufgelistet.

**Tab. 5.1 Gegenüberstellung der Auflösungen der Standardsubstanzen auf der phasenoptimierten Säule unter isokratischen und Stufengradient-Bedingungen und der Referenzmethode auf der Standardsäule mit Gradientelution.**

		(30 mm C30 + 20 mm <u>CN</u> + 50 mm Ph) x 3,0 mm i.D.		(30 mm C30 + 20 mm <u>PEI</u> + 50 mm Ph) x 3,0 mm i.D.	
Peak #		Selektivität	Auflösung	Selektivität	Auflösung
1 / 2	T2/rT2	1,34		1,30	
2 / 3	rT2/T3	1,37		1,37	
3 / 4	T3/rT3	1,27		1,28	
4 / 5	rT3/T4	1,38		1,38	
5 / 6	T4/DiAc	1,72	3,71	1,88	3,43
6 / 7	DiAc/TriAc	2,09	8,32	2,03	5,74
7 / 8	TriAc/TriProp	1,32	3,47	1,24	1,88
8 / 9	TriProp/TetraAc	1,42	4,54	1,49	3,56
9 / 10	TetraAc/TetraFA	1,13	1,60	1,40	3,45
<b>Mittelwert</b>		1,45	4,33	1,49	3,61

Die erreichten Selektivitäten zwischen den Hormonen (#1 bis #5) unterscheiden sich nicht zwischen den beiden eingesetzten Segmenten (Tab. 5.1). Dagegen wird mit einem CN-Säulensegment eine höhere mittlere Auflösung der Carbonsäuren von 4,3 erreicht. Dennoch ist die Auflösung zwischen dem Ameisensäure- und Essigsäurederivat auf der PEI-Phase am größten. Diese beiden Carbonsäuren sind zwar schwache Säuren, aber im Vergleich mit den anderen drei im Standard enthaltenen die saureren Verbindungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Kapitel 2 entwickelte Polyethylenimin-Phase durch eine zusätzliche Selektivität speziell für saure Verbindungen auch eine geeignete Erweiterung im POPLC-Phasensystem zur Optimierung stationärer Phase wäre. Da die Hydrophobie der PEI-Phase mit der bereits im POPLink-System enthaltenden Cyanopropyl-Phase vergleichbar ist, bietet die PEI-Phase eine gute Alternative zur CN-Phase.



# Literaturverzeichnis

---

---

---

- [1] A. J. Alpert; F. E. Regnier; *J. Chromatogr.*, 185 1 (1979) 375-92
- [2] K. Bischoff et al.; Patentnr.: WO/2006/125564; PCT/EP2006/004744, (2006)
- [3] Engelhardt, H.; *Practice of High Performance Liquid Chromatography*, (1986) , Springer,-Verlag, Heidelberg
- [4] Karger, B. L.; Snyder, L. R.; Horvath, C.; *An Introduction to Separation Science*, (1973) , Wiley,
- [5] Böcker, J.; *Chromatographie*, (1997) 1. Aufl., Vogel Buchverlag , Würzburg
- [6] Hamilton, R. J.; Sewell, P. A.; *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*, (1982) 2. Aufl., Chapman and Hall, NY, USA
- [7] E. Katz et al.; *J. Chromatogr.*, 270 (1983) 51-75
- [8] Cs. Horvath; H.-J. Lin; *J. Chromatogr.*, 126 (1976) 401-20
- [9] J. F. Huber; J. A. Hulsman; *Anal. Chim. Acta.*, 38 1 305-13.
- [10] J. H. Knox; H. P. Scott; *J. Chromatogr.*, 282 (1983) 297-313
- [11] J. J. van Deemter et al.; *Chem. Eng. Sci.*, 5 (1956) 271-89
- [12] J. C. Giddings; *J. Chromatogr.*, 5 (1961) 46-60
- [13] R. Endeke et al.; *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 377-393
- [14] R. Ohmacht; I. Halasz; *Chromatographia*, 14 4 (1981) 216-26
- [15] H. Engelhardt; H. Elgass; *Chromatographia*, 22 1-6 (1986) 31-9
- [16] Weiß, J.; *Ionenchromatographie*, (1991), VCH, New York
- [17] Konrad Dorfer; *Ion Exchanger*, (1991) 3. Aufl., Walter de Gruyter Berlin, New York
- [18] L. C. Sander; S. A. Wise; *Anal. Chem.*, 56 3 (1984) 504-10
- [19] L. C. Sander; S. A. Wise; *Anal. Chem.*, 59 18 (1987) 2309-13.
- [20] L. C. Sander; S. A. Wise; *Anal. Chem.*, 67 18 (1995) 3284-92

- [21] H. Engelhardt et al.; *LC GC*, 15/9 (1997) 859-866
- [22] H. Engelhardt; M. Jungheim; *Chromatographia*, 29 1-2 (1990) 59-68
- [23] K. Kimata et al.; *J. Chromatogr. Sci.*, 27 12 (1989) 721-8
- [24] U. D. Neue et al.; *J. Sep. Sci.*, 26 3/4 (2003) 174-186
- [25] U. D. Neue et al.; *J. Chromatogr. A*, 849 1 (1999) 101-116
- [26] U. D. Neue et al.; *J. Chromatogr. A*, 849 1 (1999) 87-100
- [27] Hetem, M. J. J.; *Chemically Modified Silica Surfaces in Chromatography - A Fundamental Study*, (1993) , Hüthig, Heidelberg
- [28] Niessen, W. M. A.; Gross M. L.; Caprioli, R. M.; *The Encyclopedia of Mass Spectrometry, Hyphenated Methods, Vol. 8*, (2006) , Elsevier,
- [29] W. M. A. Niessen; *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 407-435
- [30] Niessen, W. M. A.; van der Greef, J.; *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Applications*, (1992) , Marcel Dekker, Inc., New York
- [31] Gross, J. H.; *Mass Spectrometry*, (2004) , Springer,
- [32] Baker, J.; *Mass Spectrometry*, (1999) 2. Edition, Wiley & Sons, ACOL
- [33] E. De Hoffmann et al.; (1996) , John Wiley & Sons, Paris
- [34] Cotter, R. J.; *Time-of-flight mass spectrometry: instrumentation and applications in biological research*, (1997) , American Chemical Society, Washington , DC
- [35] D. P. Little et al.; *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 4893-4897
- [36] Smith, M. R.; *Understanding Mass Spectra, A basic Approach*, (2004) 2. Edition,
- [37] Goethals, E. J.; Editor; *Polymeric Amines and Ammonium Salts*, (1980) , Invited Lectures and Contributed Papers Presented at the International Symposium on Polymeric Amines and Ammonium Salts, Ghent, Belgium, 24-26 September 1979
- [38] D. Horn; J. Melzer; *Fibre-Water Interact. Pap.-Making, Trans. Symp.*, (1978) 135-50

- [39] D. Horn; J. Melzer; *Papier (Bingen, Germany)*, 29 12 (1975) 534-41
- [40] E. F. Litzinger; Patentnr.: 2018566,
- [41] K. Randerath; E. Randerath; *J. Chromatogr.*, 16 1 (1964) 111-25
- [42] E. Randerath; K. Randerath; *J. Chromatogr.*, 16 1 (1964) 126-9
- [43] G. Vanecek; F. E. Regnier; *Anal. Biochem.*, 121 1 (1982) 156-69
- [44] J. D. Pearson; F. E. Regnier; *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 137-49
- [45] R. R. Drager; F. E. Regnier; *Anal. Biochem.*, 145 1 (1985) 47-56
- [46] W. Kopaciewicz et al.; *J. Chromatogr.*, 318 2 (1985) 157-72
- [47] G. Jilge et al.; *J. Chromatogr.*, 476 (1989) 37-48
- [48] M. A. Rounds et al.; *J. Chromatogr.*, 397 (1987) 25-38
- [49] C. McNeff et al.; *J. Chromatogr. A*, 684 2 (1994) 201-12
- [50] C. McNeff; P. W. Carr; *Anal. Chem.*, 67 21 (1995) 3886-92
- [51] T. G. Lawson et al.; *Anal. Biochem.*, 133 1 (1983) 85-93
- [52] Y. Shen; M. L. Lee; *J. Microcolumn Sep.*, 8 8 (1996) 519-528
- [53] T. Shimizu et al.; *Chromatographia*, 28 11-12 (1989) 620-2
- [54] H. Elgass et al.; *Fresenius Z. fuer Anal. Chem.*, 294 2-3 (1979) 97-106
- [55] J. Jacobson et al.; *J. Chromatogr.*, 316 (1984) 53-68
- [56] F. Gritti; G. Guiochon; *J. Chromatogr.*, 1069 1 (2005) 31-42
- [57] Otto, M.; *Analytische Chemie*, (2006) Dritte Aufl., Wiley, Weinheim
- [58] J. R. Chalmers et al.; *J. Chem. Soc.*, (1949) 3424-33
- [59] C. R. Harington; G. Barger; *Biochem. J.*, 21 1 (1927) 169-83.

- [60] G. Hillmann; *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 11b (1956) 419-20
- [61] H. Nahm; W. Siedel; *Chem. Ber.*, 96 (1963) 1-9
- [62] G. M. Salamonczyk et al.; *Tetrahedron Letters*, 38 40 (1997) 6965-6968
- [63] H. Gika et al.; *J. Chromatogr. B*, 800 1-2 (2004) 193-201
- [64] W. Rong et al.; *J. Chromatogr. B*, 785 (2003) 353
- [65] L. Abou-Basha; H. Aboul-Enein; *Pharm. Acta Helv*, 70 (1995) 237
- [66] United States Pharmacopei *US Pharmacopeia*, (1995),
- [67] *European Pharmacopoeia* , (1991),
- [68] C. M. Won; *Pharmaceut Research*, 9 1 (1992 ) 131-137
- [69] M. Andre et al.; *J. Chromatogr. A*, 725 2 (1996) 287-94
- [70] S. S. Kannamkumarath et al.; *j. Anal. At. Spectroscopy*, 19 (2004) 107-113
- [71] V. Samanidou et al.; *J Liq. Chrom Rel Technol*, 23 5 (2000) 681-692
- [72] H. Gika et al.; *J Chromatogr B*, 814 (2005) 163-173
- [73] S. Tai et al.; *Anal Chem*, 76 (2004) 5092-5096
- [74] J. J. Kirkland; J. L. Glajch; *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 27-39
- [75] P. J. Schoenmakers et al.; *J. Chromatogr.* , 149 (1978) 519-537
- [76] Schoenmakers, P. J.; *Optimiation of Chromatographic Selectivity*, (1986) , Elsevier, Amsterdam
- [77] J. Zhao; P. W. Carr; *Anal. Chem.*, 71 14 (1999) 2623-2632
- [78] J. W. Dolan et al.; *J. Chromatogr., A*, 897 1+2 (2000) 37-50
- [79] Kromidas, S.; *HPLC Made to Measure. A Practical Handbook for Optimization*, (2006) , Wiley-VCH, Weinheim

- [80] L. R. Snyder; *J. Chromatogr. Sci.*, 16 (1978) 223
- [81] Sz. Nyiredy et al.; *J. Planar Chromatogr.*, 1 4 (1988) 336-42
- [82] Sz. Nyiredy; *J. Chromatogr. Sci.*, 40 10 (2002) 553-563
- [83] Sz. Nyiredy et al.; *J. Liquid Chromatogr.*, 12 1-2 (1989) 95-116
- [84] J. L. Glajch et al.; *J. Chromatogr.*, 318 1 (1985) 23-39
- [85] T. Welsch et al.; *J. High Res. Chromatogr.*, 16 (1993) 18-26
- [86] Y. Mao; P. W. Carr; *Anal. Chem.*, 72 1 (2000) 110-118
- [87] Y. Mao; P. W. Carr; *Anal. Chem.*, 72 13 (2000) 2788-2796
- [88] Sz. Nyiredy et al.; *Chromatographia*, 63 Suppl. (2006) S3-S9
- [89] Sz. Nyiredy et al.; *J. Chromatogr. A*, 1157 1-2 (2007) 122-130

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångstrøm
ACN	Acetonitril
AminonaphthSO <sub>3</sub>	2-Amino-6-naphthalensulfonsäure
APCI	engl. atmospheric pressure chemical ionization, Chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck
AU	Absorptionseinheiten
BG	Bedeckungsgrad
BPC	Basispeakchromatogramm
C/N	Verhältnis Kohlenstoff zu Stickstoff
C30	Triacetyl-Silica
CN	Cyanopropyl-Silica
DBE	Doppelbindungsäquivalente
DiAc	3,5-Diiodothyroessigsäure
DiProp	Diiodothyropropionsäure
EDGE	Ethylenglycoldiglycidylether
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
EPS	Octadecyl-Silica mit eingebetten polaren Gruppen
ESI	Elektrosprayionisierung, engl. electrospray ionization
FA	Ameisensäure
HPLC	engl. high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
i.D.	Innendurchmesser
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MeOH	Methanol
mM	Millimolar (Konzentrationsangabe)
MS	Massenspektrometrie
negAPCI	Chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck im negativen Modus
negESI	Elektrosprayionisation im negativen Modus
NH <sub>4</sub> -Ac	Ammoniumacetat
HOAc	Essigsäure

p.a.	pro analysii
PEI	Polyethylenimin
Ph	Phenyl-Silica
POPLC	engl. Phase optimized liquid chromatography, Optimierung stationärer Phasen für die Flüssigchromatographie
posAPCI	Chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck im positiven Modus
QIT	engl. quadrupole ion trap, Quadrupoleionenfalle
RPC	engl. reversed phase chromatography, Umkehrphasenchromatographie
r-T2	3,5-Diiodo-L-Thyronin
r-T3	3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin
RTICC	engl. reconstructed total ion current chromatogram, rekonstruiertes Totalionenstromchromatogramm
S/N	Verhältnis Signalhöhe zu Rauschhöhe
SH	Octadecyl-Silica mit hydrophobem Endcapping
T2	3,3'-Diiodo-L-Thyronin
T3	3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin, Thyronin
T4	3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin, Thyroxin
TetraAc	3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure, Tetraiodothyroessigsäure
TetraFA	3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure, Tetraiodothyroameisensäure
TOF-MS	engl. time-of-flight mass spectrometry, Flugzeitmassenspektrometrie
TriAc	3,5,3'-Triiodothyroessigsäure, Triiodothyroessigsäure
TriProp	3,5,3'-Triiodothyropropionsäure, Triiodothyropropionsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
SO <sub>3</sub>	2-Amino-6-naphthalensulfonsäure



## Abbildungsverzeichnis

### Kapitel 1 – Grundlagen und theoretische Hintergründe

Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines Chromatogramms.....	11
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Auflösung zweier Peaks in Abhängigkeit von der Peakbreite. ....	14
Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Bandenverbreiterung und der einzelnen van Deemter-Parameter (Formel 10). Bodenhöhe H in Abhängigkeit von der Lineargeschwindigkeit.....	16
Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Bandenverbreiterung durch höhere Lineargeschwindigkeiten an einer Pore in einer porösen Kieselgeloberfläche. ....	18
Abb. 1.5 Van Deemter-Kurven für Trägermaterialien mit unterschiedlichen Teilchendurchmessern. Berechnet nach Halász.....	19
Abb. 2.1 Grobe Einteilung kommerzieller stationärer Phasen für die HPLC. LSC = Liquid Solid Chromatography. ....	22
Abb. 2.2 Einteilung von Ionenaustauschern in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	24
Abb. 2.3 Theoretische Darstellung der Abhängigkeit des Retentionsfaktors der Substanz A von der inversen Ionenstärke des Eluenten für Ionenaustauscherphase a und b.....	25
Abb. 2.4 Beispiele für die Vielfalt der Oberflächenmodifikationen verschiedener Umkehrphasen. (A) klassische C18-Phase, hydrophobe Octadecyl-Ketten mit Endcapping, (B) Octadecyl-Ketten mit polarem Endcapping, (C) Shield-Phase, Octadecyl-Ketten mit eingebetteten polaren Gruppen, klassisches Endcapping. ....	27
Abb. 2.5 Mögliche Arten von Silanolgruppen. ....	29
Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Modifikation der Kieselgeloberfläche mittels Silanisierung von Alkylsilanen. ....	30
Abb. 2.7 Schematische Darstellung der Polymerisation direkt an der modifizierten Kieselgeloberfläche (A) und Aufsilanisierung von Polymeren mit Ankergruppe (B). ....	31
Abb. 3.1 Schematische Darstellung einer Quelle für die chemische Ionisierung unter atmosphärischem Druck (APCI, atmospheric pressure chemical ionization).....	33
Abb. 3.2 Darstellung der Bildung reaktiver Spezies durch eine Korona-Entladung (APCI).....	34
Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Prinzips der Elektrospray-Ionisierung (ESI).....	35
Abb. 3.4 Schematische Darstellung eines Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometers. ....	36
Abb. 3.5 Schematische Darstellung eines Flugzeitmassenspektrometers. ....	37
Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Auflösung von Isotopenpeaks im Massenspektrum mit hoher Auflösung (unten) und geringer Auflösung (oben).....	38
Abb. 3.7 Passives (a) und elektronisch reguliertes (b) Splitsystem. ....	39

### Kapitel 2 - Entwicklung eines Anionenaustauschers auf Basis eines porösen Kieselgels

Abb. 1.1 Verlauf der pH-Werte während der Titration von freiem linearen Polyethylenimin [PEI]=0,421 eq/L; [NaCl]=1 mol/L. (untere Kurve) ohne Zusatz von Salz; (obere Kurve) mit Zusatz von Salz [Steffen Traser, Dissertation TU Darmstadt, 2005].....	44
Abb. 2.1 Syntheschema der Quervernetzung von Polyethylenimin mit Ethandioldiglycidylether. ....	48
Abb. 2.2 Schematischer Aufbau der Apparatur für die Durchbruchmessungen. ....	54
Abb. 2.3 Belegung des Injektionsventils 7125 (Rheodyne) für die Durchbruchmessungen. ....	55

- Abb. 3.1 Stabilitätstest zweier Säulen (a, b und c, d) eines Syntheseansatzes mit 10 % Polyethylenimin (w/v) und 5 % Ethandiolglycidylether (v/v) in Methanol. Bodenzahlen (c, d) und k-Werte (a, b) in Abhängigkeit von den Säulenvolumina an Eluent. Spülen 4 h mit 50 % Acetonitril in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), Injektion Gemisch (Nitrit, Nitrat und Iodid) mit 10 % Acetonitril in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), Waters Alliance, 250 µL min<sup>-1</sup>, 210 nm. Beispielchromatogramme siehe Abb. 3.2. .... 61
- Abb. 3.2 Beispielchromatogramme der Anionentrennung des Stabilitätstests (Abb. 3.1). Säule 1 nach (a) 4 h, (c) 116 h Spülen und Säule 2 nach (b) 4 h, (d) 100 h Spülen. Injektion Gemisch (Nitrit, Nitrat und Iodid), 10 % Acetonitril in 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0), Waters Alliance, 250 µL min<sup>-1</sup>, 210 nm. .... 64
- Abb. 4.1 Vergleich der k-Werte von Iodid (dunkler Balken) und Stickstoffbedeckungsgrade (BG, in [µmol g<sup>-1</sup>]) (heller Balken) durch Normierung auf den Ansatz mit 10 % PEI und 5 % EDGE auf ProntoSIL-120 Å-10 µm. 100 Å entspricht dem Trägermaterial ProntoSIL-100 Å-10 µm, 120 Å entspricht dem Trägermaterial ProntoSIL-120 Å-10 µm. 50 x 2,0 mm i.D., 10 % Acetonitril in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, 250 µL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 215 nm, Alliance. .... 69
- Abb. 4.2 H-u-Kurven der Synthesestrategien und unterschiedlichen Porengrößen des 10 µm-Kieselgelmateriale (Tab. 4.1). Ionen die mit einem k-Wert von 10 eluiert wurden (von Nitrit, Nitrat oder Iodid). .... 71
- Abb. 4.3 Gegenüberstellung der H-u-Kurven ähnlicher Synthesestrategien zum Vergleich der zwei verwendeten Porengrößen (Tab. 4.1). ( ) ProntoSIL-120 Å-10 µm, ( ) ProntoSIL-100 Å-10 µm. (a) 120 Å, 10 % PEI 5 % EDGE, 100 Å, 15 % PEI 8 % EDGE, (b) 120 Å, 30 % PEI 5 % EDGE, 30 % PEI 8 % EDGE, (c) 120 Å, 30 % PEI 15 % EDGE, 100 Å, 30 % PEI 15 % EDGE. 10 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, (von oben nach unten Nitrit, Nitrat oder Iodid) UV @ 215 nm, 50 x 2,0 mm i.D., Flüsse: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 900, 1000, 1200 µL min<sup>-1</sup> ..... 72
- Abb. 4.4 H-u-Kurven höhermolekularer Analyten. Vergleich der Synthese mit 30 % PEI und 15 % EDGE auf zwei verwendeten Porengrößen (Tab. 4.1). ( ) ProntoSIL-120 Å-10 µm, TriAc, T4, Aminonaphthalensulfonsäure (SO<sub>3</sub>), ( ) ProntoSIL-100 Å-10 µm, TriAc, T4, Aminonaphthalensulfonsäure (SO<sub>3</sub>). 50 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, UV @ 225 nm, 50 x 2,0 mm i.D., Flüsse: 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 900, 1000, 1200 µL min<sup>-1</sup> ..... 74
- Abb. 4.5 Zusammenfassung der C-Terme (sortiert nach k-Wert) für den Syntheseansatz mit 30 % PEI und 15 % EDGE auf ProntoSIL-120 Å-10 µm und ProntoSIL-100 Å-10 µm. SO<sub>3</sub> = Aminonaphthalensulfonsäure ..... 75
- Abb. 4.6 Gegenüberstellung chromatographisch zugänglicher Kapazität vor und nach dem einstündigen Spülen der drei Säulen (2,0 mm i.D.) mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0 bei 250 µL min<sup>-1</sup>. Die Kapazität wurde mittels Frontanalyse mit NaNO<sub>3</sub> bestimmt (Beispieldurchbruchskurve Abb. 4.7a). .... 77
- Abb. 4.7 (a) Durchbruchmessung mit NaNO<sub>3</sub>, (b) Trennung von Nitrit, Nitrat und Iodid, 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % ACN, 250 µL min<sup>-1</sup> (einzelne Parameter der Chromatogramme siehe Tab. 4.4), vor ( ) und nach ( ) dem einstündigen Spülen mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0. Synthese auf ProntoSIL-120 Å-5 µm, 125 x 2,0 mm i.D. .... 78
- Abb. 5.1 Vergleich der k-Werte von Iodid, Nitrat und Nitrit vor und nach der Oberflächenaktivierung der zwei Masterbatches mit 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,0. 125 x 2,0 mm i.D., 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % ACN, 250 µL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 215 nm, Waters Alliance. .... 84
- Abb. 5.2 Retentionsfaktor in Abhängigkeit von der inversen Salzkonzentration. Isokratische Trennung von Nitrit und Iodid mit jeweils 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM NaCl in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 + 10 % ACN, 250 µL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 225 nm. MB 1 und MB 2 125 x 2,0 mm. .... 86
- Abb. 5.3 Retentionsfaktor in Abhängigkeit von der Acetonitrilkonzentration. Isokratische Trennung von Nitrit, Iodid und T4 mit jeweils 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % und 60 % ACN in 50 mM TRIS/HCl pH 7,0, 250 µL min<sup>-1</sup>, UV-Detektion @ 225 nm. MB 2, 125 x 2,0 mm. .... 87
- Abb. 5.4 H-u-Kurven des Masterbatch 1 (MB 1) und Masterbatch 2 (MB 2). Nitrat, Nitrit, T4, Aminonaphthalensulfonsäure (SO<sub>3</sub>), Iodid, van Deemter-Parameter siehe Tab. 5.3. .... 89

Abb. 5.5 Stabilitätstest bei pH 7,0 des Masterbatch 2 (125 x 2,0 mm). (a) k-Werte und (b) Bodenzahlen in Abhängigkeit von den Säulenvolumina an Eluent. 50 % Acetonitril in 50 mM TRIS/HCl (pH 7,0), Injektion von Aminonaphthalensulfonsäure (SO <sub>3</sub> ) und einem Gemisch aus Nitrit und Iodid, HP1100, UV-Detektion @ 215 nm, 250 µL min <sup>-1</sup> .....	92
Abb. 5.6 Stabilitätstest beider Masterbatches (100 x 2,0 mm). (a) k-Werte (b) und Bodenzahlen in Abhängigkeit von den Säulenvolumina an Eluent. Wasser/Acetonitril (60/40) + 0,1 Vol% Essigsäure, Injektion eines Gemisches aus Thyroxin (T4) und Diiodothyropropionsäure (DiProp), HP1100, UV-Detektion @ 225 nm, 250 µL min <sup>-1</sup> .....	94
Abb. 6.1 Probengemisch der Normalphasenchromatographie.....	98
Abb. 6.2 Normalphasenchromatographie. Zwei Säulen a und b eines Syntheseansatzes mit 10 % PEI und 5 % EDGE auf ProntoSIL-120A-5µ, 125 x 2,0 mm, Eluent: n-Hexan + 10% Ethylacetat (v/v) + 500 ppm Wasser, Bischoff-Pumpe, Knauer-Detektor, manuelles Injektionsventil mit 5 µL Probenschleife, 254 nm, 250 µL/min, Elutionsreihenfolge: Toluol, 2,6-DiMePh, 2,4-DiMePh + 2,5-DiMePh, 3,5-DiMePh (Dimethylphenole).....	99
Abb. 6.3 Normalphasenchromatographie einer kommerziellen Aminophase. ProntoSIL-120-3-AMINO, 3 µm Partikel, 120A-Trägermaterial, 100 x 4,6 mm. Eluent: n-Hexan + 10% Ethylacetat (v/v) + 500 ppm Wasser. Bischoff-Pumpe, Knauer-Detektor, manuelles Injektionsventil mit 5 µL Probenschleife, 254 nm, 1,0 mL/min, Elutionsreihenfolge: Toluol, 2,6-DiMePh, 2,4-DiMePh + 2,5-DiMePh, 3,5-DiMePh (Dimethylphenole).....	99
Abb. 6.4 Probengemisch der Benzoesäurederivate.....	100
Abb. 6.5 Trennung von Benzoesäure-Derivaten mittels Ionenaustauschchromatographie auf einer Säule des Masterbatch 1 (MB 1) und Masterbatch 2 (MB 2), 150 x 4,6 mm i.D. (Werte siehe Tab. 6.1). Gradient in 32 min von 0 - 150 mM NaCl in 50mM TRIS/HCl pH 7,0, 1 mL min <sup>-1</sup> , UV-Detektion @ 240 nm.....	101
Abb. 6.6 Substanzen des verwendeten Standard aus Thyroxin-Derivaten.....	103
Abb. 6.7 Trennung des Standardgemisches aus Thyroxin-Derivaten auf einer Säule des Masterbatch 2. 5 min isokratisch mit 5 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, Gradient in 20 min von 5 % bis 60 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % Ameisensäure.....	104

### **Kapitel 3 - Strukturaufklärung von Abbauprodukten synthetischer Schilddrüsenhormone mittels Umkehrphasenchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie**

Abb. 1.1 Strukturen der zwei Schilddrüsenhormone.....	107
Abb. 2.1 Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung. (weitere Informationen Tab. 2.1).....	112
Abb. 3.1 Gegenüberstellung der relativen Retentionszeiten (relative RT) bezogen auf die Retentionszeit von T4 des Standardgemisches in der Phosphatpuffermethode in Saarbrücken (SB) und von Peptido. Bedingungen für Saarbrücken: YMC C18 Pro 150 x 4.6 i.D.; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer pH 2.0 - 2.5, Gradient von 30-70 % Acetonitril in 38 min, 900 µL min <sup>-1</sup> ; UV @ 225 nm.....	118
Abb. 4.1 Vergleich von APCI und ESI für die massenspektrometrische Detektion. YMC C18 Pro 150 x 4.6 mm i.D.; isokratische Elution für 5 min mit 30 % Acetonitril in (a), (b), (d) Wasser mit 0,1% Ameisensäure (FA), (c), (e) 10 mM Ammoniumacetat (NH <sub>4</sub> Ac), pH 7,0. danach Elution innerhalb eines Gradienten von 30-70 % Acetonitril (c), (e) bzw. Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure (a), (b), (d) in 38 min, 900 µL min <sup>-1</sup> ; negative-ESI- (a), negative APCI- (d), (e) positive APCI-Detektion (b), (c), m/z 400-2000. HP1100/Esquire HCT.....	120
Abb. 4.2 Gegenüberstellung der Signal-zu-Rauschen-Werte von ausgewählten m/z bei verschiedenen Ionisierungsmodi (APCI und ESI) in detektierten Massenspektren. Daten aus Messungen von 121	

- Abb. 5.1 Gegenüberstellung einer Trennung des Standardgemisches mit der Phosphatpuffermethode (a) und der Ameisensäuremethode (b). (a) YMC C18 Pro 150 x 4,6 i.D.; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer pH 2,0 – 2,5, Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 38 min, 15 µL inj., 900 µL min<sup>-1</sup>; (b) YMC C18 Pro 150 x 1 mm; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 0,10 % Ameisensäure, 38 min Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 0,10% Ameisensäure, 50 µL min<sup>-1</sup>; 50 µL inj.; UV @ 225 nm; (Strukturen siehe Abb. 2.1) ..... 123
- Abb. 5.2 Basispeakchromatogramm und Massenspektren des Standardgemisches mit der Ameisensäuremethode. YMC C18 Pro 150 x 1 mm; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 0,10 % Ameisensäure, 38 min Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 0,10% Ameisensäure, 50 µL min<sup>-1</sup>, negative ESI-TOF-MS, m/z 400-2000. .... 125
- Abb. 6.1 Theoretisches (a) und gemessenes (b) Massenspektrum von Thyroxin (T4) und typisches Massenspektrum eines Kohlenstoffwasserstoffs C<sub>56</sub>H<sub>104</sub> mit einer vergleichbaren Masse (c). . 127
- Abb. 6.2 Beispiele möglicher Strukturen von Abbauprodukten bzw. Synthesenebenprodukten ausgehend von Thyroxin (T4). .... 129
- Abb. 6.3 Zusammenhang von Molekülaufbau und Doppelbindungsäquivalenten (DBE) am Beispiel von Ethan (a), Ethen (b) und Thyroxin (c). .... 131

## Massenspektren der Strukturidentifizierung

- Abb. 6.2.1 Basispeakchromatogramm ungezoomt (oben) und gezoomt (unten) einer thermisch gestressten Thyroxinprobe. YMC C18 Pro 150 x 1 mm; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 0,10 % Ameisensäure, 38 min Gradient von 30 - 70 % Acetonitril in 0,10% Ameisensäure, 50 µL min<sup>-1</sup>, negative ESI-TOF-MS, m/z 400-2000. .... 132
- Abb. 6.2.2 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #11/#12 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. 133
- Abb. 6.2.3 Identifizierung des detektierten m/z 431,89719 (Abb. 6.2.2) bei 2,4 min im Basispeakchromatogramm (Abb. 6.2.1) als Diiodotyrosin. a) Basispeakchromatogramm einer T4-Probe, Bedingungen siehe Abb. 6.2.1, b) detektiertes Massenspektrum unter dem Peak bei 2,4 min, c) Injektion einer Diiodotyrosinlösung in das Trennsystem aus Abb. 6.2.1, d) Direktinfusion der Diiodotyrosinlösung, Detektion im negativen Elektrospraymodus..... 134
- Abb. 6.2.4 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #14 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. 135
- Abb. 6.2.5 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #24 + #46 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. 136
- Abb. 6.2.6 Detektiertes Massenspektrum unter den Peaks #3 und #4 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Auf Grund des zuvor injizierten Standardgemisches können beide Substanzen als T3 und r-T3 identifiziert werden..... 137
- Abb. 6.2.7 Detektiertes Massenspektrum unter dem auslaufenden T4-Peak im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Für die Masse 1119,62113 konnten zu diesem Zeitpunkt keine Strukturvorschläge unterbreitet werden..... 138
- Abb. 6.2.8 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #48 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. 138
- Abb. 6.2.9 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #22 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. 139
- Abb. 6.2.10 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #19 + #40/#45 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. 140
- Abb. 6.2.11 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #15 + #30 + #37 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. 142

Abb. 6.2.12 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #17 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. Die Strukturen #15, #30, #37 sind in Abb. 6.2.11 gezeigt. ....	143
Abb. 6.2.13 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #20 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. ....	143
Abb. 6.2.14 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #13/#28 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. ....	144
Abb. 6.2.15 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #9 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. Auf Grund des zuvor injizierten Standardgemisches kann diese Substanz als Tetraiodothyroessigsäure identifiziert werden. ....	145
Abb. 6.2.16 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #27 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. ....	146
Abb. 6.2.17 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #10 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. Auf Grund des zuvor injizierten Standardgemisches kann diese Substanz als Tetraiodothyroameisen identifiziert werden. ....	147
Abb. 6.2.18 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #20 + #19 + #36 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. ....	148
Abb. 6.2.19 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #30/#32 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. ....	149
Abb. 6.2.20 Detektiertes Massenspektrum unter dem Peak #31/#33 im zuvor gezeigten Basispeakchromatogramm Abb. 6.2.1, Seite 136. Strukturvorschläge sind rechts dargestellt. ....	149
Abb. 6.3.1 UV-Chromatogramm mit den fraktionierten Peaks einer thermisch gestressten T4-Probe. YMC C18 Pro 150 x 4,6 mm i.D.; mobile Phase, 5 min isokratische Elution in 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer, 38 min Gradient von 30-70 % Acetonitril, 900 $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV @ 225 nm. ....	150
Abb. 6.3.2 Basispeakchromatogramm der Fraktion 1a. Es konnte kein Massenspektrum detektiert werden. YMC C18 Pro 150 x 1 mm i.D.; 3 min isokratische Elution in 10 % Acetonitril und 5,0 min in 30 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 37 min-Gradient von 30-70 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ ; negESI-TOF. ....	152
Abb. 6.3.3 Basispeakchromatogram mit extrahiertem Massenspektrum der Fraktion 1, die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten. YMC C18 Pro 150 x 1 mm i.D.; 3 min isokratische Elution in 10 % Acetonitril und 5,0 min in 30 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 37 min-Gradient von 30-70 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ ; negESI-TOF. ....	152

## Kapitel 4 - Methodenentwicklung durch Optimierung stationärer Phasen für synthetische Schilddrüsenhormon-Proben

Abb. 1.1 PRISMA-Modell (links) für die Eigenschaften (z.B. Selektivität) dreier verschiedener stationärer Phasen A, B und C (rechts) unter identischen Elutionsbedingungen. ....	160
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Vorgehensweise in der Optimierung der stationären Phase mit dem POPLC-System, basierend auf dem PRISMA-Modell am Beispiel von drei stationären Phasen A, B und C. ....	161
Abb. 2.1 Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung (weitere Informationen Tab. 2.1). ....	166
Abb. 2.2 Schematische Darstellung des POPLink Systems zum Zusammenfügen von Säulensegmenten. ....	168

- Abb. 3.1 Isokratische Trennung der Standardmischung aus zehn Substanzen auf den fünf stationären Phasen. Verwendete stationäre Phasen in der Säulendimension, 100 x 3,0 mm Cyanopropyl-Silica (CN), Phenyl-Silica (PH), Triacetyl-Silica (C30), Octadecyl-Silica (SH), Octadecyl-Silica mit eingebetteten polaren Gruppen (EPS); Isokratische Elution mit Wasser/Acetonitril (50/50, v/v) + 0,10 % Essigsäure; 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; Injektionsvolumen 50  $\mu\text{L}$ ; UV-Detektion @ 225 nm; Peakzuordnung im negativen ESI-Modus (nicht gezeigt). Peakidentifikation in Tab. 2.1, S. 170..... 173
- Abb. 3.2 Vergleich des simulierten (a) und gemessenen (b) UV-Chromatogramms der Standardmischung auf der optimierten Säulensegment-Kombination. Säule, 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN); isokratische Elution mit Wasser-Acetonitril (50/50, v/v) + 0,1 % Essigsäure, 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm. Peakidentifizierung in Tab. 2.1..... 175
- Abb. 3.3 Trennung einer thermisch gestressten Thyroxin-Probe unter isokratischen Bedingungen auf der optimierten Säule. 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN); isokratische Elution mit Wasser-Acetonitril (50/50, v/v) + 0,1 % Essigsäure, 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm und massenpektrometrische Detektion im negativen ESI-Modus mit TOF-MS. .... 177
- Abb. 3.4 UV-Chromatogramm der Referenzmessung einer thermisch gestressten Thyroxinprobe (a) und vergrößert (b). Der Elutionsbereich des Standardgemisches wurde grau hinterlegt..... 179
- Abb. 3.5 UV-Chromatogramm des Standardgemisches (a) und der thermisch gestressten Thyroxin-Probe (b) im Stufengradienten auf der phasenoptimierten Säule. Die Gradientstufen wurden eingezeichnet (Delayzeit des HPLC-Systems wurde dafür berücksichtigt). Säule 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN); Stufengradient mit 25 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure für 3 min, 45 % für 10 min, 50 % für 10 min, 70 % für 10 min; 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm. .... 180
- Abb. 4.1 UV-Chromatogramm (a) und Basispeak-Chromatogramm (b) einer thermisch gestressten Thyroxin-Probe mit Stufengradientelution. Phasenoptimierte Säule, 220 x 3,0 mm i.D. (90 mm C30 + 80 m SH + 50 mm CN); Acetonitril in Wasser versetzt mit 0,10 % Essigsäure, Stufengradient mit 25 % Acetonitril für 3 min, 45 % für 10 min, 50% für 10 min, 70% für 10 min; 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 225 nm und massenspektrometrische Detektion im negativen ESI-Modus..... 186
- Abb. 4.2 Vergleich der massenspektrometrischen Detektion von T3 (#3) und rT3 (#4) mit angepassten (d-f) und nicht angepassten Sprayparametern (a-c) in der Thyroxin-Probe. Sprayparameter (a-b) auf Eluent mit 50 % Acetonitril optimiert, (d-f) optimiert auf isokratische Stufe (Tab. 4.1), Chromatographische Bedingungen (Abb. 4.1), Wechsel der Sprayparameter der 25 %-igen auf die 45 %-ige Acetonitrilstufe..... 187
- Abb. 4.3 Vergleich der massenspektrometrischen Detektion von Verbindung #12 mit angepassten (d-f) und nicht angepassten Sprayparametern (a-c. Sprayparameter (a-b) auf Eluent mit 50 % Acetonitril optimiert, (d-f) optimiert auf isokratische Stufe (Tab. 4.1), Chromatographische Bedingungen (Abb. 4.1), Wechsel der Sprayparameter der 45 %-igen auf die 50 %-ige Acetonitrilstufe..... 188
- Abb. 4.4 Optimierung der stationären Phase mit dem Standardgemisch. (a) Referenzmessung, (b), (c) 220 x 3,0 mm i.D. optimierte POPLC-Säule (90 mm C30 + 80 mm SH + 50 mm CN), (a) 150 x 1,0 mm i.D. YMC-C18-Pro, 30-70 % Acetonitril-Gradient in 0,1 % Ameisensäure (b) isokratische Elution mit 50% Acetonitril in 0,1 % Essigsäure; (c) Stufengradient mit 3 min/25 %, 10 min/45 %, 10 min/50 %, 10 min/70 % Acetonitril in 0,1 % Essigsäure..... 191
- Abb. 5.1 Isokratische Trennung des Standardgemisch auf den sechs stationären Phasen. Verwendete stationäre Phasen der Säulendimension 100 x 3,0 mm; Cyanopropyl-Silica (CN), Phenyl-Silica (Phenyl), Triacetyl-Silica (C30), Octadecyl-Silica (SH), Octadecyl-Silica mit polar eingebetteten Gruppen (EPS); Säulendimension 100 x 2,0 mm Polyethylenimin-Silica (PEI), Isokratische Elution mit Wasser/Acetonitril (60/40, v/v) + 0,10 % Ameisensäure; 500  $\mu\text{L min}^{-1}$  bzw. PEI mit 225  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV-Detektion @ 225 nm; Peakzuordnung im negativen ESI-Modus (nicht gezeigt). Peakidentifikation in Tab. 2.1, S. 170..... 193

Abb. 5.2 Trennung des Standardgemisches auf einer optimierten stationären Phase, die einen Polyethyleniminanionenaustauscher enthält. 100 x 3,0 mm i.D. optimierte POPLC-Säule (30 mm C30 + 20 mm PEI + 50 mm Ph) und eine optimierte POPLC-Säule, bei der die PEI-Phase durch CN ausgetauscht wurde. Isokratische Elution mit 40% Acetonitril in 0,1 % Essigsäure. .194

## Tabellenverzeichnis

### Kapitel 2 - Entwicklung eines Anionenaustauschers auf Basis eines porösen Kieselgels

Tab. 2.1 Auflistung der Firmesitze verwendeter Chemikalien- und Gerätehersteller.....	52
Tab. 2.2 Verwendeter Salzgradient zur Analyse der Benzoessäurederivate. ....	56
Tab. 3.1 Ergebnisse der CHN-Analyse und daraus berechnete Bedeckungsgrade für Stickstoff (N), Kohlenstoff (C), Polyethylenimin (PEI) und dem Quervernetzer EDGE der verschiedenen Synthesestrategien. ....	58
Tab. 3.2 Gegenüberstellung von chromatographisch zugänglicher und theoretischer Kapazität.....	60
Tab. 3.3 Ergebnisse der CHN-Analyse vor und nach dem Stabilitätstest der Säulen aus Abb. 3.1. Daraus wurden Bedeckungsgrade für Stickstoff (N) und Kohlenstoff (C) berechnet.....	63
Tab. 4.1 Unterschiedliche Porengrößen und Synthesestrategien. Gegenüberstellung der Ergebnisse der CHN-Analyse und daraus berechnete Bedeckungsgrade für Stickstoff (N), Kohlenstoff (C), Polyethylenimin (PEI) und dem Quervernetzer EDGE. ....	66
Tab. 4.2 Unterschiedliche Porengrößen und Synthesestrategien. Gegenüberstellung chromatographisch zugänglicher und theoretischer Kapazität.....	68
Tab. 4.3 CHN-Analyse einer Polyethyleniminphase direkt nach der Synthese und nach dem Kontakt mit 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0. ....	76
Tab. 4.4 Gegenüberstellung der Retentionszeiten, Symmetriefaktoren, Peakbreiten und Bodenzahlen vor und nach der Oberflächenaktivierung mit 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0. Parameter der Trennung von Nitrit, Nitrat und Iodid aus Abb. 4.7b. ....	79
Tab. 5.1 CHN-Analyse vor und nach der Oberflächenaktivierung der zwei Masterbatches mit 5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0. Syntheseansatz mit 30 % PEI und 15 % EDGE (Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)).....	82
Tab. 5.2 Frontanalyse der Masterbatches. Gegenüberstellung der verschiedenen Waschschrte der zwei Syntheseansätze.....	83
Tab. 5.3 Gegenüberstellung der van Deemter-Parameter beider Masterbatches für kleine Anionen (Nitrit, Nitrat, Iodid) und höhermolekulare Anionen mit Kohlenstoffgrundgerüst (T4, Aminonaphthalensulfonsäure). H-u-Kurven siehe Abb. 5.4.....	89
Tab. 5.4 CHN-Analyse der ausgepackten Säule des Masterbatch 2 vor und nach dem Stabilitätstest mit 50 mM TRIS/HCl pH 7,0 .....	93
Tab. 5.5 CHN-Analyse der ausgepackten Säule beider Masterbatches vor und nach dem Stabilitätstest mit Essigsäure.....	95
Tab. 6.1 Retentionszeiten und Auflösungen der Benzoessäurederivate auf beiden Masterbatches. Chromatogramme siehe Abb. 6.5. ....	102

### Kapitel 3 - Strukturaufklärung von Abbauprodukten synthetischer Schilddrüsenhormone mittels Umkehrphasen-chromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie

Tab. 2.1 Übersicht der Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung und deren monoisotopischen [M-H] <sup>-</sup> -Spezies. Strukturen sind in Abb. 2.1 dargestellt. ....	112
Tab. 2.2. Übersicht aller Proben, die in dieser Arbeit verwendet wurden, deren nähere Erläuterungen und Abkürzungen. ....	113
Tab. 2.3 Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien und Instrumente. ....	113



Tab. 2.4 Gradientenprogramm der HPLC-Messungen .....	115
Tab. 3.1. Gegenüberstellung der Retentionszeiten und relativen Retentionszeiten des Standardgemisches bezogen auf T4 mit der Phosphatpuffermethode in Saarbrücken (SB) und von Peptido. Bedingungen für Saarbrücken: YMC C18 Pro 150 x 4.6 i.D.; isokratische Elution mit 30 % Acetonitril in 4,5 mM Phosphatpuffer pH 2.0 - 2.5, Gradient von 30-70 % Acetonitril in 38 min, 900 $\mu\text{L min}^{-1}$ ; UV @ 225 nm. (Strukturen siehe Abb. 2.1) .....	118
Tab. 5.1. Absolute und relative Retentionszeiten (bezogen auf T4) des Standardgemisches mit der Phosphatpuffer- und Ameisensäuremethode (Bedingungen siehe Abb. 5.1). .....	123
Tab. 6.1 Gradientenprogramm der HPLC-MS-Messungen der Fraktionen. ....	151
Tab. 6.2 Übersicht der detektierten Massen innerhalb der einzelnen Fraktionen ausgewählter Peaks einer gestressten Thyroxin-Probe (Korrelation zwischen Peaks und Fraktionsnummer Abb. 6.3.1, S.154). Fraktionierung erfolgte innerhalb der Phosphatpuffermethode. HPLC/MS-Detektion unter Verwendung der Ameisensäuremethode. ....	153
Tab. 2.1 Übersicht der Referenzsubstanzen für die Methodenentwicklung und deren monoisotopische [M-H] <sup>-</sup> -Spezies. Strukturen sind in Abb. 2.1 dargestellt. ....	166

## **Kapitel 4 - Methodenentwicklung durch Optimierung stationärer Phasen für synthetische Schilddrüsenhormon-Proben**

Tab. 2.2 Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien und Instrumente. ....	167
Tab. 2.3 Übersicht der angepassten Sprayparameter für jede isokratische Stufe des Stufengradienten für die Trennung einer thermisch gestressten T4-Probe auf der optimierten stationären Phase. ....	170
Tab. 3.1 Vergleich der vorhergesagten und gemessenen Retentionszeiten der optimierten Säule. Chromatogramme Abb. 3.2. ....	176
Tab. 3.2 Gegenüberstellung der Auflösungen der Standardsubstanzen auf der phasenoptimierten Säule unter isokratischen und Stufengradient-Bedingungen und der Referenzmethode auf der Standardsäule mit Gradientelution. ....	181
Tab. 3.3 Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Standardsubstanzen mit UV-Detektion bei 225 nm auf der phasenoptimierten Säule unter isokratischen Elutionsbedingungen und im Stufengradient. ....	182
Tab. 4.1 Einfluss der Sprayparameter-Anpassung auf die Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse einiger ausgewählter Verbindungen einer gestressten Thyroxin-Probe in der massenspektrometrischen Detektion. ....	189
Tab. 5.1 Gegenüberstellung der Auflösungen der Standardsubstanzen auf der phasenoptimierten Säule unter isokratischen und Stufengradient-Bedingungen und der Referenzmethode auf der Standardsäule mit Gradientelution. ....	195

# Anhang

---

---

---

## Kapitel 2 – Entwicklung eines Anionenaustauschers auf Basis eines porösen Kieselgels

**Abb. 3.1, S. 61, b und d**

Ion	Säulen- volumen Eluent [mL]	Retentions- zeit [min]	Bodenzahl *10 <sup>3</sup>	Peakbreite bei 50% Peakhöhe [min]	k-Wert
Nitrit	<b>Zeitpunkt 0</b>	4,40	4,46	0,15	2,78
Nitrat		5,38	4,86	0,18	3,61
Iodid		8,54	5,35	0,27	6,33
Nitrit	<b>135</b>	3,78	3,96	0,14	2,25
Nitrat		4,44	4,45	0,16	2,81
Iodid		6,52	5,22	0,21	4,59
Nitrit	<b>351</b>	3,80	3,99	0,14	2,26
Nitrat		4,47	4,52	0,16	2,84
Iodid		6,62	5,29	0,21	4,68
Nitrit	<b>567</b>	3,81	4,08	0,14	2,27
Nitrat		4,50	4,61	0,16	2,86
Iodid		6,69	5,36	0,21	4,74
Nitrit	<b>782</b>	3,81	4,17	0,14	2,27
Nitrat		4,49	4,71	0,15	2,86
Iodid		6,65	5,47	0,21	4,71
Nitrit	<b>998</b>	3,82	4,25	0,14	2,28
Nitrat		4,50	4,73	0,15	2,86
Iodid		6,67	5,46	0,21	4,72
Nitrit	<b>1214</b>	3,85	4,24	0,14	2,30
Nitrat		4,55	4,74	0,16	2,90
Iodid		6,79	5,45	0,22	4,83
Nitrit	<b>1430</b>	3,86	4,25	0,14	2,32
Nitrat		4,57	4,77	0,16	2,92
Iodid		6,84	5,46	0,22	4,87
Nitrit	<b>1492</b>	3,88	4,27	0,14	2,33
Nitrat		4,60	4,74	0,16	2,95
Iodid		6,91	5,46	0,22	4,93
Nitrit	<b>1708</b>	3,84	4,44	0,14	2,30
Nitrat		4,52	4,88	0,15	2,88
Iodid		6,66	5,59	0,21	4,72
Nitrit	<b>1924</b>	3,80	4,36	0,14	2,26
Nitrat		4,56	4,83	0,15	2,92
Iodid		6,79	5,52	0,21	4,82
Nitrit	<b>2140</b>	3,89	4,29	0,14	2,34
Nitrat		4,60	4,65	0,16	2,95
Iodid		6,88	5,43	0,22	4,91

Ion	Säulen- volumen Eluent [mL]	Retentions- zeit [min]	Bodenzahl *10 <sup>3</sup>	Peakbreite bei 50% Peakhöhe [min]	k-Wert
Nitrit	2364	4,57	4,76	0,16	2,92
Nitrat		5,66	5,20	0,18	3,85
Iodid		9,22	5,75	0,29	6,92
Nitrit	2580	3,90	4,38	0,14	2,34
Nitrat		4,58	4,85	0,16	2,93
Iodid		6,73	5,58	0,21	4,78
Nitrit	2796	3,93	4,28	0,14	2,37
Nitrat		4,64	4,73	0,16	2,98
Iodid		6,88	5,41	0,22	4,91
Nitrit	3012	3,96	4,13	0,14	2,40
Nitrat		4,69	4,59	0,16	3,02
Iodid		7,01	5,27	0,23	5,02
Nitrit	3228	3,96	4,07	0,15	2,40
Nitrat		4,72	4,53	0,16	3,05
Iodid		7,08	5,22	0,23	5,07
Nitrit	3444	3,97	4,06	0,15	2,41
Nitrat		4,69	4,50	0,16	3,03
Iodid		6,97	5,17	0,23	4,99
Nitrit	3660	3,97	4,07	0,15	2,41
Nitrat		4,69	4,47	0,17	3,03
Iodid		6,95	4,94	0,23	4,97
Nitrit	3876	4,01	3,96	0,15	2,45
Nitrat		4,76	4,32	0,17	3,08
Iodid		7,11	4,80	0,24	5,11
Nitrit	4092	4,03	3,84	0,15	2,46
Nitrat		4,79	4,15	0,17	3,11
Iodid		7,19	4,55	0,25	5,17
Nitrit	4317	4,69	4,14	0,17	3,03
Nitrat		5,80	4,22	0,21	3,97
Iodid		9,36	4,34	0,33	7,03
Nitrit	4533	4,05	3,21	0,17	2,48
Nitrat		4,79	3,37	0,19	3,11
Iodid		7,10	3,43	0,28	5,09
Nitrit	4749	4,09	2,18	0,21	2,51
Nitrat		4,84	2,23	0,24	3,16
Iodid		7,23	1,55	0,37	5,21
Nitrit	4965	4,06	1,36	0,27	2,49
Nitrat		4,81	1,41	0,30	3,13
Iodid		7,20	1,44	0,44	5,18
Nitrit	5181	4,04	1,39	0,25	2,47
Nitrat		4,78	1,49	0,29	3,10
Iodid		7,12	1,47	0,41	5,11

Ion	Säulen- volumen Eluent [mL]	Retentions- zeit [min]	Bodenzahl *10 <sup>3</sup>	Peakbreite bei 50% Peakhöhe [min]	k-Wert
Nitrit	5397	3,97	1,43	0,25	2,41
Nitrat		4,67	1,45	0,29	3,01
Iodid		6,72	1,79	0,38	4,77
Nitrit	5613	3,90	0,77	0,33	2,35
Nitrat		4,60	0,75	0,40	2,95
Iodid		6,83	0,94	0,49	4,86
Nitrit	5829	3,89	1,27	0,26	2,34
Nitrat		4,60	1,30	0,30	2,95
Iodid		6,89	2,07	0,36	4,91
Nitrit	6045	3,85	1,44	0,27	2,31
Nitrat		4,58	1,32	0,30	2,93
Iodid		6,93	2,29	0,34	4,95

Abb. 3.1, S. 61, a und c

Ion	Säulen- volumen Eluent [mL]	Retentions- zeit [min]	Bodenzahl *10 <sup>3</sup>	Peakbreite bei 50% Peakhöhe [min]	k-Wert
Nitrit	Zeitpunkt 0	4,40	4,29	0,14	2,88
Nitrat		5,42	5,88	0,17	3,77
Iodid		8,72	7,07	0,24	6,68
Nitrit	138	3,79	4,40	0,13	2,34
Nitrat		4,47	5,07	0,15	2,93
Iodid		6,63	6,36	0,20	4,83
Nitrit	340	3,80	4,32	0,14	2,34
Nitrat		4,50	4,98	0,15	2,96
Iodid		6,75	6,23	0,20	4,94
Nitrit	557	3,82	4,26	0,14	2,36
Nitrat		4,53	4,22	0,15	2,98
Iodid		6,82	6,18	0,20	5,00
Nitrit	774	3,80	4,34	0,14	2,34
Nitrat		4,49	4,24	0,15	2,95
Iodid		6,69	6,21	0,20	4,89
Nitrit	992	3,82	4,20	0,14	2,36
Nitrat		4,52	4,85	0,15	2,98
Iodid		6,78	6,10	0,20	4,97
Nitrit	1208	3,85	4,15	0,14	2,39
Nitrat		4,56	4,80	0,15	3,01
Iodid		6,86	6,09	0,21	5,04
Nitrit	1425	3,86	4,08	0,14	2,40
Nitrat		4,59	4,71	0,16	3,04
Iodid		6,92	6,04	0,21	5,09

Ion	Säulen- volumen Eluent [mL]	Retentions- zeit [min]	Bodenzahl *10 <sup>3</sup>	Peakbreite bei 50% Peakhöhe [min]	k-Wert
Nitrit	1642	3,86	4,13	0,14	2,40
Nitrat		4,57	4,79	0,16	3,03
Iodid		6,81	6,12	0,21	5,00
Nitrit	1859	3,87	4,16	0,14	2,41
Nitrat		4,58	4,81	0,16	3,03
Iodid		6,88	6,14	0,21	5,05
Nitrit	2075	3,89	4,16	0,14	2,42
Nitrat		4,61	4,82	0,16	3,06
Iodid		6,93	6,18	0,21	5,10
Nitrit	2292	3,91	4,23	0,14	2,44
Nitrat		4,64	4,91	0,16	3,08
Iodid		6,99	6,29	0,21	5,16
Nitrit	2517	4,55	5,21	0,15	3,01
Nitrat		5,62	5,92	0,17	3,95
Iodid		9,17	6,12	0,25	7,07
Nitrit	2733	3,92	4,64	0,14	2,45
Nitrat		4,62	5,32	0,15	3,07
Iodid		6,88	6,63	0,20	5,06
Nitrit	2949	3,96	4,64	0,14	2,49
Nitrat		4,69	5,27	0,15	3,13
Iodid		7,07	6,55	0,20	5,22
Nitrit	3164	3,98	4,60	0,14	2,50
Nitrat		4,72	5,28	0,15	3,15
Iodid		7,11	6,60	0,21	5,26
Nitrit	3380	4,00	4,67	0,14	2,52
Nitrat		4,75	5,35	0,15	3,18
Iodid		7,17	6,66	0,21	5,31
Nitrit	3596	4,00	4,77	0,14	2,52
Nitrat		4,73	5,43	0,15	3,16
Iodid		7,08	6,74	0,20	5,24
Nitrit	3812	4,02	4,77	0,14	2,54
Nitrat		4,77	5,43	0,15	3,19
Iodid		7,17	6,67	0,21	5,31
Nitrit	4028	4,04	4,72	0,14	2,56
Nitrat		4,80	5,38	0,15	3,23
Iodid		7,25	6,60	0,21	5,38
Nitrit	4244	4,06	4,63	0,14	2,57
Nitrat		4,83	5,22	0,16	3,25
Iodid		7,30	6,41	0,21	5,43
Nitrit	4460	4,07	4,62	0,14	2,58
Nitrat		4,82	5,19	0,16	3,25
Iodid		7,26	6,31	0,22	5,39

Ion	Säulen- volumen Eluent [mL]	Retentions- zeit [min]	Bodenzahl *10 <sup>3</sup>	Peakbreite bei 50% Peakhöhe [min]	k-Wert
Nitrit	4677	4,08	4,52	0,14	2,59
Nitrat		4,84	5,05	0,16	3,26
Iodid		7,31	6,11	0,22	5,43
Nitrit	4893	4,74	5,01	0,16	3,17
Nitrat		5,87	5,50	0,19	4,17
Iodid		9,59	6,32	0,28	7,44
Nitrit	5109	4,12	4,16	0,15	2,63
Nitrat		4,91	4,62	0,17	3,32
Iodid		7,44	5,43	0,24	5,55
Nitrit	5326	4,13	3,92	0,15	2,63
Nitrat		4,91	4,31	0,18	3,32
Iodid		7,41	4,96	0,25	5,52
Nitrit	5542	4,13	3,53	0,16	2,64
Nitrat		4,91	3,31	0,19	3,32
Iodid		7,41	4,22	0,27	5,53
Nitrit	5758	4,18	2,31	0,21	2,68
Nitrat		4,97	2,09	0,24	3,38
Iodid		7,55	2,49	0,36	5,64
Nitrit	5974	4,18	1,29	0,28	2,68
Nitrat		4,99	1,29	0,33	3,40
Iodid		7,54	1,30	0,49	5,64
Nitrit	6191	4,20	0,95	0,32	2,70
Nitrat		4,99	0,94	0,38	3,39
Iodid		7,54	0,94	0,58	5,64
Nitrit	6407	4,15	0,78	0,41	2,65
Nitrat		4,93	0,81	0,41	3,34
Iodid		7,44	0,91	0,58	5,55
Nitrit	6623	4,13	0,75	0,36	2,63
Nitrat		4,90	0,77	0,42	3,31
Iodid		7,38	0,88	0,59	5,50

**Abb. 4.1, S. 69**

Porendurchmesser des Kieselgels	Vol% PEI in Methanol	Vol% EDGE in Methanol*	Normiert auf Ansatz mit 10 Vol% PEI und 5 Vol% EDGE auf Kieselgel mit 120 Å Porengröße	
			k-Wert von Iodid	Stickstoff-Bedeckungsgrad [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{Kieselgel}$ ]
100 Å	15 %	8 %	2,06	1,30
	30 %	8 %	1,97	1,52
	30 %	15 %	2,93	1,46
120 Å	30 %	15 %	2,09	1,22
	30 %	5 %	1,43	1,26
<b>120 Å (Normierungspunkt)</b>	<b>10 %</b>	<b>5 %</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>

\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)



**Abb. 4.2, S 71 und Abb. 4.3, S. 72**

\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

30% PEI, 15% EDGE*, 100 Å								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchflusszeit der Säule [min]	Lineargeschwindigkeit $u$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Bodenhöhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Bodenhöhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Bodenhöhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]
150	0,755	1,10	30,28	70,49	11,41	68,12	15,83	68,25
200	0,491	1,70	27,59	72,36	9,16	62,03	13,26	59,82
250	0,398	2,09	27,49	71,59	9,18	64,44	13,27	61,30
300	0,332	2,51	27,47	70,77	9,27	66,93	13,35	63,61
400	0,252	3,31	26,57	74,50	9,15	73,31	13,08	69,71
500	0,204	4,08	25,80	79,42	9,05	79,98	12,83	76,38
700	0,146	5,71	25,47	88,48	9,14	91,27	12,83	87,49
900	0,119	7,00	24,25	96,75	8,83	105,54	12,33	98,05
1000	0,107	7,79	24,27	101,61	8,92	109,49	12,39	103,79
1200	0,085	9,80	25,52	109,81	9,53	123,79	13,15	116,08
15% PEI, 8% EDGE*, 100 Å								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchflusszeit der Säule [min]	Lineargeschwindigkeit $u$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Bodenhöhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Bodenhöhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Bodenhöhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]
150	0,687	1,21	18,87	70,25	10,50	63,85	7,76	65,26
200	0,519	1,61	19,37	64,04	10,52	62,64	7,82	62,54
250	0,417	2,00	19,37	63,31	10,55	63,28	7,86	63,44
300	0,348	2,39	19,43	64,42	10,61	66,07	7,91	64,86
400	0,259	3,22	19,69	67,68	10,82	71,37	8,08	70,00
500	0,211	3,95	19,43	71,15	10,74	76,19	8,06	73,42
700	0,153	5,45	19,25	81,22	10,73	87,42	8,09	83,99
900	0,119	7,00	19,41	90,19	10,91	101,72	8,27	95,36
1000	0,110	7,58	18,98	94,53	10,70	105,88	8,14	99,12
1200	0,089	9,36	19,71	101,83	11,18	119,30	8,54	111,57

30% PEI, 8% EDGE*, 100 Å								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit $u$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]
50	1,976	0,42	18,45	42,92	-	-	-	-
100	1,041	0,80	18,41	39,66	9,00	39,31	11,50	39,34
150	0,680	1,23	18,69	40,54	9,29	40,08	11,86	40,16
200	0,512	1,63	18,69	42,32	9,34	42,69	11,89	42,48
250	0,412	2,02	18,66	44,49	9,34	45,72	11,88	45,14
300	0,344	2,42	18,67	46,72	9,38	48,27	11,90	47,68
400	0,261	3,19	18,54	51,23	9,35	53,80	11,85	52,46
500	0,212	3,93	18,31	55,53	9,32	58,28	11,76	57,42
700	0,150	5,56	18,60	63,61	9,57	68,84	12,04	66,00
900	0,118	7,06	18,49	70,41	9,64	76,87	12,07	73,98
1000	0,111	7,51	17,76	74,04	9,29	81,28	11,60	78,62
1200	0,090	9,26	18,36	81,88	9,71	90,79	12,09	87,15
30% PEI, 15% EDGE*, 120 Å								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit $u$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]
50	2,05	0,41	20,89	67,81	-	-	-	-
100	1,26	0,66	22,48	43,98	5,59	43,58	7,72	39,32
150	0,83	1,00	17,06	59,97	5,50	42,56	7,87	41,12
200	0,54	1,54	19,82	59,76	6,51	46,39	9,25	44,16
250	0,44	1,90	19,60	61,40	6,46	50,38	9,16	47,04
300	0,37	2,26	19,42	63,20	6,43	53,92	9,09	51,30
400	0,27	3,04	19,71	66,46	6,60	59,40	9,29	55,78
500	0,22	3,79	19,70	70,03	6,66	65,11	9,36	61,53
700	0,16	5,24	19,58	77,25	6,74	78,38		
900	0,12	6,72	19,65	84,15	6,89	92,70	9,52	82,47
1000	0,11	7,31	19,29	87,81	6,80	98,23	9,38	89,43
1200	0,09	9,26	20,51	96,03	7,37	113,30	10,12	100,17

30% PEI, 5% EDGE*, 120 Å								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit $u$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]
100	1,11	0,75	13,86	43,89	7,25	41,65	8,97	41,16
150	0,73	1,14	13,70	39,87	7,36	41,77	9,12	40,53
200	0,56	1,50	13,55	40,50	7,28	42,26	9,02	41,83
250	0,45	1,84	13,30	42,19	7,15	44,76	8,85	44,07
300	0,38	2,19	13,18	44,18	7,12	46,74	8,80	45,65
400	0,29	2,88	13,08	48,28	7,10	50,85	8,75	49,49
500	0,23	3,56	12,97	51,61	7,08	54,85	8,71	53,52
700	0,17	4,90	12,88	59,38	7,10	64,40	8,71	63,79
900	0,13	6,31	13,06	68,91	7,27	75,03	8,88	72,98
1000	0,12	6,83	12,77	72,95	7,16	82,85	8,72	77,77
1200	0,10	8,50	13,46	82,27	7,61	97,81	9,24	90,17
10% PEI, 5% EDGE*, 120 Å								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit $u$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe $H$ [ $\mu\text{m}$ ]
50	2,29	0,36	9,57	56,07	4,94	58,07	6,28	59,19
100	1,20	0,69	9,20	65,30	4,68	67,86	5,85	66,76
150	0,81	1,03	9,20	71,38	4,71	73,24	6,10	69,13
200	0,60	1,39	9,38	76,23	4,82	79,24	6,02	78,64
250	0,48	1,73	9,37	81,37	4,86	85,07	6,05	83,11
300	0,40	2,07	9,36	85,29	4,88	90,16	6,06	88,01
400	0,30	2,79	9,55	92,32	5,02	99,28	6,21	96,45
500	0,24	3,53	9,77	99,24	5,18	106,56	6,40	102,94
700	0,17	4,90	9,81	110,33	5,28	122,34	6,47	117,85
900	0,13	6,22	9,81	118,67	5,36	137,30	6,53	127,69
1000	0,12	6,83	9,76	127,09	5,36	143,38	6,51	140,34
1200	0,10	8,50	10,30	137,73	5,76	160,87	6,94	150,41

**Abb. 4.2, S 71, Abb. 4.3, S. 72 und Abb. 4.5, S. 75b**

Bestimmung der einzelnen Terme der van Deemter Gleichung durch mathematisches Fitten der Gleichung an den Verlauf der gemessenen H-u-Kurven mit dem Programm Origin.

Porengröße des Kieselgels	Synthese-Ansatz	Ion	k-Wert	A-Term*	B-Term*	C-Term*
100 Å	30% PEI 8% EDGE**	Nitrit	9,26	32,86	0,47	6,33
		Nitrat	11,79	33,14	0,66	5,89
		Iodid	18,52	32,02	3,32	5,45
	15%PEI 8% EDGE**	Nitrit	8,05	37,45	18,70	8,63
		Nitrat	10,73	38,17	20,68	7,67
		Iodid	19,35	36,78	28,22	6,90
	30% PEI 15% EDGE**	Nitrit	9,36	36,93	21,37	8,90
		Nitrat	13,23	33,66	25,12	8,44
		Iodid	26,47	52,25	13,58	5,90
120 Å	30% PEI 15% EDGE**	Nitrit	6,50	30,67	4,10	9,01
		Nitrat	9,08	33,52	0,39	7,34
		Iodid	19,71	49,56	4,89	5,04
	30% PEI 5% EDGE**	Nitrit	7,22	22,45	10,29	8,49
		Nitrat	8,89	25,52	7,63	7,45
		Iodid	13,26	24,42	10,13	6,77
	10% PEI 5% EDGE**	Nitrit	5,08	69,21	-5,72	10,99
		Nitrat	6,29	68,32	-5,34	10,06
		Iodid	9,59	71,16	-6,89	8,08

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

\* Vereinfachte van Deemter-Gleichung  $H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$

**Abb. 4.4, S. 74**

\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

120 Å 30%PEI 15% EDGE*								
Fluss [µL/min]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linear- geschwindigkeit [mm/s]	T4		TriAc		2-Amino-6- naphthalen- sulfonsäure	
			k-Wert	Boden- höhe H [µm]	k-Wert	Boden- höhe H [µm]	k-Wert	Boden- höhe H [µm]
100	1,26	0,66	8,06	152,14	16,37	68,53	13,74	47,94
150	0,83	1,00	8,23	200,89	16,68	91,08	13,94	56,69
200	0,54	1,54	9,63	247,58	19,38	110,11	16,15	65,69
250	0,44	1,90	9,40	284,19	18,90	126,79	15,78	75,39
300	0,37	2,26	9,39	330,08	18,86	144,14	15,80	82,17
400	0,27	3,04	9,45	408,44	19,19	177,45	16,03	97,81
500	0,22	3,79	9,70	486,52	19,31	208,57	16,07	111,61
700	0,16	5,24	9,45	624,22	19,13	261,27	16,02	137,10
900	0,12	6,72	9,56	783,58	19,35	315,58	16,17	160,66
1000	0,11	7,31	9,31	844,59	19,02	338,27	15,87	172,41
1200	0,09	9,26	9,88	956,75	20,16	388,59	16,92	194,82
100 Å 30%PEI 15% EDGE*								
Fluss [µL/min]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linear- geschwindigkeit [mm/s]	T4		TriAc		2-Amino-6- naphthalen- sulfonsäure	
			k-Wert	Boden- höhe H [µm]	k-Wert	Boden- höhe H [µm]	k-Wert	Boden- höhe H [µm]
100	1,11	0,75	11,37	263,48	21,48	116,23	18,46	72,64
150	0,73	1,14	11,61	363,37	21,87	149,91	18,73	84,36
200	0,56	1,50	11,47	444,33	21,65	176,04	18,55	95,79
250	0,45	1,84	11,23	523,01	21,32	200,48	18,23	106,41
300	0,38	2,19	11,08	590,60	21,22	223,18	18,12	116,67
400	0,29	2,88	11,02	748,06	21,20	270,72	18,00	136,45
500	0,23	3,56	10,90	876,18	20,91	313,29	17,85	153,21
700	0,17	4,90	10,58	1134,26	20,75	386,68		
900	0,13	6,31	10,55	1367,61	20,89	459,90	17,82	216,04
1000	0,12	6,83	10,20	1459,17	20,48	484,83	17,42	228,87
1200	0,10	8,50	10,64	1673,53	21,47	550,06	18,17	255,34

**Abb. 4.4, S. 74 und Abb. 4.5, S. 75a**

Syntheseansatz mit 30 Vol% PEI und 15 Vol% EDGE, Bestimmung der einzelnen Terme der van-Deemter-Gleichung durch mathematisches Fitten der Gleichung an den Verlauf der gemessenen H-u-Kurven mit dem Programm Origin.

Porengröße des Kieselgels	Analyt	k-Wert	A-Term*	B-Term*	C-Term*
100 Å	Thyroxin	10,97	305,91	-141,77	168,47
	Triiodothyroessigsäure	21,20	142,71	-53,26	50,37
	Aminonaphthalensulfonsäure	18,14	78,79	-19,09	21,75
120 Å	Thyroxin	9,53	140,61	-36,55	92,85
	Triiodothyroessigsäure	19,25	77,40	-22,89	35,13
	Aminonaphthalensulfonsäure	16,09	51,53	-10,58	16,22

\*\* Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel (Herstellerangabe)

\* Vereinfachte van Deemter-Gleichung  $H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$

**Abb. 4.6, S. 77**

Syntheseansatz mit 30 Vol% PEI und 15 Vol% EDGE (Ausgangslösung 50 %-ig in Lösungsmittel, Herstellerangabe)

Porengröße des Kieselgels	Konzentration <u>nach</u> dem Spülen mit Phosphatpuffer [ $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ]	Konzentration <u>vor</u> dem Spülen mit Phosphatpuffer [ $\mu\text{mol cm}^{-2}$ ]
100 Å, 10 $\mu\text{m}$	0,78	0,62
120 Å, 10 $\mu\text{m}$	0,98	0,66
120 Å, 5 $\mu\text{m}$	1,01	0,61

**Abb. 5.1, S. 84**

Phase		k- Wert Nitrit	k- Wert Nitrat	k- Wert Iodid	
Masterbatch 1	Säule direkt nach der Synthese	3,96	5,96	14,02	
	Säule nach Spülen mit Phosphat	4,38	6,33	13,44	
	nach Inkubieren des Syntheseansatzes für 7 Stunden in Phosphat	4,39	6,59	15,33	
Masterbatch 2	Syntheseansatz	4,74	7,06	15,91	
	Syntheseansatz mit Phosphat über Nutsche gewaschen	4,64	6,96	16,06	
	nach Inkubieren des Syntheseansatzes für 7 Stunden in Phosphat		4,96	7,05	14,73
			4,67	6,92	15,74

**Abb. 5.2, S. 86**

NaCl-Konzentration des Eluenten [mM]	Inverse Ionenstärke des Eluenten [mM <sup>-1</sup> ]	Masterbatch 2		Masterbatch 1	
		k-Wert Nitrit	k-Wert Iodid	k-Wert Nitrit	k-Wert Iodid
10	0,100	4,01	12,45	3,58	11,52
50	0,020	3,70	11,58	3,27	10,58
100	0,010	2,00	6,24	1,75	5,77
150	0,007	1,62	5,04	1,46	4,69
200	0,005	1,39	4,32	1,30	4,14

**Abb. 5.3, S. 87**

ACN-Gehalt des Eluenten [%]	k-Wert Nitrit	k-Wert Iodid	k-Wert Thyroxin
60	8,55	10,13	3,64
50	6,90	10,40	5,08
40	5,83	10,98	9,04
35	6,13	12,34	10,55
30	5,11	11,66	22,34
20	4,55	12,46	Elution bei einem k-Wert >> 30
10	4,67	14,43	
5	4,40	15,23	
0	3,98	13,63	

Abb. 5.4, S. 89

kleine Anionen Masterbatch 1								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit [mm/s]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]
100	2,54	0,82			4,36	35,34	6,49	33,84
150	1,70	1,23	14,55	115,80	4,34	34,88	6,45	34,17
200	1,29	1,61	14,29	108,56	4,31	35,51	6,38	34,59
250	1,04	2,01	14,19	99,18	4,31	38,08	6,37	36,24
300	0,87	2,40	14,09	94,57	4,29	40,91	6,34	38,50
400	0,65	3,20	14,10	84,43	4,32	44,85	6,36	40,92
500	0,52	3,98	13,99	74,86	4,31	49,89	6,32	44,33
700	0,37	5,59	14,01	65,91	4,37	57,95	6,37	49,94
900	0,29	7,13	13,90	62,87	4,40	70,00	6,37	57,30
1000	0,27	7,80	13,67	60,11	4,36	76,75	6,29	60,57
kleine Anionen Masterbatch 2								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit [mm/s]	Iodid		Nitrit		Nitrat	
			k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]
100	2,51	0,83	14,07	54,99	4,57	34,17	6,61	33,75
150	1,69	1,23	13,95	61,74	4,53	34,07	6,56	33,37
200	1,27	1,64	13,92	59,17	4,53	34,64	6,55	33,47
250	1,02	2,04	13,90	54,92	4,54	35,84	6,59	34,10
300	0,85	2,45	13,95	50,37	4,56	36,66	6,57	34,19
400	0,64	3,26	13,94	49,75	4,58	39,49	6,59	35,74
500	0,52	4,05	13,87	47,94	4,57	43,10	6,55	37,95
700	0,37	5,68	13,92	45,95	4,64	50,34	6,61	42,87
900	0,29	7,16	13,67	47,64	4,60	61,49	6,53	50,42
1000	0,27	7,80	13,42	48,42	4,54	68,17	6,42	53,84
höher molekulare Verbindungen Masterbatch 1								
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit [mm/s]	T4		2-Amino-6- naphthalen- sulfonsäure			
			k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]		
100	2,67	0,78	6,22	70,37	11,99	38,38		
150	1,78	1,17	5,17	85,39	12,06	38,96		
200	1,34	1,55	5,14	98,77	11,95	42,12		
250	1,08	1,93	5,15	113,10	11,93	35,56		
300	0,90	2,32	5,20	128,58	11,91	48,89		
400	0,67	3,09	5,19	154,27	11,91	55,62		
500	0,54	3,85	5,21	177,35	11,86	62,58		
700	0,40	5,25	4,99	222,18	11,49	73,62		
900	0,30	6,85	5,04	259,01	11,71	84,63		
1000	0,28	7,51	4,92	281,85	11,56	93,67		



höher Molekulare Verbindungen Masterbatch 2						
Fluss [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Durchfluss- zeit der Säule [min]	Linearge- schwindigkeit [mm/s]	T4		2-Amino-6- naphthalen- sulfonsäure	
			k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]	k-Wert	Boden- höhe H [ $\mu\text{m}$ ]
100	2,65	0,78	5,27	64,54	12,21	38,73
150	1,78	1,17	5,03	78,89	12,17	37,98
200	1,34	1,55	5,02	92,49	12,11	41,05
250	1,08	1,94	5,05	111,14	12,11	49,32
300	0,90	2,33	5,09	151,33	12,13	60,01
400	0,68	3,08	5,03	165,88	12,01	72,42
500	0,54	3,86	5,04	192,81	12,04	80,92
700	0,39	5,38	5,03	229,64	11,99	91,55
900	0,31	6,81	4,98	258,59	11,78	95,25
1000	0,28	7,49	4,91	276,08	11,67	98,90

**Abb. 5.5, S. 92**

Säulen- volumen Eluent [mL]	Nitrit		Iodid		AminoNaphth-SO <sub>3</sub>	
	k-Wert	Bode- zahl	k-Wert	Boden- zahl	k-Wert	Boden- zahl
19	6,18	3404	9,51	3389	10,74	3176
172	6,10	3316	9,34	3359	10,45	3239
745	6,15	3457	9,42	3445		
936	6,20	3390	9,49	3390	10,67	3276
1089	6,22	3471	9,51	3523	10,71	3230
1700	6,20	3491	9,51	3610	10,78	3221
1872	6,28	3619	9,59	3619	10,80	3325
2044	6,31	3489	9,62	3543	10,84	3344
2655	6,33	3600	9,65	3669	10,90	3457
2941	6,36	3584	9,68	3719	10,92	3288
3801	6,42	3456	9,75	3623	11,01	3345
5386	6,60	3124	9,96	3110	11,20	3307
5730	6,65	2891	10,02	2894	11,29	3363
6303	6,66	2569	10,06	2565	11,34	3542
6665	6,75	2409	10,17	2368	11,48	3521

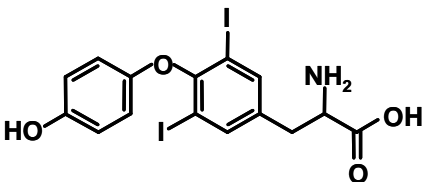
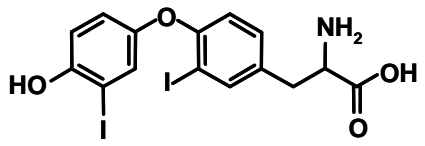
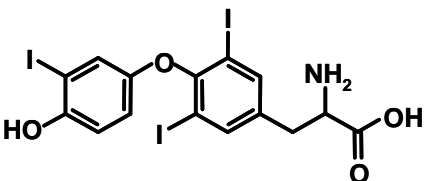
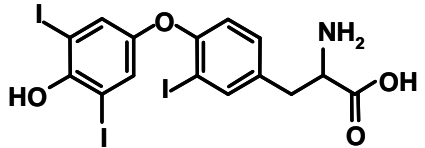
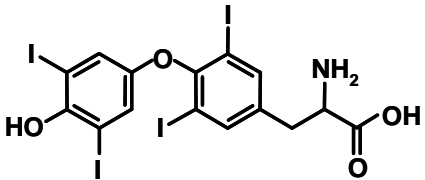
Abb. 5.6, S. 94

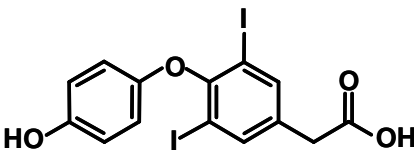
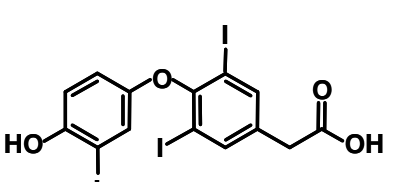
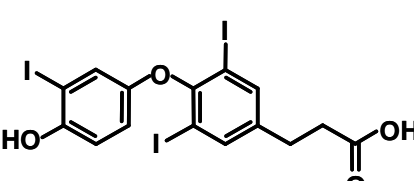
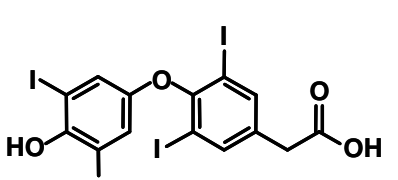
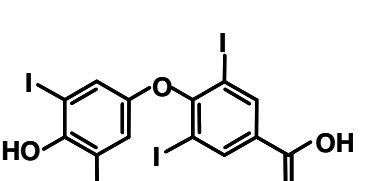
Masterbatch 2					Masterbatch 1				
Säulen- volumen Eluent [mL]	Thyroxin, T4		Diiodothyro- propionsäure, DiProp		Säulen- volumen Eluent [mL]	Thyroxin, T4		Diiodothyro- propionsäure, DiProp	
	k-Wert	Bode- zahl	k-Wert	Bode- zahl		k-Wert	Bode- zahl	k-Wert	Bode- zahl
191	0,65	908	8,44	1790	48	0,75	454	11,08	2552
382	0,73	776	10,31	1857	239	0,94	480	15,95	2887
1576	1,19	677	22,35	2312	525	1,00	432	17,15	2877
3390	1,37	529	25,85	2456	1146	1,05	408	19,13	2787
3868	1,47	370	26,05	2488	1623	1,20	508	21,94	3148
4488	1,41	435	25,81	2396	2292	1,18	456	21,69	3095
4966	1,39	493	26,03	2376	2769	1,22	661	22,87	3251
5778	1,39	593	26,06	2425	3390	1,17	534	21,50	3100
6780	1,38	313	25,47	2379	3915	1,25	696	22,87	3363
7258	1,46	446	26,26	2512	4584	1,19	551	21,84	3279
7926	1,40	480	25,49	2490	4966	1,22	625	22,54	3403
8404	1,42	430	26,12	2445	8404	1,16	461	21,35	3218
11364	1,42	294	25,31	2351	8929	1,17	518	21,14	3212
11603	1,45	311	26,10		9597	1,15	535	21,08	3265
11842	1,45	315	26,02	2540	10027	1,17	510	21,01	3316
12462	1,37	360	24,47	2415	10743	1,15	450	20,91	3156
12844	1,48	366	26,26	2543	11221	1,17	458	21,13	3303
13656	1,34	335	24,23	2358	11889	20,98	476	20,98	3257
14086	1,46	292	25,60	2655	12367	1,15	463	21,07	3289
14802	1,30	328	24,08	2547	13035	1,16	587	21,11	3247
15184	1,43	496	25,84	2754	13513	1,14	679	21,15	3324
15184	1,40	926	25,82	2600	14324	1,14	574	20,94	3188
15996	1,33	915	24,32	2554	15470	1,15	584	20,98	3284
16282	1,40	1026	25,63	2693	16569	1,15	359	20,81	3359
16378	1,38	963	25,49	2654	16998	1,17	427	20,98	3289
					17715	1,15	382	20,78	3463
					18144	1,15	382	20,80	3430
					18813	1,15	320	20,98	3457
					19099	1,17	429	21,20	3619

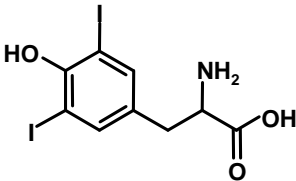
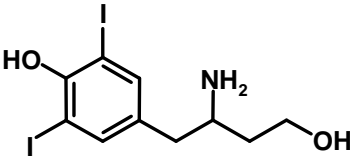
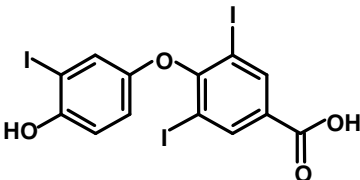
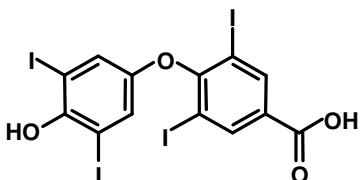
### Kapitel 3 – Strukturaufklärung von Abbauprodukten synthetischer Schilddrüsenhormone mittels Umkehrphasenchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie

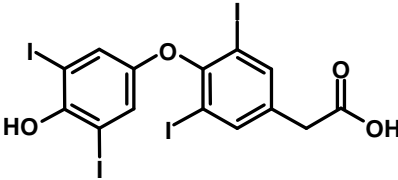
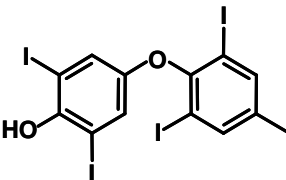
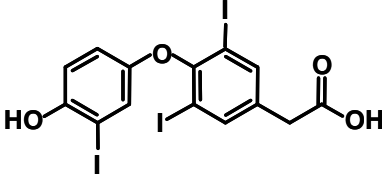
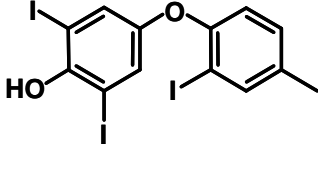
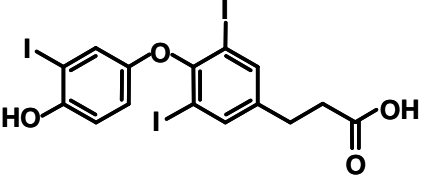
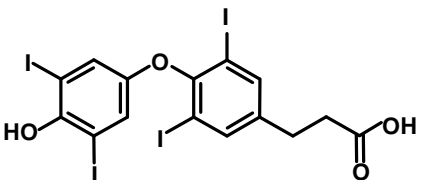
#### Strukturvorschläge und deren theoretisches m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies.

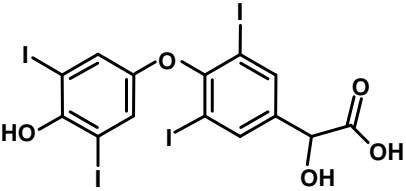
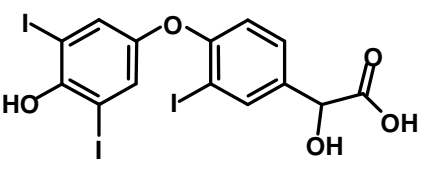
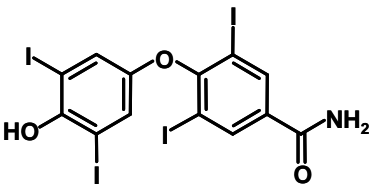
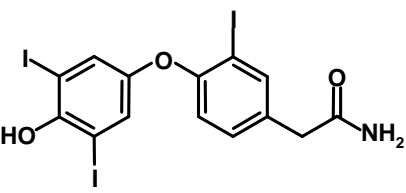
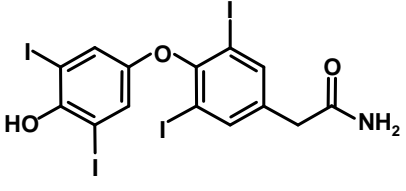
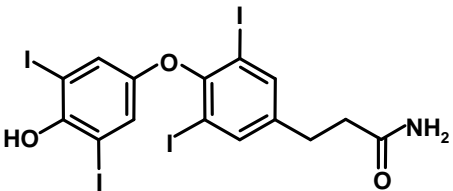
Die Verwendeten Bezeichnungen entsprechen aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht der IUPAC-Nomenklatur, die Bezeichnung „thyro“ entspricht dabei den zwei aromatischen Ringen. Mögliche Isomere sind in den Strukturvorschlägen nicht berücksichtigt. Auf Grund der Synthese sind die wahrscheinlichsten Strukturen hier abgebildet worden. „ID#“ Identifizierungsnummer, verwendet für die Peakzuordnungen in den Massenchromatogrammen.

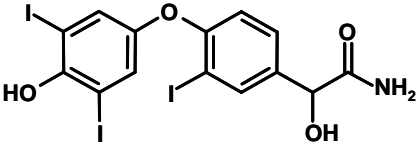
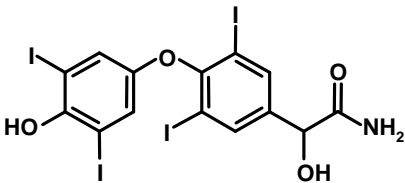
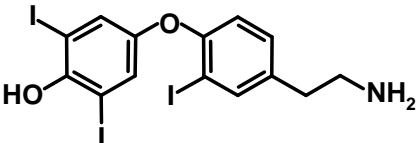
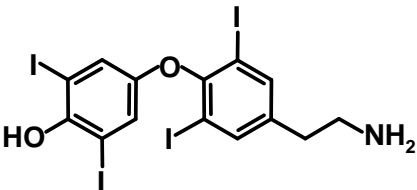
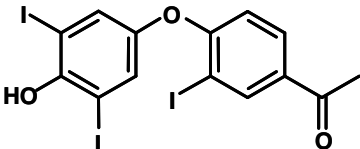
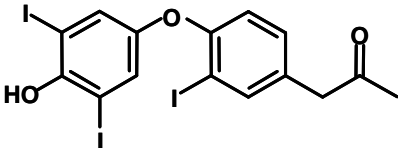
ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
<b>Substanzen des Standardgemisches</b>			
<b>Hormone</b>			
1	3,5-Diiodo-L-Thyronin, T2		523,88612
	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>		
2	3,3'-Diiodo-L-Thyronin, r-T2		523,88612
	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>		
3	3,5,3'-Triiodo-L-Thyronin, T3		649,78276
	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>		
4	3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin, r-T3		649,78276
	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>		
5	3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Thyronin, T4		775,67940
	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>		

ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der $[M-H]^-$ -Spezies
<b>Carbonsäuren</b>			
6	3,5-Diiodothyro- essigsäure, DiAc		494,85957
	$C_{14}H_{10}I_2O_4$		
7	3,5,3'-Triiodothyro- essigsäure, TriAc		620,75621
	$C_{14}H_9I_3O_4$		
8	3,5,3'-Triiodothyro- propionsäure, TriProp		634,77186
	$C_{15}H_{11}I_3O_4$		
9	3,5,3',5'- Tetraiodothyro- essigsäure, TetraAc		746,65285
	$C_{14}H_8I_4O_4$		
10	3,5,3',5'- Tetraiodothyro- ameisensäure, TetraFA		732,637204
	$C_{13}H_6I_4O_4$		

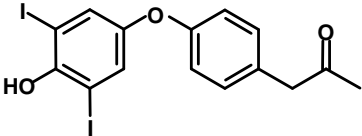
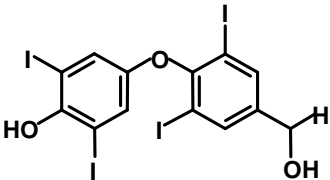
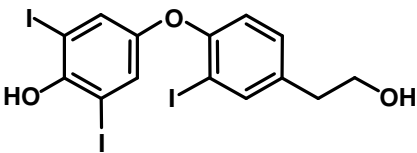
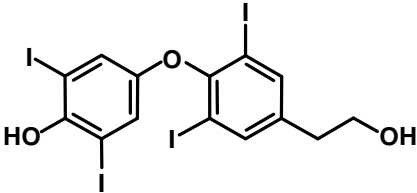
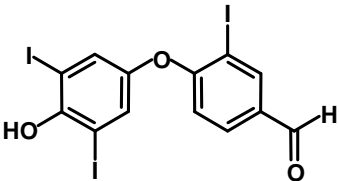
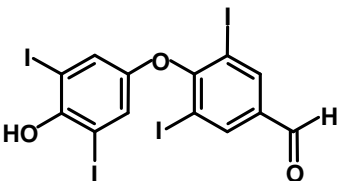
ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
<b>Strukturvorschläge von Neben- und Abbauprodukten der T4- und T3-Proben</b>			
<b>Tyrosinderivate</b>			
11	Diiodotyrosin		431,859903
	$C_9H_9I_2NO_2$		
12	Hydroxy-diiodophenylaminobutanol		431,896288
	$C_{10}H_{13}I_2O_2$		
<b>Ameisensäurederivate</b>			
13	Triiodothyroameisensäure		606,740561
	$C_{13}H_7I_3O_4$		
10	Tetraiodothyroameisensäure		732,637204
	$C_{13}H_6I_4O_4$		

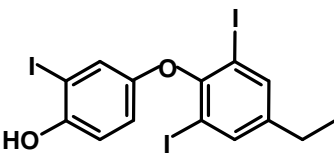
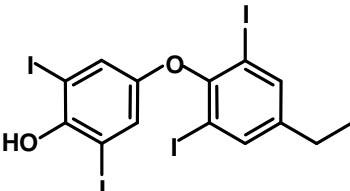
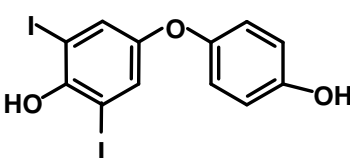
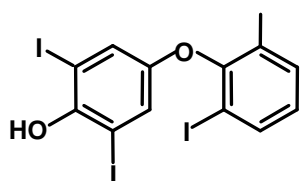
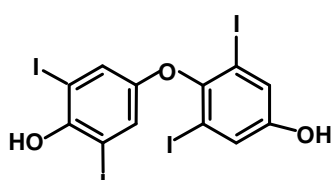
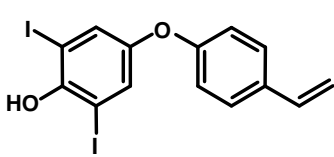
ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
<b>Essigsäurederivate</b>			
9	Tetraiodothyro-essigsäure		746,65285
	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>		
	Tetraiodothyromethan (Abspaltung von CO <sub>2</sub> )		702,663025
C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>			
7	Triiodothyro-essigsäure		620,75621
	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> I <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		
	Triiodothyromethan (Abspaltung von CO <sub>2</sub> )		576,766382
C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> I <sub>3</sub> O <sub>2</sub>			
<b>Propionsäurederivate</b>			
8	Triiodothyro-propionsäure		634,771861
	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		
14	Tetraiodothyro-propionsäure		760,668504
	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>		

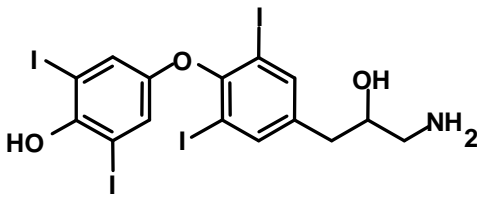
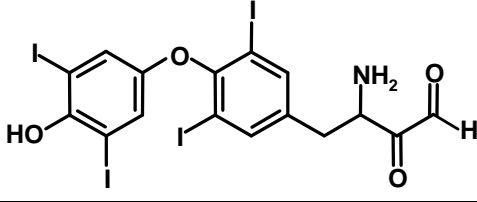
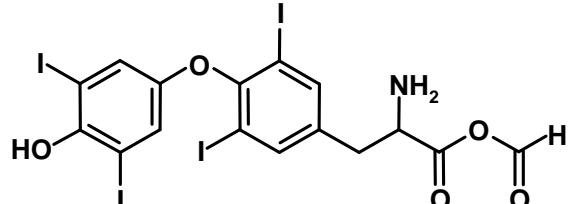
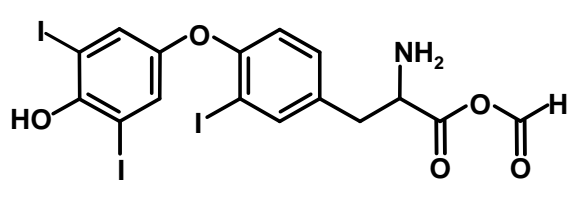
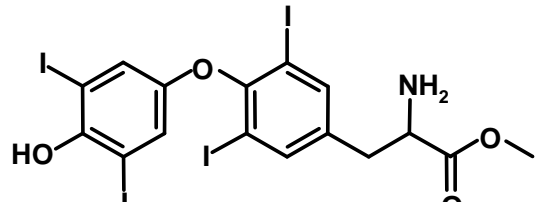
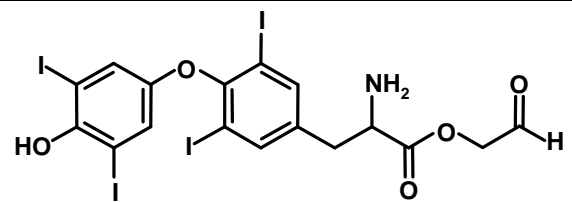
ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
<b>Milchsäurederivate</b>			
15	Tetraiodothyro- milchsäure		762,647769
	$C_{14}H_8I_4O_5$		
16	Triiodothyro- milchsäure		636,751126
	$C_{14}H_9I_3O_5$		
<b>Ameisensäureamide</b>			
17	Tetraiodothyro- ameisensäureamid		731,653189
	$C_{13}H_7I_4NO_3$		
<b>Essigsäureamide</b>			
18	Triiodothyro- essigsäureamid		619,772196
	$C_{14}H_{10}I_3NO_3$		
19	Tetraiodothyro- essigsäureamid		745,668839
	$C_{14}H_9I_4NO_3$		
<b>Propionsäureamide</b>			
20	Tetraiodothyro- propionsäureamid		759,684489
	$C_{15}H_{11}I_4NO_3$		

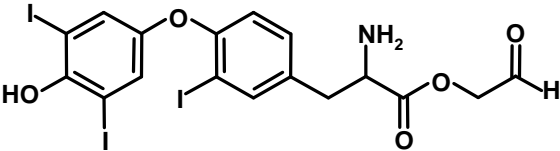
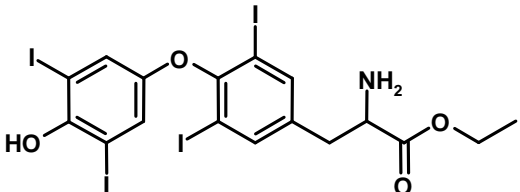
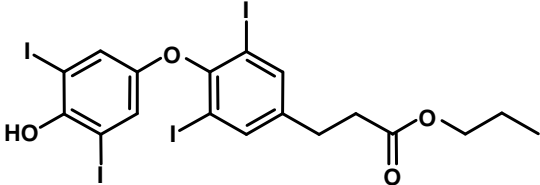
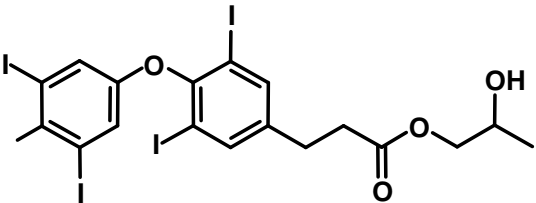
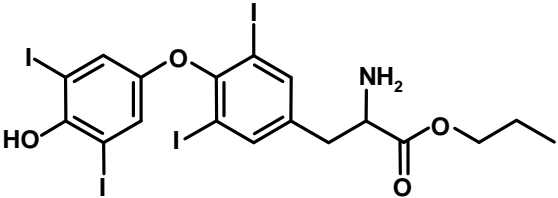
ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
<b>Milchsäureamide</b>			
21	Triiodothyro- milchsäureamid		635,76110
	$C_{14}H_{10}I_3NO_4$		
22	Tetraiodothyro- milchsäureamid		761,663753
	$C_{14}H_9I_4NO_4$		
<b>Aminderivate</b>			
23	Triiodothyroethylamin		605,792931
	$C_{14}H_{12}I_3NO_2$		
24	Tetraiodothyro- ethylamin		731,689574
	$C_{14}H_{11}I_4NO_2$		
<b>Ketonderivate</b>			
25	Triiodothyro- methylketon		604,761297
	$C_{14}H_9I_3O_3$		
26	(Triiodothyro- methylen)-methylketon		618,776947
	$C_{15}H_{11}I_3O_3$		



ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
49	(Diiodothyro-methylen)-methylketon		492,880304
	$C_{15}H_{12}I_2O_3$		
<b>Methylalkoholderivate</b>			
27	Tetraiodothyro-methanol		718,657940
	$C_{13}H_8I_4O_3$		
<b>Ethylalkoholderivate</b>			
28	Triiodothyroethanol		606,776947
	$C_{14}H_{11}I_3O_3$		
29	Tetraiodothyroethanol		732,673590
	$C_{14}H_{10}I_4O_3$		
<b>Aldehydderivate</b>			
30	Triiodothyroaldehyd		590,745647
	$C_{13}H_7I_3O_3$		
31	Tetraiodothyroaldehyd		716,642290
	$C_{13}H_6I_4O_3$		

ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
<b>Ethanderivate</b>			
32	Triiodothyroethan		590,782822
	$C_{14}H_{11}I_3O_2$		
33	Tetraiodothyroethan		716,678675
	$C_{14}H_{10}I_4O_2$		
<b>Hydroxydiphenylether</b>			
34	Hydroxyphenyl-diiiodohydroxyphenyl-ether		452,849004
	$C_{12}H_8I_2O_3$		
35	Hydroxydiiiodophenyl-diiiodophenylether		688,647375
	$C_{12}H_6I_4O_2$		
36	Di-(diiiodohydroxyphenyl)-ether		704,642290
	$C_{12}H_6I_4O_3$		
37	Hydroxydiiiodophenyl-hydroxystyrylether		462,869739
	$C_{14}H_{10}I_2O_2$		

ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
<b>Hydroxy-Propanamine</b>			
38	Tetraiodothyrohydroxypropanamin		761,700139
	$C_{15}H_{13}I_4NO_3$		
<b>Oxoaldehydprodukte</b>			
39	$C_{16}H_{11}I_4NO_4$		787,679403
<b>Anhydride</b>			
40	$C_{16}H_{11}I_4NO_5$		803,674318
41	$C_{16}H_{12}I_3NO_5$		677,777675
<b>Esterprodukte</b>			
42	$C_{16}H_{13}I_4NO_4$		789,695053
43	$C_{17}H_{13}I_4NO_5$		817,689968

ID #	verwendete Bezeichnung	Struktur	theoretische mono-isotopische Masse der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies
44	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>		691,793325
45	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>		803,710704
46	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>		802,715455
47	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> I <sub>4</sub> O <sub>5</sub>		818,710369
48	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>		817,726354

**Abb. 3.1, S. 118**

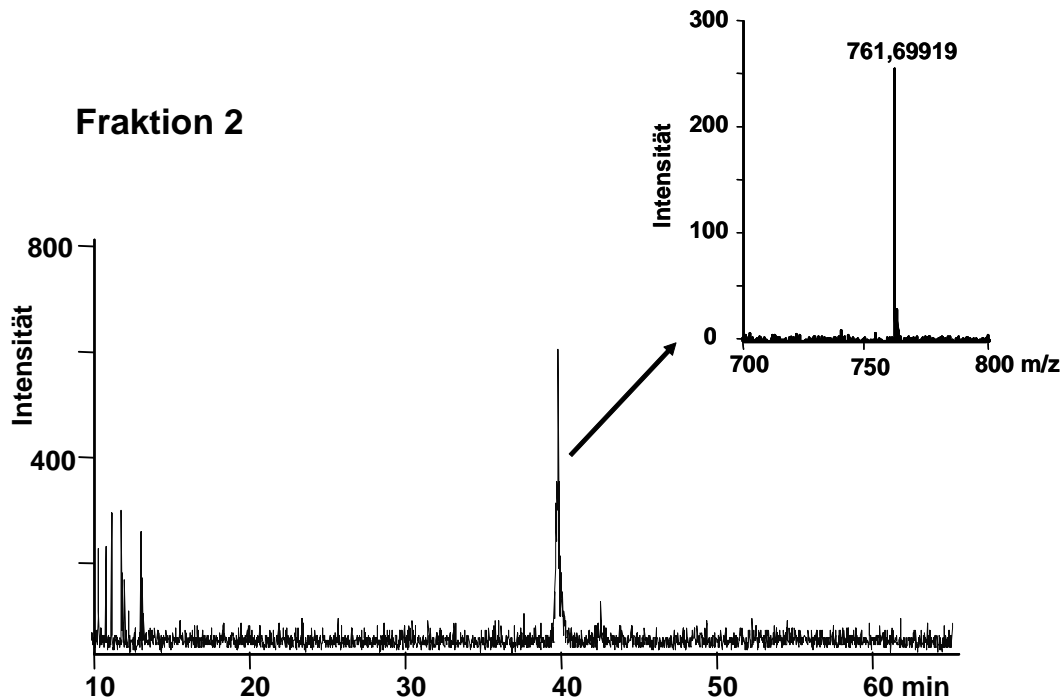
Peak #	Substanz	Peptido		Saarbrücken (SB)		relative Standardabweichung [%]
		Retentionszeit [min]	relative Retentionszeit bezogen auf T4	Retentionszeit [min]	relative Retentionszeit bezogen auf T4	
1	<b>T2</b> , 3,5-Diiodo-L-thyronin	3,26	0,26	3,95	0,29	8,63
2	<b>r-T2</b> , 3,3'-Diiodo-L-thyronin	4,99	0,39	5,89	0,43	6,95
3	<b>T3</b> , 3,5,3'-Triiodo-L-thyronin	8,31	0,65	9,37	0,68	3,71
4	<b>r-T3</b> , 3,3',5'-Triiodo-L-thyronin	9,81	0,77	10,79	0,79	1,93
5	<b>T4</b> , 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-thyronin	12,82	1,00	13,72	1,00	
6	<b>DiAc</b> , 3,5-Diiodothyroessigsäure	21,69	1,69	21,25	1,55	6,25
7	<b>TriAc</b> , 3,5,3'-Triiodothyroessigsäure	28,10	2,19	27,80	2,03	5,58
8	<b>TriProp</b> , 3,5,3'-Triiodothyropropionsäure	30,11	2,35	29,87	2,18	5,35
9	<b>TetraAc</b> , 3,5,3',5'-Tetraiodothyroessigsäure	33,40	2,61	33,35	2,43	4,92
10	<b>TetraFA</b> , 3,5,3',5'-Tetraiodothyroameisensäure	35,09	2,74	35,32	2,58	4,35

**Abb. 4.2, S. 121**

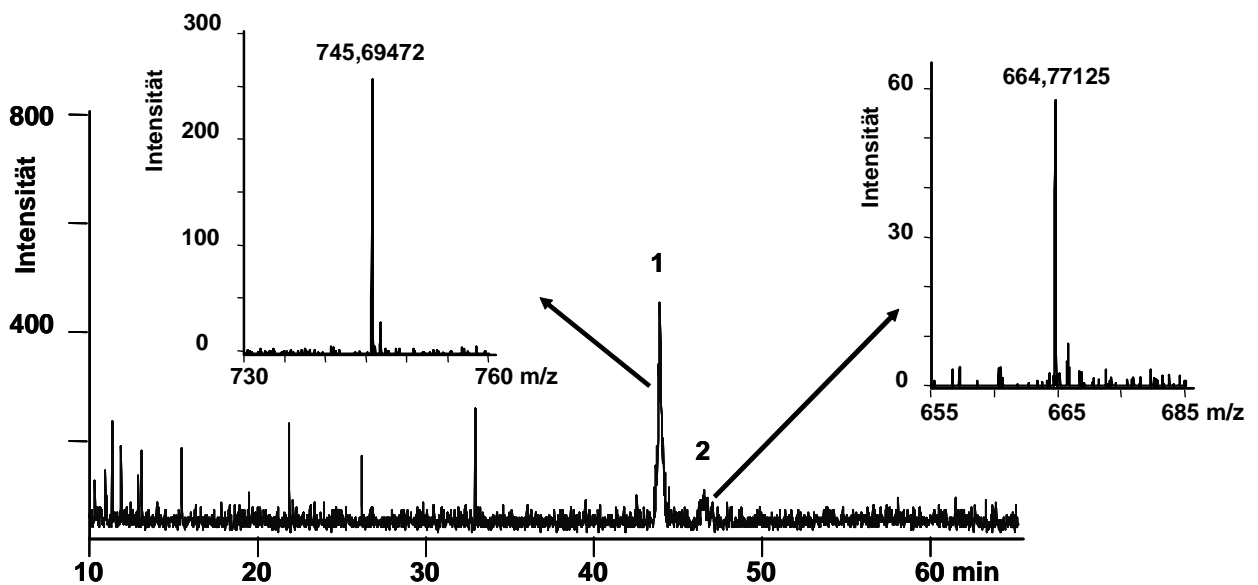
Mittelwerte des Signal zu Rauschen im Spektrum					
detektiertes m/z	posAPCI mit FA	negAPCI mit FA	posAPCI mit NH <sub>4</sub> Ac	negAPCI mit NH <sub>4</sub> Ac	negESI mit FA
<b>432,99</b>	448,0	295,8	601,6	440,8	429,7
<b>650,98</b>	1362,2	986,5	1682,5	2039,1	1602,1

**Basispeakchromatogramme und detektierte Massenspektren in den einzelnen Fraktionen des Abschnitts 6.3, S. 150**

Elutionsbedingungen: YMC C18 Pro 150 x 1 mm i.D.; 3 min isokratische Elution in 10 % Acetonitril und 5,0 min in 30 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 37 min-Gradient von 30-70 % Acetonitril versetzt mit 0,10% Ameisensäure, 50  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; negESI-TOF.

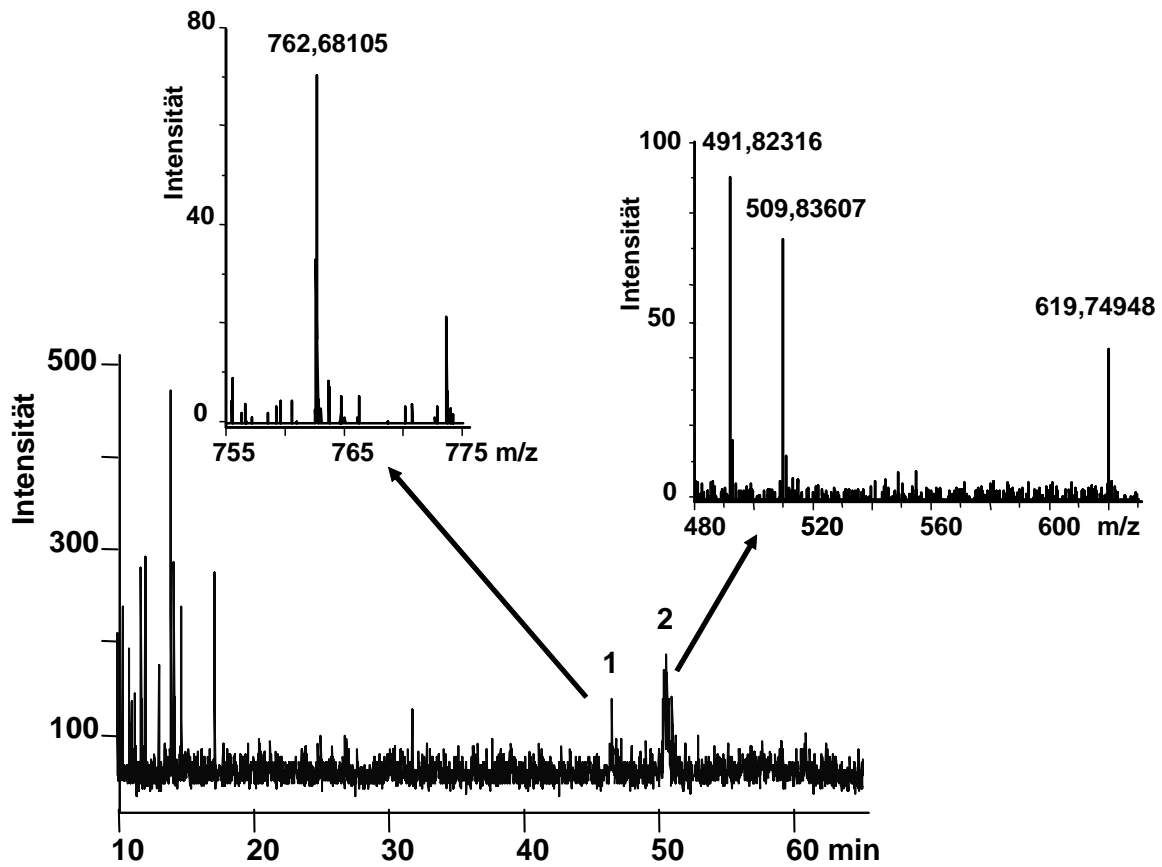


Basispeakchromatogramm mit extrahiertem Massenspektrum der Fraktion 2. Die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten.

**Fraktion 3**

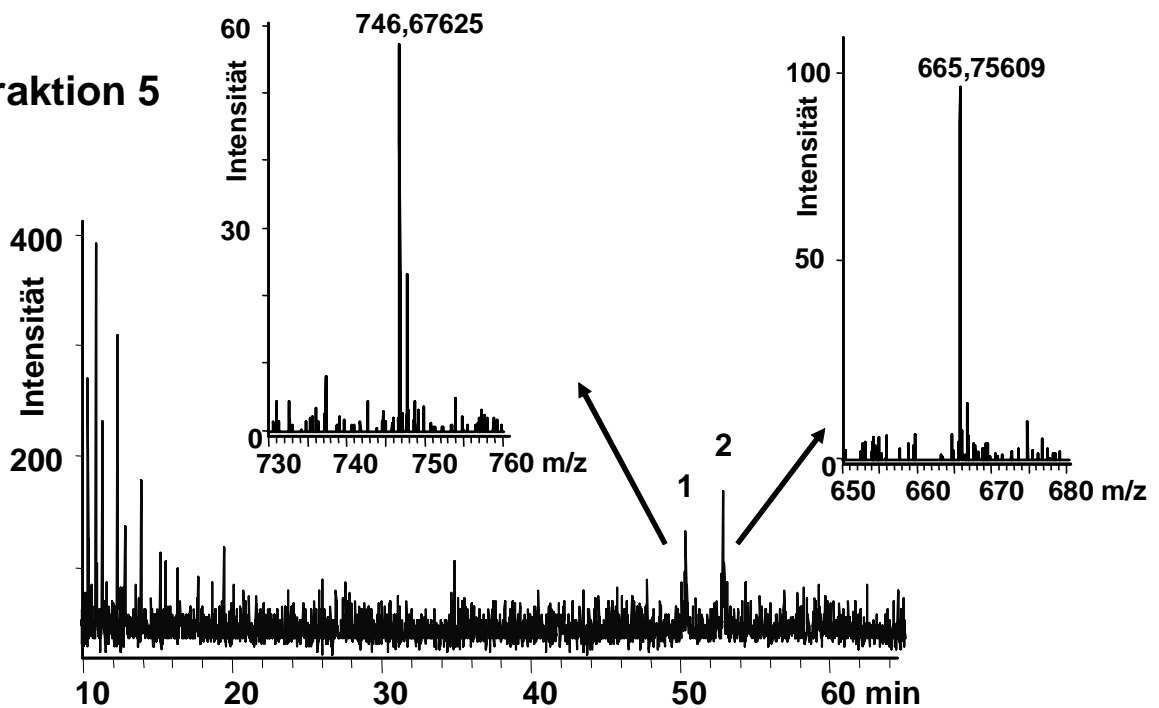
Basispeakchromatogramm mit extrahierten Massenspektren der Fraktion 3. Die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten.

**Fraktion 4**



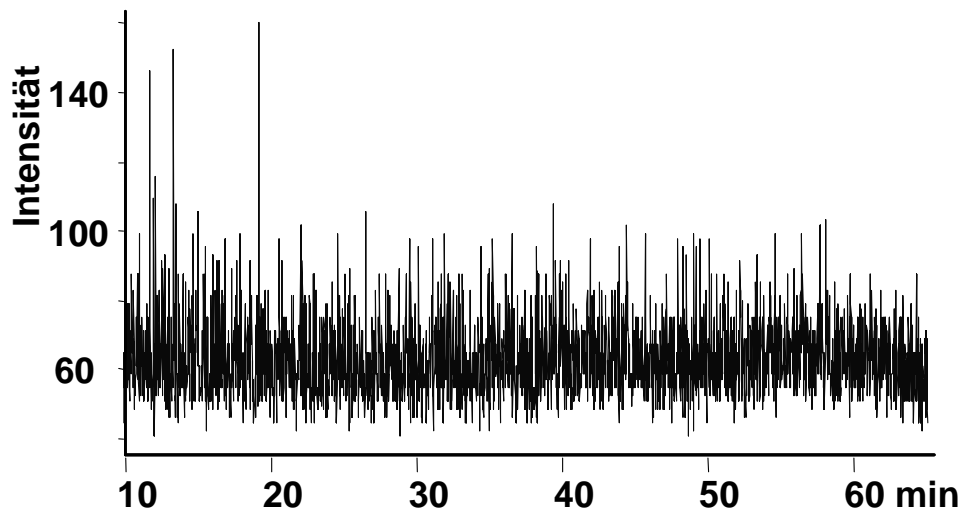
Basispeakchromatogramm mit extrahierten Massenspektren der Fraktion 4. Die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten.

**Fraktion 5**

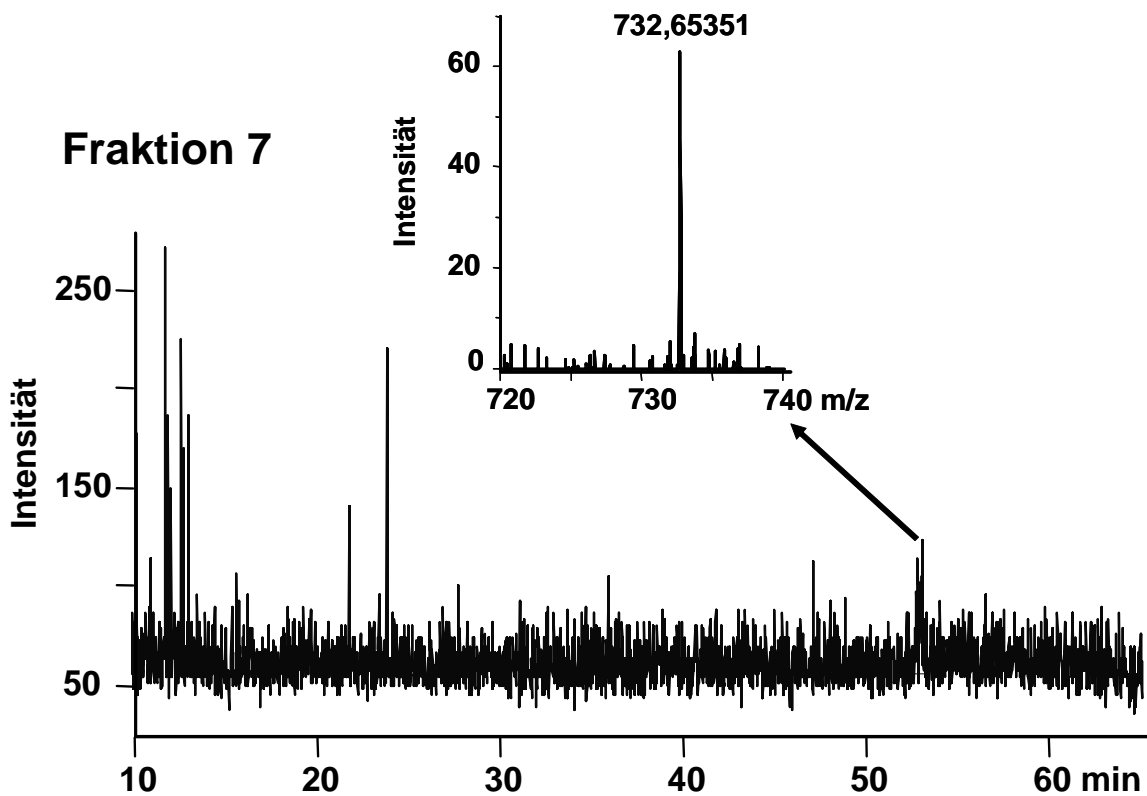


Basispeakchromatogramm mit extrahierten Massenspektren der Fraktion 5. Die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten.

## Fraktion 6

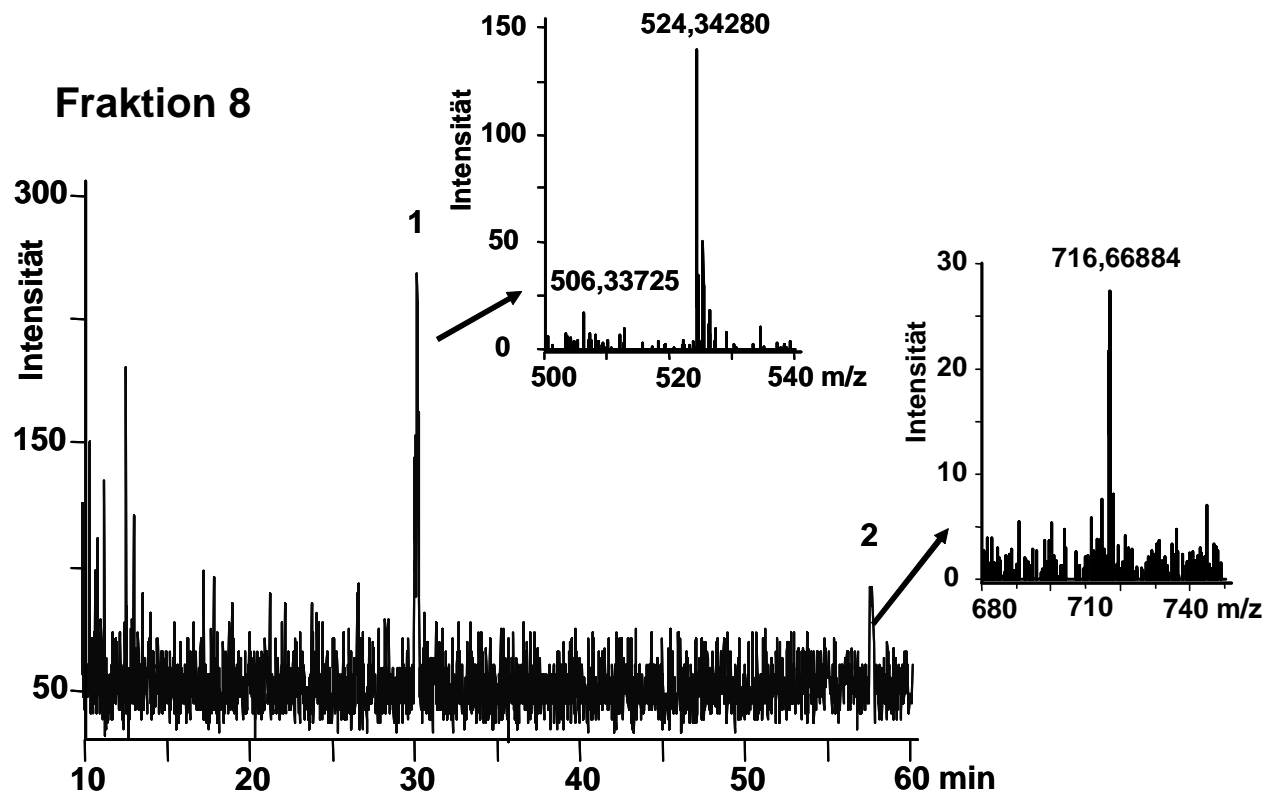


Basispeakchromatogramm der Fraktion 6. Es konnte kein Massenspektrum detektiert werden. Die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten.



Basispeakchromatogramm mit extrahiertem Massenspektrum der Fraktion 7. Die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten.





Basispeakchromatogramm mit extrahierten Massenspektren der Fraktion 8. Die Elution der Puffersalze aus dem Fraktionierungslauf wurde abgeschnitten.

**Auflistung der detektierten m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies der in dieser Arbeit diskutierten T4-Probe.**

Lagerung: 6 Monate bei 40 °C und danach für 1 h bei 60 °C. Abschnitt 6.2, S. 132.

ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel nach SmartFormula	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #	
2,94	431,89719	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	5,5	86,341	11	
		C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	4,5	2,088	12	
3,91	760,68332	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	19,478	14	
8,70	731,69071	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	8,5	1,553	24	
		802,73993	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	30,490	46
9,36	649,78275	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-0,015	3	
10,54	649,78265	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-0,169	4	
15,23	775,67919	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-0,275	5	
17,38	1119,62113			keine Zuordnung	??	
23,78	817,71286			-16,502	48	
27,25	761,66774	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	5,235	22	
31,11	745,66852	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	-0,428	19	
		803,68235	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>5</sub>	11	9,994	40
					-35,279	45
32,27	762,65131	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	9,5	4,643	15	
		590,74999	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	7,352	30
		462,86258			-15,467	37
32,44	731,65348	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	0,398	17	
35,21	759,68653	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	2,687	24	
36,29	606,74076	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9,5	0,328	13	
					-59,638	28
37,46	746,65264	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	-0,287	9	
		702,66308	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	0,078	9
38,37	718,65834	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	8,5	0,557	27	
39,37	732,63689	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	-0,429	10	
		688,64664	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	-1,067	35
40,65	759,68459	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		0,133	20	
		745,67364			6,439	19
		704,64339			1,561	36
43,82	590,75020	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	7,707	30	
					-55,218	32
46,77	716,64013	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,5	-3,014	31	
					-53,783	33

**Auflistung der detektierten m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies in einer T4-Probe die mehrere Monate bei 70 °C gelagert wurde.** (In dieser Arbeit nicht diskutiert).

ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel nach SmartFormula	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #
3,06	431,92326	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	4,5	62,450	<b>12</b>
		C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	5,5	146,707	<b>11</b>
3,94	760,68573	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	22,646	<b>14</b>
8,72	731,69272	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	8,5	4,300	<b>24</b>
	802,73987	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	30,416	<b>46</b>
9,32	649,78300	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,369	<b>3</b>
11,02	649,78032	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-3,755	<b>4</b>
15,09	775,67955	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,190	<b>5</b>
17,05	1119,67177			keine Zuordnung	
27,24	761,66711	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	4,407	<b>22</b>
	818,70143			-10,92	<b>47</b>
31,09	745,67104	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	2,952	<b>19</b>
	803,68694			-29,568	<b>45</b>
					15,705
32,30	462,87876			19,489	<b>37</b>
	590,75303			12,498	<b>30</b>
					-50,428
	762,65272	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	9,5	6,492	<b>15</b>
32,61	590,75299	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	12,430	<b>30</b>
					-50,496
	731,65295	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	-0,327	<b>17</b>
				-50,054	<b>24</b>
33,73	836,70691			keine Zuordnung	
35,10	759,68545	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	1,265	<b>20</b>
	688,64288	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	-6,527	<b>35</b>
36,29	606,74440	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9,5	6,327	<b>13</b>
					-53,639
37,46	702,66315	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	0,178	<b>9</b>
	746,65444	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	2,124	<b>9</b>
	768,64298	C <sub>16</sub> H <sub>5</sub> I <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	12,5	keine Zuordnung	
38,34	718,65705	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	8,5	-1,238	<b>27</b>
39,46	732,63579	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	-1,930	<b>10</b>
40,50	704,64254	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	8,5	0,355	<b>36</b>

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel nach SmartFormula	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #
43,87	590,75373			13,683	<b>30</b>
				-49,243	<b>32</b>
46,80	716,64028	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,5	-2,805	<b>31</b>
				-53,574	<b>33</b>

**Auflistung der detektierten m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies in einer ungestressten mikronisierten T4-Probe.**

(In dieser Arbeit nicht diskutiert). ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel nach SmartFormula	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #
3,89	760,67206	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	4,675	14
8,33	802,73933			29,743	46
9,14	649,78288	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,185	3
15,12	775,67886	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-0,700	4
17,02	1119,7009			keine Zuordnung	
27,18	761,66825	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	5,904	22
	818,70301	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> I <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	9,5	-8,989	47
30,57	1119,6998			keine Zuordnung	
31,04	745,66938	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	0,726	19
	803,68452			-32,579	45
				12,694	40
	817,70661	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-24,145	48
32,37				20,352	43
	462,89232			48,785	37
	590,75416			14,411	30
	731,65536	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	2,967	17
				-46,760	24
762,65298	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	9,5	6,833	15	
32,57	731,65153	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	-2,267	17
				-51,995	24
33,11	789,70270	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	9,683	42
37,36	702,66324	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	0,306	9
	746,65502	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	2,901	9
39,37	688,64487	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	-3,638	35
	732,63545	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	-2,394	10
					-52,056
40,65	759,68495	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	0,607	20
45,42	787,68721	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	10,5	9,911	39
46,77	589,74661			keine Zuordnung	
	716,63747	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,5	-6,726	31
				-57,494	33

**Auflistung der detektierten m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies in einer mikronisierten T4-Probe, die für 2 h bei 55 °C, gefolgt von 1 h bei 60 °C gelagert wurde.**

(In dieser Arbeit nicht diskutiert). ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel (SmartFormula)	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #
2,89	431,86199	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	5,5	4,833	<b>11</b>
				-79,413	<b>12</b>
3,87	445,07042			keine Zuordnung	
6,93	802,73767			27,675	<b>46</b>
7,89	649,78283	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,108	<b>3</b>
9,11	649,78296	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,308	<b>4</b>
14,00	775,68003	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,808	<b>5</b>
16,02	1119,54671			keine Zuordnung	
26,38	761,66701	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	4,276	<b>22</b>
29,98	1119,5433			keine Zuordnung	
30,55	745,67210	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	4,373	<b>19</b>
	803,67942			-38,924	<b>45</b>
		C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>5</sub>	10,5	6,348	<b>40</b>
	817,69811	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>5</sub>	10,5	-34,540	<b>48</b>
31,84	462,83170			9,957	<b>43</b>
	590,74342	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	-82,181	<b>37</b>
	762,65149	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	9,5	-3,770	<b>30</b>
32,05	590,74419	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	4,879	<b>15</b>
	731,65656	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	-2,466	<b>30</b>
					4,607
				-45,120	<b>24</b>
32,71	789,70119	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	7,771	<b>42</b>
34,73	799,14011			keine Zuordnung	
37,12	702,66215	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	-1,245	<b>9</b>
	746,65332	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	0,624	<b>9</b>
39,15	688,64613	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	8,5	-1,808	<b>35</b>
	732,63660	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	9,5	-0,824	<b>10</b>
					-50,486
40,34	759,68741	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	3,845	<b>20</b>
43,77	590,73917	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	-10,964	<b>30</b>
				-73,888	<b>32</b>
46,77	716,63985	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,5	-3,405	<b>31</b>
				-54,174	<b>33</b>
53,43	827,13408			keine Zuordnung	

**Auflistung der detektierten m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies in einer ungestressten T3-Probe.** (In dieser Arbeit nicht diskutiert).

ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel nach SmartFormula	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #
2,97	431,85466	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	5,5	-12,141	<b>11</b>
4,18	523,88602	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-0,185	<b>1</b>
5,68	523,88688	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	1,456	<b>2</b>
8,68	649,78383	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	1,647	<b>3</b>
14,5	775,67946	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,073	<b>5</b>
25,25	492,86206			-37,015	<b>49</b>
	619,78057			13,511	<b>18</b>
25,97	677,78380	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>	10,5	9,037	<b>41</b>
	691,80492	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>	10,5	16,761	<b>44</b>
26,27	605,76573			-44,901	<b>23</b>
	636,75654	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> I <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	9,5	8,503	<b>16</b>
31,61	448,84779	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9,5	Bildung im Sprayprozess	
	576,76952	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> I <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8,5	5,441	<b>7</b>
	688,75389			154,673	<b>35</b>
	732,77744			191,413	<b>10</b>
32,91	606,74765	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9,5	11,684	<b>13</b>
				-48,283	<b>28</b>
	674,73880			keine Zuordnung	
40,3	463,83338			keine Zuordnung	
	590,75209	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	10,907	<b>30</b>
46,87	716,65167			-52,019	<b>32</b>
		C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,5	13,089	<b>31</b>
				-37,681	<b>33</b>
	530,96945			keine Zuordnung	

**Auflistung der detektierten m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies in einer T3-Probe, die für 12 h bei 60 °C gelagert wurde.** (In dieser Arbeit nicht diskutiert).

ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel nach SmartFormula	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #
3,03	431,92905	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	4,5	75,856	<b>12</b>
				160,114	<b>11</b>
4,31	523,88599	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	-0,242	<b>1</b>
5,92	523,88771	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	3,041	<b>2</b>
9,29	649,78419	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	2,201	<b>3</b>
15,07	775,67950	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,5	0,125	<b>5</b>
25,56	492,87978	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9,5	-1,063	<b>49</b>
	619,77706	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	9,5	7,848	<b>18</b>
26,21	677,79160			20,545	<b>41</b>
	691,80903			22,702	<b>44</b>
31,88	448,90150	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> I <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4,5	Bildung im Sprayprozess	
	576,76612	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> I <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8,5	-0,454	<b>7</b>
	688,76035			164,053	<b>35</b>
33,07	606,74426			-53,870	<b>28</b>
		C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9,5	6,097	<b>13</b>
	674,74204			keine Zuordnung	
40,32	463,87277			keine Zuordnung	
	590,74618	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,5	0,902	<b>30</b>
					-62,023
44,35	1252,20567			keine Zuordnung	
46,85	716,65438			16,870	<b>31</b>
				-33,899	<b>33</b>



**Auflistung der detektierten m/z der [M-H]<sup>-</sup>-Spezies in einer T3-Probe, die für 4 h bei 60 °C gelagert wurde.** (In dieser Arbeit nicht diskutiert).

ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

Retentionszeit [min]	detektiertes m/z der [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Summenformel-Vorschlag des SmartFormula für die [M-H] <sup>-</sup> -Spezies	Doppelbindungs-äquivalente der Summenformel nach SmartFormula	Abweichung des theoretischen vom detektierten m/z [ppm]	ID #
3,01	431,93025	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	4,50	78,635	<b>12</b>
				162,893	<b>11</b>
4,25	523,88606	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	9,50	-0,109	<b>1</b>
5,80	523,88552	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	9,50	-1,140	<b>2</b>
9,25	649,78213	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>	9,50	-0,970	<b>3</b>
15,06	775,67922	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	9,50	-0,236	<b>4</b>
25,64	492,87781	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9,50	-5,060	<b>49</b>
	619,77701	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	9,50	7,767	<b>18</b>
26,21	677,79099	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>	10,50	19,645	<b>41</b>
	691,80657	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> I <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>	10,50	19,146	<b>44</b>
31,89	576,76668	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> I <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	8,50	0,517	<b>7</b>
	688,75984			163,313	<b>35</b>
33,15	606,74373	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	9,50	5,223	<b>13</b>
				-54,743	<b>28</b>
	674,74267			keine Zuordnung	
40,28	463,87163			keine Zuordnung	
	590,74616	C <sub>13</sub> H <sub>6</sub> I <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	9,50	0,868	<b>30</b>
					-62,057
44,30	1252,23333			keine Zuordnung	
46,85	716,65358	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> I <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	9,50	15,754	<b>31</b>
					-35,016

## Kapitel 4 – Methodenentwicklung durch Optimierung stationärer Phasen für synthetische Schilddrüsenhormon-Proben

**Abb. 3.1, S. 173**

stationäre Phase	SH	Phenyl	EPS	CN	C30
Substanz im Standardgemisch	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]
T2	1,15	1,29	1,18	1,35	1,88
r-T2	1,22	1,47	1,22	1,75	2,18
T3	1,35	1,67	1,43	1,95	2,72
r-T3	1,48	1,84	1,47	1,98	3,40
T4	1,72	2,33	1,84	2,15	4,32
DiAc	3,79	3,42	9,16	2,48	3,40
TriAc	7,09	5,05	23,39	3,02	6,09
TriProp	9,21	5,86	24,88	3,23	7,78
TetraAc	13,96	7,78	44,78	3,68	10,46
TetraFA	17,67	7,78	>> 50	3,68	12,23

**Abb. 3.3, S. 177**

ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

UV	neg ESI TOF MS	
Retentionszeit [min]	ID#	Retentionszeit im Basispeakchromatogramm
3,60		
4,18	<b>3</b>	4,34
4,97		
5,36	<b>4</b>	5,35
5,79		
	<b>5</b>	6,58
8,69	<b>22</b>	8,70
9,78	<b>40</b>	9,84
10,55		
13,46	<b>19</b>	13,41
16,05	<b>17</b>	16,05
21,88	<b>9</b>	21,89
26,02	<b>10</b>	26,01
	<b>24 od. 17</b>	27,44

**Abb. 4.1, S. 186**

ID# entspricht der Nummerierung der Strukturen der Tabelle im Anhang Seite A-17.

UV	neg ESI TOF MS	
Retentionszeit [min]	ID#	Retentionszeit im Basispeakchromatogramm
4,13	11	4,19
9,97	3	10,03
	4	11,16
	5	13,13
17,56	22	17,60
18,91	45	19,10
19,81	48	19,83
22,32	19	22,35
	17	24,75
27,71	9	27,72
28,49	10	28,53
	24	30,01
	31	33,00

**Abb. 4.4, S. 191**

Peak# / ID#	Standard-substanz	Retentionszeit [min]		
		Optimierte stationäre Phase (90 mm C30+80 mm SH+50 mm CN)		YMC C18 Pro 150 x 1 mm
		isokratisch	Stufengradient	Referenzmessung im linearen Gradient
1	T2	3,27	8,02	3,78
2	r-T2	3,72	9,13	5,48
3	T3	4,44	10,26	9,05
4	r-T3	5,88	11,65	10,64
5	T4	6,82	13,28	14,71
6	DiAc	7,40	15,23	24,50
7	TriAc	12,76	21,55	31,33
8	TriProp	16,12	25,04	33,38
9	TetraAc	22,33	27,71	36,85
10	TetraFA	26,70	28,53	39,04

**Abb. 4.4, S. 191**

stationäre Phase	SH	Phenyl	EPS	PEI	C30	CN
Substanz im Standardgemisch	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]
T2	1,41	2,21	1,42	1,59	2,42	1,64
r-T2	1,65	2,63	1,63	1,59	3,14	2,08
T3	2,00	3,17	2,07	1,59	4,07	2,32
r-T3	2,30	3,75	2,19	1,59	5,43	2,60
T4	3,00	4,66	3,05	1,59	7,45	2,84
DiAc	9,58	7,61	17,46	3,65	7,11	3,28
TriAc	23,34	13,84	54,14	4,15	17,16	4,52
TriProp	32,90	17,35	70,68	2,44	23,70	6,44
TetraAc	52,75	24,78	117,48	4,15	33,66	7,32
TetraFA	68,90	26,01	200,00	18,71	40,53	8,92

**Abb. 5.2, S. 194**

Substanz im Standardgemisch	30 mm C30 + 20 mm <b>CN</b> + 50 mm Phenyl	30 mm C30 + 20 mm <b>PEI</b> + 50 mm Phenyl
	Retentionszeit [min]	Retentionszeit [min]
T2	2,05	1,96
r-T2	2,41	2,25
T3	2,94	2,72
r-T3	3,47	3,20
T4	4,39	4,05
DiAc	6,83	6,71
TriAc	13,16	12,62
TriProp	17,01	15,42
TetraAc	23,78	22,47
TetraFA	26,69	30,97

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von April 2004 bis Dezember 2008 am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik an der Universität des Saarlandes.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Christian G. Huber für die Themenstellungen und die Betreuung dieser Arbeit. Auch danke ich Ihm für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf internationalen und nationalen Tagungen zu präsentieren.

Für die finanzielle und materielle Förderung, die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Themas möchte ich mich bei Herrn Klaus Bischoff und der Firma Bischoff Analysentechnik und -geräte (Leonberg, Deutschland) bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Stefan Lamotte für die fachliche und moralische Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich möchte mich für die Fragestellung und Bereitstellung der Schilddrüsenhormone sowie die finanzielle Unterstützung bei Herrn Dr. Ralf Braun der Peptido GmbH (Bexbach, Deutschland) bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Engelhardt danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Frank Steiner für die Betreuung der ersten eineinhalb Jahre meiner Doktorarbeit und für die Einführung in die Chromatographie, speziell die Trenntechnik der HPLC, und die Kapillarelektrophorese.

Unserem Laboranten Herrn Reiner Wintringer (Windy) danke ich für das freundschaftliche Verhältnis, die Unterstützung und die offenen Ohren, die er immer für mich hatte.

Mein spezieller Dank gilt dem Werkstatt-Team Herrn Norbert Ochs, Jens Wiegert und Peter Skohoutil für die schnelle Umsetzung und Hilfe bei den kleineren und größeren apparativen Problemen.

Mein Dank gilt auch meiner Arbeitsgruppe für das Arbeitsklima und die Momente, die den Alltag mit einem Lachen begleitet haben. Ich möchte auch unserer Sekretarin Christa Göllen danken, die immer ein offenes Ohr für die vielen kleinen Probleme hatte und mich tatkräftig in allen Verwaltungsangelegenheiten unterstützt hat.

Zum Schluß möchte ich meinen Freunden für die seelische und moralische Unterstützung danken. Ihr seid die Besten.