

Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

1. Universität Duisburg-Essen, Instrumentelle Analytische Chemie
2. Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
3. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Physikalische Chemie

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur
Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **16120 N**

Entwicklung eines flüssigchromatografischen Analyseverfahrens zur Struktur- und Identitätsaufklärung in komplexen wässrigen Medien mittels gekoppelter Raman/IRMS Detektoren.

(Bewilligungszeitraum: 01.06.2009 – 29.02.2012)

der AiF-Forschungsvereinigung

Umwelttechnik

Essen, den 25.06.2012
Duisburg, den 18.6.2012
Düsseldorf, den 14/06/12

Ort, Datum

Dr. Maik A. Jochmann
Dr. Thorsten Teutenberg
Prof. Dr. Hans Bettermann

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	15
Abkürzungen	17
1 Zusammenfassung.....	20
2 Wissenschaftlich technische Umsetzung	21
2.1 Auswahl geeigneter Testsubstanzen	21
2.1.1 Geschmacksstoffe	21
2.1.2 Sulfonamide	23
2.1.3 Steroide	24
2.2 Erstellung einer internen Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank.....	26
2.3 Messung der Isotopensignaturen der Modellsubstanzen.....	30
2.3.1 δ -Notation	30
2.3.2 Elementaranalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie	31
2.3.3 Fließinjektionsanalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie	32
2.3.4 Messung des verwendeten Referenzgases	35
2.4 Entwicklung des Raman-Detektors	36
2.4.1 Experimenteller Ansatz unter Einsatz der Raman-Mikroskopie	36
2.4.2 Experimenteller Ansatz unter Einsatz eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters.....	38
2.5 Implementierung des Raman-Detektors in das HPLC-System	46
2.6 Optimierung des Raman-Detektors	48
2.6.1 Beschichtung des Auskoppel-Lichtwellenleiters zur Raman-Streulichtabnahme	48
2.6.2 Austausch des Laserlicht-Einkoppel-Lichtwellenleiters durch ein Quartz-Fenster	50
2.6.3 Integration eines zusätzlichen Kantenfilters im Monochromator	51
2.7 Implementierung des Raman-Detektors in das HT-HPLC-IRMS-System	53

2.8	Untersuchung geeigneter Trennphasen für die Isotopenverhältnis-massenspektrometrie	54
2.8.1	Untersuchung der Temperaturstabilität geeigneter Trennphasen	54
2.8.2	Untersuchung der Temperaturstabilität geeigneter Trennphasen mittels IRMS.....	60
2.8.3	Auswirkung des Säulenblutens auf den Isotopenwert.....	61
2.8.4	Isotherme Arbeitsweise	62
2.8.5	Gradientenarbeitsweise.....	64
2.8.6	Vorbereitung und Regeneration der Säulen für die IRMS	66
2.9	Anpassung der chromatografischen Methoden.....	67
2.9.1	Methodenentwicklung für die Trennung von Geschmacksstoffen	67
2.9.2	Methodenentwicklung für die Trennung von Sulfonamiden.....	84
2.9.3	Methodenentwicklung für die Trennung von Steroiden	92
2.10	Methodentransfer auf die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie.....	95
2.11	Analyse von Modellsubstanzgemischen mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System	98
2.11.1	Analyse eines Sulfonamid-Mixes mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System.....	98
2.11.2	Analyse eines Geschmacksstoff-Mixes mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System	101
2.11.3	Analyse eines Steroid-Mixes mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System.....	103
2.12	Authentizitätskontrolle von Koffein	107
2.13	Authentizität von Antibiotika	119
3	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse.....	127
3.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrags.....	127
3.2	Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihren innovativen Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten	128
3.2.1	Photonik und Präzisionstechnik.....	128
3.2.2	Lebensmitteltechnik.....	129
3.2.3	Umwelttechnik und pharmazeutische Analytik	129

3.3	Zusammenstellung aller Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem IGF-Vorhaben veröffentlicht wurden oder in Kürze veröffentlicht werden sollen.....	130
3.4	Angaben über gewerbliche Schutzrechte, sofern sie erworben wurden, oder ihre Anmeldung beabsichtigt ist	131
3.5	Einschätzung der Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und ggf. aktualisierten Transferkonzepts.....	131
4	Anhang	137
4.1	Basiskomponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus	137
4.2	Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank.....	138
4.3	Untersuchung weiterer stationärer Phasen	147
4.3.1	Interchim Silice Upti-prep Strategy C ₁₈ -2.....	147
4.3.2	Interchim Silice Upti-prep Strategy C ₁₈ -3.....	148
4.3.3	Supelco Ascentis Express C ₁₈	149
4.3.4	AkzoNobel Kromasil Eternity-2.5-C ₁₈	150
4.3.5	Showa Denko – Shodex ET-RP1 4D.....	151
4.4	Reaktion der Presse und der analytischen Community auf die Anwendung zur Koffeinauthentizität.....	152
5	Literaturverzeichnis	156
6	Projektmitarbeiter und Autoren des Abschlussberichts	159
6.1	Projektmitarbeiter IAC Universität Duisburg-Essen.....	159
6.2	Projektmitarbeiter Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.	159
6.3	Projektmitarbeiter Universität Düsseldorf	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Schematische Darstellung des Raman-Mikroskop-Spektrometers.	26
Abbildung 2-2:	Transmissionskurve 45° dichroitischer Strahlteiler (Semrock LPD01-532RU-25) [4].	27
Abbildung 2-3:	Raman-Mikroskop-Spektrometer: 1: Diodengepumpter Festkörperlaser (532 nm, 2 Watt), 2: Volumentransmissionsgitter-Monochromator (hier offen dargestellt), 3: Tieftemperatur CCD-Kamera, 4: Mikroskopobjektiv, 5: Dichroitischer Strahlteiler, 6: Achromatische Linse (f=35 mm), 7: Laser-Umlenkspiegel, 8: VIS-Umlenkspiegel, 9: Lichtweg Anregungslaser (grün), 10: Lichtweg Raman-Streulicht (rot).	28
Abbildung 2-4:	Aufbau zur Messung der Kohlenstoffisotopensignatur mittels EA-IRMS.	31
Abbildung 2-5:	Aufbau zur Messung der Kohlenstoffisotopensignatur mittels FIA-IRMS.	33
Abbildung 2-6:	Kapillare aus Quarzglas mit Fenster der Firma <i>Polymicro Technologies</i> , USA [11].	36
Abbildung 2-7:	UV-Chromatogramm von Koffein, Theobromin und Theophyllin.	37
Abbildung 2-8:	Raman-Spektren von wässrigen Koffein-Lösungen, untergrundkorrigiert.	38
Abbildung 2-9:	Durchflusszelle nach dem Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters.	39
Abbildung 2-10:	Integration der Durchflusszelle in die Raman-Apparatur.	40
Abbildung 2-11:	Raman-Spektrum einer Koffein-Lösung (10 g L ⁻¹) mit dem Versuchsaufbau nach Abbildung 2-10.	41
Abbildung 2-12:	Raman-Signale von Koffein; vergrößerter Ausschnitt der Abbildung 2-11.	42
Abbildung 2-13:	Transmissionsspektrum einer mit Kantenfilter beschichteten Quarzfaser.	43
Abbildung 2-14:	Raman-Spektrum einer Koffein-Lösung (10 g L ⁻¹) mit dem Versuchsaufbau nach Abbildung 2-10; schwarz: ohne Beschichtung, rot: beschichtete Einkoppel-Faser.	44
Abbildung 2-15:	Konzentrationsreihen von Koffein-Lösungen. Auswertung des Raman-Signals bei 1339 cm ⁻¹	45
Abbildung 2-16:	Kopplung von HT-HPLC und Raman-Detektor.	46
Abbildung 2-17:	HPLC-Raman-Kopplung am Beispiel von Sulfadiazin und Sulfathiazol. Konzentration: 100 mg L ⁻¹ ; Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C ₁₈ , 100 x 2,1 mm; 3,5 µm; Mobile Phase: Phosphat Puffer pH 2,2; Flussrate: 1 mL min ⁻¹ ; Temperatur: 30°C; Injektionsvolumen: 10 µL.	47

Abbildung 2-18:	Transmissionskurven der Beschichtung des Auskoppel-Lichtwellenleiters von 200 bis 800 nm (schwarzer Kurvenverlauf: Beschichtung eines SMA-Stecker-gefassten Glasfaserendes; roter Kurvenverlauf: Beschichtung eines freistehenden Glasfaserendes).	49
Abbildung 2-19:	Optimierung der Durchflusszelle vor Implementierung in das Gesamtsystem.....	50
Abbildung 2-20:	Untergrund-Glas-Raman-Signal des Auskoppel-Lichtwellenleiters; schwarz: ohne zusätzlichen Kantenfilter im Monochromator, rot: mit zusätzlichem Kantenfilter im Monochromator.....	52
Abbildung 2-21:	Schematische Darstellung der Gesamtkopplung von HT-HPLC-Raman-IRMS.....	53
Abbildung 2-22:	Testchromatogramme der Waters XSelect CSH C ₁₈ . a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 10. Heizphase (sauer), d) nach der 15. Heizphase (basisch). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XSelect (150 mm × 4,6 mm; 5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].	57
Abbildung 2-23:	Testchromatogramme der YMC Triart. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 10. Heizphase (sauer), d) nach der 11. Heizphase (basisch). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: YMC Triart (150 mm × 4,6 mm; 5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].	59
Abbildung 2-24:	HTLC-IRMS Chromatogramm von CO ₂ Pulsen (A) und Mehrfachinjektion von 100 ppm Ethanol (B) auf einer XBridge C ₁₈ Säule bei 100°C (Graphik von Zhang et al. [34]).	62
Abbildung 2-25:	(4A) δ ¹³ C von CO ₂ Gaspulsen (Kreise, linke Ordinate) und Hintergrund von ⁴⁴ CO ₂ (Quadrate, rechte Ordinate) wurden mit einer XBridge C ₁₈ - (1), Acquity C ₁₈ - (2), Triart C ₁₈ - (3) und einer ZirChrom-PBD-Trennsäule (4) bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichungen (n=9) der Messungen. Die gestrichelten Linien zeigen den Wert des eingemessenen CO ₂ Gases (-37,81 ‰). Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von ± 0,3 ‰. (4B) δ ¹³ C Werte multipler Injektionen eines 100 mg L ⁻¹ Ethanol Standards auf den unter (4A) aufgeführten Säulen bei Änderung der Temperatur. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichungen (n=3) der Messungen. Die gestrichelten Linien geben den Mittelwert wieder. Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von ± 0,3 ‰ (Graphik von Zhang et al. [34]).	63

Abbildung 2-26:	Temperatur programmiertes LC-IRMS Chromatogramm sukzessiver CO ₂ Gaspulse (A) und multipler Injektionen eines 100 ppm Ethanol Standards (B) auf einer XBridge C ₁₈ Säule. Temperaturprogramm: 1 min bei 60°C, dann mit 20°C min ⁻¹ auf 120°C, 1 min halten, dann mit 5°C min ⁻¹ auf 180°C und für 1 min halten (Graphik von Zhang et al. [34]).....	64
Abbildung 2-27:	δ ¹³ C-Werte multipler Injektionen eines 100 mg L ⁻¹ Ethanol Standards. Die Berechnung der Peakflächen erfolgte mittels des „Individual Background“ Algorithmus (Dreiecke, linke Ordinate) und des „Dynamic Background“ Algorithmus (Kreise, linke Ordinate). Die Anstiege des Untergrunds von m/z 44 (Kreuze, rechte Ordinate) sind für die vier untersuchten Säulen dargestellt. Zur Bestimmung der Steigung des Untergrunds wurde die Differenz des Untergrunds am Peakanfang und Peakende durch die Peakweite an der Basis dividiert. Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von ± 0,5 ‰ (Graphik von Zhang et al. [34]).	65
Abbildung 2-28:	Regeneration einer Säule mit Methanol nach de-wetting.	66
Abbildung 2-29:	Trennung von sechs Geschmacksstoffen mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: ZirChrom-PBD (150 × 3,0 mm, 5 µm); a) bereits verwendete Trennsäule, b) fabrikneue Trennsäule; mobile Phase: Phosphatpuffer, 10 mmol L ⁻¹ , pH 2,7; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: siehe Abbildung. Injektionsvolumen: 5 µL; Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Methanol, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.	68
Abbildung 2-30:	Trennung von sechs Geschmacksstoffen und Methanol mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 µm); mobile Phase: Phosphatpuffer, 10 mmol L ⁻¹ , pH 2,7; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: 30°C auf 180°C mit a) 2°C min ⁻¹ , b) 8°C min ⁻¹ . Injektionsvolumen: 3 µL; Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Methanol, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.....	69
Abbildung 2-31:	Trennung von sechs Geschmacksstoffen und Methanol mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters Acquity C ₁₈ (50 × 2,1 mm, 1,7 µm); mobile Phase: Phosphatpuffer, 10 mmol L ⁻¹ , pH 2,7; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: 50°C auf 180°C mit 2°C min ⁻¹ ; Injektionsvolumen: a) 3 µL b) 1,5 µL; Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Methanol, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.	71
Abbildung 2-32:	Isotherme Auflösungskarte und die simulierten isothermen Trennungen: Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Temperatur: siehe Abbildung.....	73

Abbildung 2-33:	Kombination von Temperaturgradienten-Basismessungen für eine systematische Methodenentwicklung in der Hochtemperatur-HPLC.....	74
Abbildung 2-34:	Chromatogramme der Trennung von sechs Geschmacksstoffen mittels Temperaturgradienten-Elution. Die Starttemperatur der Gradienten wurde variiert: (a) = 40°C, (b) = 50°C, (c) = 60°C, (d) = 70°C. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: siehe Abbildung. Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.....	75
Abbildung 2-35:	Darstellung von neun aufeinanderfolgenden Chromatogrammen der Trennung von sechs Geschmacksstoffen und Uracil. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: siehe Abbildung. Analyten: 1) Uracil, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.....	78
Abbildung 2-36:	Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Cycle Time.....	80
Abbildung 2-37:	Bestimmung der erforderlichen Equilibrierungszeit im Temperaturgradienten-Modus.....	81
Abbildung 2-38:	Gemeinsame Darstellung von drei Chromatogrammen der Trennung der Geschmacksstoffe. Die Temperatur der einzelnen Temperaturgradienten-Punkte wurde jeweils um ± 1°C verändert. Chromatografische Bedingungen: siehe Abbildung 2-35.	83
Abbildung 2-39:	Vergleich zwischen dem van` t Hoff plot (a) und der Auftragung des Logarithmus des Retentionsfaktors gegen die Temperatur (b) für die ausgewählten Sulfonamide. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure. Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 270 nm.....	84
Abbildung 2-40:	Isotherme Trennungen von fünf Sulfonamiden. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 μm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 270 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.....	86

Abbildung 2-41:	Chromatogramme der Basismessungen. Trennung von fünf Sulfonamiden und Uracil mittels Temperaturgradienten-Elution. a): Steigung: 2°C min ⁻¹ , b) Steigung: 6°C min ⁻¹ . Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 270 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.....	88
Abbildung 2-42:	Trennung von fünf Sulfonamiden und Uracil mittels Temperaturgradienten-Elution. a): Starttemperatur: 60°C, b) Starttemperatur: 100°C. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 270 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.....	89
Abbildung 2-43:	Vergleich zwischen der a) isothermen und b) Temperaturgradienten-Elution der Sulfonamide. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperatur: a) isotherm bei 80°C, b) Temperaturgradient siehe Abbildung 2-42 a; Detektion: UV bei 270 nm, Injektionsvolumen: a) 2 µL, b) 1 µL. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.....	91
Abbildung 2-44:	Trennung von sieben Steroiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: ZirChrom-PBD (150 × 3,0 mm, 5 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 0,6 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: siehe Abbildung; Detektion: IRMS (44 m/z); Injektionsvolumen: 10 µL. Analyten: 1) 19-Nortestosteron, 2) Testosteron, 3) Epitestosteron, 4) trans-Dehydroandrosteron, 5) Etiocholan-3α ol-17-on, 6) cis-Androsteron, 7) 5α-Androstan-3α, 17β-diol [52].....	92
Abbildung 2-45:	Trennung von sieben Steroiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 1,5 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: siehe Abbildung; Detektion: UV bei 200 nm; Injektionsvolumen: 5 µL. Analyten: 1) 19-Nortestosteron, 2) Testosteron, 3) Epitestosteron, 4) trans-Dehydroandrosteron, 5) Etiocholan-3α ol-17-on, 6) cis-Androsteron, 7) 5α-Androstan-3α, 17β-diol.....	93
Abbildung 2-46:	Trennung von drei Steroiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C ₄ (50 × 2,1 mm, 3,5 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperaturgradient: siehe Abbildung; Detektion: UV bei 200 nm; Injektionsvolumen: 0,1 µL. Analyten: 1) 19-Nortestosteron, 2) Testosteron, 3) Epitestosteron.....	94

Abbildung 2-47:	Trennung der Geschmacksstoffe mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (100 × 3,0 mm, 3,5 µm); mobile Phase: Phosphatpuffer 10 mmol L ⁻¹ , pH 2,7; Temperaturgradient: siehe Abbildung. a) UV-Chromatogramm aufgenommen in der IUTA e. V, b) UV-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen, c) IRMS-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen. Analyten: 1) Theobromin, 2) Theophyllin, 3) Catechin, 4) Koffein, 5) Aspartam, 6) Rutin.	96
Abbildung 2-48:	Trennung von Sulfonamiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₁₈ (100 × 3,0 mm, 3,5 µm); mobile Phase: Phosphatpuffer 10 mmol L ⁻¹ , pH 2,7; Temperaturgradient: siehe Abbildung. a) UV-Chromatogramm aufgenommen in der IUTA e. V, b) UV-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen, c) IRMS-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen. Analyten: 1) Sulfadiazin, 2) Sulfathiazol, 3) Sulfamerazin, 4) Sulfamethoxazol, 5) Trimethoprim.....	97
Abbildung 2-49:	Trennung von fünf Sulfonamiden. a) UV-Chromatogramm, b) IRMS-Chromatogramm. Analyten: 1) Sulfadiazin 2) Sulfathiazol 3) Sulfamerazin 4) Sulfamethoxazol 5) Trimethoprim; Konzentration: 0,1 mg mL ⁻¹ . Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C ₁₈ , 100 x 2,1 mm; 3,5 µm; mobile Phase: 10 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 3; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; UV-Detektion bei 254 nm; Injektionsvolumen: 20 µL.....	99
Abbildung 2-50:	Raman-Spektren von Sulfadiazin, Sulfathiazol und Sulfamerazin mit Nummerierung der zugeordneten Schlüsselbanden und Angabe der relativen Wellenzahlen.....	100
Abbildung 2-51:	Trennung von sechs Geschmacksstoffen. a) UV-Chromatogramm, b) IRMS-Chromatogramm. Analyten: 1) Theobromin 2) Theophyllin 3) Catechin 4) Koffein 5) Aspartam 6) Rutin; Konzentration: 0,2 mg mL ⁻¹ . Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C ₁₈ , 100 x 2,1 mm; 3,5 µm; Mobile Phase: Phosphatpuffer pH 3; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; UV-Detektion bei 254 nm; Injektionsvolumen: 10 µL.....	101
Abbildung 2-52:	Raman-Spektren von Theobromin, Theophyllin, Catechin und Koffein mit Nummerierung der zugeordneten Schlüsselbanden und Angabe der relativen Wellenzahlen.	102
Abbildung 2-53:	Fluoreszenzspektrum von Rutin, gemessen mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System; rote Pfeile: Sättigung des CCD-Chips durch Untergrund-Glas-Raman-Signale; rot gestrichelte Linie: tatsächlicher Kurvenverlauf des Rutin-Fluoreszenzspektrums.	103

Abbildung 2-54:	UV-Chromatogramm von fünf Steroiden a) UV-Chromatogramm, b) IRMS-Chromatogramm. Analyten: 1) 19-Nortestosteron 2) Testosteron 3) Epi-testosteron 4) cis-Androsteron 5) 17-Hydroxyprogesteron; Konzentration: 0,3 mg mL ⁻¹ ; Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C ₄ , 50 × 2,1 mm; 3,5 μm; Mobile Phase: Wasser; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 200 nm; Injektionsvolumen: 10 μL.....	104
Abbildung 2-55:	Raman-Spektren von Steroiden, gemessen mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System.....	105
Abbildung 2-56:	HT-RPLC-IRMS Chromatogramm einer Mischung von Koffeinderivaten (100 mg L ⁻¹), Espresso, Tee, Energy drink. Es wurde eine XBridge C ₁₈ -Trennsäule (2,1 × 100 mm, 3,5 μm) bei einer Temperatur von 80°C verwendet (Graphik von Zhang et al. [67])......	110
Abbildung 2-57	δ ¹³ C-Werte von Koffein im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 400 mg L ⁻¹ . Die Kreise repräsentieren die δ ¹³ C-Werte und die Quadrate die totale Peakfläche. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Messungen (n=3). Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert der δ ¹³ C-Werte. Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von ± 0,5 ‰ (Graphik von Zhang et al. [67])......	112
Abbildung 2-58:	Offset zwischen gemessenen und wahren Kohlenstoffisotopensignaturen der oben aufgeführten internationalen Standards.	113
Abbildung 2-59:	δ ¹³ C-Werte und Konzentrationen von Koffein aus unterschiedlichen Quellen. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Messungen (n = 3). Die vier gestrichelten Linien grenzen zwei unterschiedliche Bereiche der δ ¹³ C-Werte ein. Werte zwischen -25 und -32 ‰ repräsentieren den Bereich des natürlichen Koffeins aus C ₃ -Pflanzen. Der Bereich zwischen -33 und -38 ‰ gibt die Bandbreite des synthetischen Koffeins wieder. Cola-artige Getränke außer Coca Cola™ (Graphik von Zhang et al. [67]).	115
Abbildung 2-60:	δ ¹³ C-Werte und Konzentrationen von Koffein in unterschiedlichen Getränken, die aufgrund ihrer Deklaration natürliches Koffein enthalten sollen. Es wurden vier falsch gekennzeichnete Produkte gefunden. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Messungen (Graphik von Zhang et al. [67]).	116
Abbildung 2-61:	Einseitiges Konfidenzintervall für Proben, die natürliches bzw. synthetisches Koffein enthalten (Graphik von Zhang et al. [67]).	118

Abbildung 2-62:	A) HT-HPLC-IRMS Chromatogramm (m/z 44) einer Standardmischung aus Sulfonamiden. Die gestrichelte Linie zeigt den verwendeten Temperaturgradienten. Die Peaks in Elutionsreihenfolge: Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Die Konzentration der Substanzen: 100 mg L^{-1} . B) HT-HPLC-IRMS Chromatogramm (m/z 44) einer pharmazeutischen Probe mit Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Gleiches Temperaturprogramm wie unter A) (Graphik von Kujawinski et al. [73]).	120
Abbildung 2-63:	Peakflächen (Quadrate) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (Kreuze) gemessen mittels FIA- und HT-HPLC-IRMS bei $500 \mu\text{L min}^{-1}$ (Graphik von Kujawinski et al. [73]).	122
Abbildung 2-64:	Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen EA-IRMS und FIA-IRMS in Abhängigkeit der relativen Peakflächen pro nmol C. Die Peakflächen pro Kohlenstoff wurden gegen den Referenzgaspeak referenziert, um Unterschiede in der Ionisation herauszumitteln. Die Kurve zeigt einen logarithmischen Zusammenhang für die Sulfonamide (Graphik von Kujawinski et al. [73]).	123
Abbildung 2-65:	Kalibration von Sulfadiazin (Graph A) und Trimetoprim (Graph B). Die Rhomben zeigen die Peakfläche (m/z 44), die Quadrate die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (Graphik von Kujawinski et al. [73]).	124
Abbildung 2-66:	Korrigierte $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Trimethoprim und Sulfamethoxazol in pharmazeutischen Produkten. (Graphik von Kujawinski et al. [73]).	126
Abbildung 4-1:	Spectra-Physics Millennia Pro 2s diodengepumpter Festkörperlaser.	137
Abbildung 4-2:	Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VIS Monochromator (offen).	137
Abbildung 4-3:	Andor Newton DU920P CCD-Kamera.	137
Abbildung 4-4:	Raman-Spektrum von Sulfadiazin.	138
Abbildung 4-5:	Raman-Spektrum von Sulfamerazin.	138
Abbildung 4-6:	Raman-Spektrum von Sulfamethazin.	139
Abbildung 4-7:	Raman-Spektrum von Sulfamethoxazol.	139
Abbildung 4-8:	Raman-Spektrum von Sulfathiazol.	140
Abbildung 4-9:	Raman-Spektrum von Trimethoprim.	140
Abbildung 4-10:	Raman-Spektrum von Aspartam.	141
Abbildung 4-11:	Raman-Spektrum von Koffein.	141
Abbildung 4-12:	Raman-Spektrum von Catechin.	142
Abbildung 4-13:	Raman-Spektrum von Rutin.	142
Abbildung 4-14:	Raman-Spektrum von Androsteron.	143
Abbildung 4-15:	Raman-Spektrum von Eticholanolon.	143
Abbildung 4-16:	Raman-Spektrum von Prasteron.	144
Abbildung 4-17:	Raman-Spektrum von Pregnantriol.	144

Abbildung 4-18:	Raman-Spektrum von Testosteron.....	145
Abbildung 4-19:	Raman-Spektrum von Nandrolon.	145
Abbildung 4-20:	Raman-Spektrum von Epitestosteron.....	146
Abbildung 4-21:	Testchromatogramme der Interchim Silice Upti-Prep Strategy C ₁₈ -2. a) fabrikneue Phase, b) nach der 4. Heizphase (neutral). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Interchim Silice Upti-Prep Strategy C ₁₈ -2 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21]......	147
Abbildung 4-22:	Testchromatogramme der Interchim Silice Upti-Prep Strategy C ₁₈ -3. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Interchim Silice Upti-Prep Strategy C ₁₈ -3 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21]......	148
Abbildung 4-23:	Testchromatogramme der Supelco Ascentis Express C ₁₈ . a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Supelco Ascentis Express C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm; 2,7 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 0,7 mL min ⁻¹ ; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21]......	149
Abbildung 4-24:	Testchromatogramme der AkzoNobel Kromasil Eternity-2.5-C ₁₈ . a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 6. Heizphase (sauer). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: AkzoNobel Kromasil Eternity-2.5-C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm; 2,5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L ⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min ⁻¹ ; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21]......	150

Abbildung 4-25: Testchromatogramme der Showa Denko Shodex ET-RP1 4D. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 10. Heizphase (sauer), d) nach der 15. Heizphase (basisch). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Showa Denko Shodex ET-RP1 4D (150 mm × 4,6 mm; 4 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) Wasser/Acetonitril; Flussrate: 0,6 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Methylbenzoat, 3) Butylbenzoat, 4) Hexylbenzoat [21]..... 151

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Physikalisch-chemische Eigenschaften der ausgewählten Geschmacksstoffe.....	21
Tabelle 2-2:	Physikalisch-chemische Eigenschaften der ausgewählten Sulfonamide.....	23
Tabelle 2-3:	Physikalisch-chemische Eigenschaften der ausgewählten Steroide.....	24
Tabelle 2-4:	Internationale Skala für Kohlenstoff. Daten adaptiert von Coplen [7].	30
Tabelle 2-5:	Kohlenstoffisotopensignaturen der ausgewählten Reinsubstanzen.....	34
Tabelle 2-6:	Zusammenstellung der im Rahmen dieses Forschungsvorhabens untersuchten kommerziell verfügbaren Trennsäulen.....	55
Tabelle 2-7:	Übersicht über die mittels IRMS-Detektion getesteten Säulen.....	61
Tabelle 2-8:	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte sukzessiv aufgebener CO_2 Gaspulse ($n = 21$) und multipler Injektionen eines 100 mg L^{-1} Ethanol Standards ($n = 8$) unter Temperatur-Gradientenbedingungen. Die Differenz $ \Delta\delta_{\text{HT-LC-FIA}} $ in ‰ repräsentiert die Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ Werte von temperaturprogrammierter HPLC-IRMS und FIA-IRMS.....	65
Tabelle 2-9:	Vergleich von simulierten Retentionszeiten (Simul. RT) berechnet mittels LES Modell und experimentell ermittelten Retentionszeiten (Expt. RT) der Geschmacksstoffe. Die dargestellten Werte korrespondieren mit Abbildung 2-34.....	77
Tabelle 2-10:	Übersicht über die experimentell ermittelten Retentionszeiten sowie verschiedene statistische Parameter der Wiederholungsmessungen der Geschmacksstoffe. Die Daten korrespondieren mit Abbildung 2-35.....	79
Tabelle 2-11:	Änderung der kritischen Auflösung (R_s) zwischen Koffein und Aspartam wenn die Temperatur der Gradientenpunkte verändert wird. Die Daten korrespondieren mit Abbildung 2-38.....	82
Tabelle 2-12:	Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression der Sulfonamide in Abhängigkeit der Auftragung des Logarithmus des Retentionsfaktors gegen die reziproke Temperatur bzw. Temperatur.....	85
Tabelle 2-13:	Koffeinhaltige Proben und ihre Probenvorbereitung für die EA- und HT-HPLC-IRMS.....	108
Tabelle 2-14:	Vergleich zwischen dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Koffein aus verschiedenen Quellen, gemessen mit HT-HPLC-IRMS und EA-IRMS.....	113
Tabelle 2-15:	Werte zur Ermittlung der Konfidenzintervalle.....	117
Tabelle 2-16:	Methodennachweisgrenzen und Vergleich der HT-HPLC-IRMS Werte mit FIA- und EA-Werten der Sulfonamide und Trimethoprim.....	121
Tabelle 2-17:	Bulk- und korrigierte CSIA-Werte der pharmazeutischen Proben.....	126

Tabelle 3-1:	Aktualisierter und fortgeschriebener Plan zum Transfer der Ergebnisse in die industrielle Praxis.....	132
Tabelle 4-1:	Spezifikationen der Basiskomponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus.....	137

Abkürzungen

Å	Angström
BEH	Ethylene Bridged Hybrid
Bg	Background
C	Carbon (Kohlenstoff)
°C	Grad Celsius
CCD	Charge-coupled Device
CF	Central Focusing
cm	Zentimeter
CSH	Charged Surface Hybrid
CSIA	Compound specific isotopic analysis (Komponentenspezifische Isotopenanalyse)
d. h.	Das heißt
EA	Elemental analysis, Elementaranalyse
EA-IRMS	Elemental analysis isotope ratio mass spectrometry (Elementaranalyse- Isotopenverhältnismassenspektrometrie)
EPI	Griechisch: Epi = auf, Präposition für Auflichtobjektive
et al.	et alii
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow injection analysis, Fließinjektionsanalyse
FIA-IRMS	Flow injection analysis isotope ratio mass spectrometry (Fließinjektionsanalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie)
g	Gramm
GC	Gas chromatography (Gaschromatografie)
HHU	Heirich-Heine Universität
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HT-HPLC	High-temperature high-performnace liquid chromatography (Hochtemperatur- Hochleistungsflüssigchromatografie)
HT-HPLC-IRMS	High-temperature high-performance liquid chromatography isotope ratio mass spectroemtry (Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigchromatografie- Isotopenverhältnismassenspektrometrie)
IAC	Instrumental Analytical Chemistry, Instrumentelle Analytische Chemie
IAEA	International Atomic Energy Agency
IC	Infinity Corrected

ID	Innendurchmesser, internal diameter
IEC	Ion exchange chromatography (Ionenaustauschchromatographie)
IRMS	Isotope ratio mass spectrometry (Isotopenverhältnismassenspektrometrie)
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik
L	Liter
LES	Linear Elution Strength
LSVEC	Zweite Grundlage für die Delta ¹³ C Skala
LSS	Linear Solvent Strength
m	Meter
mAU	Milli absorbance-unit
MDL	Method detection limit (Methodennachweisgrenze)
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
NBS	National Bureau of Standards
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
PBD	Polybutadien
pH	Potentium hydrogenii
ppm	Parts per million
RPLC	Reversed-phase liquid chromatography (Umkehrphasen-Flüssigchromatografie)
RT	Retention time (Retentionszeit)
s	Sekunde
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering
SLWD	Super Long Working Distance
SMA	Sub-Miniature-A
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	Visible

VPDB

Vienna Pee Dee Belemnite

W

Watt

1 Zusammenfassung

Das Forschungsziel bestand darin, die Isotopenverhältnismassenspektrometrie (LC-IRMS) mit der Hochtemperatur-HPLC (HT-HPLC) und der Raman-Spektroskopie zu koppeln, um eine kombinierte Struktur- und Isotopenanalytik für Verbindungen, die der Gaschromatografie-IRMS Analyse nicht zugänglich sind, zu entwickeln. Mit der funktionstüchtigen Zusammenführung aller drei Komponenten am Standort Essen wurde dieses Ziel erreicht.

Im Rahmen des Projekts wurde ein online Raman-Detektor auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters entwickelt. Die Kopplung an die HT-HPLC konnte erfolgreich umgesetzt werden. Auch nach mehrwöchigem Einsatz blieb das System dicht und druckstabil. Die Nachweisgrenze des Raman-Detektors liegt bei einer Peakkonzentration von 1 mg L^{-1} in der Durchflusszelle. Dies entspricht einer absoluten Menge von 500 Nanogramm Analyt, die auf die HPLC-Trennsäule gegeben werden muss.

Wie in den Forschungszielen definiert, wurden Verfahren zur Beantwortung von Fragestellungen der Authentizitäts- und Herkunftskontrolle von Produkten entwickelt. In diesem Zusammenhang sind die Entwicklung einer Methode zur Unterscheidung natürlichen und synthetischen Koffeins sowie ein Verfahren zur Authentizitätskontrolle von Antibiotika zu nennen. Beide Methoden sind bestehenden GC- und EA-IRMS Methoden dadurch überlegen, dass sie ohne Derivatisierung und arbeitsaufwendige Probenvorbereitungsschritte wie Extraktion oder Aufreinigung auskommen. Es konnte gezeigt werden, dass im Fall der Koffeindifferenzierung lediglich eine Verdünnung der flüssigen Probe nötig ist.

Im Weiteren wurde eine Methode zur Kontrolle des Steroiddopings mittels der HT-HPLC-Raman-IRMS-Kopplung entwickelt. Auch diese Methode ist den bestehenden GC-IRMS Methoden dadurch überlegen, dass keine die Isotopensignatur verändernde Derivatisierung nötig ist.

Die Ergebnisse können u. a. in den Branchen optische Technologien, Umwelttechnik, pharmazeutische Analytik und chemische Industrie sowie Lebensmitteltechnik verwertet und angewendet werden.

Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht.

2 Wissenschaftlich technische Umsetzung

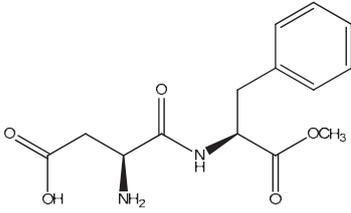
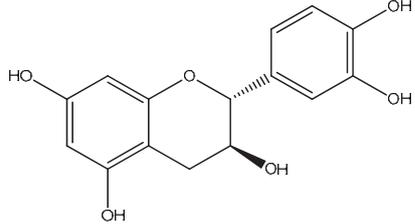
2.1 Auswahl geeigneter Testsubstanzen

Zu Projektbeginn wurden relevante Substanzen ausgewählt, die zu Substanzgemischen vereinigt wurden. Dabei wurde auf ein breites Anwendungsspektrum Wert gelegt. Die einzelnen Substanzen sind in den nachfolgenden Unterkapiteln aufgelistet.

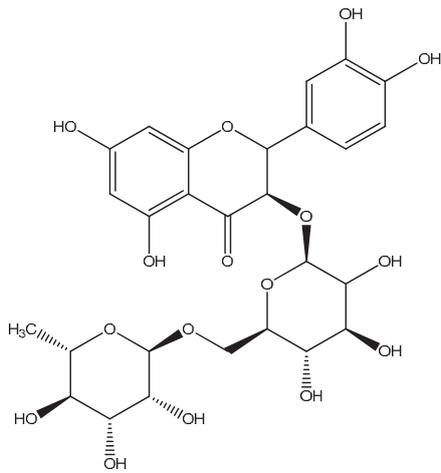
2.1.1 Geschmacksstoffe

Die Analyse stabiler Isotope hat sich in Kombination mit der Gaschromatografie als sicheres Werkzeug zur Aufdeckung von Lebensmittelfälschungen erwiesen [1,2]. In Tabelle 2-1 sind die hier als Probensubstanzen verwendeten Geschmacksstoffe aufgeführt.

Tabelle 2-1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der ausgewählten Geschmacksstoffe.

Verbindung	pK_{a1}	pK_{a2}	Formel (MW in g mol^{-1})	CAS-Nr.
Aspartam 	3,71	7,55	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$ (294,31)	22839-47-0
Catechin 	9,54		$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (290,27)	7295-85-4

Rutin

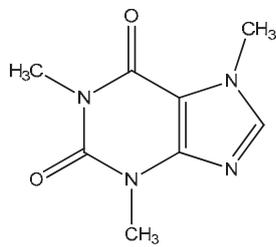


6,17

$C_{27}H_{30}O_{16}$
(610,52)

153-18-4

Koffein

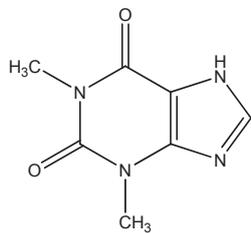


0,52

$C_8H_{10}N_4O_2$
(194,19)

58-08-2

Theophyllin



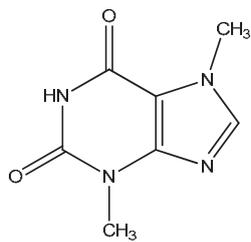
1,64

8,60

$C_7H_8N_4O_2$
(180,16)

58-55-9

Theobromin



0,41

9,90

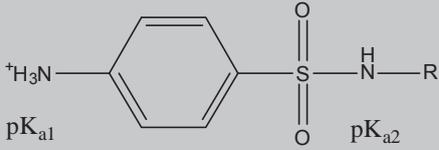
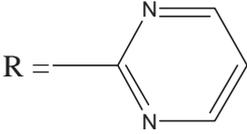
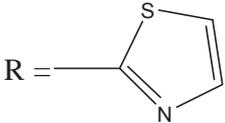
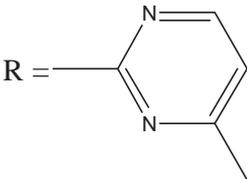
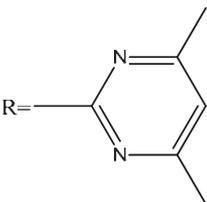
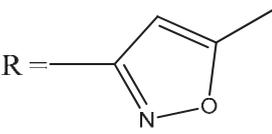
$C_7H_8N_4O_2$
(180,16)

83-67-0

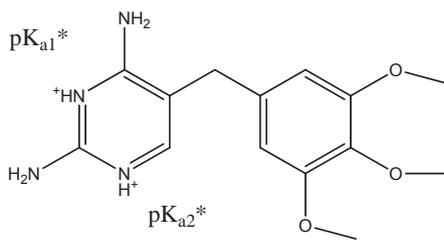
2.1.2 Sulfonamide

Sulfonamide und Trimethoprim sind Antibiotika und werden bei bakteriellen Infektionen eingesetzt. Es handelt sich hierbei um künstlich hergestellte Antibiotika. Tabelle 2-2 listet die ausgewählten Substanzen inklusive ihrer physiko-chemischen Eigenschaften auf.

Tabelle 2-2: Physikalisch-chemische Eigenschaften der ausgewählten Sulfonamide.

Verbindung	pK_{a1}	pK_{a2}	Formel (MW in $g\ mol^{-1}$)	CAS-Nr.
				
Sulfadiazin				
	1,6	6,8	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$ (250,28)	68-35-9
Sulfathiazol				
	2,01	7,11	$C_9H_9N_3O_2S_2$ (255,32)	144-74-1
Sulfamerazin				
	2,07	6,9	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$ (264,31)	127-58-2
Sulfamethazin				
	2,28	7,42	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$ (278,33)	57-68-1
Sulfamethoxazol				
	1,85	5,60	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$ (253,28)	723-46-6

Trimethoprim



3,23

6,76

$C_{14}H_{18}N_4O_3$
(290,32)

738-70-5

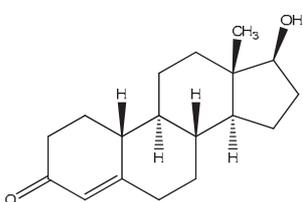
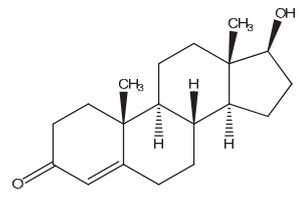
*single mesomeric structure showing the initial protonation sites

2.1.3 Steroide

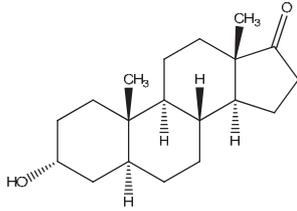
Doping durch die Einnahme von Steroiden gehört heutzutage zu den am weitesten eingesetzten Maßnahmen zur illegalen Steigerung der körperlichen Fitness [3]. Zur Unterscheidung körpereigener Steroide von synthetisch eingenommenen wird routinemäßig die GC-IRMS eingesetzt. In der Steroiddopingkontrolle mittels GC-IRMS werden heutzutage typischerweise die in Tabelle 2-3 aufgeführten Komponenten verwendet.

Die bisherige Methode mittels GC-IRMS erfolgte durch eine vorherige Derivatisierung der Steroide, um sie der Gaschromatografie zugänglich zu machen [3]. Diese Derivatisierung ist problematisch, da die Einführung von kohlenstoffhaltigen Gruppen durch das Derivatisierungsreagenz zu falschen Isotopensignaturen durch kinetische Isotopeneffekte und einer Verdünnung des Isotopensignals führen kann. Im Rahmen dieses Projekts sollte gezeigt werden, dass eine direkte Analyse der nicht derivatisierten Verbindungen möglich ist.

Tabelle 2-3: Physikalisch-chemische Eigenschaften der ausgewählten Steroide.

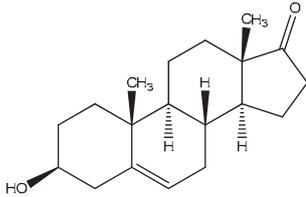
Verbindung	pK_{a1}	pK_{a2}	Formel (MW in $g\ mol^{-1}$)	CAS-Nr.
19-Nortestosteron (Nandrolon)			$C_{18}H_{26}O_2$ (274,40)	434-22-0
				
Testosteron			$C_{19}H_{28}O_2$ (288,43)	58-22-0
				

cis-Androsteron



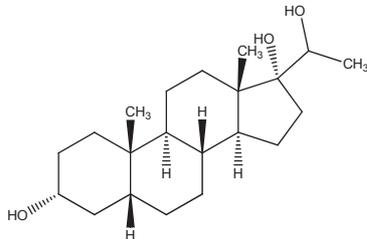
$C_{19}H_{30}O_2$
(290,44) 53-41-8

trans-Dehydroandrosteron



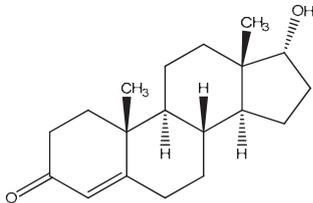
$C_{19}H_{28}O_2$
(288,43) 53-43-0

5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol



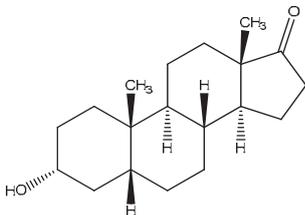
$C_{21}H_{36}O_3$
(336,52) 723-46-6

Epitestosteron



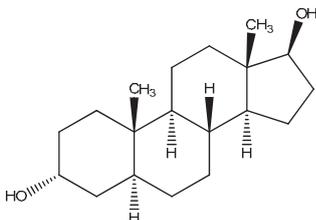
$C_{19}H_{28}O_2$
(288,43) 481-30-1

Etiocholan-3 α -ol-17-on



$C_{19}H_{30}O_2$
(290,44) 53-42-9

5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol



$C_{19}H_{32}O_2$
(292,46) 1852-53-5

2.2 Erstellung einer internen Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank

Für die Erstellung der internen Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank wurden die in Kapitel 2.1 aufgeführten Modellsubstanzen Raman-spektroskopisch vermessen.

Die Raman-Spektren wurden mit einem Raman-Mikroskop-Spektrometer aufgenommen, welches primär aus einem diodengepumpten Festkörperlaser, einem Transmissionsgitter-Monochromator und einer Tieftemperatur-CCD-Kamera aufgebaut wurde. Dieser modulartige Eigenbau ermöglichte später die unkomplizierte Umrüstung zum eigentlichen Raman-Detektor, der zwischen HPLC und IRMS integriert werden konnte. Eine detaillierte Beschreibung der Basiskomponenten findet sich im Anhang in der Tabelle 4-1.

Eine schematische Darstellung des Raman-Mikroskop-Spektrometers zeigt die Abbildung 2-1. Das Laserlicht (grün dargestellt) wird über zwei Justagespiegel zu einem dichroitischen Strahlteiler gelenkt. Dieser spezielle Strahlteiler der Firma Semrock reflektiert unter einem Einfallswinkel von 45° mehr als 98% des s-polarisierten Laserlichts in Richtung Mikroskopobjektiv, welches das Licht auf die Probe fokussiert.

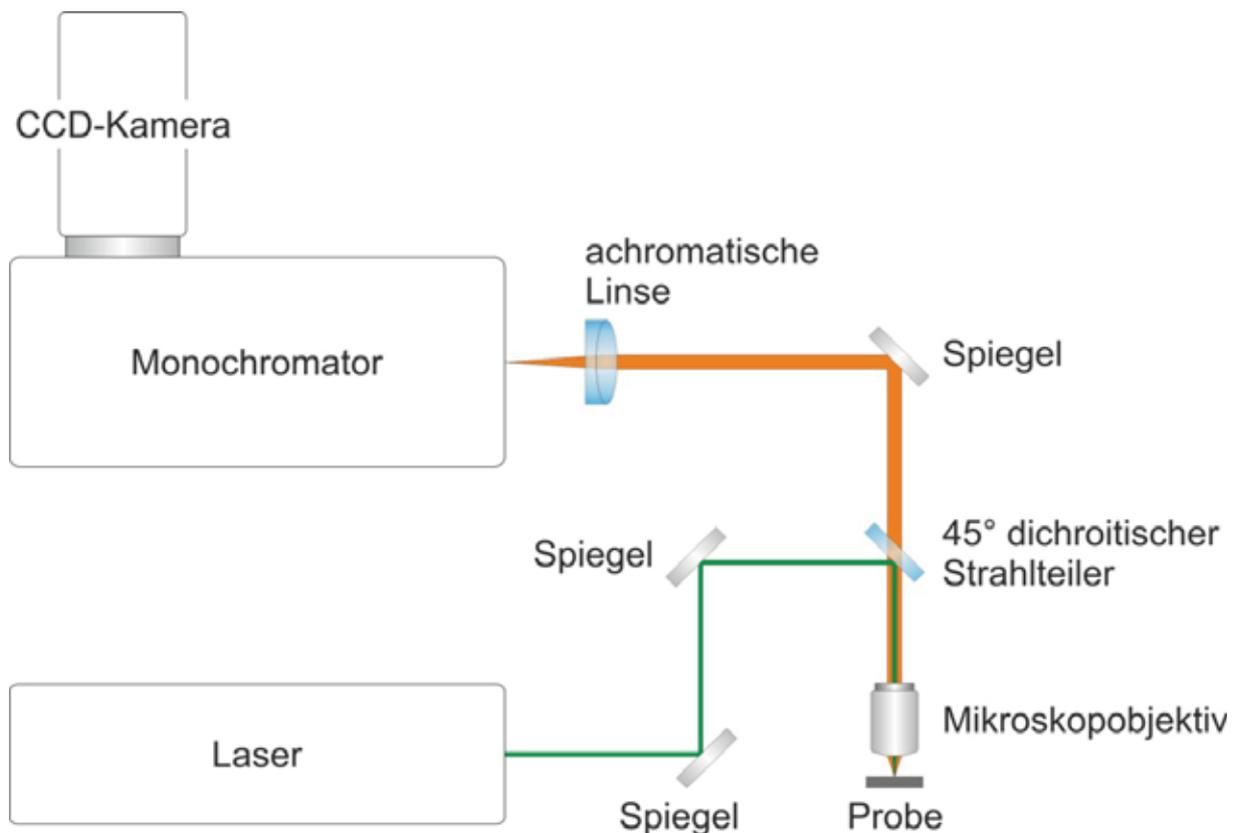


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Raman-Mikroskop-Spektrometers.

Bei dem hier eingesetzten Mikroskopobjektiv handelt es sich um ein Nikon CF IC EPI Plan SLWD mit einer 50-fach Vergrößerung, einer numerischen Apertur von 0,45 und einem Arbeitsabstand von 13,8 mm.

Das im Fokus erzeugte Raman-Streulicht (orange dargestellt) wird mit dem Mikroskopobjektiv gesammelt und wieder zum dichroitischen Strahlteiler zurückgeführt. Die Transmission des dichroitischen Strahlteilers beträgt für das zum Laserlicht frequenzverschobene Raman-Streulicht mehr als 93% ($T_{\text{avg}} > 93\%$ 538,9 – 824,8 nm) [4]. Eine Transmissionskurve des verwendeten Strahlteilers ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

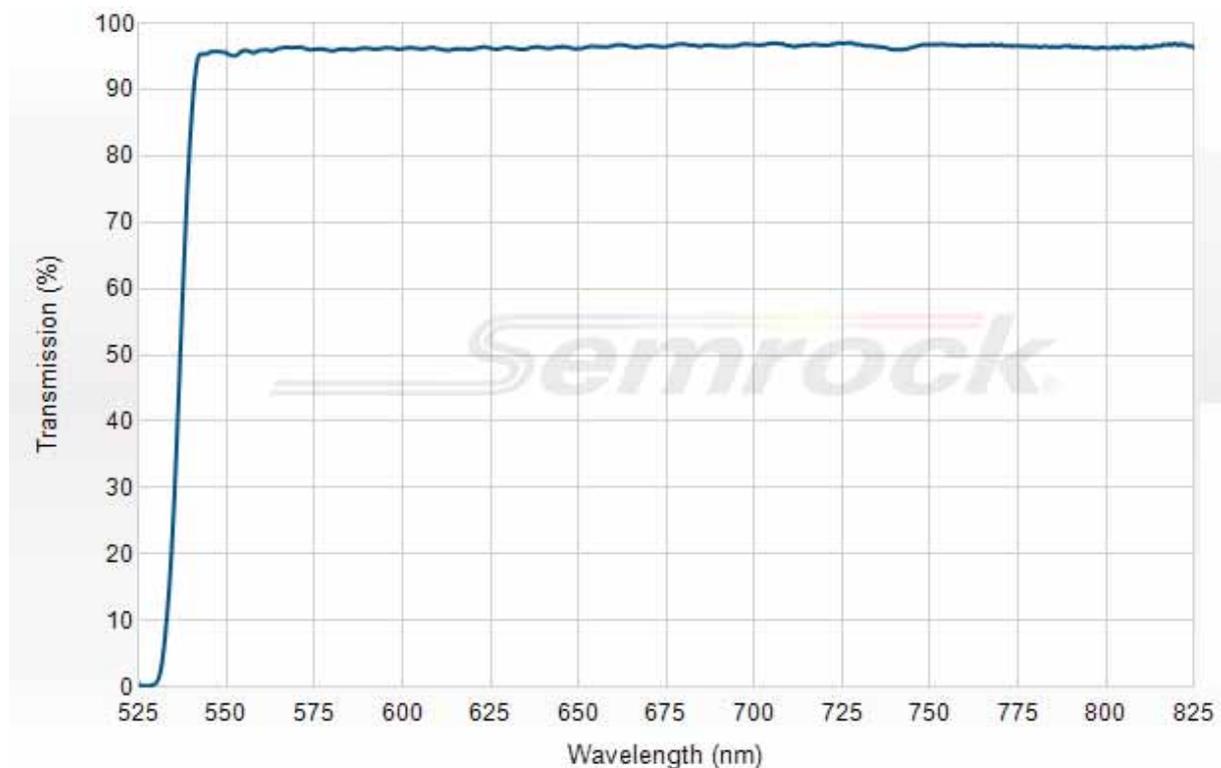


Abbildung 2-2: Transmissionskurve 45° dichroitischer Strahlteiler (Semrock LPD01-532RU-25) [4].

Nach Passieren des Strahlteilers wird das Raman-Streulicht über einen weiteren Umlenkspiegel zu einem achromatischen Zweilinser geführt und somit in den Monochromator fokussiert. Hier wird das Raman-Streulicht zunächst spektral zerlegt und anschließend zur weiteren Auswertung auf die CCD-Kamera abgebildet.

Die Abbildung 2-3 zeigt eine Fotografie des beschriebenen Raman-Mikroskop-Spektrometers. Die optische Wegführung des Laseranregungslichts und des Raman-Streulichts sind mit Hilfe der grün und rot gestrichelten Linien verdeutlicht.

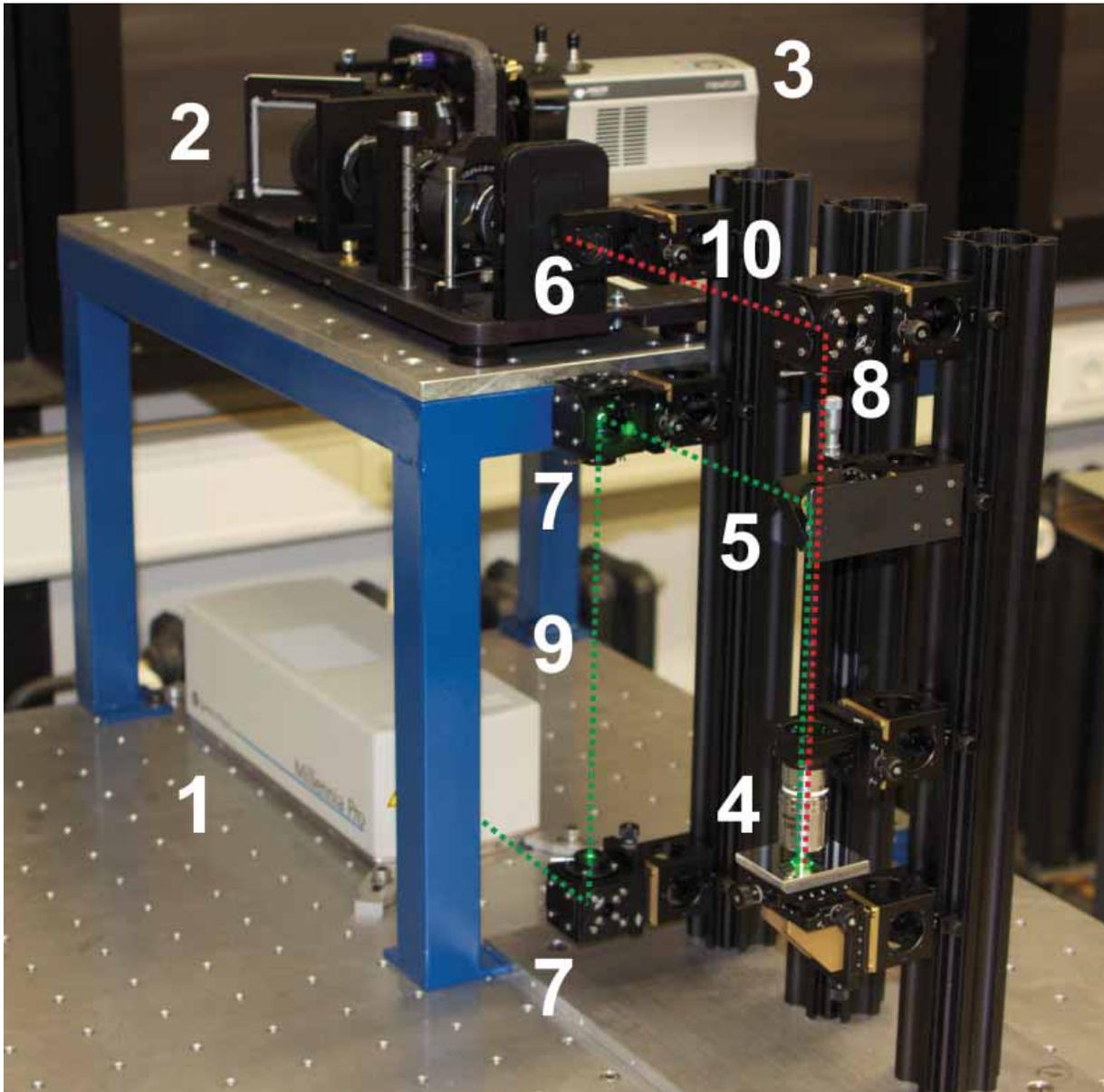


Abbildung 2-3: Raman-Mikroskop-Spektrometer: 1: Diodengepumpter Festkörperlaser (532 nm, 2 Watt), 2: Volumentransmissionsgitter-Monochromator (hier offen dargestellt), 3: Tieftemperatur CCD-Kamera, 4: Mikroskopobjektiv, 5: Dichroitischer Strahlteiler, 6: Achromatische Linse (f=35 mm), 7: Laser-Umlenkspiegel, 8: VIS-Umlenkspiegel, 9: Lichtweg Anregungslaser (grün), 10: Lichtweg Raman-Streulicht (rot).

Die Raman-Spektren der Modellsubstanzen sind im Anhang in Kapitel 4.2 hinterlegt. Probleme traten lediglich bei der Vermessung von Catechin und Rutin auf. Hier konnten aufgrund einer starken Untergrundfluoreszenz der Proben keine zufriedenstellenden Raman-Spektren aufgenommen werden.

Catechin konnte in der späteren Kopplung des Gesamtsystems (siehe Kapitel 2.11.2) allerdings problemlos Raman-spektroskopisch vermessen werden. Die Fluoreszenz ist somit nicht auf das Catechin-Molekül selbst, sondern auf eine Verunreinigung des Standards zurückzuführen, die chromatografisch abgetrennt werden konnte.

Rutin zeigte jedoch auch nach der chromatografischen Trennung eine starke Fluoreszenz. Dies bestätigt die native Eigenfluoreszenz des in die Gruppe der Flavonoide einzuordnenden Rutins [5].

2.3 Messung der Isotopensignaturen der Modellsubstanzen

Zur Überprüfung einer möglichen Isotopenfraktionierung während der Methoden- und Applikationsentwicklung sowie zur Normalisierung der Isotopenwerte auf die internationale Referenzskala wurden die in Kapitel 2.1 ausgewählten Verbindungen mittels der Elementaranalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie (EA-IRMS) sowie der Fließinjektionsanalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie (FIA-IRMS auch μ -Elementaranalyse) gegen internationale Standards normalisiert.

2.3.1 δ -Notation

Im Bereich der Isotopenverhältnismassenspektrometrie werden in der Regel keine absoluten Gehalte der einzelnen Isotope gemessen, sondern lediglich Verhältnisse von schweren zu leichten Isotopen $R({}^hE / {}^lE)_c$ (z. B. ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$) einer Probe oder einer Verbindung. Um diese Verhältnisse über längere Zeiträume und zwischen Laboratorien vergleichbar zu machen, wird dieses Verhältnis mittels der relativen Differenz des Isotopenverhältnisses einer Probe und eines internationalen Referenzmaterials in der so genannten δ -Notation auf eine internationale Skala bezogen [6]:

$$\delta^h E_{c,ref} = \frac{R({}^hE / {}^lE)_c - R({}^hE / {}^lE)_{ref}}{R({}^hE / {}^lE)_{ref}} = \frac{R({}^hE / {}^lE)_c}{R({}^hE / {}^lE)_{ref}} - 1$$

Da die Unterschiede in der natürlichen Isotopenzusammensetzung des Referenzmaterials $R({}^hE / {}^lE)_{ref}$ und der Probe $R({}^hE / {}^lE)_c$ sehr klein sind, wird das Verhältnis beider Werte oft mit 1000 multipliziert und das Ergebnis in per mill (‰) angegeben.

Für Kohlenstoff wird die internationale Skala durch das marine Karbonat Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) verwendet, welches durch das Referenzmaterial NBS19 als Anker definiert ist. Um Skaleneffekte (Skalenkompression) auszuschließen, wurde als zweiter Anker das Lithiumcarbonat LSVEC genutzt. In Tabelle 2-4 sind die Werte der Ankerpunkte zur Definition der Kohlenstoffskala $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB-LSVEC}}$ angegeben.

Tabelle 2-4: Internationale Skala für Kohlenstoff. Daten adaptiert von Coplen [7].

Element	${}^iE/{}^jE$	Skala	Anker 1		Anker 2	
			Material	$10^3 \delta^iE$	Material	$10^3 \delta^iE$
Kohlenstoff	${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB-LSVEC}}$	NBS 19	+1,95	L-SVEC	-46,6

Die Normalisierung der EA- und FIA-IRMS Werte auf die internationale Skala erfolgte, wie international gefordert [7], durch eine Zweipunktkalibration:

$$\delta^h E_{c,i-ref} = \frac{\delta^h E_{i-ref1} - \delta^h E_{i-ref2}}{\delta^h E_{m-ref1} - \delta^h E_{m-ref2}} \times (\delta^h E_c - \delta^h E_{m-ref2}) + \delta^h E_{i-ref2}$$

Zur Normalisierung der Standardsubstanzen und des EA-IRMS Arbeitsstandards (Acetanilid, 99%, Merck, Darmstadt, Deutschland) auf die internationale IAEA konforme Skala, wurden je nach zu vermessenem Bereich NBS-22 (Öl; $\delta^{13}\text{C} = -30,031 \text{ ‰}$), IAEA-CH-6 (Sucrose; $\delta^{13}\text{C} = -10,449 \text{ ‰}$) und IAEA 600 (Koffein; $\delta^{13}\text{C} = -27,771 \text{ ‰}$) verwendet [8]. Die Auswertung der EA- und FIA-IRMS Messungen erfolgte konform nach internationalen Standards [9].

2.3.2 Elementaranalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie

Zur Messung der Kohlenstoffisotopie der ausgewählten Reinsubstanzen wurde ein EA1110 Elemental Analyzer (CEInstrument, Mailand, Italien) mittels eines ConFlo IV Interface an ein MAT 253 Isotopenmassenspektrometer (beide Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) gekoppelt. In Abbildung 2-4 ist der schematische Aufbau eines EA-IRMS Systems, wie es zur Messung verwendet wurde, dargestellt.

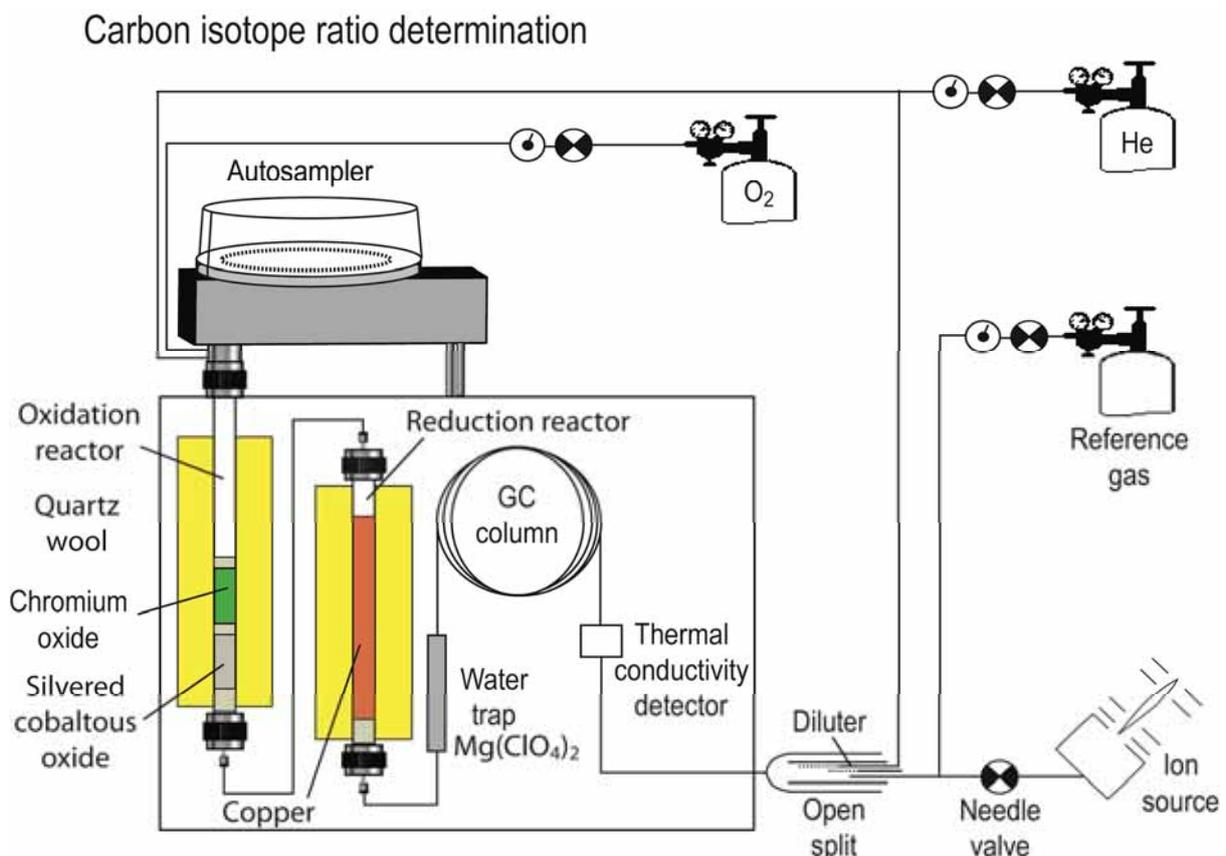


Abbildung 2-4: Aufbau zur Messung der Kohlenstoffisotopensignatur mittels EA-IRMS.

Zur Durchführung der Messung mussten die flüssigen oder festen Proben in Zinnkapseln (IVA, Meerbusch, Deutschland) versiegelt und eingewogen werden. Die so präparierten Proben wurden anschließend in das Probenaufgabekarusell gegeben, von wo sie dem Oxidationsreaktor zugeführt wurden. Durch schnelle Oxidation mittels eines Katalysators (Chromoxid, IVA, Meerbusch, Deutschland) und der Zugabe eines Sauerstoffgaspulses erfolgte die Umsetzung der zu messenden Reinsubstanz in Kohlenstoffdioxid (CO₂), Stickstoff (N₂) und Wasser bei ca. 1000°C. Die Produkte des Oxidationsprozesses wurden mittels eines Heliumstroms durch einen mit elementarem Kupfer gefüllten, ca. 600°C heißen Reduktionsreaktor geführt. In diesem wurde der freigesetzte Sauerstoff gebunden und Spuren von Stickoxiden zu elementarem Stickstoff reduziert. Nach der Reduktion erfolgten die Trocknung der Gase durch Magnesiumperchlorat (Mg(ClO₄)₂) (IVA, Meerbusch, Deutschland) sowie die Trennung von Stickstoff und Kohlenstoffdioxid mittels einer gepackten Säule (3,5 m, Porapak PQ (80/100 mesh)) bei 40°C. Die separierten Gase wurden über einen open-split in das Isotopenverhältnismassenspektrometer überführt.

2.3.3 Fließinjektionsanalyse-Isotopenverhältnismassenspektrometrie

Zur Normalisierung wasserlöslicher Verbindungen sowie zur Untersuchung möglicher Isotopeneffekte durch die Hochtemperatur-Flüssigchromatografie kann die FIA-IRMS eingesetzt werden. International hat sich mittlerweile der Begriff Fließinjektionsanalyse gegenüber dem zu Anfang der Entwicklung benutzten Begriff μ -Elementaranalyse durchgesetzt [10].

Bei der FIA-IRMS wurden die Reinsubstanzen in Wasser gelöst und ohne vorherige chromatografische Trennung über eine Probenschleife direkt in das Liquiface Interface (Thermo, Bremen, Deutschland) injiziert (siehe Abbildung 2-5). Die Oxidation erfolgte analog zur HPLC-IRMS-Kopplung ebenfalls mittels nasschemischer Oxidation. Um Variationen im Ionisationsprozess zu eliminieren, wurde der Druck des Referenzgases während der FIA Messungen nicht geändert.

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit konnten die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Substanzen nicht auf diese Weise bestimmt werden, sodass in diesen Fällen nur EA-Messungen vorliegen.

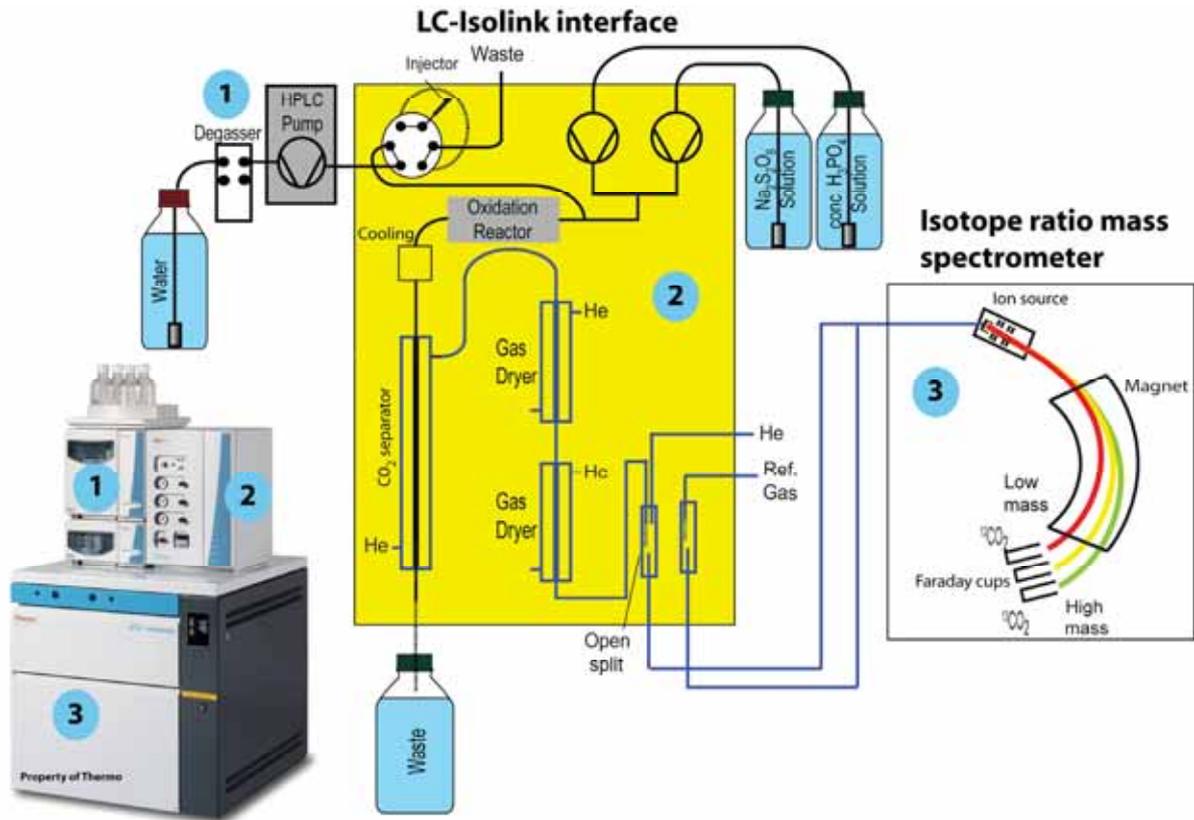


Abbildung 2-5: Aufbau zur Messung der Kohlenstoffisotopensignatur mittels FIA-IRMS.

In Tabelle 2-5 sind die mittels EA- und FIA-IRMS ermittelten Kohlenstoffisotopensignaturen der ausgewählten Reinsubstanzen aufgeführt.

Tabelle 2-5: Kohlenstoffisotopensignaturen der ausgewählten Reinsubstanzen.

Substanzname	Lieferant und Reinheit	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte EA-IRMS, (n \geq 3; \pm 1 σ)	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte FIA-IRMS (n \geq 3; \pm 1 σ)
19-Nortestosteron	Sigma-Aldrich \geq 99%	-28,69 \pm 0,03	-
Testosteron	Sigma-Aldrich \geq 95%	-29,42 \pm 0,02	-
cis-Androsteron	Acros Organics \geq 97%	-31,18 \pm 0,02	-
trans-Dehydroandrosteron ^{a)}	Sigma-Aldrich \geq 99%	-	-
5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol	Sigma-Aldrich \geq 95%	-29,56 \pm 0,05	-
Epitestosteron	Sigma-Aldrich \geq 95%	-31,56 \pm 0,02	-
Etiocholan-3 α -ol-17-on	Sigma-Aldrich \geq 95%	-33,16 \pm 0,04	-
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol	Sigma-Aldrich \geq 95%	-31,08 \pm 0,01	-
Sulfadiazin	Sigma-Aldrich \geq 99%	-29,20 \pm 0,2	-31,6 \pm 0,4
Sulfathiazol	Fluka \geq 98%	-26,64 \pm 0,04	-29,6 \pm 0,4
Sulfamerazin	Sigma-Aldrich \geq 99%	-28,90 \pm 0,03	-31,2 \pm 0,4
Sulfamethazin ^{a)}	Sigma-Aldrich \geq 99%	-	-
Sulfamethoxazol	Sigma-Aldrich \geq 99,9%	-30,30 \pm 0,2	-27,91 \pm 0,02
Trimethoprim	Sigma-Aldrich \geq 99,1%	-37,60 \pm 0,2	-34,15 \pm 0,04
Aspartam	Sigma-Aldrich \geq 98%	-17,59 \pm 0,03	-
Koffein	Sigma-Aldrich \geq 97%	-35,56 \pm 0,08	-40,72 \pm 0,06
Catechin	Fluka \geq 98,5%	-26,15 \pm 0,08	-
Rutin	Acros Organics \geq 97%	-28,60 \pm 0,02	-

^{a)}Verbindung hat sich für die Methodenentwicklung als irrelevant herausgestellt.

2.3.4 Messung des verwendeten Referenzgases

Das verwendete Kohlendioxid Referenzgas ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2, \text{VPDB}} = -37,81 \text{ ‰}$ ($n = 5$)) wurde am Institut für Grundwasserökologie des Helmholtz Zentrums München mittels Dual-Inlet-IRMS eingemessen. Dazu wurde das als Referenzgas benutzte Kohlendioxidgas in mehrere evakuierte und mit Holland-Hähnen bestückte Gasmäuse gefüllt. Das eingemessene Gas wurde zur Korrektur von Ionisierungseffekten in der Ionenquelle sowie zur Sensitivitätsberechnung (Berechnung der relativen Peakfläche pro Kohlenstoffatom) benutzt.

2.4 Entwicklung des Raman-Detektors

2.4.1 Experimenteller Ansatz unter Einsatz der Raman-Mikroskopie

Zu Beginn des Projekts wurde ein experimenteller Ansatz unter Einsatz der Raman-Mikroskopie verfolgt. Der experimentelle Aufbau entspricht dabei prinzipiell dem Aufbau des Raman-Mikroskop-Spektrometers, welches bereits für die Erstellung der Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank (siehe Abbildung 2-1) genutzt wurde. Der für Feststoffe gedachte Probenträger wird durch eine Durchflusszelle ersetzt, die ein Fenster für die Lasereinkopplung und Raman-Streulichtabnahme besitzt. Ein Beispiel für eine Durchflusszelle mit optischem Fenster zeigt die Abbildung 2-6. Solche aus Quarzglas bestehenden Kapillaren (Fused Silica Capillary Tubing) sind kommerziell erhältlich und werden üblicherweise bei der Kapillarelektrophorese eingesetzt [11]. Aufgrund der sehr glatten Innenwand und einer guten Druckstabilität ist diese Kapillare für flüssigchromatografische Anwendungen sehr gut geeignet. Zudem sind Innendurchmesser zwischen 50 und 250 μm erhältlich, so dass eine problemlose Integration in das bestehende HPLC-System gewährleistet ist.



Abbildung 2-6: Kapillare aus Quarzglas mit Fenster der Firma *Polymicro Technologies*, USA [11].

Als Vorversuch dieses experimentellen Ansatzes wurde zunächst die Nachweisstärke der Raman-Mikroskopie für verdünnte Lösungen untersucht. Exemplarisch wurden dazu Konzentrationsreihen von wässrigen Koffein-Lösungen in Quarzglasküvetten angesetzt. Diese wurden mit dem in Kapitel 2.2 beschriebenen Raman-Mikroskop-Spektrometer vermessen, indem die Küvetten auf dem Probenstisch in den Fokus des Lasers justiert wurden. Die Laserleistung wurde auf eine maximale Leistung von 2 Watt eingestellt.

Die Messzeit wurde an die Peakbreite von Koffein nach einer flüssigkeitschromatografischen Trennung angepasst. Abbildung 2-7 zeigt das UV-Chromatogramm der Trennung von

Koffein, Theobromin und Theophyllin. Die Messzeit, die für eine online-Raman-Messung zur Verfügung steht, wurde auf 10 Sekunden festgelegt.

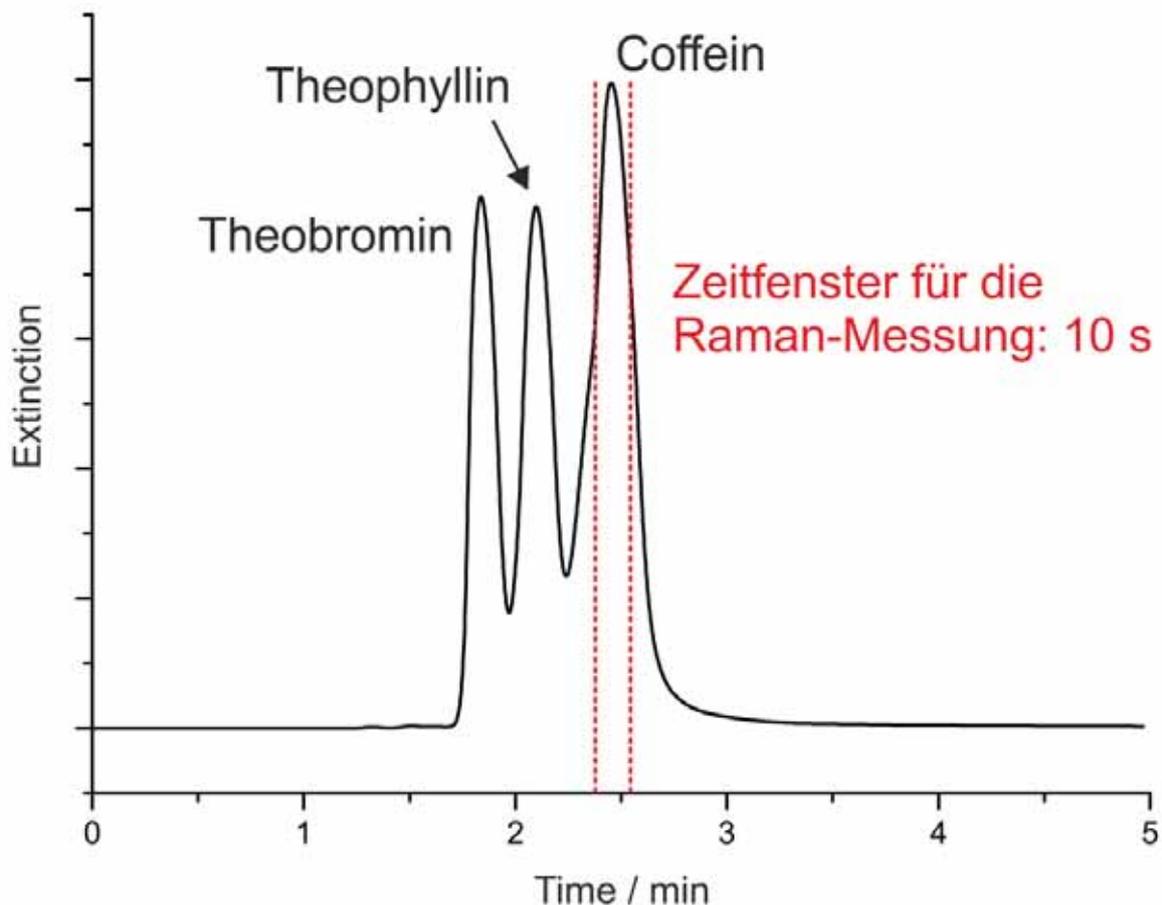


Abbildung 2-7: UV-Chromatogramm von Koffein, Theobromin und Theophyllin.

Die gemessenen Raman-Spektren sind in Abbildung 2-8 dargestellt. Bei einer Laserleistung von 2 Watt und einer Messzeit von 10 s liegt die Nachweisgrenze der Raman-Mikroskopie bei einer Konzentration von $62,5 \text{ mg L}^{-1}$. Bei niedrigeren Konzentrationen lag das Signal-zu-Rauschverhältnis unter 2:1 und die Raman-Signale des Koffeins konnten nicht mehr eindeutig zugeordnet werden.

Die Nachweisgrenze der Raman-Mikroskopie liegt demnach etwa um den Faktor 60 über der definierten Zielkonzentration von 1 mg L^{-1} . Die konventionelle Raman-Mikroskopie scheidet daher für das Kopplungsvorhaben aus.

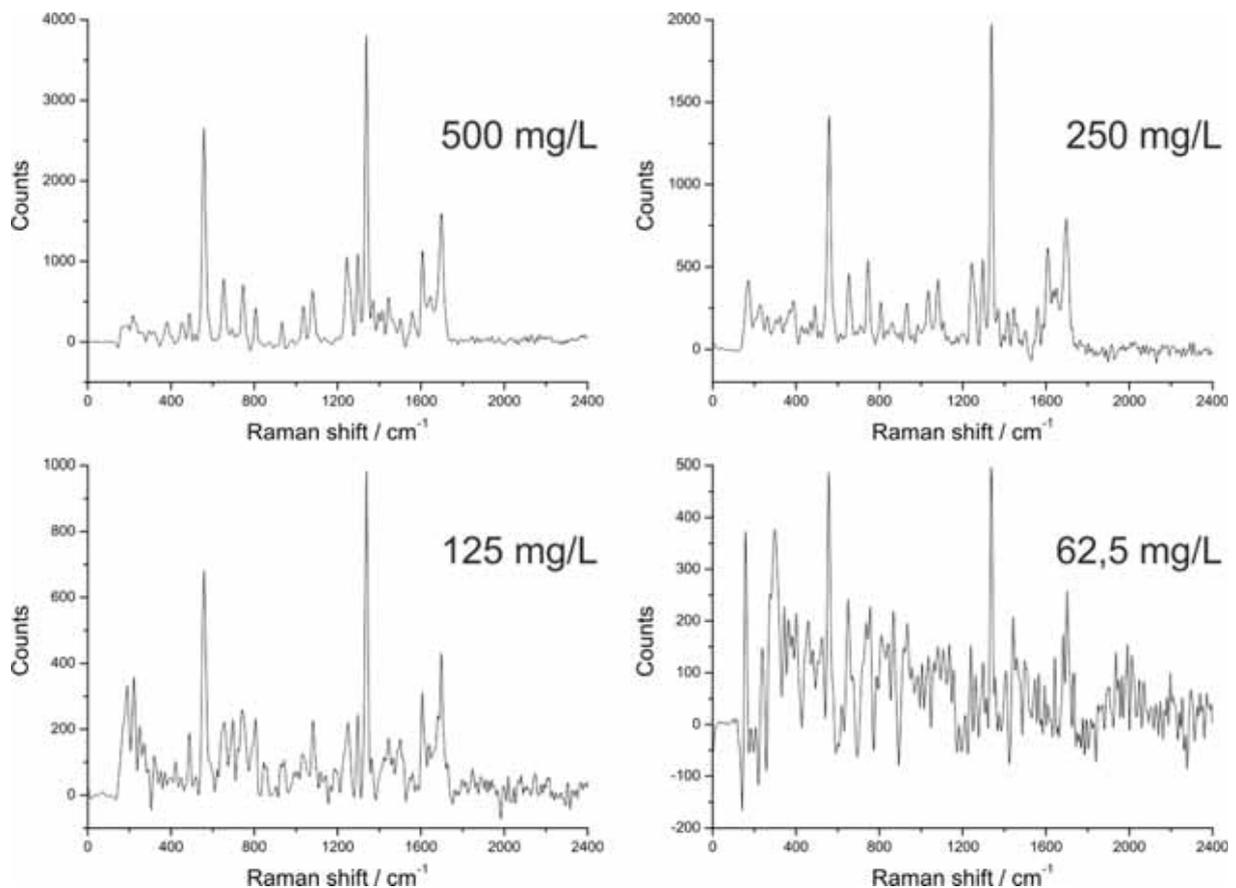


Abbildung 2-8: Raman-Spektren von wässrigen Koffein-Lösungen, untergrundkorrigiert.

2.4.2 Experimenteller Ansatz unter Einsatz eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters

Als Alternative zur Raman-Mikroskopie wurde ein anderer experimenteller Ansatz gewählt, bei dem die Durchflusszelle als Flüssigkern-Lichtwellenleiter ausgelegt ist. Das Grundprinzip dieser Technologie wurde in der Vergangenheit auch schon von anderen Arbeitsgruppen für die Kopplung von HPLC und Raman-Spektroskopie angewendet [12-17]. Die Abbildung 2-9 zeigt schematisch das Funktionsprinzip der lichtleitenden Durchflusszelle, welche analog einer optischen Glasfaser nach dem Prinzip der Totalreflexion arbeitet. Der lichtleitende Kern ist die mobile Phase der HPLC, in diesem Fall gepuffertes Wasser. Der Brechungsindex des Phosphatpuffers kann aufgrund seiner niedrigen Konzentration von 20 mmol L^{-1} dem von reinem Wasser gleichgesetzt werden und liegt bei etwa 1,33. Der Mantel muss das optisch dünnere Medium sein, mit einem Brechungsindex kleiner 1,33. Hier wurde das amorphe Fluoropolymer „Teflon AF 2400“ verwendet, welches bei der hier ausgewählten Anregungswellenlänge von 532 nm einen Brechungsindex kleiner 1,30 besitzt [18]. Kapillaren aus Teflon AF sind kommerziell verfügbar, allerdings nach unserem

Kenntnisstand nur in den USA. Im Rahmen des Projekts wurden Kapillaren von den Firmen *Random Technologies* und *Biogeneral* bezogen.

Die Einkopplung des Laserlichts in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter, sowie die Auskopplung des Raman-Streulichts kann, im Gegensatz zur Raman-Mikroskopie, nicht senkrecht zur Durchflusszelle, sondern muss längsseitig erfolgen. Dazu wird das Laserlicht mit Hilfe eines Lichtwellenleiters (Quarzfaser) über ein T-Stück in die Durchflusszelle eingekoppelt.

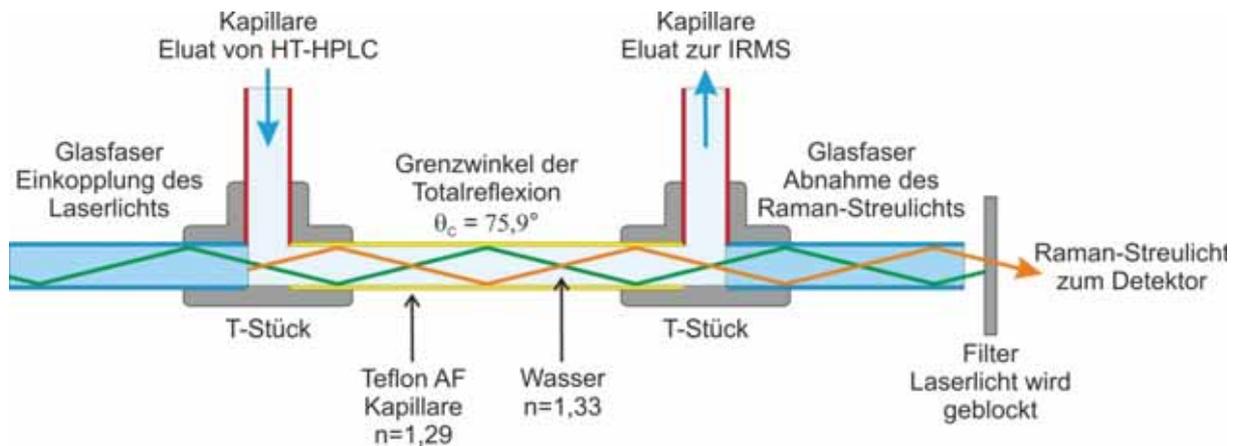


Abbildung 2-9: Durchflusszelle nach dem Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters.

Das in der Durchflusszelle erzeugte Raman-Streulicht wird auf der anderen Seite über ein zweites T-Stück mittels einer weiteren Quarzfaser abgenommen und kann so zu Monochromator und Detektor geführt werden. In Abbildung 2-10 ist eine Übersicht der Kombination von Durchflusszelle und Raman-Spektrometer dargestellt.

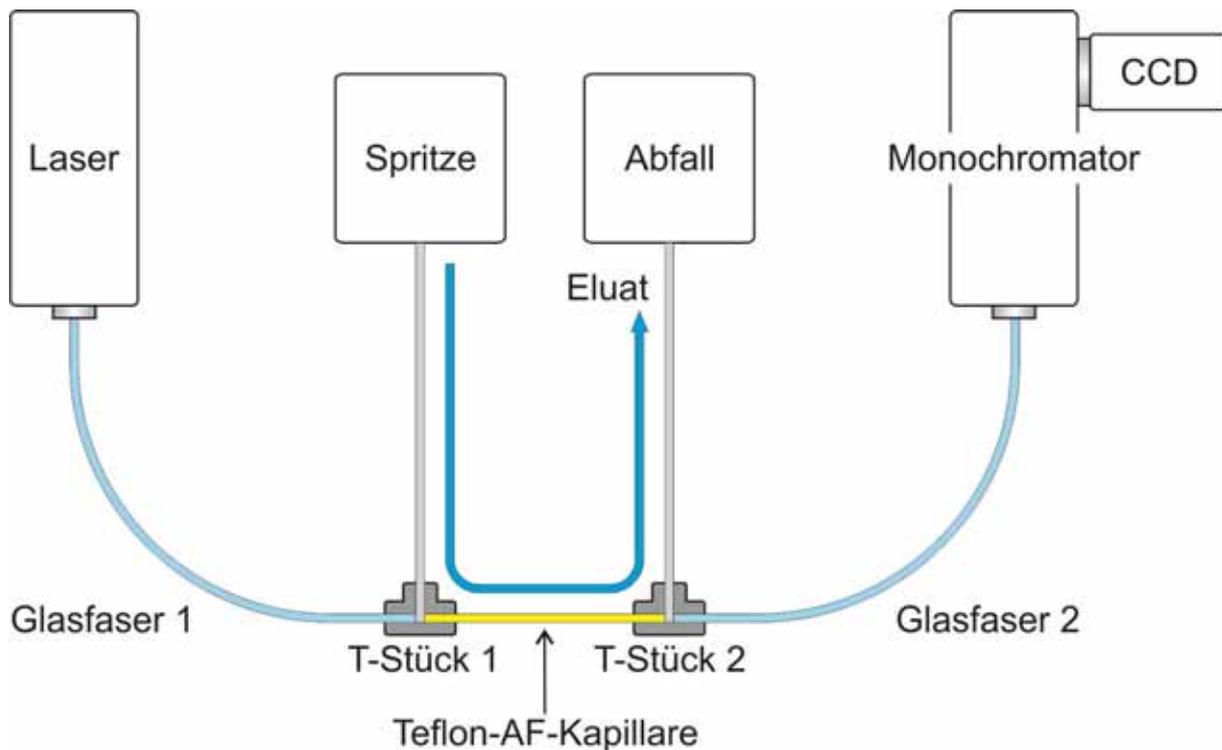


Abbildung 2-10: Integration der Durchflusszelle in die Raman-Apparatur.

Bevor die HPLC-Raman-Kopplung erfolgte, wurden die Lösungen der jeweiligen Analyten zunächst manuell mittels einer Spritze durch die Durchflusszelle gepumpt. Ein erster Versuch wurde mit einer relativ hoch konzentrierten Koffein-Lösung von 10 g L^{-1} durchgeführt. Das erhaltene Spektrum ist in Abbildung 2-11 dargestellt. Entgegen aller Erwartungen sind auf den ersten Blick keine Raman-Signale von Koffein zu erkennen. Die Abbildung 2-11 zeigt das Raman-Spektrum von Quarzglas, welches in der Einkoppel-Quarzfaser erzeugt und bis zum Detektor durchgeleitet wird. Dieses Raman-Signal ist so intensiv, dass der CCD-Chip der Kamera bei einer Laserleistung von 50 mW und einer Belichtungszeit von 1 s überbelichtet wird.

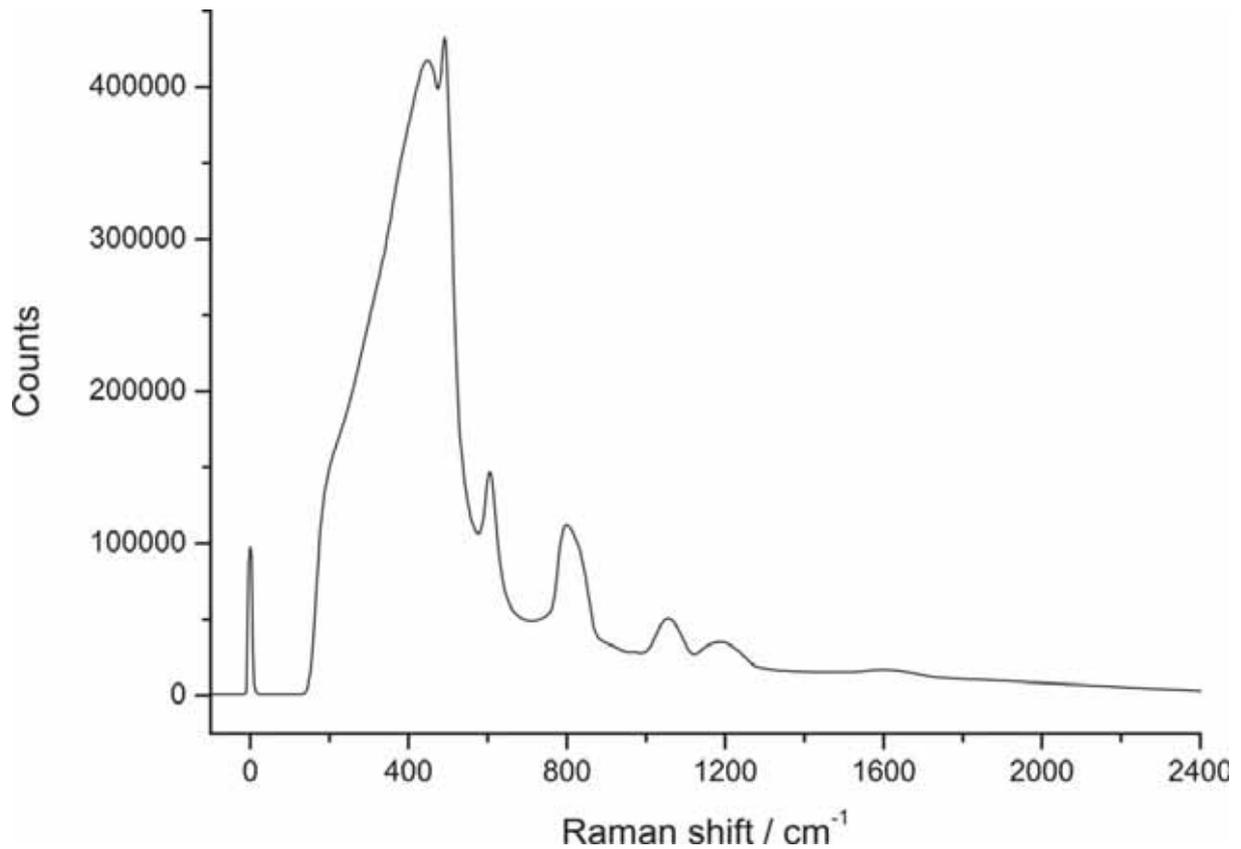


Abbildung 2-11: Raman-Spektrum einer Koffein-Lösung (10 g L^{-1}) mit dem Versuchsaufbau nach Abbildung 2-10.

Bei einer Vergrößerung des Bereichs zwischen 1250 und 1650 cm^{-1} , in dem Koffein bei 1339 cm^{-1} ein sehr starkes Raman-Signal aufweist (siehe Anhang Abbildung 4-11), können die beobachteten Raman-Signale dem Koffein zugeordnet werden. Der vergrößerte Ausschnitt ist in Abbildung 2-12 dargestellt.

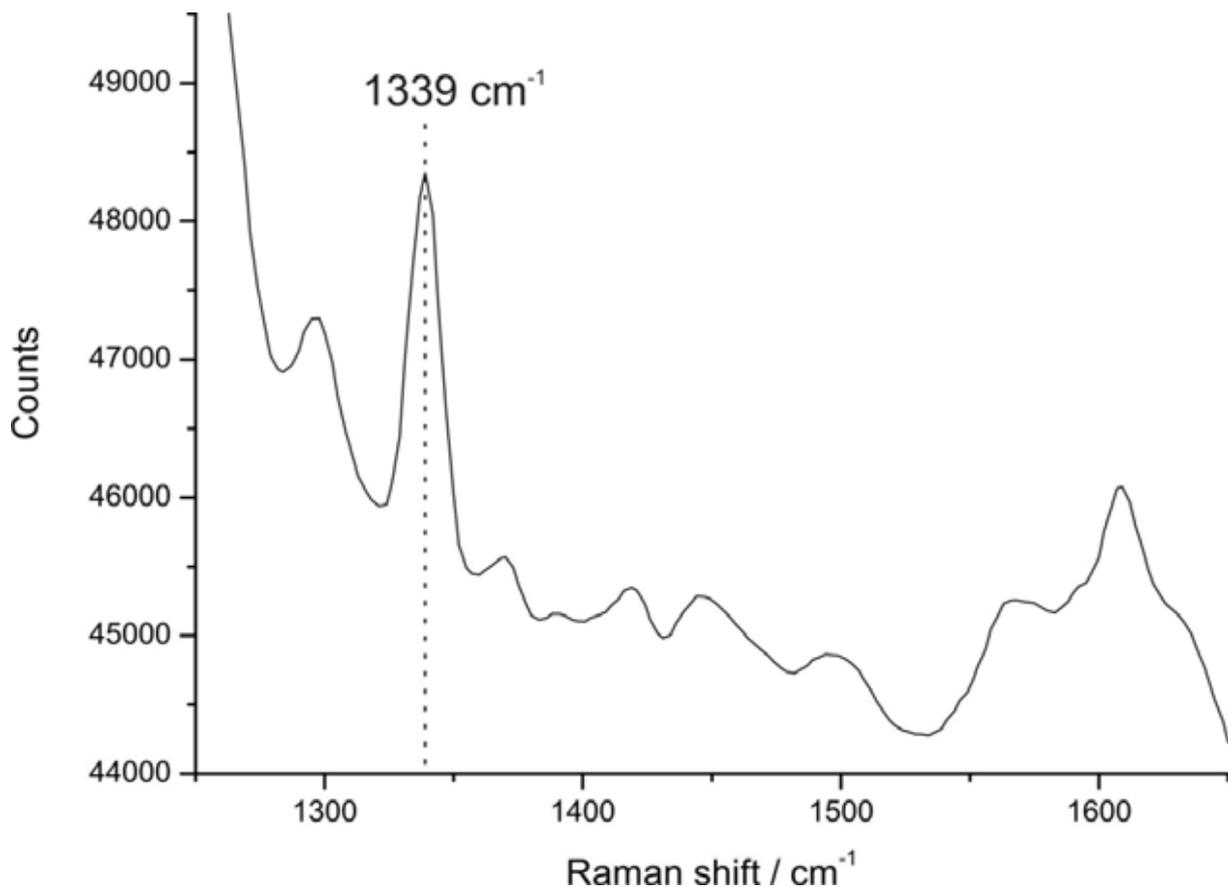


Abbildung 2-12: Raman-Signale von Koffein; vergrößerter Ausschnitt der Abbildung 2-11.

Der Vergleich der Intensität des Koffein-Signals bei 1339 cm^{-1} zwischen der Messung mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter und den Raman-mikroskopischen Messungen (siehe Abbildung 2-8) belegt, dass durch den neuen Versuchsaufbau bei Anpassung der Konzentration, der Belichtungszeit und der Laserleistung ein ca. 10 mal stärkeres Raman-Signal von Koffein erhalten wird. Somit bietet das Verfahren auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters ein enormes Potential für die Raman-spektroskopische Untersuchung von HPLC-Eluaten.

Um nun längere Belichtungszeiten und demzufolge eine höhere Laserleistung zu ermöglichen, musste das Untergrund-Raman-Signal der Quarzfaser reduziert werden. Dazu wurde ein Kantenfilter auf die Stirnfläche der Einkoppel-Faser aufgebracht, der das Laserlicht in die Durchflusszelle passieren lässt, das Raman-Streulicht des Quarzglases allerdings blockiert. Diese neuartige Beschichtung für Lichtwellenleiter, die von der Firma *Laser Components* durchgeführt wurde, war mit einem erheblichen zeitlichen Aufwand verbunden. Das folgende Diagramm (Abbildung 2-13) zeigt das Transmissionsspektrum der mit Kantenfilter beschichteten Quarzfaser. Die Laserwellenlänge mit 532 nm passiert den Kantenfilter zu 85% . Ab einer Wellenlänge von 549 nm , die im Raman-Spektrum einer Frequenzverschiebung von 582 cm^{-1} entspricht, liegt die Transmission bei nur noch 1% .

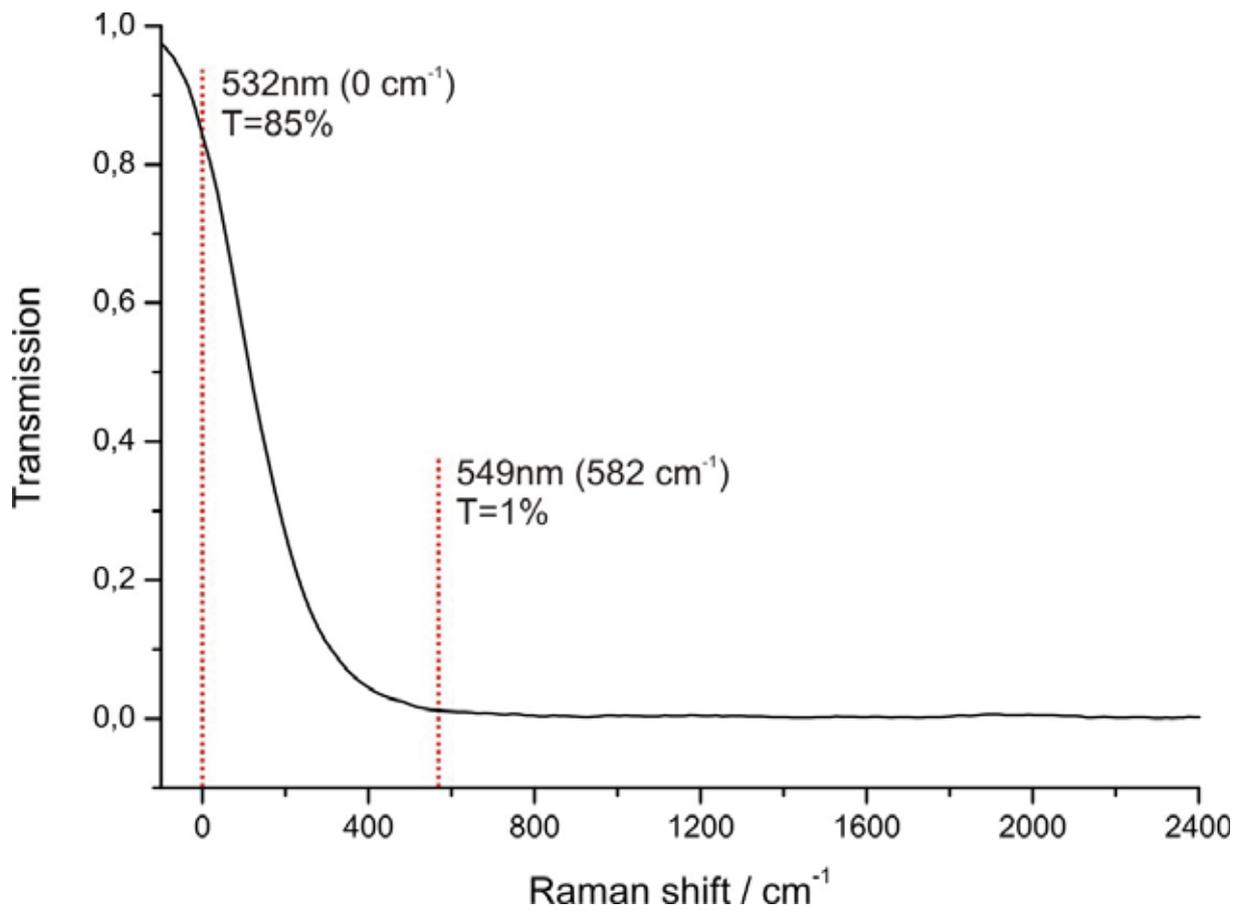


Abbildung 2-13: Transmissionsspektrum einer mit Kantenfilter beschichteten Quarzfaser.

Die beschichtete Faser wurde anschließend in das System eingebaut und die Raman-Messungen an der Koffein-Lösung wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 2-14 dargestellt. Die schwarze Linie zeigt die Messung ohne Beschichtung, die rote Linie stellt die Raman-Messung mit Kantenfilter dar. Demnach konnte das Untergrund-Raman-Signal des Quarzglasens enorm reduziert werden.

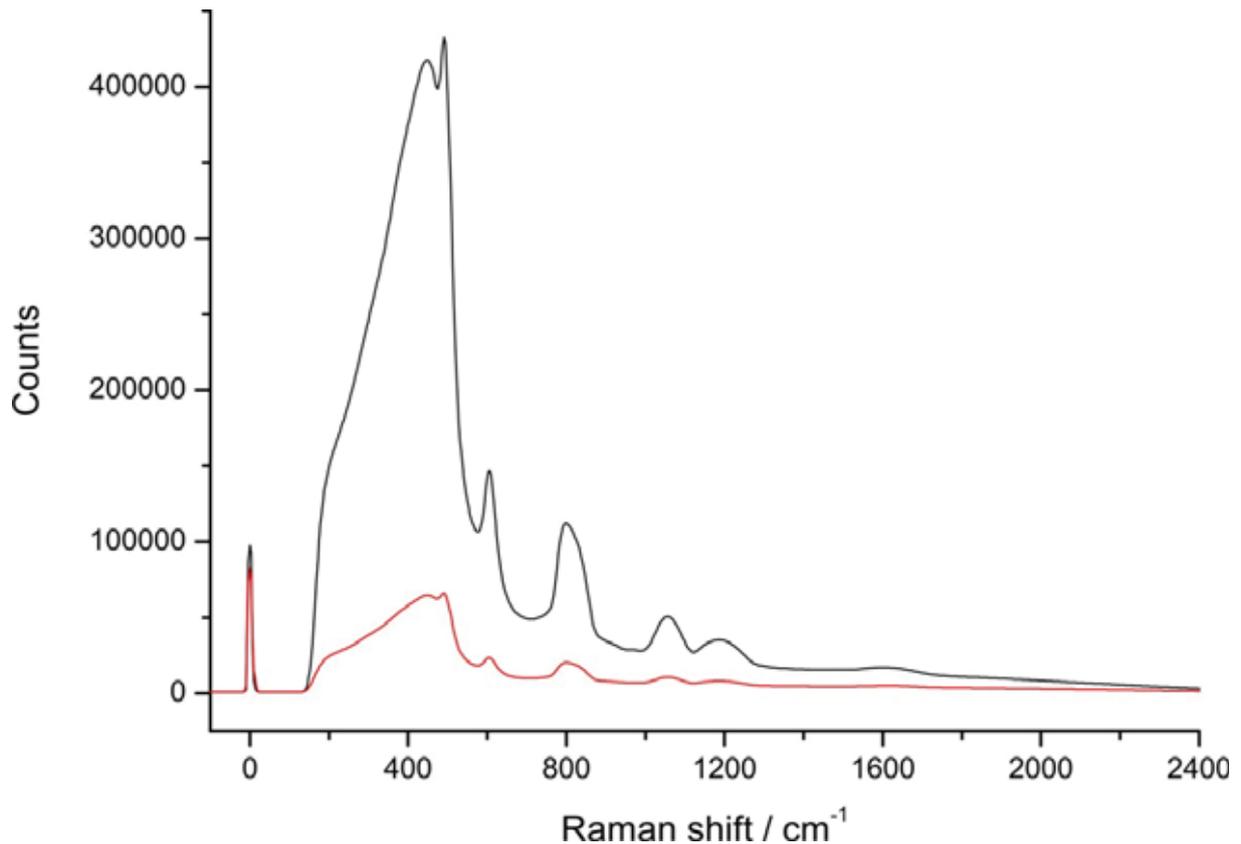


Abbildung 2-14: Raman-Spektrum einer Koffein-Lösung (10 g L^{-1}) mit dem Versuchsaufbau nach Abbildung 2-10; schwarz: ohne Beschichtung, rot: beschichtete Einkoppel-Faser.

Im Folgenden wurden die Koffein-Lösungen weiter verdünnt sowie die Belichtungszeit und die Laserleistung erhöht. Die Messergebnisse sind in Abbildung 2-15 dargestellt. Die absolute Nachweisgrenze wurde anhand des besonders stark ausgeprägten Raman-Übergangs bei 1339 cm^{-1} zu 1 mg L^{-1} ermittelt. Es konnte im Vergleich zu den Messungen mit dem Raman-Mikroskop-Spektrometer eine Verbesserung der Nachweisgrenze um den Faktor 60 erreicht werden.

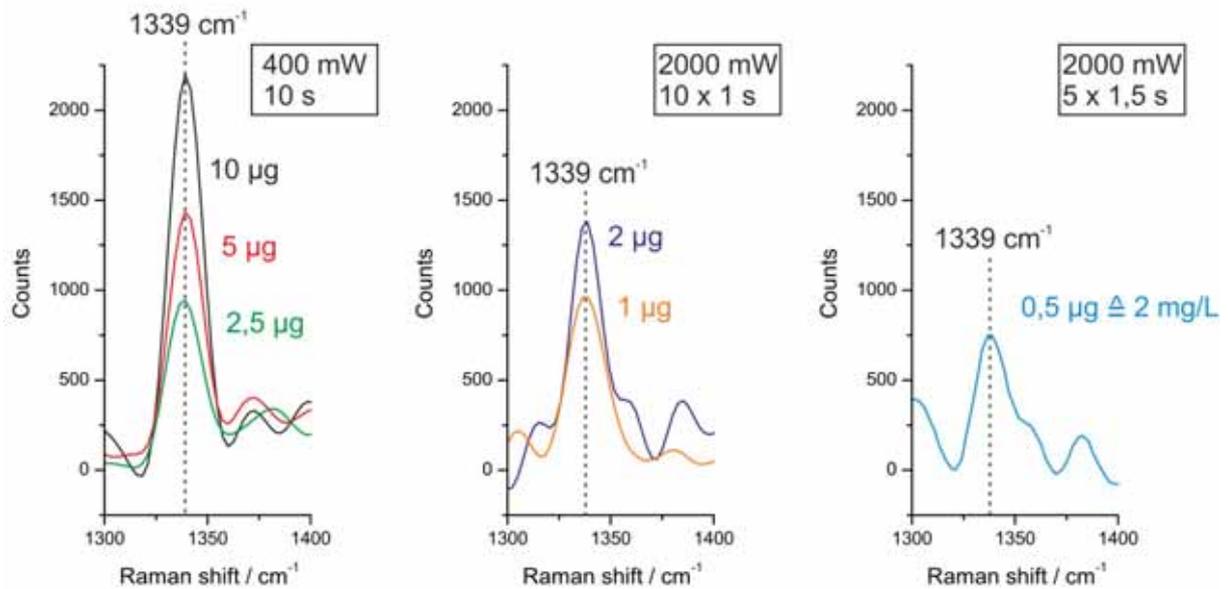


Abbildung 2-15: Konzentrationsreihen von Koffein-Lösungen. Auswertung des Raman-Signals bei 1339 cm^{-1} .

Es muss hier allerdings erwähnt werden, dass in diesem unteren Konzentrationsbereich nur noch das Schlüsselsignal bei 1339 cm^{-1} beobachtet werden konnte. Alle anderen Raman-Signale des Koffeins lagen im Untergrundrauschen des Detektors. Für die spätere Kopplung im Gesamtsystem ist daher eine weitere Verbesserung der Nachweisstärke nötig, um eine eindeutige Identifikation der detektierten Modellsubstanzen anhand mehrerer Schlüsselbanden vornehmen zu können. Die weitere Optimierung des Raman-Detektors wird in Kapitel 2.6 beschrieben.

2.5 Implementierung des Raman-Detektors in das HPLC-System

Zur Realisierung der HPLC-Raman-Kopplung wurde der HHU ein HPLC-System vom IUTA zur Verfügung gestellt. Die Kopplung ist in Abbildung 2-16 dargestellt.

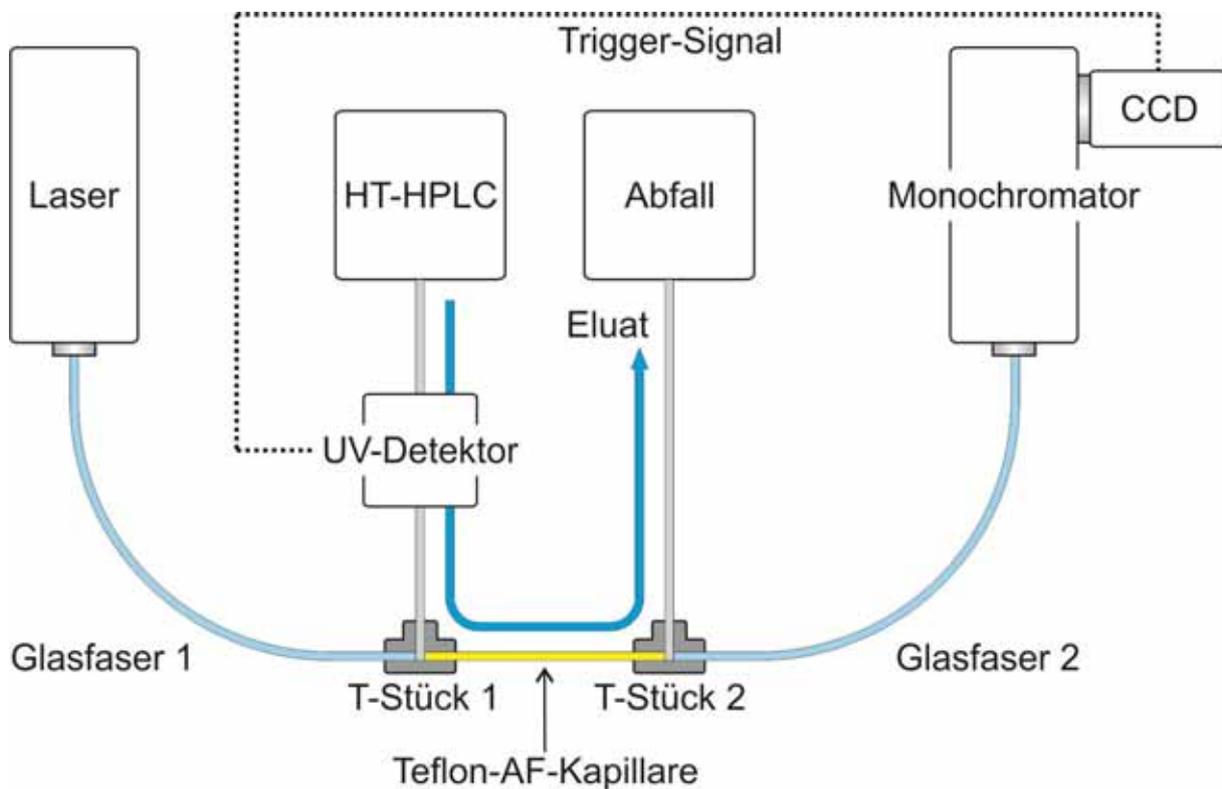


Abbildung 2-16: Kopplung von HT-HPLC und Raman-Detektor.

Bevor das Eluat über das T-Stück 1 in die Durchflusszelle gelangt, wird es von einem standardmäßigen HPLC-UV-Detektor analysiert. Bei Detektion eines Analyten gibt der UV-Detektor ein Trigger-Signal an die CCD-Kamera aus. Somit kann eingestellt werden, dass die Raman-Messung immer dann durchgeführt wird, wenn sich auch gerade ein Analyt in der Durchflusszelle befindet. Die Funktionsweise der Kopplung von HPLC und Raman-Detektor ist zunächst exemplarisch anhand der beiden Antibiotika Sulfadiazin und Sulfathiazol durchgeführt worden. Dazu wurden $10 \mu\text{L}$ einer 100 mg L^{-1} Stammlösung der beiden Sulfonamide injiziert. Die Abbildung 2-17 zeigt das resultierende UV-Chromatogramm und die zugehörigen Raman-Spektren.

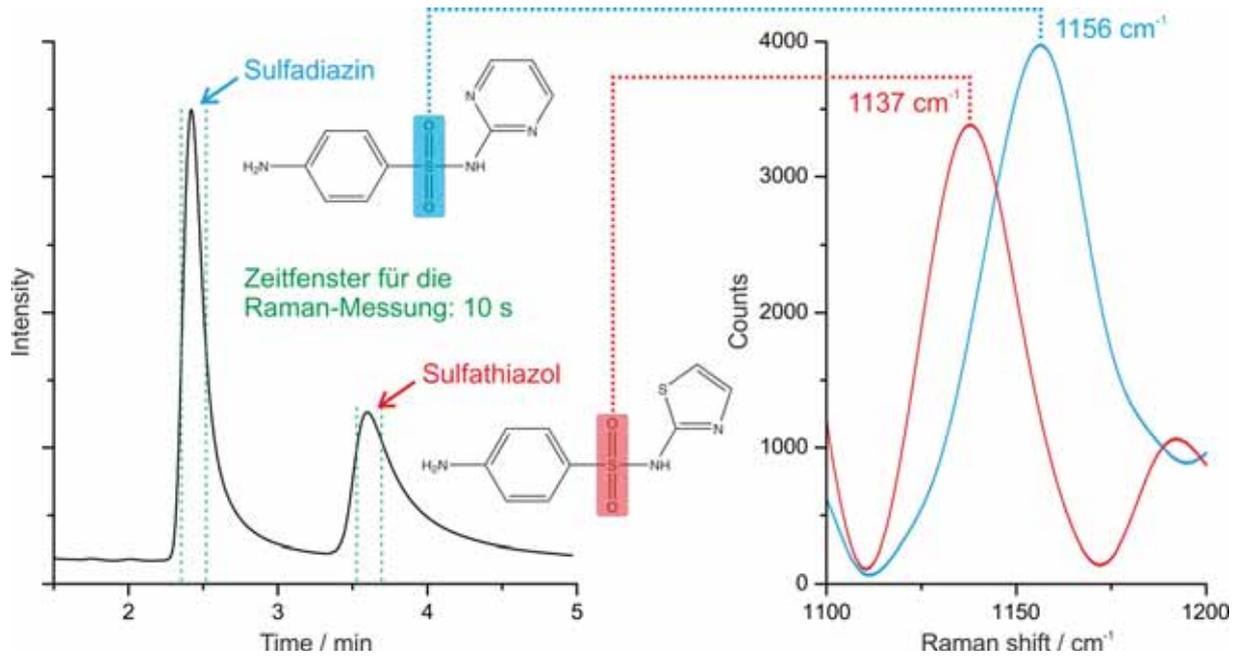


Abbildung 2-17: HPLC-Raman-Kopplung am Beispiel von Sulfadiazin und Sulfathiazol. Konzentration: 100 mg L⁻¹; Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C₁₈, 100 x 2,1 mm; 3,5 µm; Mobile Phase: Phosphat Puffer pH 2,2; Flussrate: 1 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Injektionsvolumen: 10 µL.

Die Abbildung zeigt auf der linken Seite die chromatografische Trennung von Sulfadiazin und Sulfathiazol mittels UV-Detektion. Für eine Identifizierung bzw. Zuordnung der Substanzen wurde der Raman-Detektor eingesetzt. Dazu wurden die stark ausgeprägten Raman-Signale der O=S=O-Gruppen beider Sulfonamide beobachtet. Sulfadiazin zeigt ein Peak-Maximum bei 1156 cm⁻¹ und ist damit um 19 cm⁻¹ von dem Raman-Signal des Sulfathiazols bei 1137 cm⁻¹ verschoben.

Anhand des Elutionsprofils lässt sich die Peakkonzentration auf 0,5 mg L⁻¹ berechnen. Wie auch schon bei den vorangegangenen Messungen des Koffeins basiert die Zuordnung der beiden Sulfonamide auf dem Schlüsselsignal der O=S=O-Gruppe. Andere Raman-Übergänge konnten in diesem Konzentrationsbereich nicht detektiert werden.

2.6 Optimierung des Raman-Detektors

2.6.1 Beschichtung des Auskoppel-Lichtwellenleiters zur Raman-Streulichtabnahme

Vor Zusammenführung des HPLC-Raman-Systems mit der IRMS sollte der Detektor hinsichtlich der bestmöglichen Nachweisstärke optimiert werden. Ziel war es, neben besonders stark ausgeprägten Raman-Signalen, zusätzliche Raman-Übergänge zur eindeutigen Identifizierung der Modellsubstanzen zu erhalten.

Der begrenzende Faktor, der maßgeblich auf die Nachweisgrenze des Raman-Detektors Einfluss nimmt, ist das immer noch recht hohe Untergrund-Raman-Signal der Quarzfasern. Dieses Raman-Signal führt schon bei einer sehr geringen Laserleistung und kurzen Belichtungszeiten zu einer Überbelichtung des CCD-Chips der Kamera.

Bei dem in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Aufbau ist zu beachten, dass bisher nur die Glasfaser zur Laserlicht-Einkopplung mit einem Kantenfilter beschichtet wurde. Das Laseranregungslicht kann somit weitestgehend ungehindert in die Durchflusszelle eingekoppelt werden, während die in der Quarzfaser entstehende Glas-Raman-Streuung blockiert wird. Allerdings wird das Laserlicht nicht nur durch die gesamte Durchflusszelle geleitet, sondern gelangt zu einem beträchtlichen Teil auch in die Raman-Streulicht-Auskoppelfaser (siehe Abbildung 2-9). Hier wird ebenfalls Glas-Raman-Streulicht erzeugt, welches ungehindert zum Detektor gelangt. Zur Vermeidung dieses ungewünschten Raman-Streulichts kann auch die Auskoppelfaser mit einem Kantenfilter beschichtet werden (siehe Abbildung 2-19). In diesem Fall sollte das Laserlicht weitestgehend blockiert werden, während das erwünschte Raman-Streulicht des Analyten aus der Durchflusszelle den Kantenfilter passiert und den Detektor erreicht.

Vor diesem Hintergrund wurde ein weiterer Beschichtungsauftrag an die Firma *Laser Components* vergeben. Die Abbildung 2-18 zeigt die Ergebnisse dieser Beschichtung anhand zweier Transmissionskurven. Bei dem schwarzen Graphen handelt es sich um die Beschichtung einer SMA-Stecker-gefassten Glasfaser, welche als Referenz dient. Die Lage der optischen Kante ist hierbei optimal getroffen. Die Transmission der Anregungswellenlänge liegt bei etwa 4,8%, das Raman-Streulicht passiert den Kantenfilter ab 570 nm mit 90%. Die rote Kurve zeigt die Transmission einer ungefassten, frei stehenden Glasfaser, wie sie für die Adaption an die Raman-Durchflusszelle benötigt wird. Es ist deutlich zu sehen, dass die Lage der optischen Kante in Richtung höherer Wellenlängen um etwa 35 nm verschoben ist. Der Lichtwellenleiter ist für den Einsatz im Raman-Detektor

leider unbrauchbar, da ein Großteil des Raman-Streulichts blockiert wird. Der abgeschnittene Bereich umfasst in etwa die ersten 1200 cm^{-1} im Raman-Spektrum.

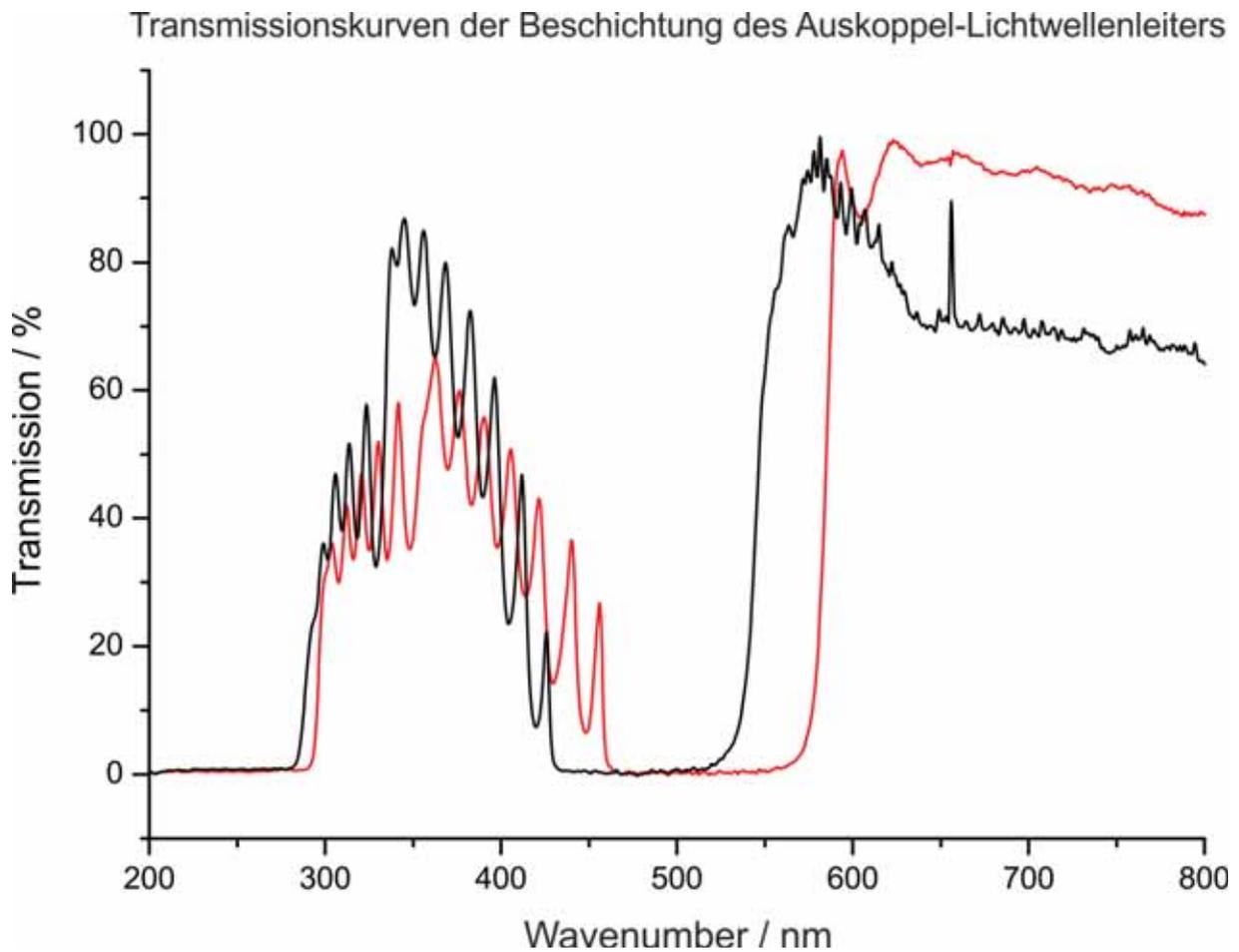


Abbildung 2-18: Transmissionskurven der Beschichtung des Auskoppel-Lichtwellenleiters von 200 bis 800 nm (schwarzer Kurvenverlauf: Beschichtung eines SMA-Stecker-gefassten Glasfaserendes; roter Kurvenverlauf: Beschichtung eines freistehenden Glasfaserendes).

Aufgrund des erheblichen technischen Aufwands für die Faserbeschichtungen und die damit verbundenen Kosten, wurde die weitere Optimierung hinsichtlich der Lage der optischen Kante an dieser Stelle eingestellt. Für eine optimale Faserbeschichtung sind von der Firma *Laser Components* Kosten in Höhe von 13.685 Euro (brutto) kalkuliert worden, welche im Rahmen des Projekts nicht mehr zur Verfügung standen.

2.6.2 Austausch des Laserlicht-Einkoppel-Lichtwellenleiters durch ein Quartz-Fenster

Obwohl die Einkoppel-Faser erfolgreich beschichtet werden konnte, blockiert die Beschichtung nicht das komplette Glas-Raman-Signal. Dies ist primär darauf zurückzuführen, dass das Laserlicht aus der Faser unter einer numerischen Apertur von $NA = 0,22$ austritt und der Kantenfilter unter verschiedenen Winkeln passiert wird. Ein Interferenz-Kantenfilter arbeitet allerdings nur bei senkrecht auftretendem, parallelem Licht optimal. Es gelangt also immer noch ein Restanteil an Untergrund-Glas-Raman-Signal aus dem Anregungs-Lichtwellenleiter in den Detektor.

Des Weiteren führt die Apertur des Lichtwellenleiters zu Verlusten von Laserleistung, da die Randstrahlen des Laserlichts nicht direkt in die Teflon-AF-Kapillare gelangen, sondern an der Innenwand des T-Stücks zum Teil diffus gestreut werden.

Eine Möglichkeit, das Untergrund-Glas-Raman-Signal weitestgehend zu minimieren und gleichzeitig die Laserlicht-Einkopplung zu optimieren besteht darin, auf den Laserlicht-Einkoppel-Lichtwellenleiter zu verzichten und diesen durch ein Quartz-Fenster zu ersetzen. Auf diese Weise lässt sich das Glasvolumen und somit das daraus resultierende Glas-Raman-Signal reduzieren. Die Einkopplung des Laserlichts wird durch ein spezielles Mikroskopobjektiv realisiert, welches einen sehr großen Arbeitsabstand benötigt. Dazu wurde ein Nikon CF IC EPI Plan SLWD mit einer 10-fach Vergrößerung, einer numerischen Apertur von 0,21 und einem Arbeitsabstand von 20,3 mm verwendet. Eine schematische Darstellung der Laserlichteinkopplung ist in Abbildung 2-19 dargestellt.

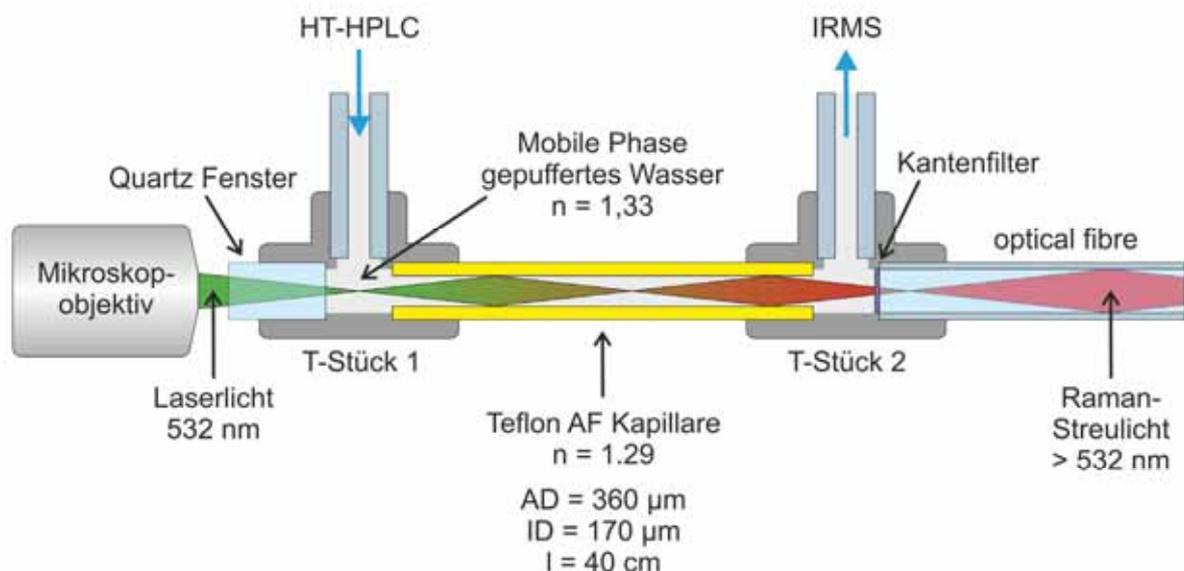


Abbildung 2-19: Optimierung der Durchflusszelle vor Implementierung in das Gesamtsystem.

Das Quartz-Fenster entspricht im Prinzip einem runden Glasstab, dessen Enden optisch poliert wurden. Der Durchmesser des Glasstabs beträgt 1,58 mm und ist damit an das 1/16-zöllige Maß kommerzieller HPLC-Komponenten angepasst. Der Quarzstab kann im Prinzip wie eine 1/16-Zoll Kapillare an das T-Stück 1 adaptiert werden. Durch die Verwendung kommerziell erhältlicher HPLC-Komponenten ist eine druckstabile Abdichtung des Systems gewährleistet.

Die Länge des Quarzstabs bzw. die Dicke des Fensters wurde mit 8 mm bemessen. In Abstimmung auf die Apertur des Mikroskopobjektivs lässt sich das Laserlicht nahezu verlustfrei in die Kapillare einkoppeln.

2.6.3 Integration eines zusätzlichen Kantenfilters im Monochromator

Um das sehr starke Glas-Raman-Signal bei 500 cm^{-1} zu unterdrücken, wurde ein Kantenfilter direkt am Ende des Auskoppel-Lichtwellenleiters, innerhalb des Monochromators, platziert. Dieser blockt alle Wellenlängen des sichtbaren Bereichs unterhalb von 550 nm mit einer optischen Dichte von 4. Ab 550 nm, d. h. ab 600 cm^{-1} , passieren etwa 99% des Raman-Streulichts den Kantenfilter.

Der schwarze Kurvenverlauf in Abbildung 2-20 zeigt das Untergrund-Glas-Raman-Signal des Auskoppel-Lichtwellenleiters. Der rote Graph stellt das Raman-Signal nach Implementierung des Kantenfilters in den Monochromator dar, welcher die ersten 600 cm^{-1} des Untergrund-Glas-Raman-Signals unterdrückt.

Bei diesem Vorgehen handelt es sich leider nur um eine Kompromiss-Lösung. Während durch diese Maßnahme zwar Untergrund-Signale reduziert werden können, kommt es zu einem Informationsverlust, da die ersten 600 cm^{-1} auch für die spektrale Analyse der Zielsubstanzen nicht mehr zur Verfügung stehen.

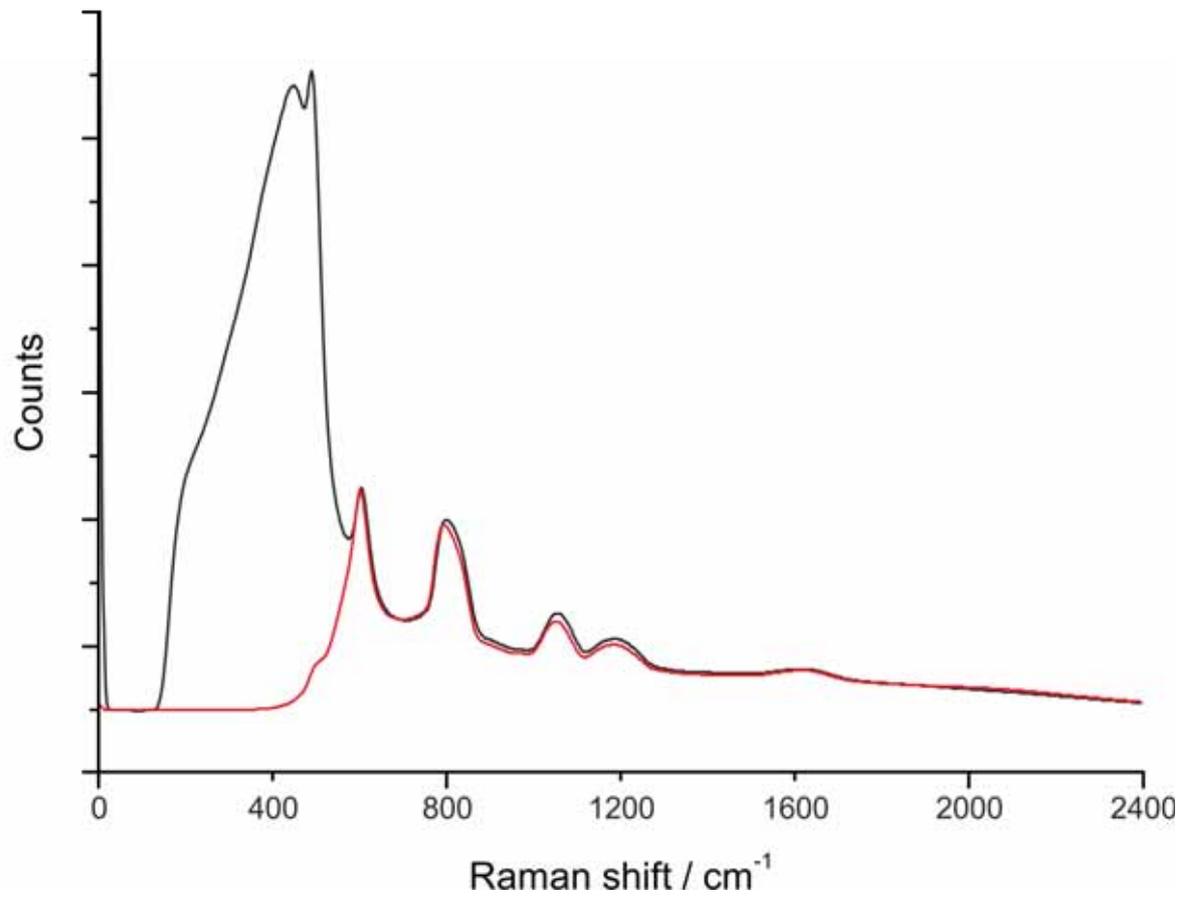


Abbildung 2-20: Untergrund-Glas-Raman-Signal des Auskoppel-Lichtwellenleiters; schwarz: ohne zusätzlichen Kantenfilter im Monochromator, rot: mit zusätzlichem Kantenfilter im Monochromator.

2.7 Implementierung des Raman-Detektors in das HT-HPLC-IRMS-System

Die Implementierung des Raman-Detektors in das HT-HPLC-IRMS-System wurde im Januar 2012 realisiert. Dazu wurde der entwickelte Raman-Aufbau an die Universität Duisburg-Essen überführt. Eine schematische Darstellung der finalen Version der Gesamtkopplung ist in Abbildung 2-21 dargestellt.

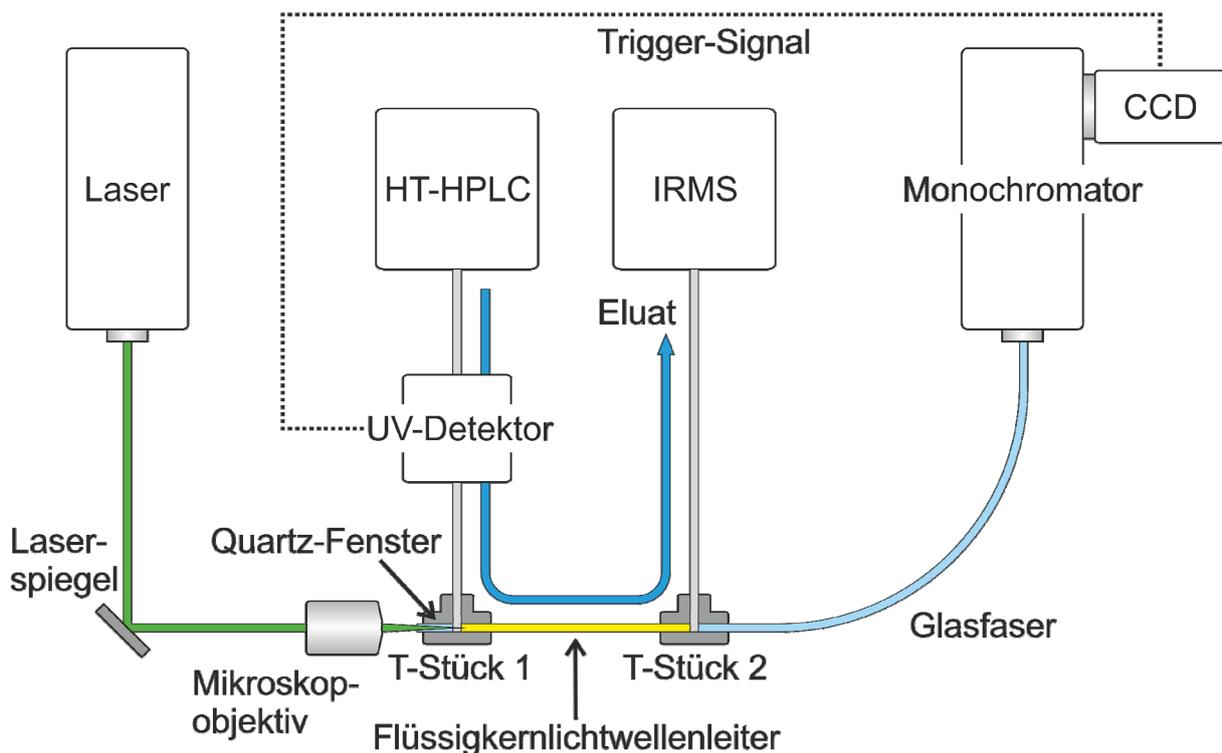


Abbildung 2-21: Schematische Darstellung der Gesamtkopplung von HT-HPLC-Raman-IRMS.

Der dargestellte Aufbau entspricht prinzipiell dem Aufbau nach Abbildung 2-16 (Kapitel 2.5). In der finalen Gesamtkopplung wurde hinter das T-Stück 2 die IRMS zugeschaltet. Geändert hat sich zudem die Art der Laserlicht-Einkopplung, welche jetzt, wie bereits in Kapitel 2.6.2 beschrieben, über ein Mikroskopobjektiv erfolgt. Weiterhin hat es sich als zweckmäßiger erwiesen, zu Beginn der chromatografischen Trennung ein einzelnes Trigger-Start-Signal am UV-Detektor abzugreifen, um dann kontinuierlich alle 10 s Raman-Spektren über die gesamte Messlaufzeit aufzunehmen, da die in Kapitel 2.5 beschriebene Methodik nur dann sinnvoll angewendet werden kann, wenn alle Analyten UV-aktiv sind. Insbesondere für einige Steroide, wie z. B. cis-Androsteron und 17-Hydroxyprogesteron, erweist sich die kontinuierliche Spektrenakquisition als vorteilhaft. Die vollständige Analyse der Modellschubstanzen mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System ist in Kapitel 2.11 dargestellt.

2.8 Untersuchung geeigneter Trennphasen für die Isotopenverhältnis-massenspektrometrie

2.8.1 Untersuchung der Temperaturstabilität geeigneter Trennphasen

Im Rahmen eines bereits abgeschlossenen industriellen Forschungsvorhabens wurde eine Testmethode entwickelt und etabliert, um die Eignung chromatografischer Trennsäulen für den Einsatz in der Hochtemperatur-Flüssigchromatografie zu untersuchen [19].

Diese Testprozedur ist wie folgt aufgebaut:

- a) Die Trennsäule wird auf eine Temperatur von 150°C erhitzt.
- b) Die Temperatur von 150°C wird für einen Zeitraum von fünf Stunden (eine Heizphase) gehalten.
- c) Anschließend wird die Trennsäule auf eine Temperatur von 30°C abgekühlt.
- d) Abschließend erfolgt die Messung eines Testchromatogramms (Neue-Teststandard).

Der Zyklus der Punkte a bis d beschreibt eine Heizphase. In Abhängigkeit vom Testverlauf wird die Trennsäule während der Heizphasen mit unterschiedlich zusammengesetzten mobilen Phasen gespült. Für die 1. bis 5. Heizphase wird eine mobile Phase bestehend aus 90/10 (v/v) Wasser/Methanol verwendet. Dies beschreibt die neutrale Heizphase. Anschließend folgt die saure Heizphase, bei der die Säule mit einer mobilen Phase bestehend aus 90/10 (v/v) Phosphatpuffer pH 2,2/Methanol gespült wird. Abschließend folgt die basische Heizphase. Hier wird eine mobile Phase bestehend aus 90/10 (v/v) Phosphatpuffer pH 12,0/Methanol verwendet.

Anschließend werden die Testchromatogramme der einzelnen Heizphasen mit dem Testchromatogramm der fabrikneuen Trennsäule verglichen.

Im Rahmen dieses Projekts wurde diese Testprozedur auf die in Tabelle 2-6 aufgeführten Trennsäulen angewendet. An dieser Stelle werden lediglich die Ergebnisse der Trennsäulen diskutiert, welche für die Hochtemperatur-Flüssigchromatografie geeignet sind. Die Ergebnisse der übrigen stationären Phasen finden sich im Anhang in Abschnitt 4.3.

Tabelle 2-6: Zusammenstellung der im Rahmen dieses Forschungsvorhabens untersuchten kommerziell verfügbaren Trennsäulen.

Hersteller	Säulenbezeichnung	Länge [mm]	ID [mm]	Partikelgröße [µm]	Porengröße [Å]
AkzoNobel	Kromasil Eternity-2.5-C ₁₈	100	4,6	2,5	100
Interchim	Silice Upti-prep Strategy C ₁₈ -2	150	4,6	5,0	100
Interchim	Silice Upti-prep Strategy C ₁₈ -3	150	4,6	5,0	100
Showa Denko	Shodex ET-RP1 4D (polymer)	150	4,6	4,0	---
Supelco	Ascentis Express C ₁₈ (fused-core)	150	4,6	2,7	90
Waters	XBridge Amide	150	4,6	3,5	130
Waters	XSelect CSH C ₁₈	150	4,6	5,0	144
YMC	Triart C ₁₈	150	4,6	5,0	120

2.8.1.1 Waters XSelect CSH C₁₈

Die Waters XSelect CSH C₁₈ basiert auf dem BEH (ethylene bridged hybrid) Material, welches von Wyndham [20] im Jahre 2003 vorgestellt wurde. Dabei werden die Silika-Partikel zusätzlich über Ethylbrücken verbunden, wodurch dieses Material gegenüber hohen Drücken, Temperaturen und pH-Werten deutlich stabiler ist als klassische silika-basierte Umkehrphasen [19]. Im Unterschied zu der Waters XBridge BEH C₁₈ Trennsäule wurde das Material der Waters XSelect CSH C₁₈ durch das Aufbringen einer Oberflächenladung zusätzlich modifiziert mit dem Ziel, die Selektivität für basische Analyten zu verbessern.

In Abbildung 2-22 sind die Testchromatogramme der Waters XSelect in Abhängigkeit der einzelnen Heizphasen dargestellt. Im Vergleich zu der Waters XBridge BEH C₁₈ ist die Temperaturstabilität der XSelect geringfügig schwächer, welches sich durch kleine Veränderungen der Selektivität nach der 5. Heizphase (neutral) bemerkbar macht [21]. In Bezug auf das kritische Peakpaar (Dipropylphthalat und Naphthalin) führt die Änderung der Selektivität zu einer Verbesserung der Auflösung zwischen diesen Peaks, wobei sich die Peakform der Analyten nur geringfügig verändert. Weiterhin wird für den Analyten Propranolol eine höhere Retentionszeit als bei der fabrikneuen Phase beobachtet, was auf eine Zunahme der Silanolaktivität bzw. Oberflächenaktivität hindeutet. Gleichzeitig resultiert für die hydrophoben Marker (Naphthalin und Acenaphthen) eine geringere Retentionszeit als bei der fabrikneuen Trennsäule. Beide Beobachtungen können durch den Verlust des

Endcappings bzw. der gebundenen Phase aufgrund der Hydrolyse des Säulenmaterials erklärt werden. Überraschend ist, dass keine weitere Reduzierung der Hydrophobizität beobachtet wird, wenn im Anschluss an die neutrale Heizphase die saure Heizphase durchgeführt wird (Vergleich Abbildung 2-22 b und c). Hier ist zu beachten, dass aufgrund der sauren Elution eine deutliche Bandenverbreiterung verbunden mit einer Erhöhung der Retentionszeiten für die basischen Analyten (Propranolol und Amitriptylin) einhergeht. In Bezug auf die basische Heizphase (Abbildung 2-22 d) wird wie erwartet die vollständige Degradation der Packung beobachtet. Aufgrund des hohen pH-Werts von 12 kommt es zu einem Abbau des Silika-Grundgerüsts.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Waters XSelect CSH C₁₈ für die Hochtemperatur-Flüssigchromatografie sehr gut geeignet ist, wenn mobile Phasen mit sauren bzw. einem neutralen pH-Wert verwendet werden. Die Temperatur-Stabilität ist, ähnlich wie für die XBridge C₁₈ Phase, deutlich besser als für viele silika-basierenden Trennsäulen anderer Hersteller.

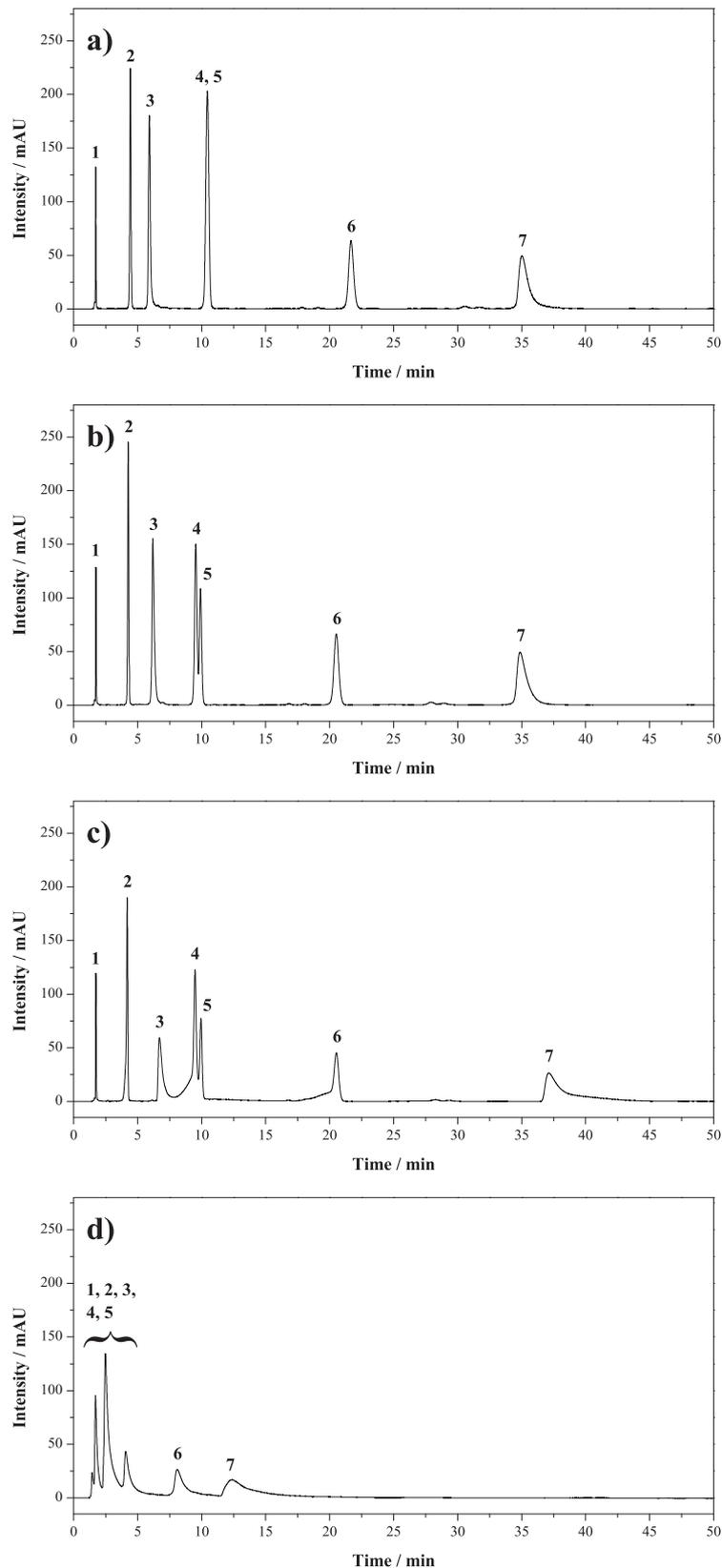


Abbildung 2-22: Testchromatogramme der Waters XSelect CSH C₁₈. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 10. Heizphase (sauer), d) nach der 15. Heizphase (basisch). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XSelect (150 mm × 4,6 mm; 5 μm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyacetone, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].

2.8.1.2 YMC Triart

Bei der Triart Trennsäule der Firma YMC werden ebenfalls Hybrid-Partikel verwendet. Dazu werden während der Herstellung abwechselnd anorganische sowie organische Silane als einzelne Schichten aufgebracht, bis die gewünschte Partikelgröße erreicht ist. Anschließend erfolgt eine chemische Modifizierung der Oberfläche der Partikel mit z. B. C₁₈ Ketten. Abschließend erfolgt das *endcapping*, um die verbleibende Silanolaktivität zu unterdrücken. In Bezug auf die Temperaturstabilität dieser Phase ist der Hersteller eher konservativ und gibt eine Temperaturstabilität von 70°C für einen pH-Bereich von 1 bis 7 an. Für den pH-Bereich von 7 bis 12 wird eine Temperaturstabilität von 40°C angegeben.

Aufgrund des Herstellungsprozesses besitzt die Triart eine hohe Kohlenstoff-Oberflächenbelegung, die sich durch eine höhere Hydrophobizität äußert (Abbildung 2-23 a). So ist beispielsweise die Retention des hydrophoben Markers Acenaphthen etwa 1,5-mal höher als bei der Waters XBridge C₁₈ Trennsäule [19]. Dennoch können erste Effizienzverluste nach der neutralen Heizphase beobachtet werden. Ähnlich wie bei der Waters XSelect kommt es zu einer kleinen Verringerung der Hydrophobizität, was anhand der Verschiebung der Retentionszeiten von Naphthalin und Acenaphthen zu niedrigeren Retentionszeiten deutlich wird (Abbildung 2-23 b). Gleichzeitig kommt es auch hier zu einer Verbesserung der kritischen Auflösung zwischen Dipropylphthalat und Naphthalin. Aufgrund der Zunahme der Silanolaktivität werden für die basischen Analyten Propranolol und Amitriptylin höhere Retentionszeiten sowie ein stärker ausgeprägtes Peak tailing beobachtet (Abbildung 2-23 b). Die anschließende saure Heizphase führte zu einer deutlichen Reduzierung der Hydrophobizität der Trennsäule (Abbildung 2-23 c). Die Retentionszeiten der hydrophoben Marker Naphthalin und Acenaphthen verkürzten sich um ca. 30% im Vergleich zur neutralen Heizphase (Abbildung 2-23 b). Dennoch ist die Peakform der Analyten mit Ausnahme von Propranolol akzeptabel und vergleichbar mit der Waters XSelect Trennsäule.

Im Anschluss an die saure Heizphase wurde noch ein basischer Heizzyklus durchgeführt (Abbildung 2-23 d). Wie zu erwarten, führte dieser basische Heizzyklus zu einem deutlichen Verlust an Trenneffizienz.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die YMC Triart Trennsäule für die Hochtemperatur-Flüssigchromatografie geeignet ist, wenn ein neutraler pH-Wert eingestellt wird.

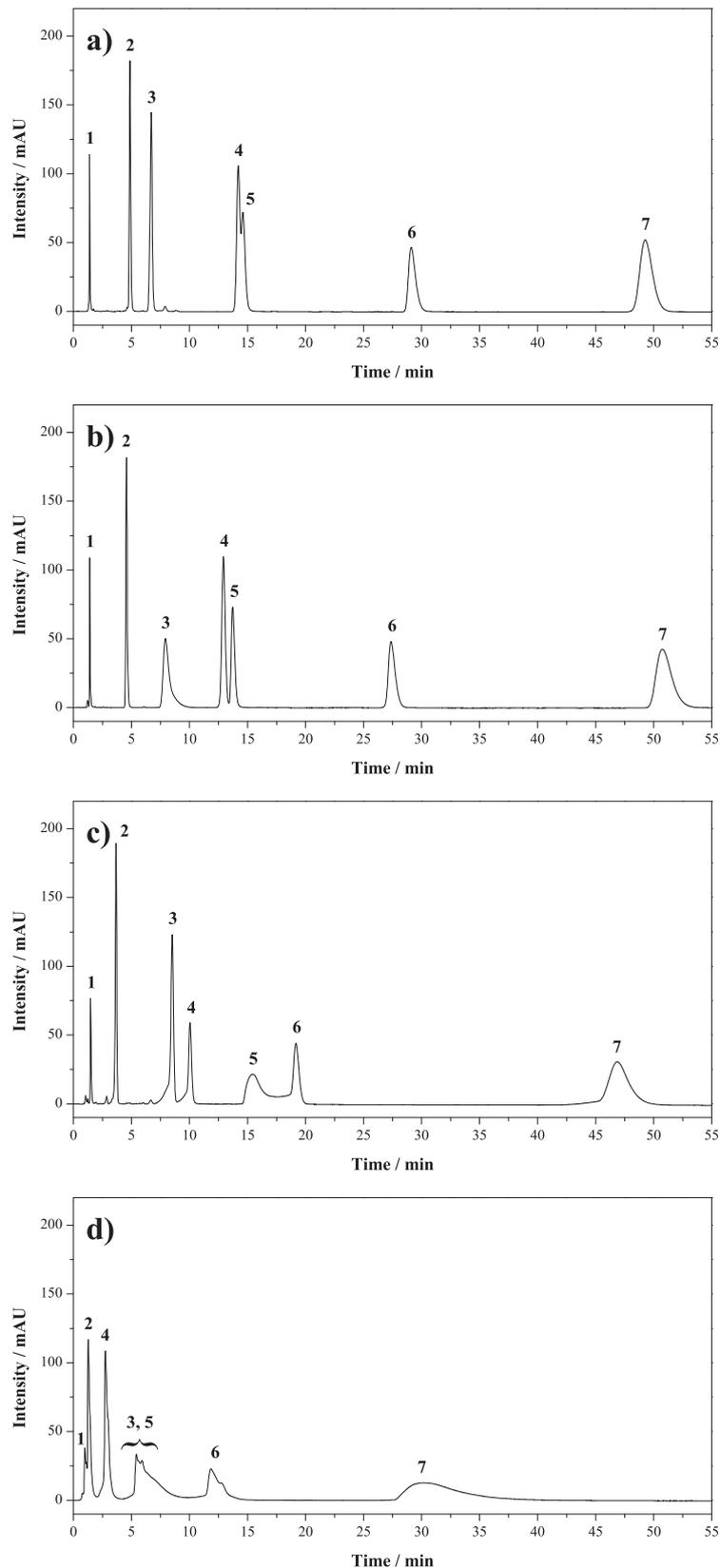


Abbildung 2-23: Testchromatogramme der YMC Triart. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 10. Heizphase (sauer), d) nach der 11. Heizphase (basisch). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: YMC Triart (150 mm × 4,6 mm; 5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyacetone, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Waters Hybrid-Trennsäulen (XBridge, XSelect, Acquity) für Anwendungen in der Hochtemperatur-Flüssigchromatografie sehr gut geeignet sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die YMC Triart Phase ebenfalls für Hochtemperaturanwendungen mit neutralen mobilen Phasen geeignet ist. Die Testchromatogramme der anderen in Tabelle 2-6 aufgeführten Trennsäulen sind im Anhang in Abschnitt 4.3 dargestellt.

Auf Grundlage der in diesem Forschungsvorhaben durchgeführten Untersuchungen sowie unter Berücksichtigung früherer Arbeiten [19,22,23] konnten der Forschungsstelle 1 (IAC) eine Auswahl geeigneter Trennphasen genannt werden, bei denen weiterführende IRMS Untersuchungen sinnvoll sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nachfolgend dargestellt.

2.8.2 Untersuchung der Temperaturstabilität geeigneter Trennphasen mittels IRMS

Seit Einführung der LC-IRMS-Kopplung im Jahr 2004 [24] wurde die Methode im Wesentlichen nur für ionisierbare Verbindungen wie Zucker [24-26], Aminosäuren [27-31] und kleine Peptide [31,32], die mittels Ionenaustauschchromatografie (IEC) getrennt werden können, verwendet. Die im Bereich der Flüssigchromatografie am meisten verwendete Art der Trennung beruht aber auf der Umkehrphasenchromatografie (RP-HPLC). Zur Trennung von Verbindungen in der LC-IRMS wurde diese aber nur selten angewendet [32]. Es ist daher von besonderem Interesse, Methoden für nicht ionisierbare Verbindungen zu entwickeln, sowie Methoden, die im Bereich der RP-HPLC etabliert sind, auf die LC-IRMS zu übertragen. Die RP-HPLC ist der IEC bei der Trennung schwach ionisierbarer Verbindungen in einer ionenreichen Matrix überlegen. Die größte Herausforderung bei der Kopplung der RP-HPLC mit der IRMS ist der rein wässrige Eluent und die zwingende Abwesenheit organischer Modifier und Puffer [24]. Dies ist nötig, da der gesamte organische Kohlenstoff quantitativ zu CO₂ umgesetzt wird. Ein weiterer wichtiger Faktor ist mögliches Säulenbluten, welches zu einem erhöhten Untergrundsignal im Isotopenverhältnismassenspektrometer beiträgt. Je nach Intensität des Säulenblutens können daraus eine verminderte Sensitivität und damit verbundene Störungen der gemessenen Isotopenwerte resultieren.

Eine für die Isotopenverhältnismassenspektrometrie geeignete Trennsäule muss sich daher durch einen möglichst geringen Austrag an Kohlenstoff auszeichnen. Dies gilt insbesondere dann, wenn Temperaturgradienten angewendet werden. Anhand der am IUTA durchgeführten Untersuchungen konnte eine Vorauswahl an potentiell geeigneten Trennsäulen getroffen werden. Tabelle 2-7 gibt einen Überblick über die mittels IRMS-Detektion untersuchten Trennmaterialien. Wie in Kapitel 2.8.1 dargelegt, lagen ausreichend Daten hinsichtlich der Temperaturstabilität einer Vielzahl von stationären Phasen vor und es

wurden auch Untersuchungen zum Säulenbluten dieser Phasen im Temperaturgradientenmodus durchgeführt [23]. Allerdings lassen sich die mit einem UV- oder Verdampfungslichtstreuendetektor erzielten Resultate nicht direkt auf das Isotopenverhältnismassenspektrometer übertragen. Der Grund hierfür ist, dass mit einem UV-Detektor nur Verbindungen mit einem chromophoren System bzw. mit einem Verdampfungslichtstreuendetektor nur Verbindungen, die partikulär vorliegen, erfasst werden. Somit waren anhand der vorliegenden Daten nur eingeschränkt Aussagen bezüglich des Austrags an kohlenstoffhaltigen Verbindungen bzw. Partikeln aus der Säule möglich, weshalb die Experimente nur am Isotopenverhältnismassenspektrometer (IRMS) durchgeführt werden konnten.

Tabelle 2-7: Übersicht über die mittels IRMS-Detektion getesteten Säulen.

Hersteller	Säulenbezeichnung	Länge [mm]	ID [mm]	Partikelgröße [µm]	Porengröße [Å]	Temperaturbereich [°C]
Waters	XBridge C ₁₈	50	3,0	2,5	135	30-180
Waters	Acquity C ₁₈	50	2,1	1,7	130	100-200
YMC	Triart C ₁₈	150	2,0	5,0	120	30-150
ZirChrom	ZirChrom-PBD	150	3,0	5,0	300	30-150

2.8.3 Auswirkung des Säulenblutens auf den Isotopenwert

Wie in der Literatur berichtet, kann durch Hydrolyse der stationären Phase erhöhtes Säulenbluten beobachtet werden [23], was eine geringeren Sensitivität und eine verringerte Oxidationskapazität des Reaktors zur Folge hat. Zudem kann die Zunahme des Untergrunds durch den Austrag von Kohlenstoff aus der Säule zu einer verringerten Präzision der Isotopenwerte führen. Dieser Effekt kann insbesondere bei der Anwendung der Temperaturgradientenelution zu inakzeptablen Untergrundanstiegen führen.

2.8.4 Isotherme Arbeitsweise

Basierend auf einer früheren Studie [33] konnte gezeigt werden, dass Hybridphasen bis zu einer Temperatur von 200°C stabil sind. Die ZirChrom-PBD Säule und die YMC Triart C₁₈ (Triart C₁₈) mit ihren spärlichen Hybridpartikeln wurde bis zu einer Temperatur von 150°C getestet. Der Einfluss des Säulenblutens auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte wurde durch den Vergleich der HT-HPLC-IRMS Werte mit FIA-IRMS Werten (bei Raumtemperatur) ermittelt.

Um den Effekt des Säulenblutens auf die HT-HPLC-IRMS Messung zu untersuchen, wurde die Auswirkung des Untergrundanstiegs bei isothermer Arbeitsweise sowie unter Anwendung von Temperaturgradienten auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des eingemessenen Kohlenstoffdioxid Referenzgases und Ethanol als Testsubstanz untersucht (siehe Abbildung 2-24).

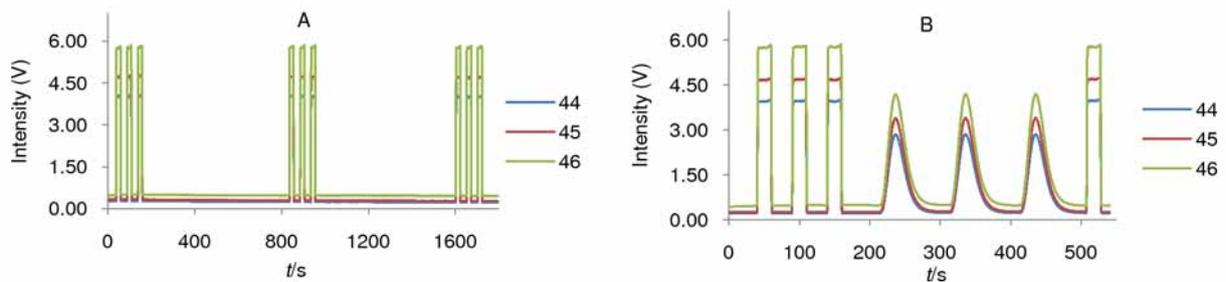


Abbildung 2-24: HTLC-IRMS Chromatogramm von CO₂ Pulsen (A) und Mehrfachinjektion von 100 ppm Ethanol (B) auf einer XBridge C₁₈ Säule bei 100°C (Graphik von Zhang et al. [34]).

Im isothermen Modus konnte bei Temperaturen bis 150°C (ZirChrom-PBD, YMC Triart C₁₈) und 180°C (XBridge C₁₈ (1), Acquity C₁₈) trotz steigenden Untergrunds kein signifikanter Einfluss auf die Isotopensignatur beobachtet werden.

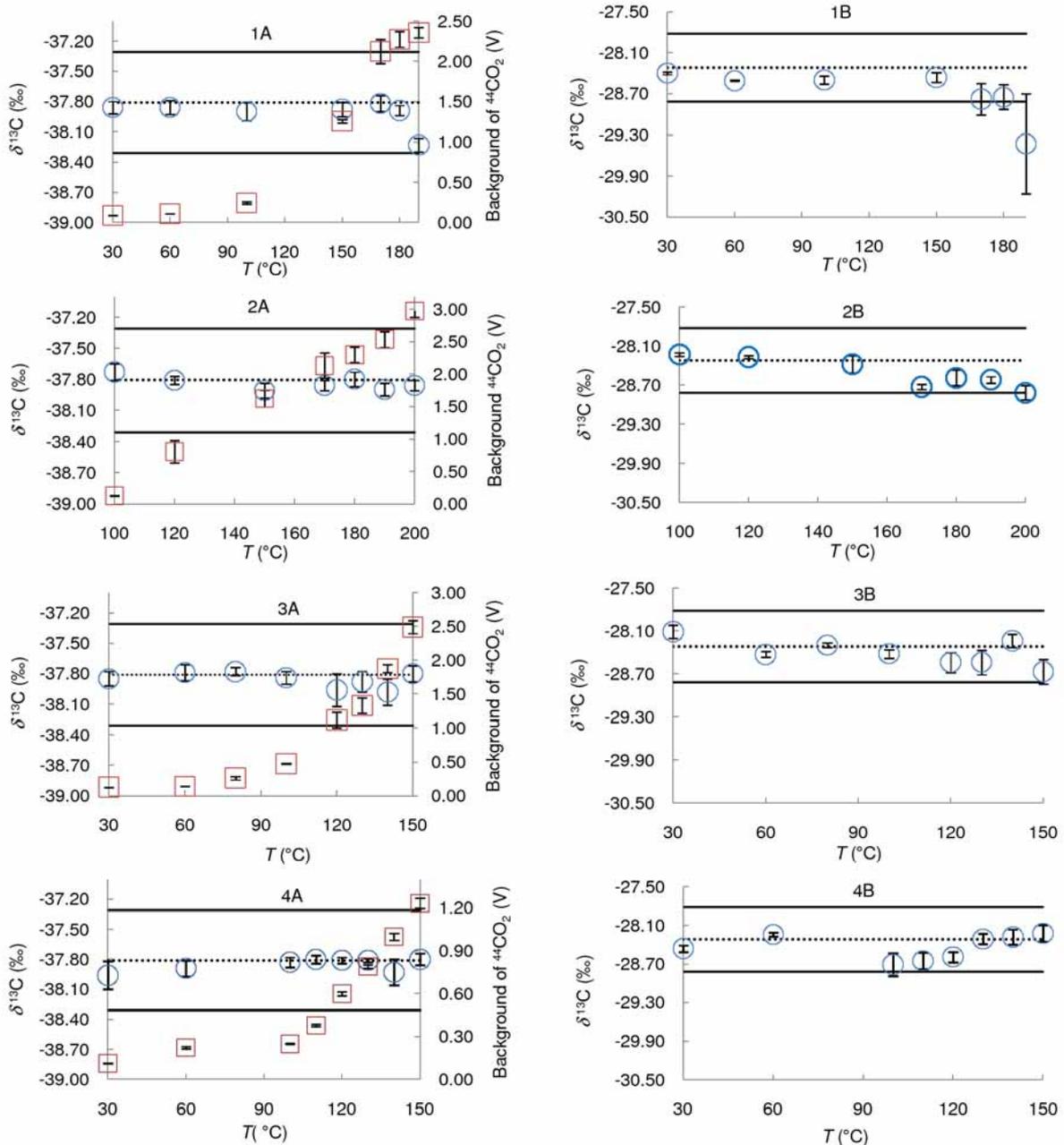


Abbildung 2-25: (4A) $\delta^{13}\text{C}$ von CO_2 Gaspulsen (Kreise, linke Ordinate) und Hintergrund von $^{44}\text{CO}_2$ (Quadrate, rechte Ordinate) wurden mit einer XBridge C₁₈- (1), Acquity C₁₈- (2), Triart C₁₈- (3) und einer ZirChrom-PBD-Trennsäule (4) bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichungen (n=9) der Messungen. Die gestrichelten Linien zeigen den Wert des eingemessenen CO_2 Gases (-37,81 ‰). Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von $\pm 0,3$ ‰. (4B) $\delta^{13}\text{C}$ Werte multipler Injektionen eines 100 mg L⁻¹ Ethanol Standards auf den unter (4A) aufgeführten Säulen bei Änderung der Temperatur. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichungen (n=3) der Messungen. Die gestrichelten Linien geben den Mittelwert wieder. Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von $\pm 0,3$ ‰ (Graphik von Zhang et al. [34]).

Wie in Abbildung 2-25 (4A) gezeigt, liegen alle $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Gases innerhalb eines $\pm 0,50$ ‰ Intervalls, das die Gesamtunsicherheit der Methode widerspiegelt. Die Resultate belegen, dass unter diesen Bedingungen eine hohe Präzision (Standardabweichung $\leq 0,16$ ‰, n = 9) und Genauigkeit ($\leq 0,17$ ‰, Differenz zum Standardwert) erreicht werden

kann. Für die multiple Injektion von Ethanol (siehe Abbildung 2-25 (4B)) zeigte sich, dass die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte konsistent ($\leq 0,23 \text{ ‰}$) mit den FIA Werten sind. Erst ab einer Temperatur von 190°C liegen die Werte für die XBridge C_{18} Säule außerhalb des $\pm 0,5 \text{ ‰}$ Intervalls.

Im Fall der isothermen Untersuchungen wurde beobachtet, dass das Säulenbluten keinen signifikanten Einfluss auf die Isotopensignaturen hat.

2.8.5 Gradientenarbeitsweise

Die Messung des CO_2 Gaspulses auf dem ansteigenden Untergrund sollte den Einfluss auf die Isotopensignatur des Gases zeigen. Um den Einfluss einer steigenden Basislinie auf eluierende Verbindungen zu testen, wurden multiple Injektionen von Ethanol durchgeführt (siehe Abbildung 2-26).

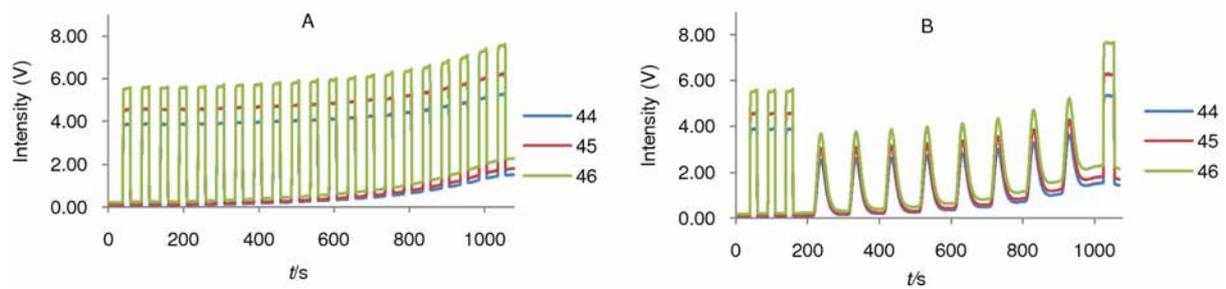


Abbildung 2-26: Temperatur programmiertes LC-IRMS Chromatogramm sukzessiver CO_2 Gaspulse (A) und multipler Injektionen eines 100 ppm Ethanol Standards (B) auf einer XBridge C_{18} Säule. Temperaturprogramm: 1 min bei 60°C , dann mit $20^\circ\text{C min}^{-1}$ auf 120°C , 1 min halten, dann mit 5°C min^{-1} auf 180°C und für 1 min halten (Graphik von Zhang et al. [34]).

Bei der Gradientenarbeitsweise zeigte ein langsamer Anstieg ($< 20 \text{ mV s}^{-1}$) der Basislinie keinen signifikanten Einfluss auf die Isotopensignaturen der Kohlenstoffdioxidgaspulse und auf die multiplen Injektionen des Ethanols (siehe dazu Abbildung 2-27 und Tabelle 2-8).

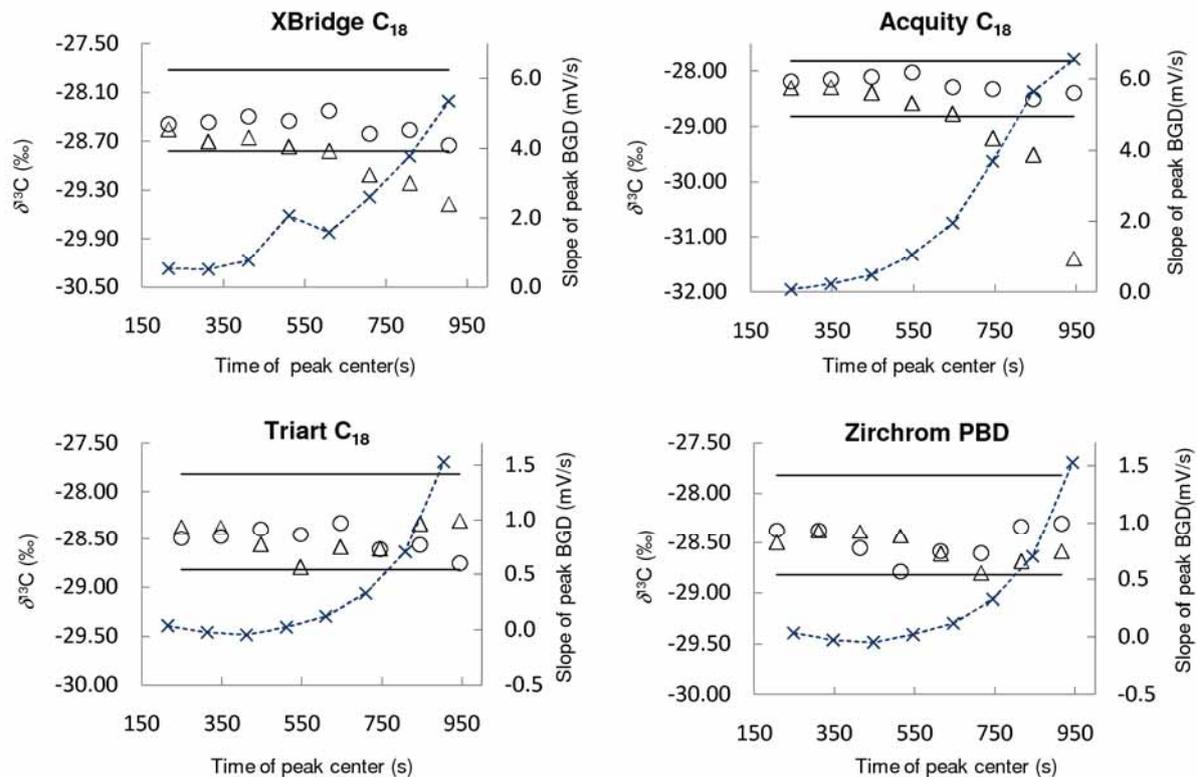


Abbildung 2-27: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte multipler Injektionen eines 100 mg L^{-1} Ethanol Standards. Die Berechnung der Peakflächen erfolgte mittels des „Individual Background“ Algorithmus (Dreiecke, linke Ordinate) und des „Dynamic Background“ Algorithmus (Kreise, linke Ordinate). Die Anstiege des Untergrunds von m/z 44 (Kreuze, rechte Ordinate) sind für die vier untersuchten Säulen dargestellt. Zur Bestimmung der Steigung des Untergrunds wurde die Differenz des Untergrunds am Peakanfang und Peakende durch die Peakweite an der Basis dividiert. Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von $\pm 0,5$ ‰ (Graphik von Zhang et al. [34]).

Der Einfluss des verwendeten Peakintegrationsalgorithmus auf die Isotopensignatur wurde anhand des „Individual Background“ Algorithmus und des „Dynamic Background“ Algorithmus untersucht. Wie aus Abbildung 2-27 hervorgeht, eignet sich der „Dynamic Background“ Algorithmus besser, um den Untergrundanstieg bei der Verwendung von Temperaturprogrammen zu kompensieren. Bei isothermer Arbeitsweise liefert allerdings der „Individual Background“ Algorithmus bessere Ergebnisse.

Tabelle 2-8: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte sukzessiv aufgegebenener CO_2 Gaspulse ($n = 21$) und multipler Injektionen eines 100 mg L^{-1} Ethanol Standards ($n = 8$) unter Temperatur-Gradientenbedingungen. Die Differenz $|\Delta\delta_{\text{HT-LC-FIA}}|$ in ‰ repräsentiert die Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ Werte von temperaturprogrammierter HPLC-IRMS und FIA-IRMS.

Säule	XBridge C ₁₈			Acquity C ₁₈			Triart C ₁₈			ZirChrom-PBD		
	CO ₂	Ethanol		CO ₂	Ethanol		CO ₂	Ethanol		CO ₂	Ethanol	
$\delta^{13}\text{C}\%$	-37,90	-28,51	-28,91	-37,87	-28,25	-29,03	-37,99	-28,49	-28,61	-37,95	-28,52	-28,55
Standardabweichung	0,09	0,13	0,32	0,06	0,16	1,04	0,13	0,17	0,29	0,13	0,16	0,16
$ \Delta\delta_{\text{HT-LC-FIA}} $	0,09	0,19	0,59	0,07	0,07	0,61	0,18	0,17	0,29	0,14	0,20	0,23

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl unter isothermen Bedingungen als auch im Temperaturgradientenmodus keine Beeinflussung der Isotopensignatur des Kohlenstoffs erfolgt. Die vier untersuchten Säulen können daher für die HT-HPLC-IRMS-Kopplung verwendet werden. In Tabelle 2-7 sind die möglichen Temperaturbereiche der untersuchten Säulen aufgeführt. Wie in Kapitel 2.12 beschrieben, konnten mehr als 800 Messungen ohne eine Verschlechterung der Trennleistung durchgeführt werden.

2.8.6 Vorbereitung und Regeneration der Säulen für die IRMS

Da die Trennsäulen zum Transport und zur Lagerung mit organischen Lösungsmitteln gefüllt sind, müssen diese vor der ersten Messung konditioniert werden. Dazu sollten die Säulen für mindestens zwei Stunden mit reinem Wasser gespült und anschließend mit Phosphatpuffer eine Stunde lang bei einer Flussrate von $500 \mu\text{L min}^{-1}$ equilibriert werden.

Im Fall von „de-wetting“ kann die Säule durch Spülen mit Methanol über Nacht und anschließendes Spülen mit reinem Wasser wieder regeneriert werden (siehe Abbildung 2-28). Das „de-wetting“ bezeichnet einen reversiblen Phasenkollaps, bei dem die C_{18} -Ketten aufgrund des hohen Wasseranteils auf der Oberfläche zusammenbrechen, so dass nur noch eine geringe Wechselwirkung der Analyten mit der hydrophoben Oberfläche möglich ist.

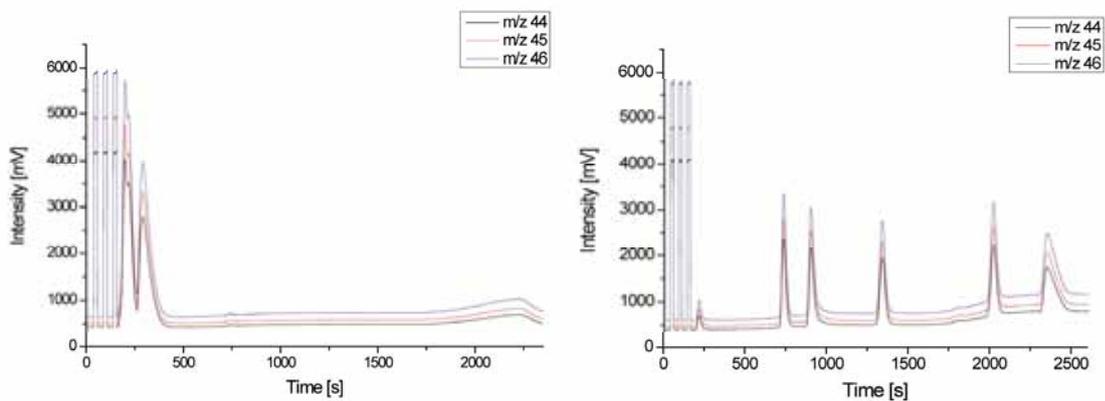


Abbildung 2-28: Regeneration einer Säule mit Methanol nach de-wetting.

2.9 Anpassung der chromatografischen Methoden

2.9.1 Methodenentwicklung für die Trennung von Geschmacksstoffen

2.9.1.1 Evaluierung geeigneter Trennsäulen

ZirChrom-PBD

Im Rahmen der Methodenentwicklung zur Trennung der Geschmacksstoffe wurde die Eignung verschiedener chromatografischer Trennsäulen evaluiert. Zunächst wurden Trennsäulen auf Basis von Zirkoniumdioxid, welche mit Polybutadien (PBD) beschichtet sind, untersucht. Ein Vorteil dieser Trennsäulen ist die geringere Hydrophobizität im Vergleich zu klassischen bzw. Hybrid silica-basierenden C₁₈ Trennsäulen [35]. Dadurch ist es möglich, auch unpolare Analyten mit einer wässrigen mobilen Phase zu trennen. Weiterhin erfordert die Elution unpolarer Substanzen niedrigere Temperaturen als für Silikagel-basierte Umkehrphasen.

In Abbildung 2-29 sind zwei Trennungen der Geschmacksstoffe mittels Temperaturgradienten-Elution auf unterschiedlichen ZirChrom-PBD Trennsäulen dargestellt. Abbildung 2-29 a zeigt die Trennung auf einer bereits für Hochtemperaturanwendungen verwendeten ZirChrom-PBD Säule, wohingegen in Abbildung 2-29 b eine fabrikneue Trennphase eingesetzt wurde. Unabhängig vom Alter der verwendeten Trennsäule wird ersichtlich, dass die ZirChrom-PBD-Phase für die Basislinientrennung der ausgewählten Geschmacksstoffe ungeeignet ist. Trotz der niedrigen Starttemperatur von 30°C eluieren fünf der sechs Analyten bereits innerhalb von vier Minuten. Weiterhin ist eine Ko-Elution von Koffein und Aspartam zu beobachten. Aufgrund dieser Begebenheiten ist es nicht möglich, die Trennung der Analyten durch Anwendung eines Temperaturgradienten zu optimieren. In Bezug auf das unpolare Rutin ist festzuhalten, dass die ZirChrom-PBD Trennsäule für die Elution von Rutin unter Verwendung einer wässrigen mobilen Phase sehr gut geeignet ist. Das Retentionsverhalten von Rutin kann mittels Temperaturgradienten-Elution signifikant beeinflusst werden. Darüber hinaus bietet die Anwendung von Temperaturgradienten in Bezug auf die Peakform und Peakbreite von Rutin gewisse Vorteile. In Abbildung 2-29 a eluiert Rutin unter isothermen Bedingungen als flacher, breiter Peak, wohingegen in Abbildung 2-29 b Rutin innerhalb des Temperaturgradienten-Fensters als höherer und schmalerer Peak eluiert wird. Dies führt unter anderem zu einer besseren Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Dieses Thema wird in Abschnitt 2.9.2.3 weiterführend diskutiert.

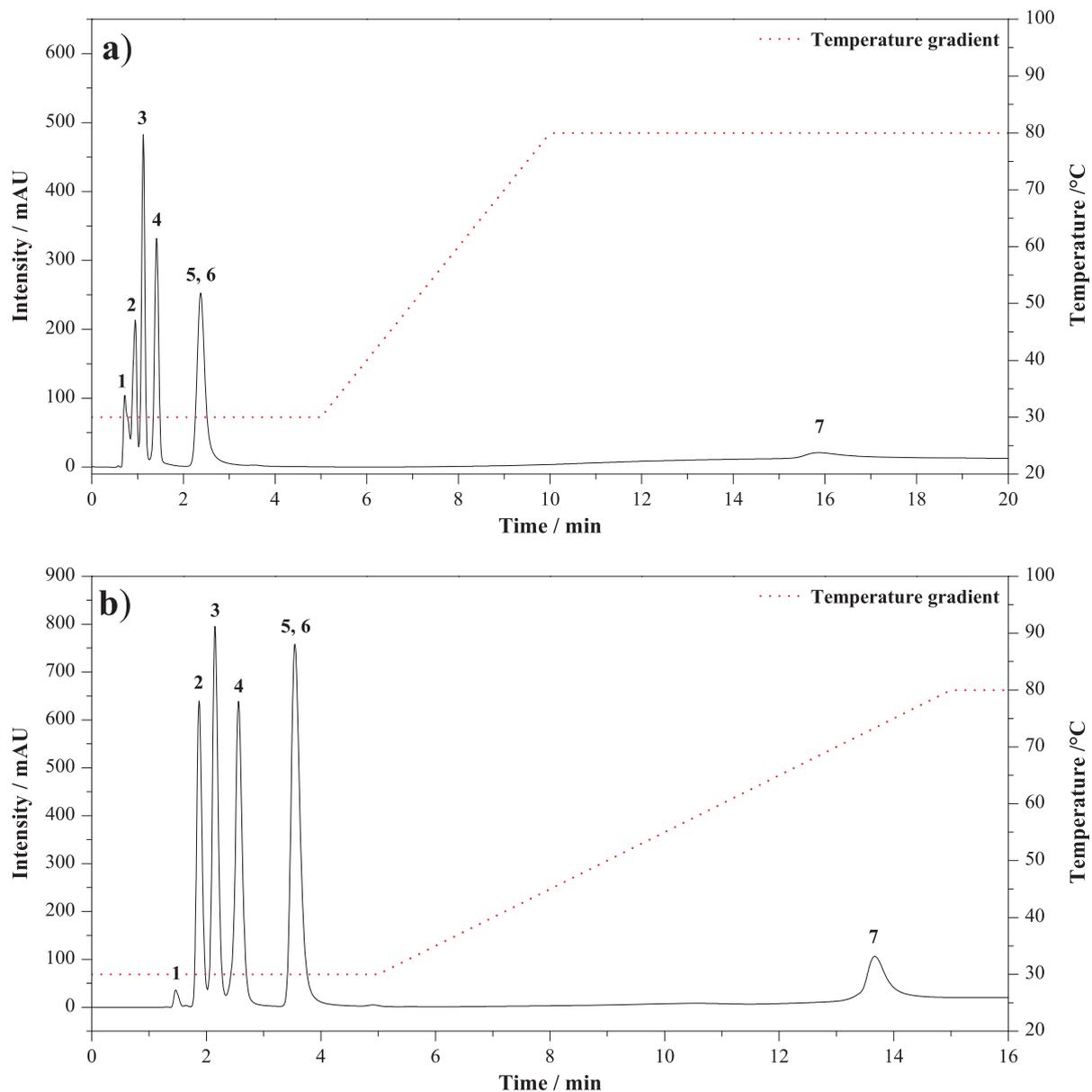


Abbildung 2-29: Trennung von sechs Geschmacksstoffen mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: ZirChrom-PBD (150 × 3,0 mm, 5 µm); a) bereits verwendete Trennsäule, b) fabrikneue Trennsäule; mobile Phase: Phosphatpuffer, 10 mmol L⁻¹, pH 2,7; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Temperaturgradient: siehe Abbildung. Injektionsvolumen: 5 µL; Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Methanol, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.

Waters XBridge C₈

Bei der Waters XBridge C₈ Trennsäule handelt es sich um eine Hybrid silica-basierende Phase. Diese Hybrid-Trennsäulen zeichnen sich durch eine herausragende Druck-, Temperatur und pH-Stabilität aus [19]. Allerdings ist die Hydrophobizität dieser Trennsäulen höher als bei metalloxid-basierenden Phasen wie beispielsweise der ZirChrom-PBD-Trennsäule, sodass die Eignung dieser Phase für die Trennung der Geschmacksstoffe untersucht wurde. In Abbildung 2-30 a wurde ein Temperaturgradient mit einer Steigung von

2°C min⁻¹ angewendet und die Elution der Geschmacksstoffe gelingt innerhalb von 42 Minuten. In diesem Beispiel eluiert Rutin bei einer Temperatur von ca. 110°C als letzter Peak von der Säule. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 2-30 b ein Temperaturgradient mit einer Steigung von 8°C min⁻¹ angewendet worden. Unter diesen Bedingungen ist die Trennung der Geschmacksstoffe innerhalb von ca. 13 Minuten möglich.

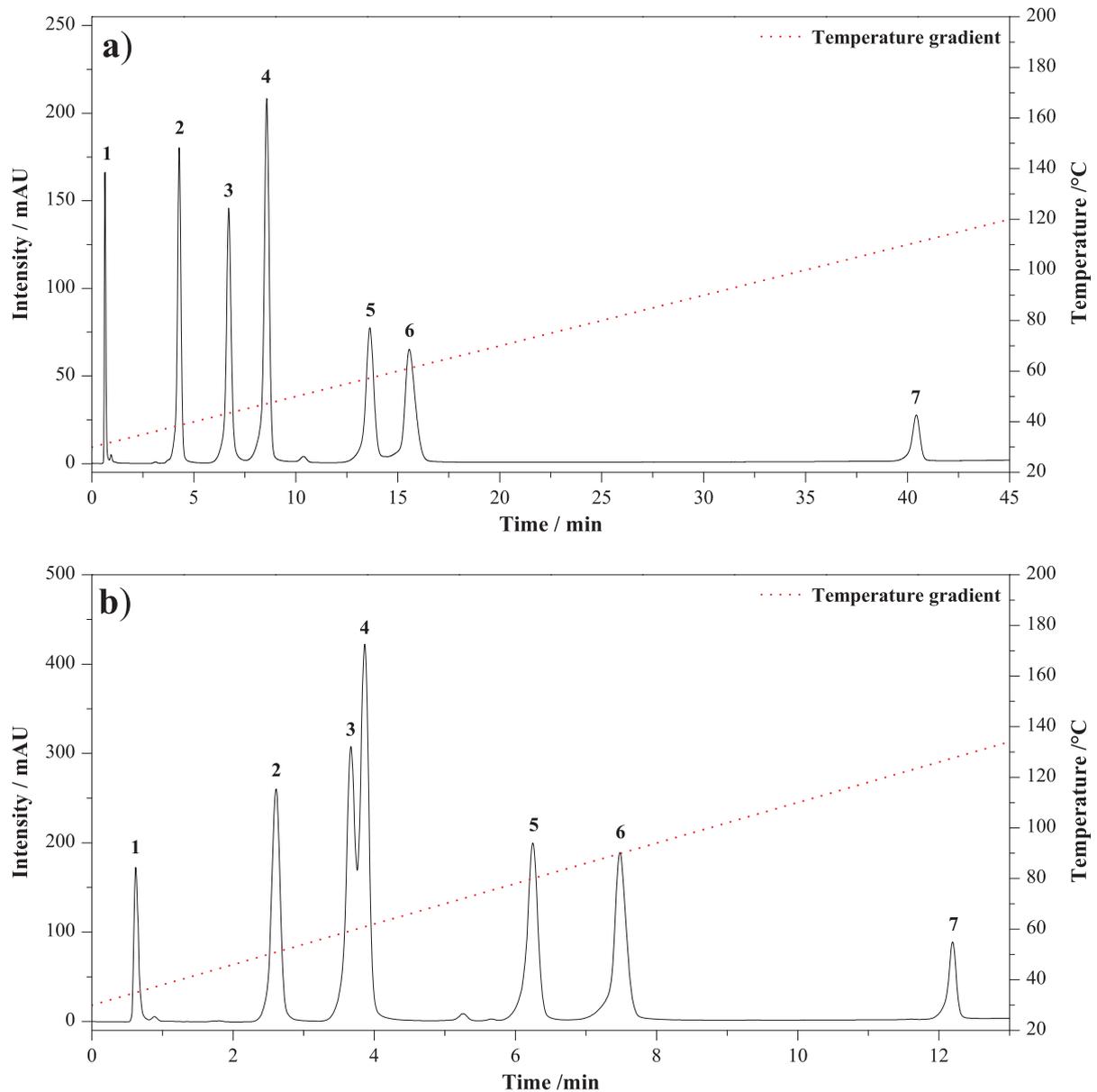


Abbildung 2-30: Trennung von sechs Geschmacksstoffen und Methanol mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 µm); mobile Phase: Phosphatpuffer, 10 mmol L⁻¹, pH 2,7; Flussrate: 0,5 mL min⁻¹; Temperaturgradient: 30°C auf 180°C mit a) 2°C min⁻¹, b) 8°C min⁻¹. Injektionsvolumen: 3 µL; Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Methanol, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.

Darüber hinaus wird eine Ko-Elution von Theophyllin und Catechin beobachtet. Unter Verwendung des Gradienten mit einer Steigung von 8°C min⁻¹ ist zu beachten, dass eine Temperatur von ca. 130°C erforderlich ist, um Rutin von der Säule zu eluieren. Generell ist die Waters XBridge C₈ Trennsäule für die Trennung der Geschmacksstoffe mittels

Temperaturgradienten-Elution geeignet. Auch bei dieser Phase ist in Bezug auf die niedrige Starttemperatur des Gradienten von 30°C zu beachten, dass der erste Analyt in Abhängigkeit der Gradientensteigung nach vier bzw. zweieinhalb Minuten von der Säule eluiert. Vor diesem Hintergrund ist es schwierig, den Lösungsmittelpeak, der keine Retention erfährt, von den Analytpeaks abzutrennen. Dies ist jedoch für eine exakte Bestimmung der Delta-Werte mittels IRMS erforderlich [36]. Vor diesem Hintergrund scheint eine C₁₈ Trennsäule aufgrund der höheren Hydrophobizität besser geeignet zu sein als die hier verwendete C₈ Phase.

Waters Acquity C₁₈

Bei der Waters Acquity C₁₈ handelt es sich ebenfalls um eine Hybrid silica-basierende C₁₈ Trennsäule. Im Unterschied zu den Waters XBridge Trennphasen, welche mit Partikeln > 2 µm gefüllt sind, werden bei den Acquity Trennsäulen Partikel < 2 µm verwendet. Darüber hinaus zeichnen sich die Acquity Trennsäulen, ähnlich wie die XBridge Phasen, durch eine herausragende Druck-, Temperatur und pH-Stabilität aus.

In Abbildung 2-31 sind zwei Chromatogramme einer Basislinientrennung der Geschmacksstoffe mittels Temperaturgradienten-Elution dargestellt. Die kritische Auflösung zwischen Theophyllin und Catechin beträgt 3,2 (Abbildung 2-31 a) bzw. 4,2 (Abbildung 2-31 b). Weiterhin verdeutlichen die in Abbildung 2-31 dargestellten Trennungen, dass die Halbierung des Injektionsvolumens zu einer Verbesserung der Auflösung um den Faktor 1,3 führt, wenn alle übrigen chromatografischen Parameter konstant gehalten werden. Darüber hinaus könnte diese Methode noch in Hinblick auf eine Verkürzung der Laufzeit von derzeit ca. 35 Minuten auf unter 20 Minuten optimiert werden. Generell ist festzuhalten, dass die Waters Acquity C₁₈ Trennsäule gut geeignet ist, um die Geschmacksstoffe mittels Temperaturgradienten-Elution zu trennen. Allerdings muss beachtet werden, dass aufgrund der Verwendung von Partikeln < 2 µm ein Systemdruck größer 400 bar bei einer Flussrate von 0,5 mL min⁻¹ und einer Starttemperatur des Temperaturgradienten von 50°C erhalten wird. Somit lässt sich diese Trennung nicht auf konventionelle HPLC-Systemen übertragen, da diese ein Drucklimit von 400 bar besitzen. Daher wurde für die Methodenentwicklung der Geschmacksstoffe eine Waters XBridge C₁₈ Trennsäule mit 3,5 µm Partikeln ausgewählt, wodurch die Übertragbarkeit der resultierenden Methoden auf jedes kommerziell verfügbare HPLC-System gewährleistet ist.

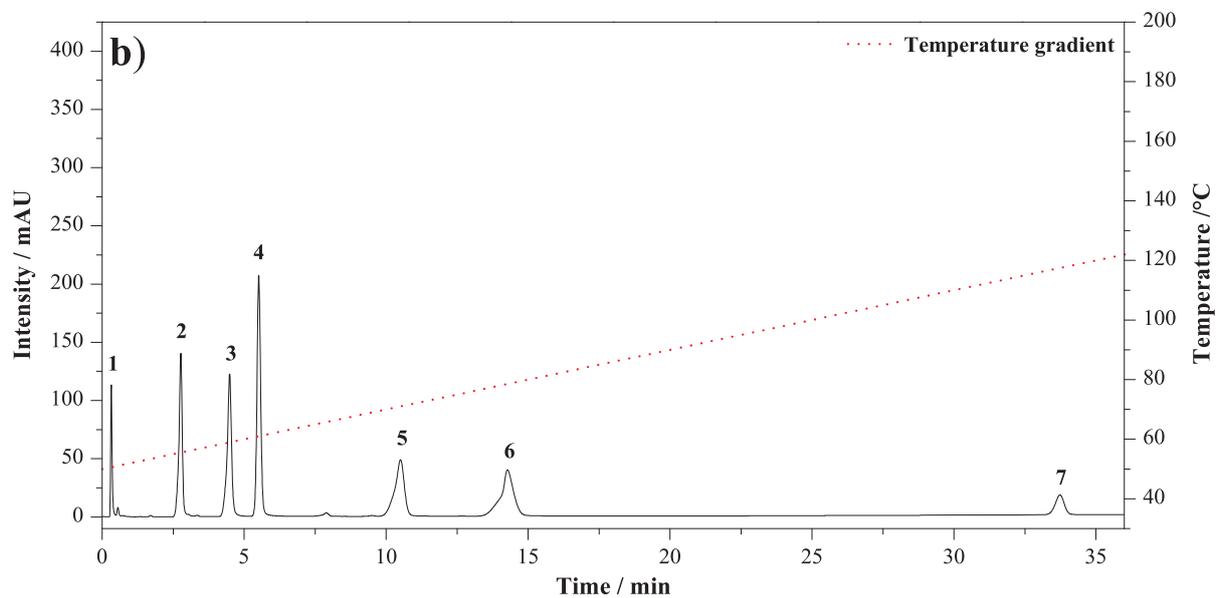
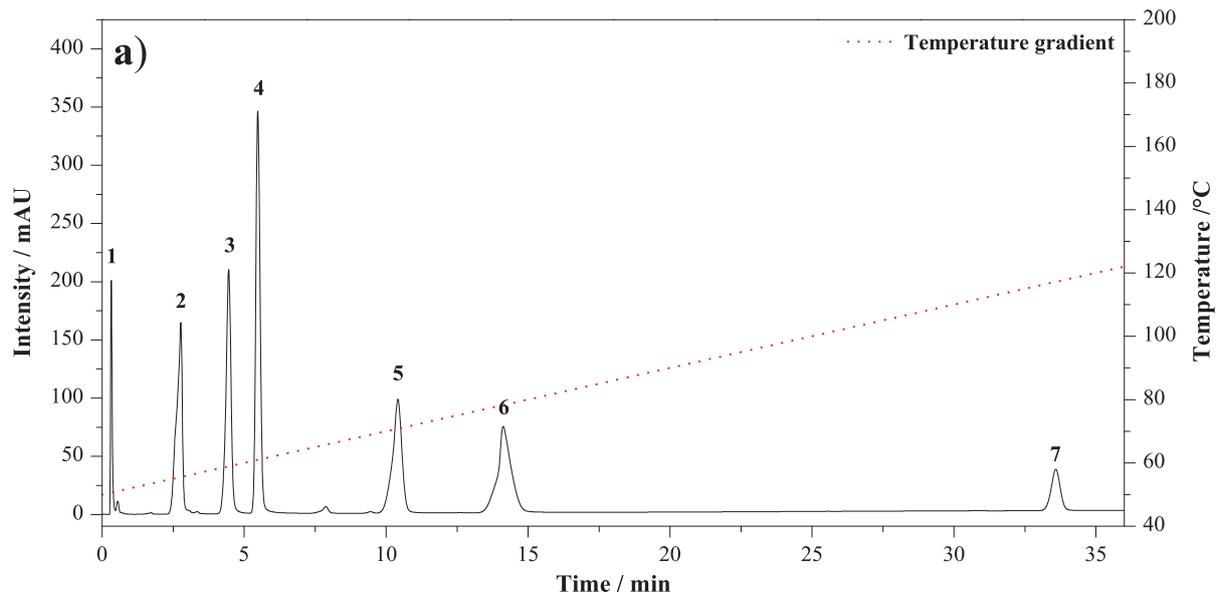


Abbildung 2-31: Trennung von sechs Geschmacksstoffen und Methanol mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters Acquity C₁₈ (50 × 2,1 mm, 1,7 μm); mobile Phase: Phosphatpuffer, 10 mmol L⁻¹, pH 2,7; Flussrate: 0,5 mL min⁻¹; Temperaturgradient: 50°C auf 180°C mit 2°C min⁻¹; Injektionsvolumen: a) 3 μL b) 1,5 μL; Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Methanol, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.

2.9.1.2 Methodenentwicklung für isotherme Trennungen

Zunächst wurde untersucht, ob die Geschmacksstoffe unter isothermen Bedingungen basisliniengetrennt werden können. Der Vorteil einer isothermen Methode besteht darin, dass keine Equilibrierungszeiten der Trennsäule berücksichtigt werden müssen.

Für diese Untersuchungen wurde eine van't Hoff Analyse in einem Temperaturbereich von 40°C bis 160°C durchgeführt und die experimentell ermittelten Retentionsdaten der Geschmacksstoffe in die kommerziell verfügbare Software DryLab® 2000 plus überführt. Anschließend wurde mit Hilfe der DryLab® Software eine Auflösungskarte (resolution map) erstellt, welche in Abbildung 2-32 a dargestellt ist. Hierbei wird die kritische Auflösung in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen.

Aufgrund der Auflösungskarte wird deutlich, dass eine Basislinientrennung (Auflösung $\geq 1,5$) lediglich bei zwei Temperaturen von 25°C und von 61°C möglich ist. Die zu erwartenden simulierten Chromatogramme sind in Abbildung 2-32 b bis d dargestellt.

Wird eine isotherme Trennung bei einer Temperatur von 25°C (Abbildung 2-32 b) durchgeführt, wäre es möglich, die Geschmacksstoffe mit einer Auflösung von 2,6 zu trennen. Auf der anderen Seite ist zu beachten, dass Rutin unter diesen Bedingungen erst nach ca. 6300 Minuten bzw. nach 4,5 Tagen von der Trennsäule eluieren würde. Wird die Temperatur auf 61°C erhöht (Abbildung 2-32 c), können die Geschmacksstoffe mit einer kritischen Auflösung von 1,8 getrennt werden. Auch bei dieser Temperatur resultiert eine nicht praktikable Laufzeit von ca. 350 Minuten für Rutin. Wird die Temperatur weiter auf beispielsweise 102°C erhöht (Abbildung 2-32 d), kann die Gesamtlaufzeit auf 27 Minuten reduziert werden. Gleichzeitig wird jedoch die kritische Auflösung von 1,8 auf 1,1 verringert, sodass die erforderliche Basislinientrennung der Geschmacksstoffe nicht möglich ist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine Basislinientrennung der Geschmacksstoffe unter isothermen Bedingungen nicht realisiert werden kann.

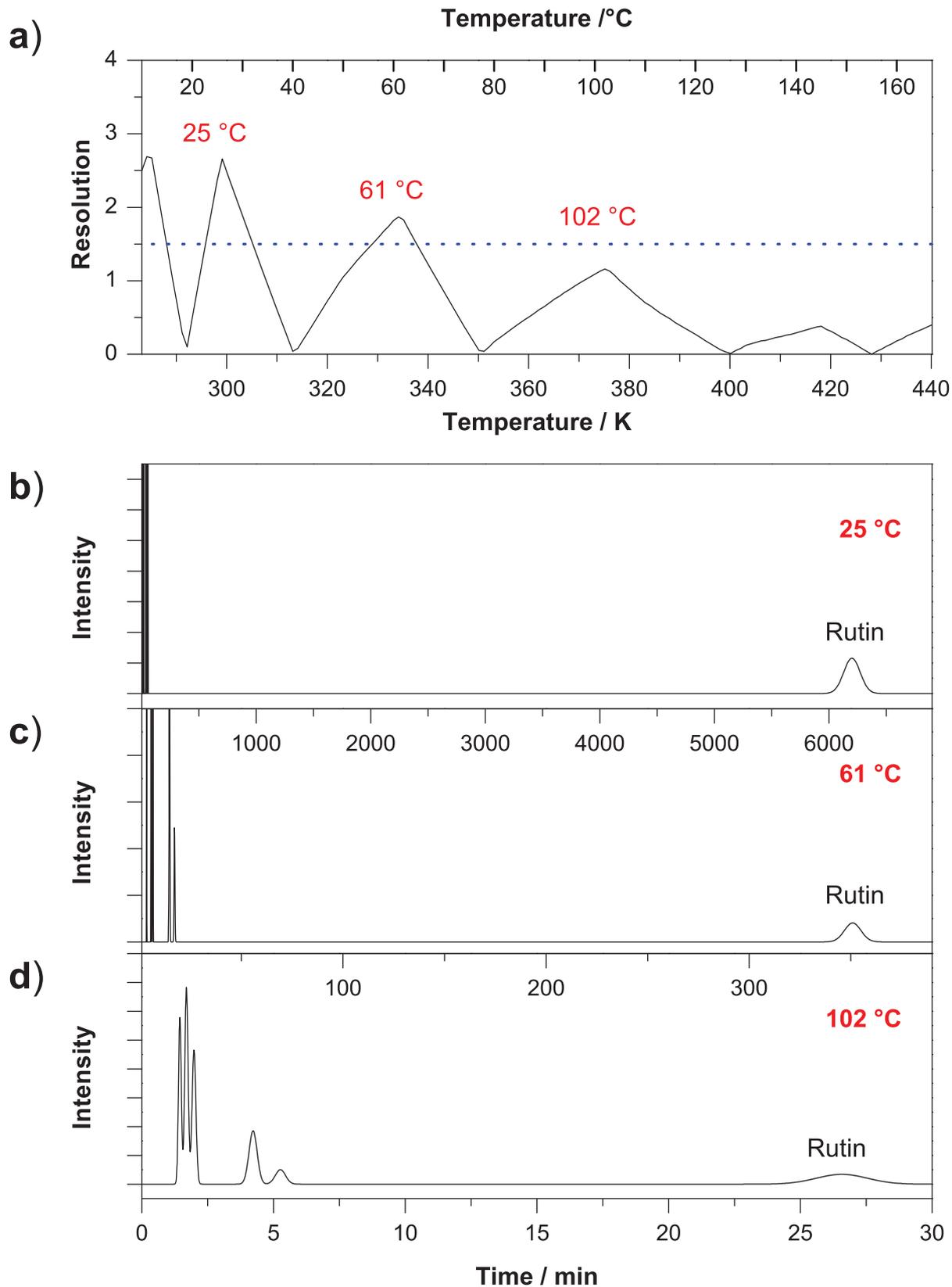


Abbildung 2-32: Isotherme Auflösungskarte und die simulierten isothermen Trennungen: Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min⁻¹; Temperatur: siehe Abbildung.

2.9.1.3 Methodenentwicklung für Trennungen mittels Temperaturgradienten

In dem bereits abgeschlossenen industriellen Forschungsvorhaben „Entwicklung von flüssigchromatografischen Methoden auf Basis der simultanen Anwendung der Lösungsmittel- und Hochtemperatur-Gradientenelution“ wurde in Kooperation mit dem Hersteller der DryLab® Software ein Retentionsmodell für eine systematische Methodenentwicklung in der Hochtemperatur-Flüssigkeitschromatografie entwickelt. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde dieses Modell weiterentwickelt und verfeinert. Dadurch ist es nun möglich, auf Grundlage von vier Temperaturgradienten-Basismessungen eine Computer-unterstützte, systematische Methodenentwicklung durchzuführen [37-39].

In Abbildung 2-33 ist der schematische Aufbau dieser Basismessungen dargestellt.

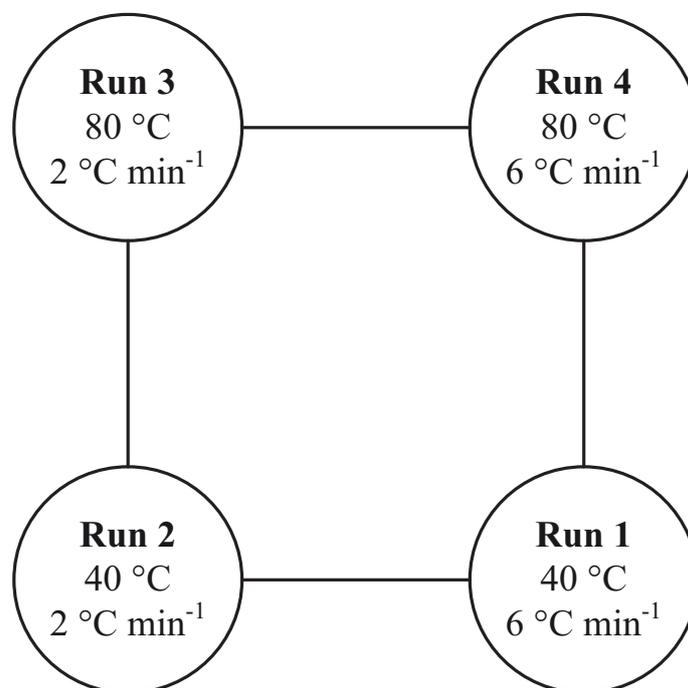


Abbildung 2-33: Kombination von Temperaturgradienten-Basismessungen für eine systematische Methodenentwicklung in der Hochtemperatur-HPLC.

Zunächst muss definiert werden, welcher Temperaturbereich als Starttemperatur für die Methodenentwicklung prinzipiell geeignet ist. In den meisten Fällen ist ein Temperaturbereich von 40°C bis 80°C als Starttemperatur für die Gradienten gut geeignet. Anschließend werden zwei Temperaturgradienten-Messungen bei der niedrigen und höheren Starttemperatur des Gradienten durchgeführt. In Bezug auf die angewendeten Steigungen der Temperaturgradienten ist zu beachten, dass diese konstant gehalten werden und sich die Gradientensteigungen mindestens um den Faktor drei unterscheiden sollten (z. B. 2°C min⁻¹ und 6°C min⁻¹). Darüber hinaus ist darauf zu achten, dass die Analyten bei den Basismessungen innerhalb der entsprechenden Temperaturgradienten-Fenster von der Säule eluieren. Anderenfalls ist mit größeren Abweichungen zwischen den simulierten und experimentell ermittelten Retentionszeiten zu rechnen [39].

Auf Grundlage der in Abbildung 2-33 dargestellten Kombination von Basismessungen wurde eine systematische Methodenentwicklung zur Trennung der Geschmacksstoffe mittels Temperaturprogrammierung durchgeführt. Für die Methodenentwicklung wurde ein Temperaturbereich von 40°C bis 180°C betrachtet.

In Abbildung 2-34 sind vier Chromatogramme der Trennung der Geschmacksstoffe dargestellt. Diese Methoden unterscheiden sich in der Anzahl der Segmente sowie der Starttemperatur der Gradienten.

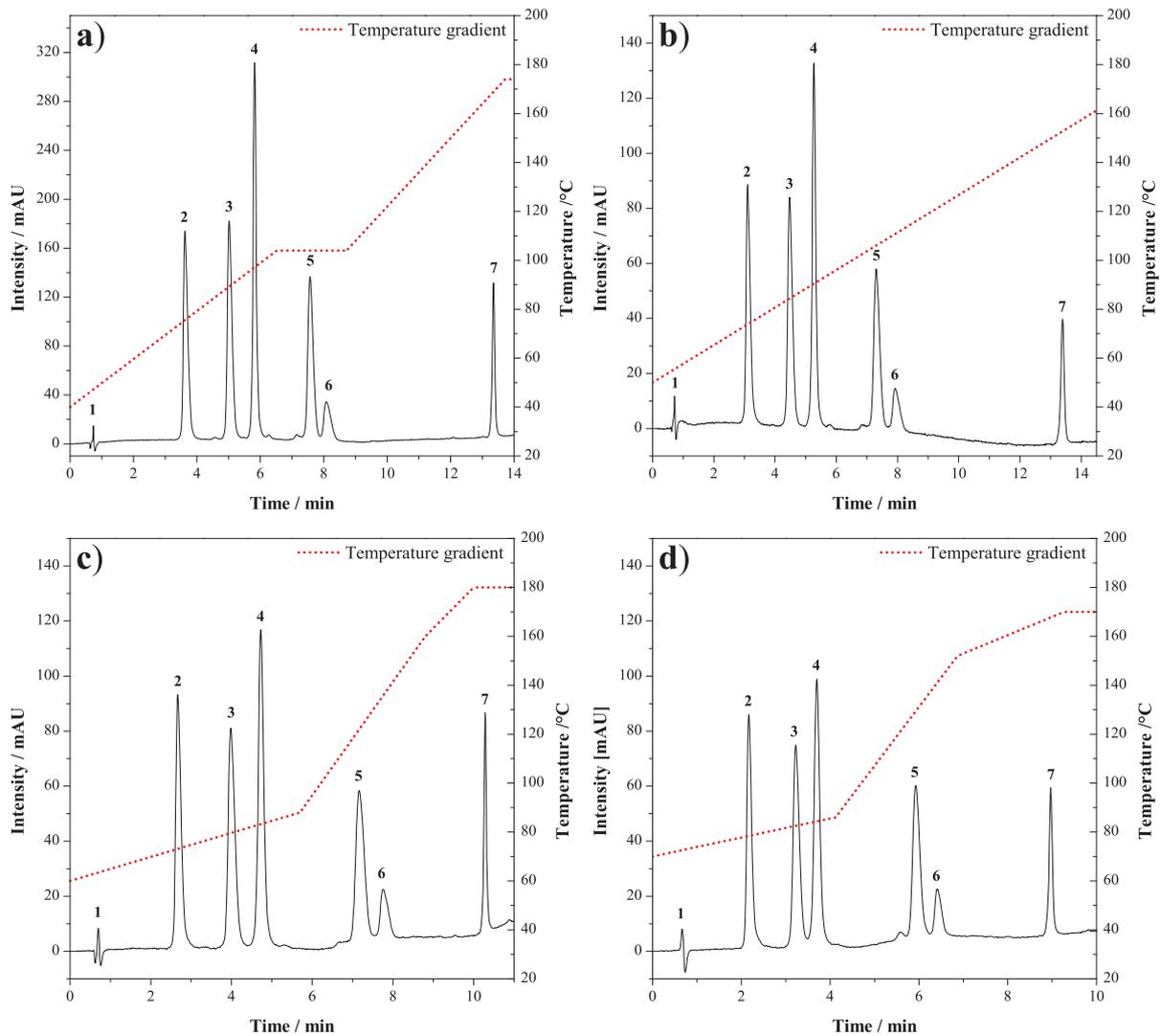


Abbildung 2-34: Chromatogramme der Trennung von sechs Geschmacksstoffen mittels Temperaturgradienten-Elution. Die Starttemperatur der Gradienten wurde variiert: (a) = 40°C, (b) = 50°C, (c) = 60°C, (d) = 70°C. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min⁻¹; Temperaturgradient: siehe Abbildung. Detektion: UV bei 200 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.

In Tabelle 2-9 werden experimentell ermittelte und vorhergesagte Retentionszeiten, relative Fehler und mittlere relative Fehler der in Abbildung 2-34 dargestellten Methoden zur Trennung der Geschmacksstoffe verglichen.

In Bezug auf die Anwendung von einfachen linearen Temperaturgradienten (Abbildung 2-34 b) können die Retentionszeiten der Analyten präzise vorhergesagt werden. Der maximale relative Fehler beträgt 4,3%, wohingegen ein mittlerer relativer Fehler von 2,6% berechnet wurde. In Bezug auf die Anwendung von komplexen Temperaturgradienten mit unterschiedlichen Steigungen des Gradienten oder isothermen Segmenten (Abbildung 2-34 a, c und d) ist zu beobachten, dass die Präzision der Retentionsvorhersagen mit zunehmender Anzahl von Segmenten abnimmt. So wird für die Analyten Theophyllin und Catechin, welche stets während des ersten Segments der in Abbildung 2-34 gezeigten Trennungen eluieren, ein relativer Fehler zwischen 1,0% und 3,5% berechnet. Im Vergleich dazu wird für den Analyten Rutin, welcher stets während des dritten (Abbildung 2-34 a und d) beziehungsweise vierten (Abbildung 2-34 c) Segments der in Abbildung 2-34 dargestellten Chromatogramme eluiert, ein relativer Fehler zwischen 3,5% und 5,6% berechnet. Wird nun ein einfacher linearer Temperaturgradient betrachtet (Abbildung 2-34 b), resultiert ein relativer Fehler von 1,1% für Rutin.

In Bezug auf die Anwendung einer Methode, welche eine Basislinientrennung der Geschmacksstoffe ermöglicht, sind lediglich die Methoden in Abbildung 2-34 b sowie Abbildung 2-34 d geeignet. Bei einer Starttemperatur des Gradienten von 50°C gelingt die Trennung der Analyten innerhalb von ca. 14 Minuten mit einer kritischen Auflösung zwischen Koffein und Aspartam von 1,51 (Abbildung 2-34 b). Wird die Starttemperatur auf 70°C erhöht und ein mehrstufiger Gradient angewendet, können die Geschmacksstoffe in ca. 9,5 Minuten mit einer kritischen Auflösung zwischen Koffein und Aspartam von 1,61 getrennt werden. Die kritische Auflösung zwischen Koffein und Aspartam der in Abbildung 2-34 a gezeigten Trennung beträgt 1,36, wohingegen eine kritische Auflösung von 1,49 für die Trennung in Abbildung 2-34 c berechnet wurde.

Da die LC-IRMS eine Basislinientrennung erfordert und eine maximale Auflösung von 1,61 unter gewissen Umständen problematisch ist, könnte die kritische Auflösung der in Abbildung 2-34 d dargestellten Trennung erhöht werden, indem eine Trennsäule doppelter Länge verwendet wird. Dadurch würde sich die kritische Auflösung theoretisch von 1,61 auf 2,27 erhöhen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die Analysezeit ebenfalls verdoppelt.

Tabelle 2-9: Vergleich von simulierten Retentionszeiten (Simul. RT) berechnet mittels LES Modell und experimentell ermittelten Retentionszeiten (Expt. RT) der Geschmacksstoffe. Die dargestellten Werte korrespondieren mit Abbildung 2-34.

Abbildung	Analyt	Seg. ^a	Peak- weite [min] ^b	Expt. RT [min]	Simul. RT [min]	Differenz [min]	Rel. Fehler [%]	Ø rel. Fehler [%]
Abbildung 2-34 a	Theobromin	1	0,29	3,62	3,73	0,12	3,2	2,8
	Theophyllin	1	0,30	5,01	5,07	0,06	1,2	
	Catechin	1	0,22	5,81	5,70	0,11	1,9	
	Koffein	2	0,34	7,56	7,67	0,11	1,4	
	Aspartam	2	0,44	8,07	8,50	0,43	5,3	
	Rutin	3	0,19	13,35	12,88	0,47	3,5	
Abbildung 2-34 b	Theobromin	1	0,28	3,10	3,23	0,13	4,3	2,6
	Theophyllin	1	0,32	4,47	4,61	0,14	3,1	
	Catechin	1	0,25	5,27	5,33	0,06	1,2	
	Koffein	1	0,39	7,30	7,48	0,19	2,5	
	Aspartam	1	0,46	7,91	8,18	0,27	3,5	
	Rutin	1	0,25	13,39	13,24	0,15	1,1	
Abbildung 2-34 c	Theobromin	1	0,27	2,66	2,75	0,09	3,3	2,7
	Theophyllin	1	0,35	3,98	4,08	0,10	2,6	
	Catechin	1	0,29	4,72	4,78	0,06	1,2	
	Koffein	2	0,42	7,16	7,07	0,09	1,2	
	Aspartam	2	0,42	7,75	7,59	0,16	2,1	
	Rutin	4	0,15	10,28	9,70	0,58	5,6	
Abbildung 2-34 d	Theobromin	1	0,23	2,16	2,25	0,09	4,2	3,0
	Theophyllin	1	0,30	3,22	3,33	0,11	3,5	
	Catechin	1	0,27	3,69	3,73	0,04	1,0	
	Koffein	2	0,33	5,92	5,81	0,11	1,9	
	Aspartam	2	0,31	6,41	6,28	0,13	2,0	
	Rutin	3	0,17	8,97	8,50	0,46	5,2	

^a Der Analyt eluierte in dem angegebenen Temperatursegment (Seg.).

^b Die Peakweite wurde in 10% der Peakhöhe berechnet.

2.9.1.4 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit von Temperaturgradienten-Methoden

Im Rahmen der Validierung einer chromatografischen Methode ist die Reproduzierbarkeit ein wichtiger Parameter. Um die Reproduzierbarkeit bei hohen Temperaturen innerhalb der Spezifikationen des verwendeten Hochtemperatur-Säulenofens zu untersuchen, wurde eine Trennmethode bestehend aus drei Segmenten mit einer Steigung von $7,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ und $31,9^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sowie einem isothermen Segment bei einer Temperatur von 180°C entwickelt. Das Profil des Temperaturgradienten ist in Abbildung 2-35 dargestellt. Des Weiteren sind in Abbildung 2-35 neun aufeinanderfolgende Chromatogramme der Trennung der Geschmacksstoffe abgebildet. Die Überlagerung der Chromatogramme verdeutlicht, dass die Temperaturgradienten-Methode hoch reproduzierbar ist. Es können nahezu keine Unterschiede zwischen den einzelnen Chromatogrammen beobachtet werden. Dies wird auch bei Betrachtung der in Tabelle 2-10 zusammengefassten experimentell ermittelten Retentionszeiten der Geschmacksstoffe ersichtlich.

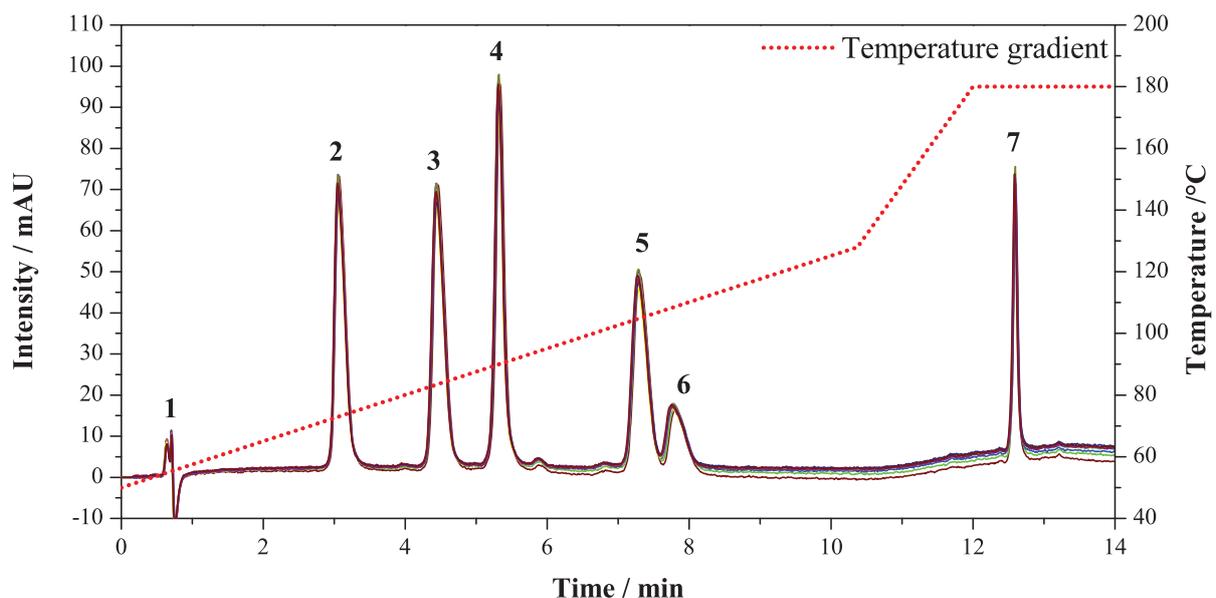


Abbildung 2-35: Darstellung von neun aufeinanderfolgenden Chromatogrammen der Trennung von sechs Geschmacksstoffen und Uracil. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (50 × 3,0 mm, 3,5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min⁻¹; Temperaturgradient: siehe Abbildung. Analyten: 1) Uracil, 2) Theobromin, 3) Theophyllin, 4) Catechin, 5) Koffein, 6) Aspartam, 7) Rutin.

Die Standardabweichung der Retentionszeiten der Geschmacksstoffe liegt in einem Bereich von 0,00 Minuten bis 0,03 Minuten. Daraus resultiert eine relative Standardabweichung der Retentionszeiten von maximal 0,4% für die Temperaturgradienten-Methode. Diese ist vergleichbar mit der relativen Standardabweichung der Retentionszeiten für Lösungsmittelgradienten-Methoden [40].

Tabelle 2-10: Übersicht über die experimentell ermittelten Retentionszeiten sowie verschiedene statistische Parameter der Wiederholungsmessungen der Geschmacksstoffe. Die Daten korrespondieren mit Abbildung 2-35.

Messung	Retentionszeit der Analyten [min]						
	Uracil	Theobromin	Theophyllin	Catechin	Koffein	Aspartam	Rutin
1	0,71	3,08	4,48	5,35	7,34	7,87	12,61
2	0,71	3,08	4,47	5,34	7,33	7,87	12,60
3	0,71	3,08	4,47	5,34	7,33	7,85	12,60
4	0,71	3,06	4,45	5,31	7,31	7,84	12,60
5	0,71	3,07	4,46	5,32	7,30	7,83	12,59
6	0,71	3,07	4,45	5,32	7,30	7,82	12,59
7	0,71	3,07	4,46	5,32	7,30	7,81	12,58
8	0,71	3,07	4,46	5,33	7,31	7,82	12,59
9	0,71	3,06	4,45	5,31	7,29	7,80	12,59
Mittelwert [min]	0,71	3,07	4,46	5,33	7,31	7,83	12,59
Standard- abweichung [min]	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01
rel. Standard- abweichung [%]	0,0	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,1

2.9.1.5 Bestimmung der Cycle Time

Ein wichtiger Parameter einer Gradienten-Methode ist die Cycle Time, die angibt, in welchen Zeitabständen Proben nacheinander in das System injiziert werden können, so dass reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. In Bezug auf die Temperaturprogrammierung in der Hochtemperatur-Flüssigchromatografie muss somit die Zeit bestimmt werden, die benötigt wird, um die Trennsäule auf die Starttemperatur des Gradienten thermisch zu equilibrieren [41,42]. Die Cycle Time wurde anhand der in Abschnitt 2.9.1.4 beschriebenen Methode bestimmt (siehe Abbildung 2-35).

Die Cycle Time kann in vier Zeitabschnitte unterteilt werden:

- Die Zeit für die Injektion der Probe (1:40 Minuten),
- die Dauer des Temperaturgradienten (14:00 Minuten),
- die Zeit für die Abkühlung des Säulenofens von 180°C auf 50°C (3:40 Minuten) und
- die Zeit für die thermische Equilibrierung der Trennsäule bei der Starttemperatur von 50°C.

Abbildung 2-36 zeigt schematisch die Vorgehensweise zur Bestimmung der Cycle Time.

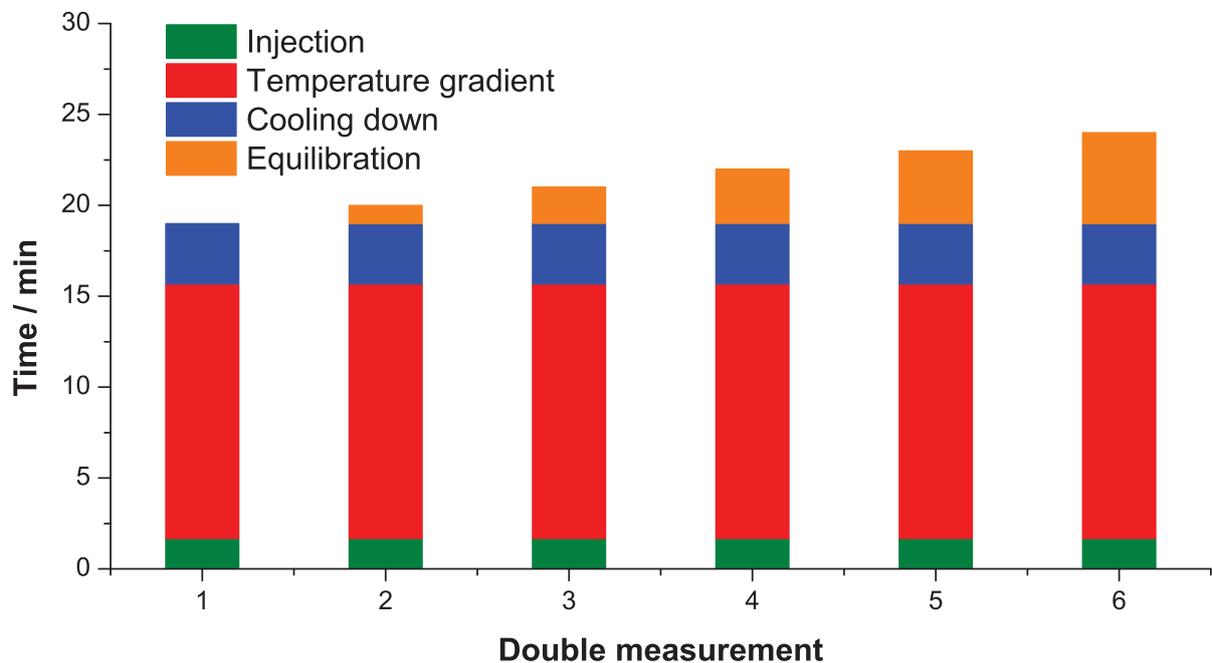


Abbildung 2-36: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Cycle Time.

Obwohl die Zeit für die Abkühlung des Säulenofens bis zur Ausgabe eines Ready-Signals mit 3:40 Minuten exakt bestimmt werden kann, schließt dies aufgrund der thermischen Masse der Trennsäule nicht die Zeit für die thermische Equilibrierung ein. Vor diesem

Hintergrund wurden in einem ersten Schritt die Retentionszeiten der Geschmacksstoffe in Abhängigkeit des angewendeten Temperaturgradienten (Abbildung 2-35) experimentell ermittelt und als Berechnungsgrundlage verwendet. Anschließend wurden sechs Temperaturgradienten-Doppelmessungen durchgeführt und die Equilibrierungszeit innerhalb einer Doppelmessung in einem Intervall von einer Minute variiert. Zwischen den ersten Messungen der aufeinanderfolgenden Doppelmessungen wurde eine Wartezeit von 30 Minuten berücksichtigt, um zu gewährleisten, dass die Trennsäule thermisch equilibriert war. Anschließend werden die experimentell ermittelten Retentionszeiten der Geschmacksstoffe in Abhängigkeit der Equilibrierungsdauer mit den Retentionszeiten der thermisch equilibrierten Trennung verglichen und die Differenzen der Retentionszeiten berechnet. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 2-37 dargestellt.

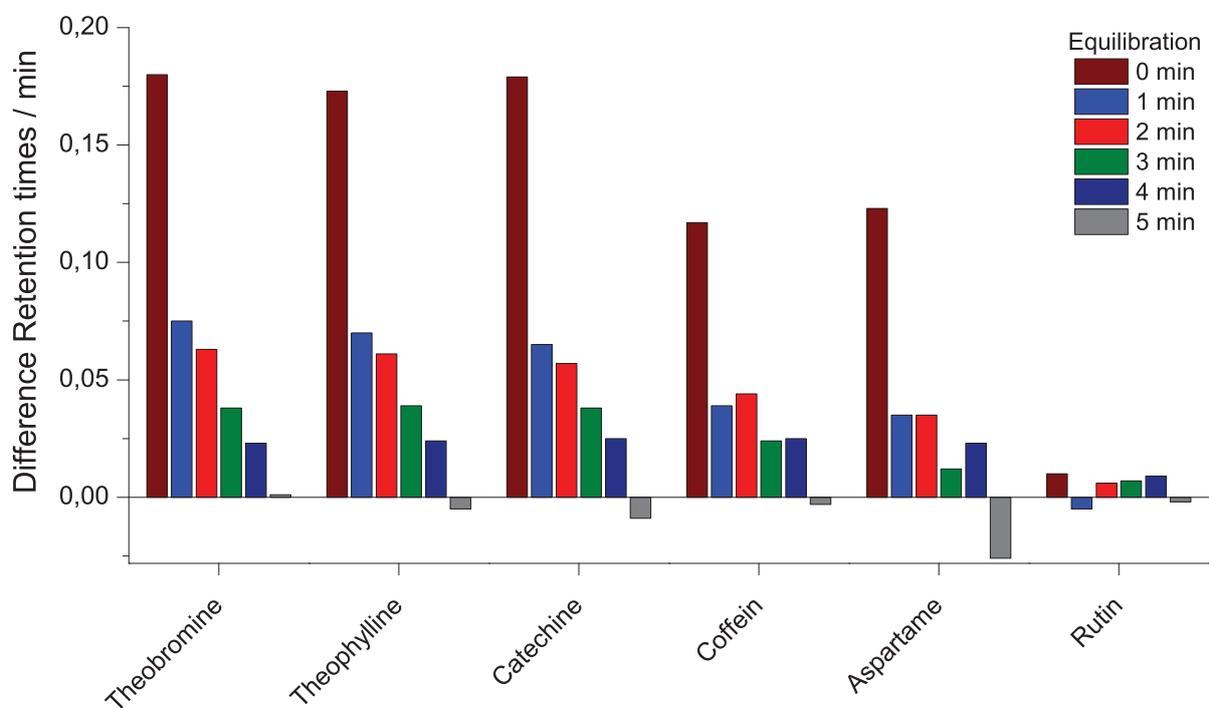


Abbildung 2-37: Bestimmung der erforderlichen Equilibrierungszeit im Temperaturgradienten-Modus.

Hierbei wird deutlich, dass die Differenzen der Retentionszeiten mit zunehmender Equilibrierungsdauer kleiner werden. Bei einer Equilibrierung von 5 Minuten sind die Differenzen der Retentionszeiten kleiner bzw. gleich der in Abschnitt 2.9.1.4 ermittelten Standardabweichung für Wiederholungsmessungen der Geschmacksstoffe.

Unter Berücksichtigung der Zeit, welche für die Injektion der Probe sowie die Abkühlung des Hochtemperatur-Säulenofens erforderlich ist, ergibt sich eine Equilibrierungsdauer von mindestens 10:20 Minuten für eine Methode in einem Temperaturbereich von 50°C bis 180°C. Wird die Dauer des angewendeten Temperaturgradienten berücksichtigt, beträgt die Cycle Time für die in Abbildung 2-35 dargestellte Methode 24 Minuten.

2.9.1.6 Untersuchungen zur Robustheit von Temperaturgradienten-Methoden

Ein weiterer wichtiger Parameter einer chromatografischen Methode ist die Robustheit. Sie beschreibt die Änderung der chromatografischen Trennung in Abhängigkeit kleiner Variationen der Methodenparameter, wie z. B. der Temperatur oder des Zeitprogramms.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde deshalb die Robustheit der in Abbildung 2-35 dargestellten Methode zur Trennung der Geschmacksstoffe in Bezug auf kleine Änderungen der Temperatur untersucht. Dazu wurde die Temperatur der jeweiligen Gradientenpunkte um $\pm 2^\circ\text{C}$ variiert und die kritische Auflösung zwischen Koffein und Aspartam ermittelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 2-11 zusammengefasst.

Tabelle 2-11: Änderung der kritischen Auflösung (R_S) zwischen Koffein und Aspartam wenn die Temperatur der Gradientenpunkte verändert wird. Die Daten korrespondieren mit Abbildung 2-38.

$\Delta T = -2^\circ\text{C}$		$\Delta T = -1^\circ\text{C}$		$\Delta T = \pm 0^\circ\text{C}$		$\Delta T = +1^\circ\text{C}$		$\Delta T = +2^\circ\text{C}$	
Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Temp. [°C]
0,00	48	0,00	49	0,00	50	0,00	51	0,00	52
10,37	126	10,37	127	10,37	128	10,37	129	10,37	130
12,00	178	12,00	179	12,00	180	12,00	181	12,00	182
14,00	178	14,00	179	14,00	180	14,00	181	14,00	182
R_S	1,06	1,10		1,13		1,09		1,15	

Wird die Temperatur der Gradientenpunkte um -2°C verringert, wird ebenfalls die kritische Auflösung von 1,13 auf 1,06 reduziert. Für den Fall, dass die Temperatur um $+1^\circ\text{C}$ erhöht wird, kommt es zu einer Reduzierung von 1,13 auf 1,09. Im Gegensatz dazu erhöht sich die kritische Auflösung von 1,13 auf 1,15, wenn die Temperatur der Gradientenpunkte um $+2^\circ\text{C}$ erhöht wird. Gleichzeitig ändern sich auch die Retentionszeiten. In Abbildung 2-38 sind die experimentell ermittelten Chromatogramme für die Änderung der Temperatur um $\pm 1^\circ\text{C}$ dargestellt.

Wird die Temperatur der Gradientenpunkte um 1°C verringert, wird eine Erhöhung der Retentionszeiten für alle Analyten beobachtet. Im Gegensatz dazu führt eine Erhöhung der Temperatur der Gradientenpunkte zu einer Verringerung der Retentionszeiten.

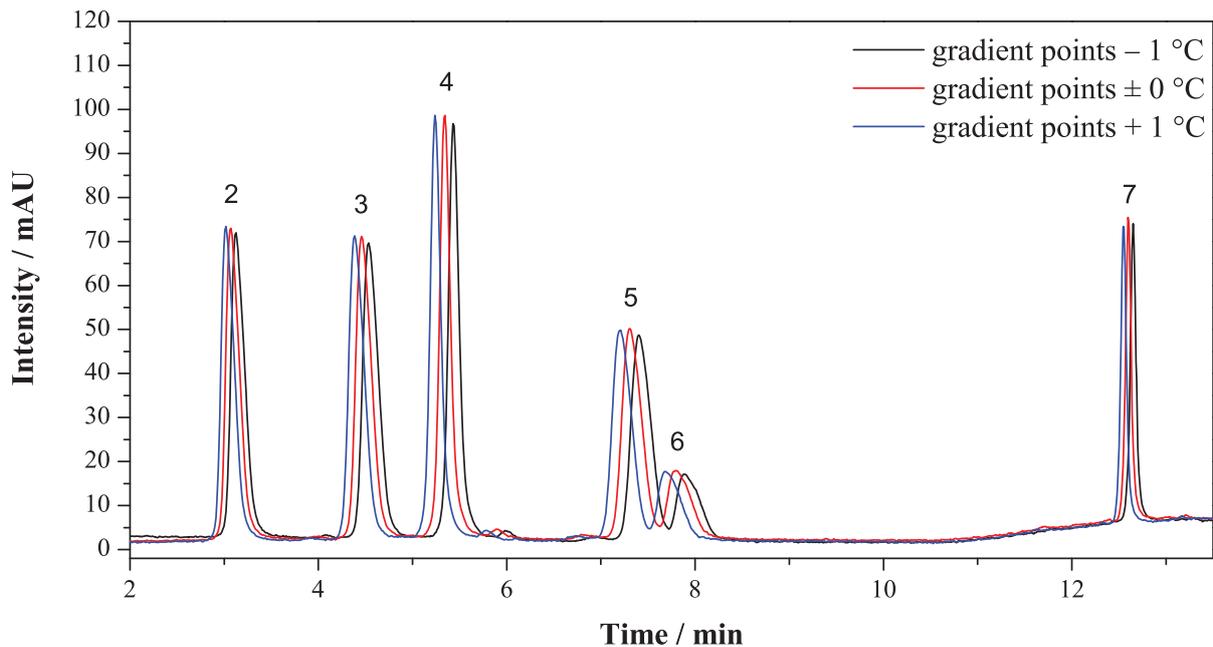


Abbildung 2-38: Gemeinsame Darstellung von drei Chromatogrammen der Trennung der Geschmacksstoffe. Die Temperatur der einzelnen Temperaturgradienten-Punkte wurde jeweils um $\pm 1^\circ\text{C}$ verändert. Chromatografische Bedingungen: siehe Abbildung 2-35.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die in Abbildung 2-35 d dargestellte Temperaturgradienten-Methode nicht robust ist und für Routineanwendungen ungeeignet ist.

2.9.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenentwicklung zur Trennung der Geschmacksstoffe

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine isotherme Trennung der Geschmacksstoffe aufgrund der sehr langen Retentionszeiten nicht sinnvoll ist. Im Vergleich dazu wurde gezeigt, dass eine Temperaturgradienten-Elution gut geeignet ist, um die Geschmacksstoffe mit einer kritischen Auflösung $\geq 1,5$ zu trennen. Um die kritische Auflösung und die Robustheit der Methode zu erhöhen, werden die Trennungen für die Kopplung mit dem Isotopenverhältnismassenspektrometer auf einer $100\text{ mm} \times 3,0\text{ mm}; 3,5\text{ }\mu\text{m}$ Waters XBridge C_{18} Trennsäule durchgeführt (siehe Abschnitt 2.10).

2.9.2 Methodenentwicklung für die Trennung von Sulfonamiden

2.9.2.1 Methodenentwicklung für isotherme Trennungen

Im Rahmen der Methodenentwicklung zur Trennung der Sulfonamide wurde zunächst untersucht, ob diese Analyten unter isothermen Bedingungen mit einer Auflösung $\geq 1,5$ getrennt werden können. Dazu wurde eine van't Hoff Analyse in einem Temperaturbereich von 60°C bis 180°C durchgeführt. Anschließend wurden die experimentell ermittelten Retentionsdaten verwendet, um einen van't Hoff plot zu erstellen, welcher in Abbildung 2-39 a dargestellt ist. Weiterhin sind in Tabelle 2-12 die Parameter der linearen Regression des van't Hoff plots für die Sulfonamide zusammengefasst. Abbildung 2-39 a verdeutlicht, dass alle Sulfonamide einen kurvenförmigen van't Hoff plot aufweisen, obwohl eine strikte linearere Beziehung zwischen dem Logarithmus des Retentionsfaktors der Analyten und der inversen Temperatur erwartet wurde [41-43]. In der wissenschaftlichen Literatur sind verschiedene Beispiele für lineare [44-46] als auch nicht-lineare [47-49] van't Hoff plots beschrieben. In Bezug auf eine systematische isotherme Methodenentwicklung sind die beobachteten Abweichungen von diesem linearen Verhalten problematisch, denn die van't Hoff Analyse bzw. Gleichung ist die mathematische Grundlage für kommerziell verfügbare Software Programme wie ChromSwordAuto oder DryLab.

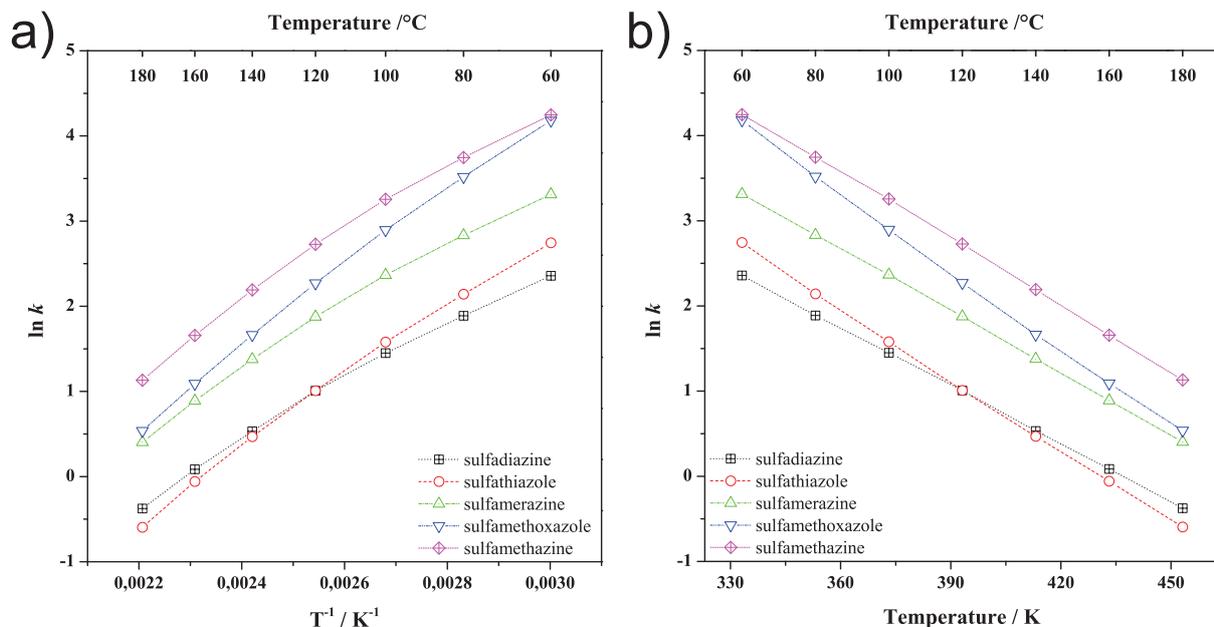


Abbildung 2-39: Vergleich zwischen dem van't Hoff plot (a) und der Auftragung des Logarithmus des Retentionsfaktors gegen die Temperatur (b) für die ausgewählten Sulfonamide. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure. Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Detektion: UV bei 270 nm.

Tabelle 2-12: Zusammenfassung der Parameter der linearen Regression der Sulfonamide in Abhängigkeit der Auftragung des Logarithmus des Retentionsfaktors gegen die reziproke Temperatur bzw. Temperatur.

Abbildung	Analyt	Steigung	Achsenabschnitt	Korrelations-Koeffizient (R ²)
Abbildung 2-39 a	Sulfadiazin	3420,2	-7,7987	0,9915
	Sulfathiazol	4181,5	-9,7066	0,9955
	Sulfamerazin	3656,1	-7,5318	0,9908
	Sulfamethoxazol	4587,0	-9,4821	0,9963
	Sulfamethazin	3917,8	-7,3620	0,9893
Abbildung 2-39 b	Sulfadiazin	-0,0227	3,719	0,9999
	Sulfathiazol	-0,0277	4,3676	0,9995
	Sulfamerazin	-0,0243	4,7815	0,9999
	Sulfamethoxazol	-0,0304	5,9549	0,9992
	Sulfamethazin	-0,0261	5,8349	0,9997

Die Konsequenz des nicht-linearen van't Hoff Verhaltens ist, dass isotherme Retentionsvorhersagen zu großen Abweichungen zwischen simulierten und experimentell ermittelten Retentionszeiten führen, wenn die Berechnungen auf Grundlage von lediglich zwei Temperaturen wie beispielsweise 60°C und 180°C beruhen. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise ein relativer Fehler von 23% für die Vorhersage der Retentionszeit für Sulfamethazin bei einer Temperatur von 100°C ermittelt [37].

Um die Genauigkeit der Retentionsvorhersage zu verbessern ist es möglich, eine Auftragung des Retentionsfaktors der Sulfonamide gegen die Temperatur zu wählen. Diese Auftragung ist in Abbildung 2-39 b dargestellt. Weiterhin sind die Parameter der linearen Regression für diesen Plot in Tabelle 2-12 zusammengefasst. Für die Auftragung des Retentionsfaktors der Sulfonamide gegen die Temperatur kann eine strikt lineare Beziehung beobachtet werden. Dies wird ebenfalls durch die in Tabelle 2-12 aufgeführten Korrelationskoeffizienten verdeutlicht. Unter Verwendung der Auftragung des Logarithmus des Retentionsfaktors gegen die Temperatur kann der relative Fehler für die Vorhersage der Retentionszeit für eine Temperatur von 100°C für Sulfamethazin von 23% auf 4,5% reduziert werden.

An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass der Parameter Temperatur in der Flüssigchromatografie verwendet werden kann, um die Selektivität der Trennung signifikant zu verändern [50,51]. So ist in Abbildung 2-39 die Änderung der Elutionsreihenfolge von Sulfathiazol und Sulfadiazin bei einer Temperatur von etwa 120°C zu erkennen. In Bezug auf eine isotherme Methodenentwicklung verdeutlicht Abbildung 2-39, dass zwei Temperaturbereiche zwischen 70°C bis 100°C und zwischen 150°C bis 180°C geeignet sind.

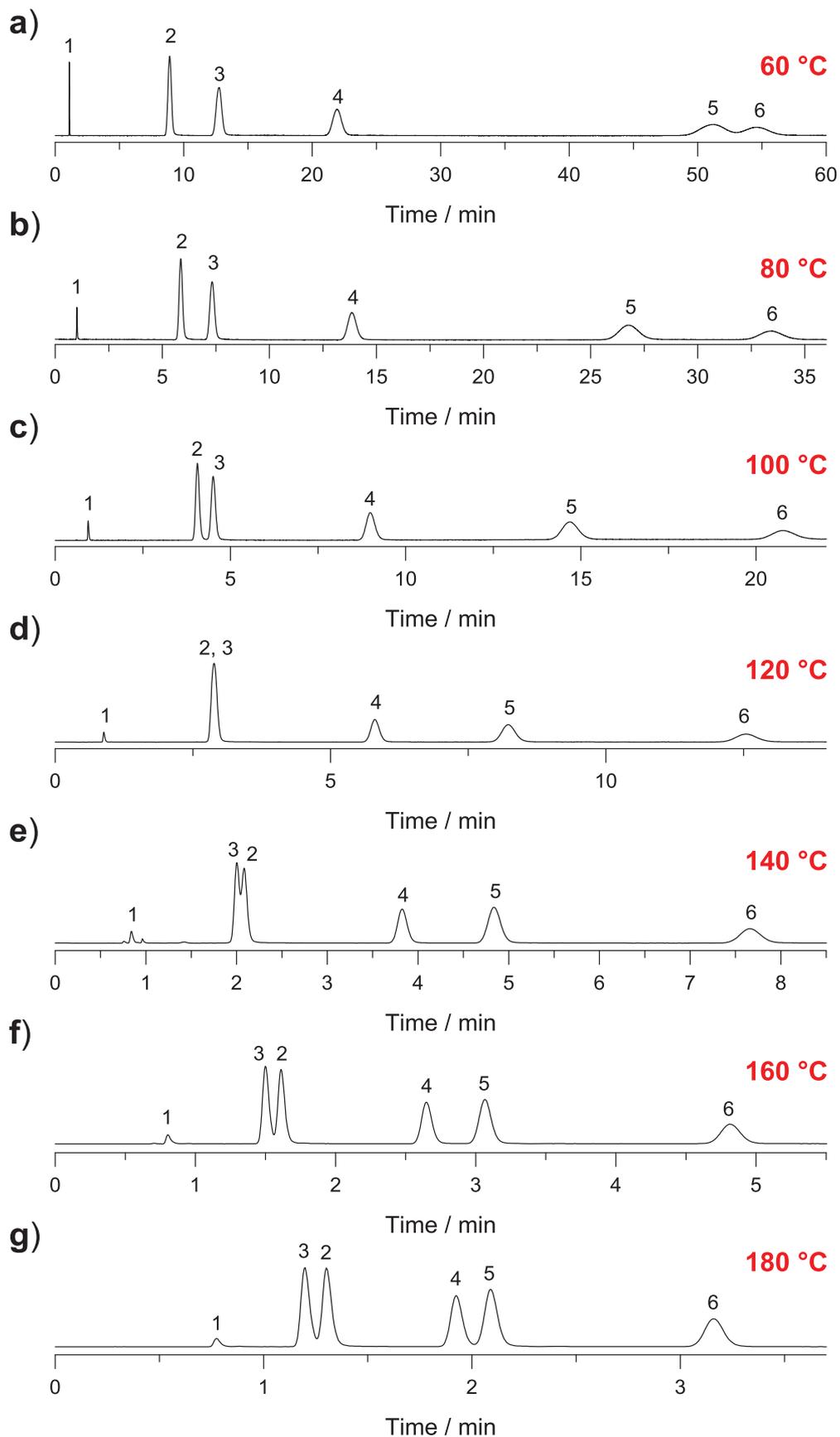


Abbildung 2-40: Isotherme Trennungen von fünf Sulfonamiden. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Detektion: UV bei 270 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.

Dies wird auch aus den in Abbildung 2-40 dargestellten experimentell ermittelten Chromatogrammen ersichtlich.

Wird die Trennung der Sulfonamide bei einer Temperatur von 60°C (Abbildung 2-40 a) durchgeführt, können die ersten drei Sulfonamide mit einer hohen Auflösung von 5,8 getrennt werden, wohingegen die kritische Auflösung (R_s) zwischen Sulfamethoxazol und Sulfamethazin (Peak-Paar 5/6) mit 0,9 zu gering ist. Weiterhin eluieren diese Analyten nach ca. 60 Minuten als breite Peaks. Wird die Temperatur auf 80°C erhöht (Abbildung 2-40 b), können alle Sulfonamide mit einer kritischen Auflösung von 4,0 basisliniengetrennt werden und die Analysendauer wird auf ca. 36 Minuten reduziert. Wird die Temperatur auf 120°C erhöht (Abbildung 2-40 d), ist die Auflösung zwischen Sulfamethoxazol und Sulfamethazin sehr groß ($R = 7,2$), wohingegen Sulfadiazin und Sulfathiazol co-eluieren. Darüber hinaus verringert sich die Analysendauer auf 14 Minuten. Eine Erhöhung der Temperatur auf 180°C hat zur Folge (Abbildung 2-40 g), dass die Analysendauer auf ca. 3,5 Minuten reduziert werden kann und eine Trennung aller Sulfonamide mit einer kritischen Auflösung von 1,1 erfolgt. Die Auflösung von 1,1 wäre für eine UV-Detektion geeignet, jedoch nicht für die Kopplung mit dem Isotopenverhältnismassenspektrometer. Hier ist eine Basislinientrennung zwingend notwendig ($R_s \geq 1,5$). Weiterhin ist zu beachten, dass einige Sulfonamide nicht rein wässrig gelöst werden können. Die injizierte Probe enthält unter Umständen einen großen Anteil eines organischen Lösungsmittels, welches zu einem ausgeprägten Lösungsmittelpeak im IRMS führt. Dieser Lösungsmittelpeak kann sich über mehrere Minuten erstrecken und die zuerst von der Säule eluierenden Peaks überdecken. Die Bestimmung der Delta-Werte im IRMS wird somit verfälscht bzw. ist nicht möglich. Vor diesem Hintergrund ist eine Methode zu bevorzugen, bei der die Analyten eine ausreichende Abtrennung vom Lösungsmittelpeak erfahren. Weiterhin ist zu beachten, dass die Lebensdauer der Trennsäule signifikant verlängert werden kann, wenn die Trennung nicht bei einer hohen Temperatur von 180°C durchgeführt wird.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die in Abbildung 2-40 g dargestellte Trennmethode der Sulfonamide bei 180°C für die Kopplung mit dem Isotopenverhältnismassenspektrometer ungeeignet ist und die Methode in Abbildung 2-40 b bei einer Temperatur von 80°C für die Trennung der Sulfonamide mittels HT-HPLC-IRMS trotz einer höheren Analysenzeit zu bevorzugen ist.

2.9.2.2 Methodenentwicklung für Trennungen mittels Temperaturgradienten

Für die Entwicklung einer Temperaturgradienten-Methode zur Trennung der Sulfonamide wurde auch hier die in Abschnitt 2.9.1.3 beschriebene Vorgehensweise angewendet. Darüber hinaus wurden zusätzlich isotherme Retentionsdaten bei 60°C und 180°C verwendet.

Abbildung 2-41 zeigt zwei Chromatogramme der Basismessungen, bei denen unterschiedliche Steigungen der Temperaturgradienten angewendet wurden.

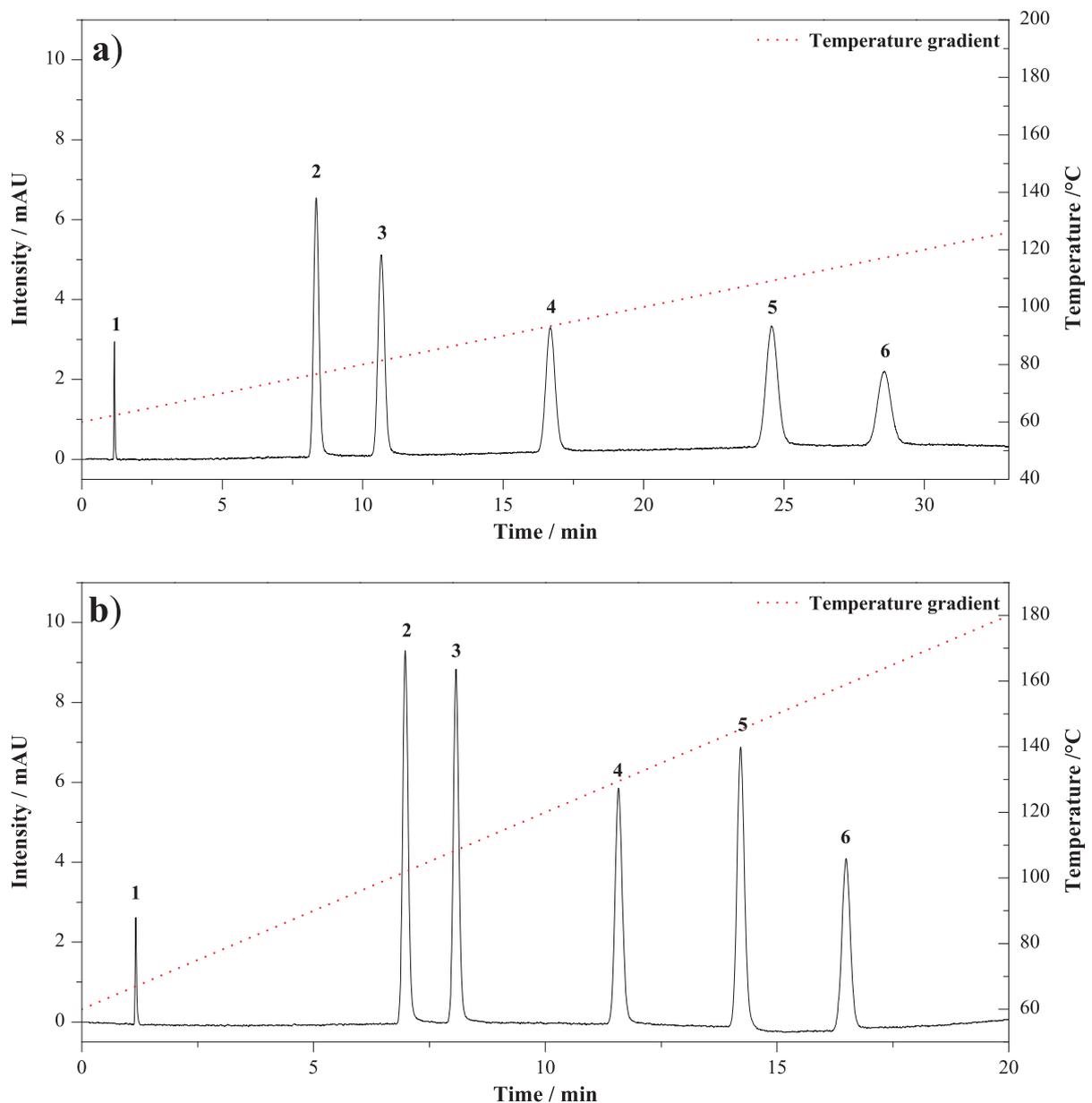


Abbildung 2-41: Chromatogramme der Basismessungen. Trennung von fünf Sulfonamiden und Uracil mittels Temperaturgradienten-Elution. a): Steigung: 2°C min⁻¹, b) Steigung: 6°C min⁻¹. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Detektion: UV bei 270 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.

Die Chromatogramme verdeutlichen, dass die Selektivität des Phasensystems für die Trennung der Sulfonamide sehr gut ist, da bereits bei den Basismessungen eine Basislinientrennung erreicht wird. Daher wurde die Temperaturgradienten-Methode lediglich in Hinsicht auf eine kürzere Analysendauer optimiert. Zwei Methoden dieser Optimierung sind in Abbildung 2-42 dargestellt. Die erste Temperaturgradienten-Methode (Abbildung 2-42 a) hat eine Starttemperatur von 60°C und besteht aus zwei linearen Temperaturgradienten mit Steigungen von ca. 12°C min⁻¹ sowie zwei isothermen Segmenten bei 115°C und 180°C.

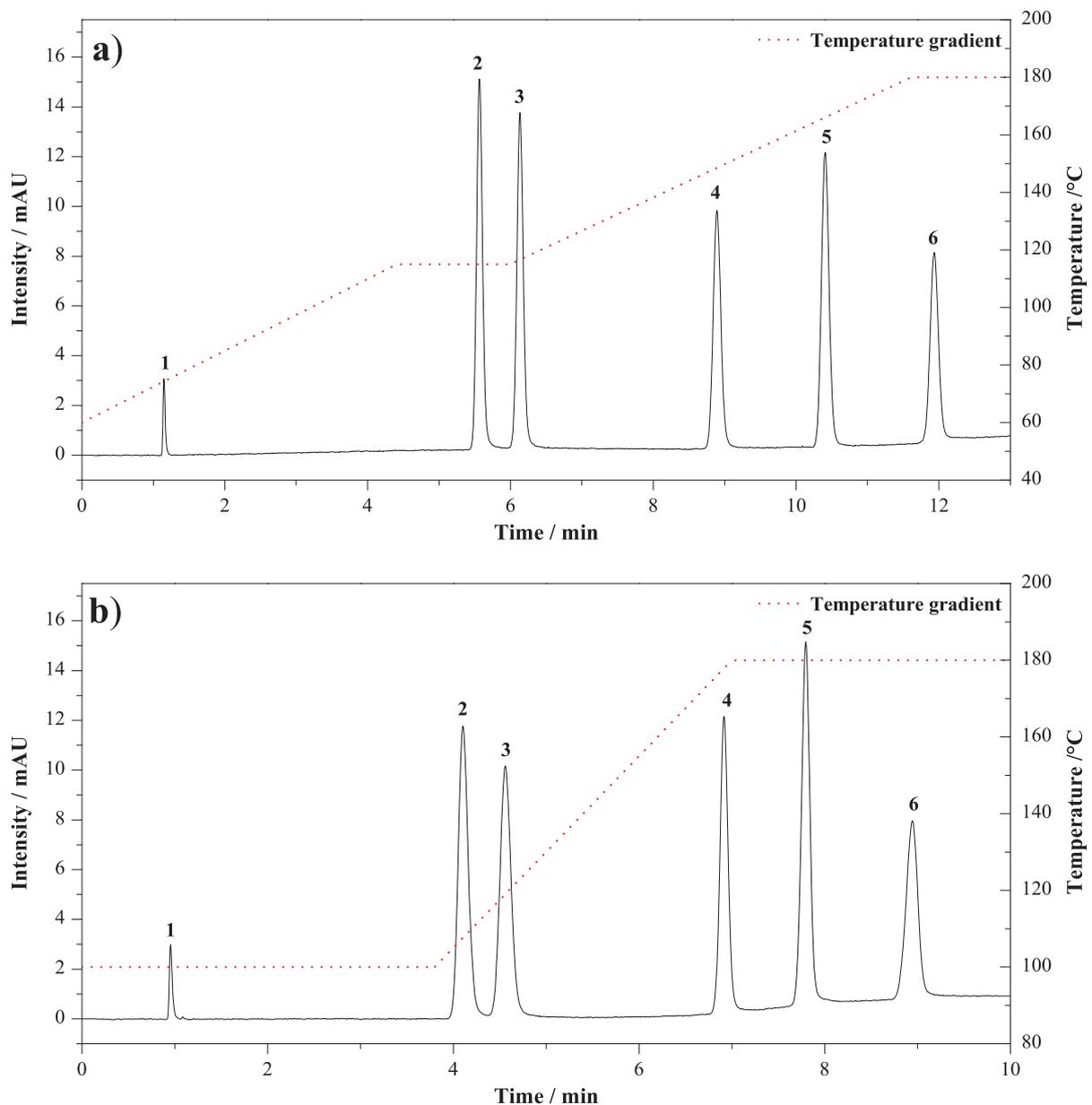


Abbildung 2-42: Trennung von fünf Sulfonamiden und Uracil mittels Temperaturgradienten-Elution. a): Starttemperatur: 60°C, b) Starttemperatur: 100°C. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Detektion: UV bei 270 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.

Unter diesen Bedingungen können die Sulfonamide in ca. 13 Minuten mit einer kritischen Auflösung von 3,4 zwischen Sulfadiazin und Sulfathiazol von der Säule eluiert werden. Die zweite Temperaturgradienten-Methode (Abbildung 2-42 b) hat eine Starttemperatur von 100°C und besteht aus zwei isothermen Segmenten bei 100°C und 180°C sowie einem Temperaturgradienten mit einer Steigung von 25°C min⁻¹. Dadurch kann die Analysendauer auf ca. 9 Minuten verkürzt werden, wobei die kritische Auflösung zwischen Sulfadiazin und Sulfathiazol auf 2,1 reduziert wird.

Unter praktischen Gesichtspunkten würde die in Abbildung 2-42 a gezeigte Methode für die Kopplung mit dem Isotopenverhältnismassenspektrometer aufgrund der höheren Auflösung des kritischen Peakpaars bevorzugt werden. Wird die Lebensdauer der Trennphase berücksichtigt, ist ebenfalls die in Abbildung 2-42 a dargestellte Trennung zu bevorzugen, da unter diesen Bedingungen die Trennsäule der Maximal-Temperatur von > 150°C über einen kürzeren Zeitraum ausgesetzt ist als bei der Methode in Abbildung 2-42 b.

2.9.2.3 Vergleich zwischen isothermer und Temperaturgradienten-Trennung

In den Abschnitten 2.9.2.1 und 2.9.2.2 konnte gezeigt werden, dass eine Basislinientrennung der Sulfonamide sowohl unter isothermen Bedingungen als auch im Temperaturgradienten-Modus möglich ist. Vor diesem Hintergrund erfolgt nun ein Vergleich und eine Bewertung der beiden Methoden, die in Abbildung 2-43 gegenübergestellt sind. Es wird deutlich, dass die Analysenzeit mit Hilfe der Temperaturgradienten-Methode (Abbildung 2-43 b) um den Faktor drei gegenüber der isothermen Trennung bei 80°C verkürzt werden kann (Abbildung 2-43 a). Darüber hinaus werden im Temperaturgradienten-Modus deutlich schmalere und höhere Peaks erhalten als unter isothermen Bedingungen, wodurch eine niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenze erzielt wird. Somit ist im Kontext der Kopplung mit dem IRMS die Temperaturgradienten-Methode zu bevorzugen, obwohl die Lebensdauer der Trennsäule bei einer isothermen Trennung bei 80°C deutlich verlängert werden kann.

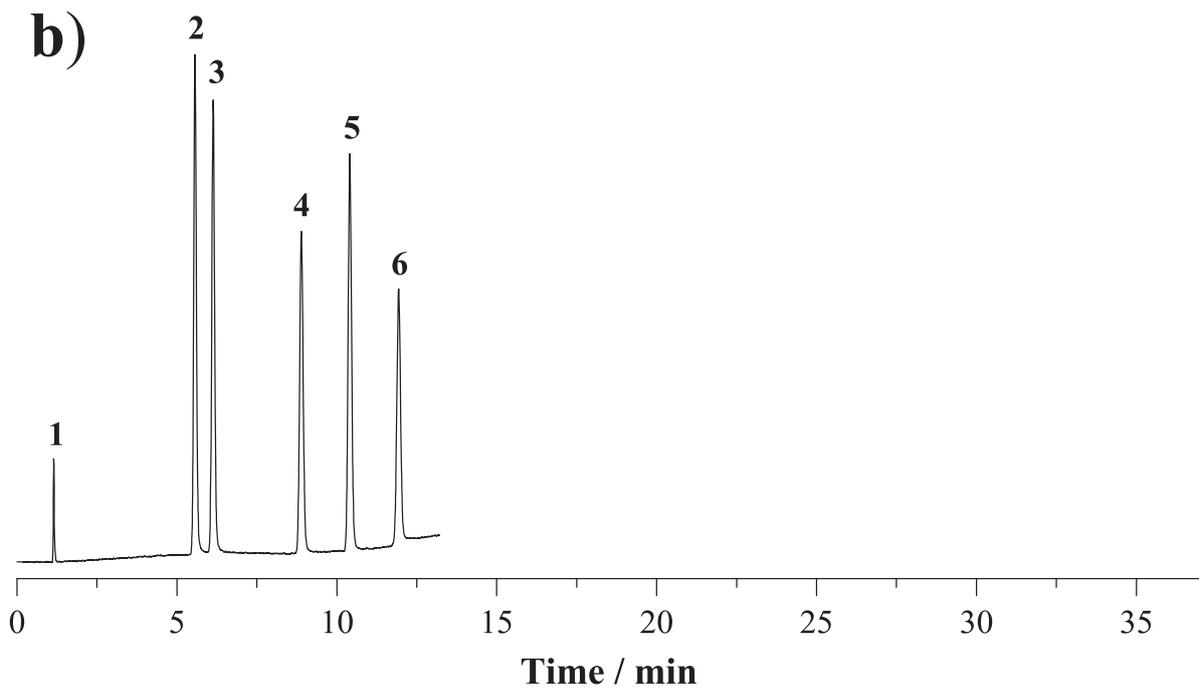
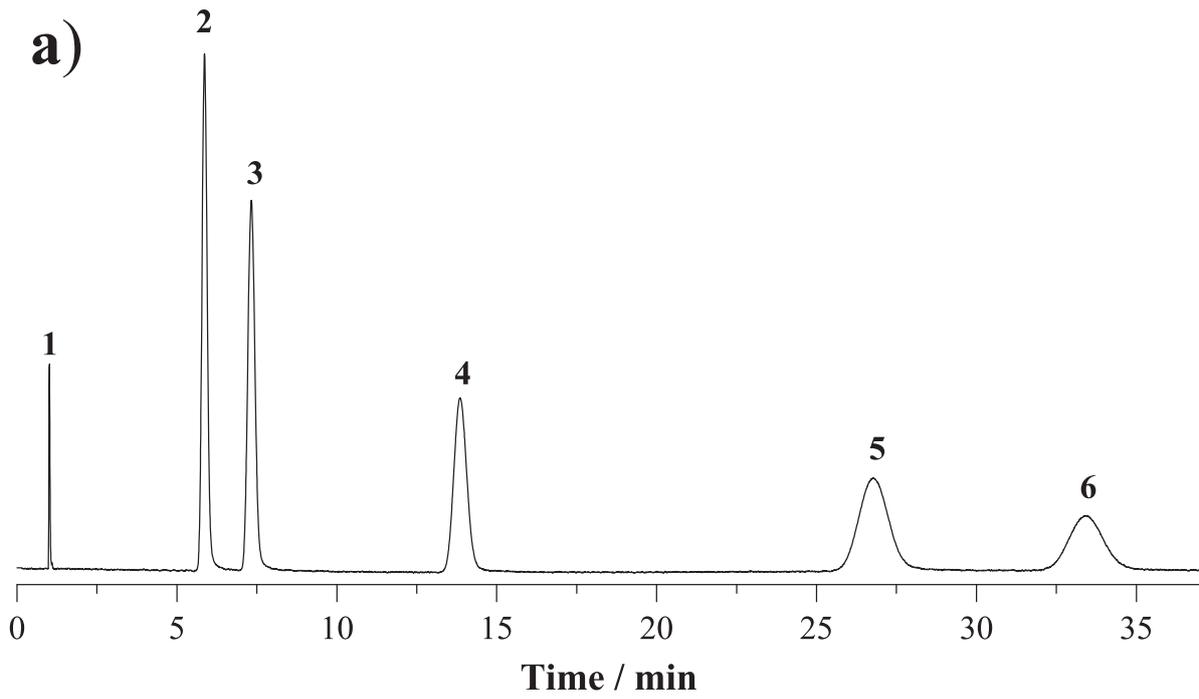


Abbildung 2-43: Vergleich zwischen der a) isothermen und b) Temperaturgradienten-Elution der Sulfonamide. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (75 × 4,6 mm, 2,5 µm), mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Temperatur: a) isotherm bei 80°C, b) Temperaturgradient siehe Abbildung 2-42 a; Detektion: UV bei 270 nm, Injektionsvolumen: a) 2 µL, b) 1 µL. Analyten: 1) Uracil, 2) Sulfadiazin, 3) Sulfathiazol, 4) Sulfamerazin, 5) Sulfamethoxazol, 6) Sulfamethazin.

2.9.3 Methodenentwicklung für die Trennung von Steroiden

2.9.3.1 Methodenentwicklung für Trennungen mittels Temperaturgradienten

Bei den in diesem Forschungsvorhaben untersuchten Substanzklasse der Steroide handelt es sich um die unpolarsten Analyten, welche betrachtet wurden. Aufgrund der hohen Hydrophobizität dieser Analyten ist eine Elution mit einer rein wässrigen mobilen Phase auf klassischen C_{18} Umkehrphasen nahezu unmöglich. Smith und Mitarbeiter [46] untersuchten, unter welchen Bedingungen Steroide über eine Waters Hybrid C_{18} Trennsäule eluiert werden können. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Elution von Testosteron bei einer Temperatur von 130°C unter Verwendung einer 5 cm langen Trennsäule mit einer mobilen Phase, die 5% Methanol enthielt, ca. 240 Minuten erfordert [46]. Diese langen Retentionszeiten sind unter praktischen Gesichtspunkten nicht akzeptabel.

Daher werden für die Trennung von unpolaren Analyten mittels Hochtemperatur-Flüssigchromatografie Trennsäulen verwendet, welche eine geringere Hydrophobizität besitzen als C_{18} Umkehrphasen. Eine Alternative sind z. B. die mit Polybutadien-(PBD) beschichteten Trennsäulen auf Basis von Zirkoniumdioxid. In Abbildung 2-44 ist eine Temperaturgradienten-Trennung von sieben Steroiden auf einer ZirChrom-PBD-Säule dargestellt [52]. Die Elution der Steroide gelingt unter Verwendung einer wässrigen mobilen Phase in ca. 45 Minuten. Die Maximaltemperatur der Methode beträgt 120°C .

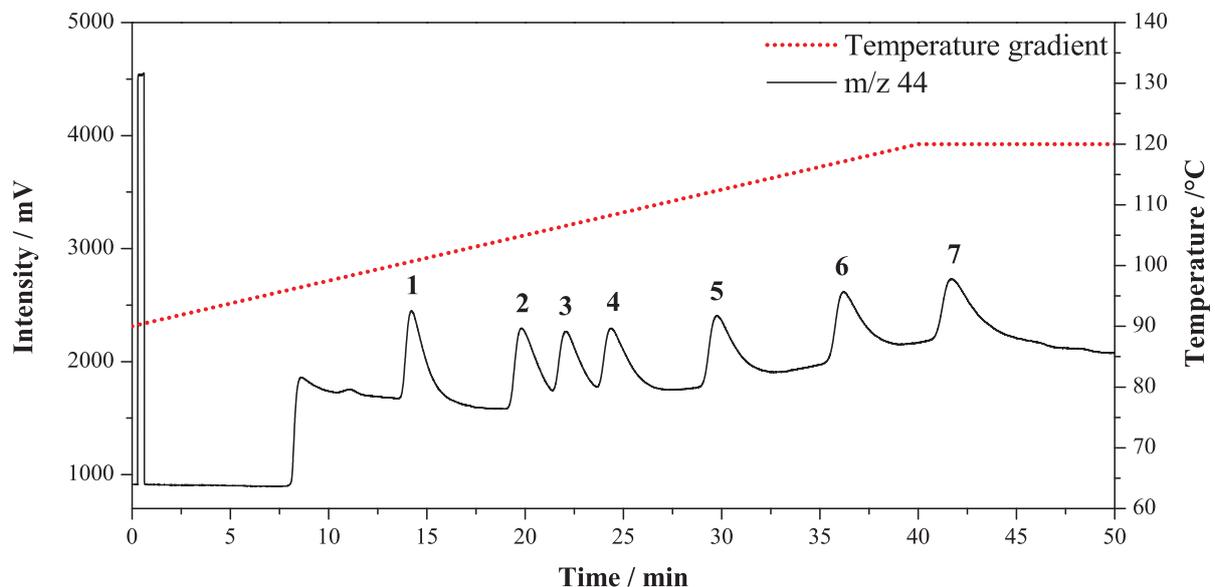


Abbildung 2-44: Trennung von sieben Steroiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: ZirChrom-PBD ($150 \times 3,0$ mm, $5 \mu\text{m}$); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,6 \text{ mL min}^{-1}$; Temperaturgradient: siehe Abbildung; Detektion: IRMS (44 m/z); Injektionsvolumen: $10 \mu\text{L}$. Analyten: 1) 19-Nortestosteron, 2) Testosteron, 3) Epitestosteron, 4) trans-Dehydroandrosteron, 5) Etiocholan- 3α ol-17-on, 6) cis-Androsteron, 7) 5α -Androstan- 3α , 17β -diol [52].

Ein Nachteil der in Abbildung 2-44 dargestellten Methode ist, dass die einzelnen Steroidpeaks als breite Banden von der Trennsäule eluieren. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte der hohe organische Anteil in der Injektionslösung (80% Methanol) sein, was zu einer Peakdeformation führen kann [53]. So beträgt beispielsweise die Peakweite von Epitestosteron ca. 3 Minuten.

Dennoch verdeutlicht die Trennung in Abbildung 2-44, dass durch die Reduzierung der Hydrophobizität der Trennsäule auch unpolare Analyten mittels Temperaturgradienten-Elution unter Verwendung eines wässrigen Eluenten von einer RP-Trennsäule eluiert werden können.

Die Hydrophobizität einer Trennsäule kann auch über die Auswahl der chemischen Modifizierung des Packungsmaterials variiert werden. So sollte die Hydrophobizität einer Trennsäule mit abnehmender Kohlenstoff-Kettenlänge sinken (Hydrophobizität: $C_{18} > C_8 > C_4$). Um dies zu überprüfen, wurden Steroid-Messungen auf einer Waters XBridge C_8 Trennsäule durchgeführt. In Abbildung 2-45 ist ein Chromatogramm dieser Messungen dargestellt.

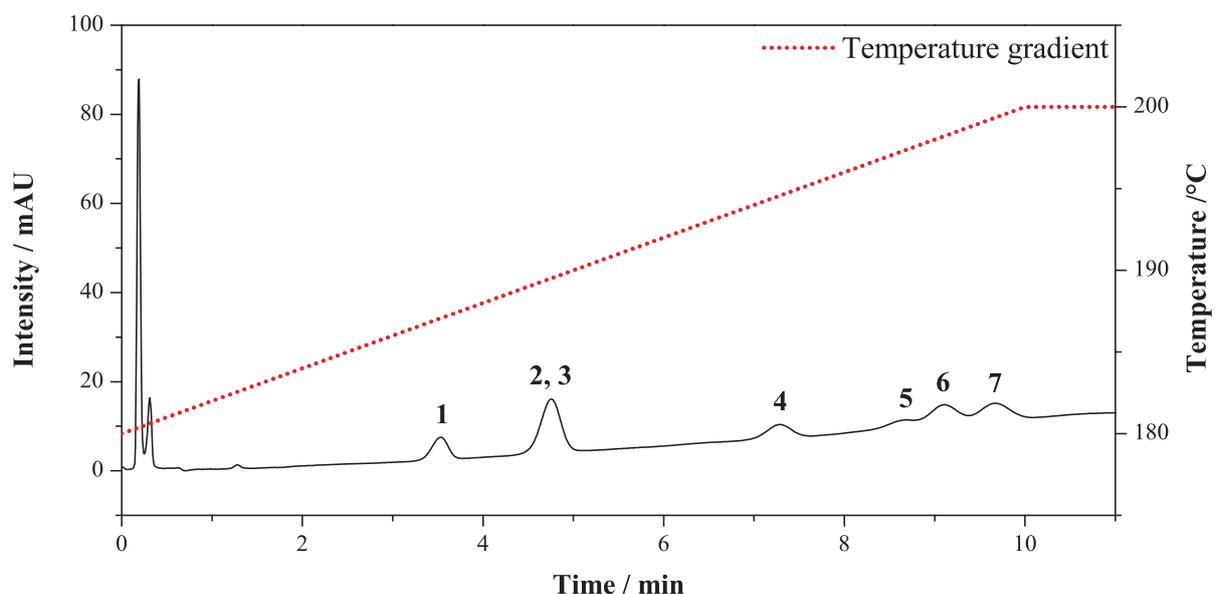


Abbildung 2-45: Trennung von sieben Steroiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C_8 ($50 \times 3,0$ mm, $3,5 \mu\text{m}$); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; Temperaturgradient: siehe Abbildung; Detektion: UV bei 200 nm ; Injektionsvolumen: $5 \mu\text{L}$. Analyten: 1) 19-Nortestosteron, 2) Testosteron, 3) Epitestosteron, 4) trans-Dehydroandrosteron, 5) Etiocholan- 3α ol-17-on, 6) cis-Androsteron, 7) 5α -Androstan- 3α , 17β -diol.

Abbildung 2-45 verdeutlicht, dass die Elution der Steroide mittels Temperaturgradienten prinzipiell möglich ist. Hier ist jedoch zu beachten, dass Temperaturen bis zu 200°C sowie eine hohe Flussrate der mobilen Phase erforderlich sind. Dadurch wird die Lebensdauer der Trennphase signifikant verkürzt und eine Kopplung mit dem Isotopenverhältnis-

massenspektrometer ist aufgrund der Limitierung der Flussrate auf maximal $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ nicht möglich.

Vor diesem Hintergrund war es erforderlich, die Hydrophobizität der verwendeten Trennsäule weiter zu reduzieren und eine Waters XBridge C₄ Trennsäule zu verwenden. Abbildung 2-46 zeigt die Trennung von drei Steroiden auf einer C₄ Phase. Hier wird ersichtlich, dass eine deutlich geringere Temperatur zur Elution der Steroide erforderlich ist. So eluiert Epitestosteron bei einer Temperatur von ca. 140°C als letzter Peak von der Trennsäule. Darüber hinaus kann die Peakweite der Steroidpeaks im Vergleich zu der in Abbildung 2-44 dargestellten Trennung um die Hälfte reduziert werden. Für Epitestosteron wurde auf der ZirChrom-PBD (Abbildung 2-44) eine Peakweite von ca. 3 Minuten beobachtet, wohingegen eine Peakweite von ca. 1,5 Minuten auf der Waters XBridge C₄ (Abbildung 2-46) resultiert.

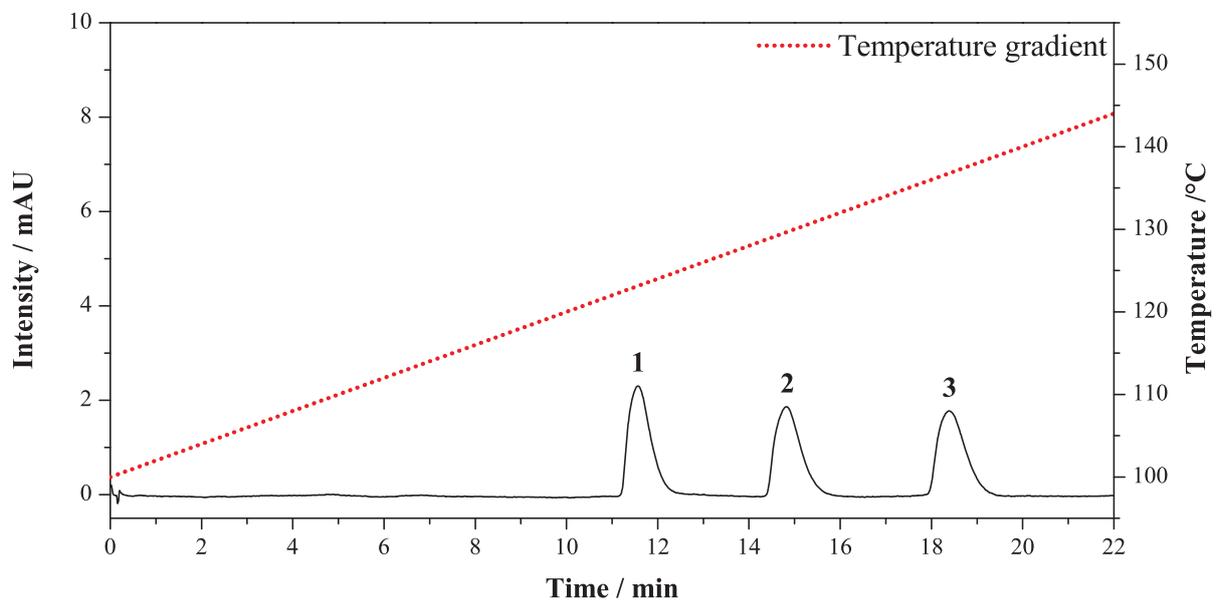


Abbildung 2-46: Trennung von drei Steroiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge C₄ ($50 \times 2,1 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; Temperaturgradient: siehe Abbildung; Detektion: UV bei 200 nm ; Injektionsvolumen: $0,1 \mu\text{L}$. Analyten: 1) 19-Nortestosteron, 2) Testosteron, 3) Epitestosteron.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Trennung der Steroide auf einer Waters XBridge C₄ Trennsäule durchgeführt werden sollte. Die Auswahl dieser Phase stellt einen guten Kompromiss von Säulen-Lebensdauer sowie akzeptablen Retentionszeiten und Peakformen dar. Die Trennungen der Steroide in der Gesamtkopplung des Systems wird in Abschnitt 2.11.3 beschrieben.

2.10 Methodentransfer auf die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Wie in Abbildung 2-47 für die Geschmacksstoffe oder in Abbildung 2-48 für die Sulfonamide gezeigt, sind die Trennungen nur durch einen zeitlichen Versatz, der durch die Konversion der Verbindungen im Interface zum IRMS bedingt ist, vom UV Chromatogramm zu unterscheiden. Die Umsetzung im Interface führt dabei zu einer leichten Peakverbreiterung, die in den hier gezeigten Optimierungsbeispielen keinen Einfluss auf die Auflösung und somit auf die Kohlenstoffisotopensignatur hat. Auch der leichte Anstieg der Basislinie mit fortschreitendem Temperaturgradienten hat keinen Einfluss auf die Isotopensignatur.

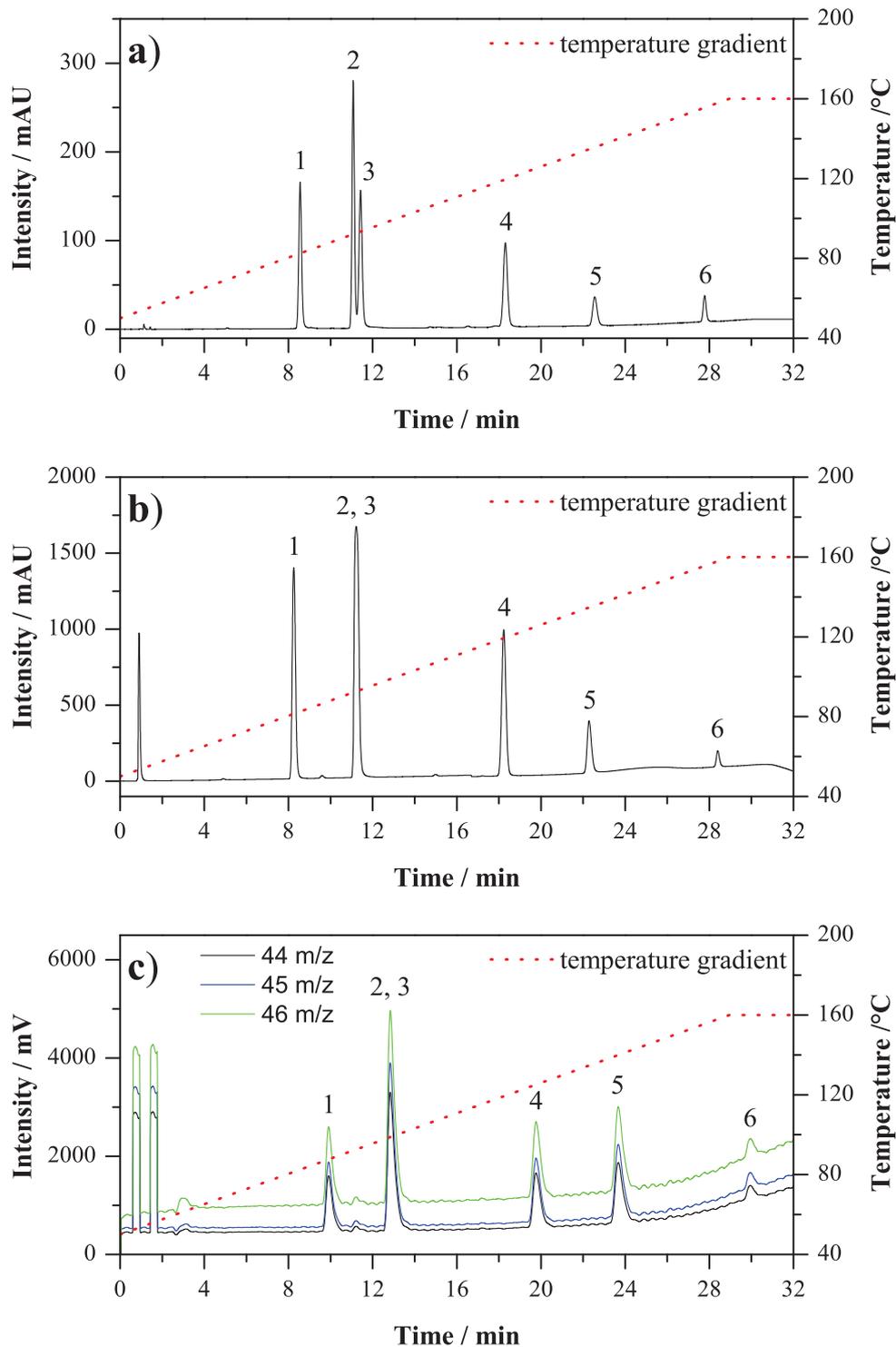


Abbildung 2-47: Trennung der Geschmacksstoffe mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (100 × 3,0 mm, 3,5 μm); mobile Phase: Phosphatpuffer 10 mmol L⁻¹, pH 2,7; Temperaturgradient: siehe Abbildung. a) UV-Chromatogramm aufgenommen in der IUTA e. V, b) UV-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen, c) IRMS-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen. Analyten: 1) Theobromin, 2) Theophyllin, 3) Catechin, 4) Koffein, 5) Aspartam, 6) Rutin.

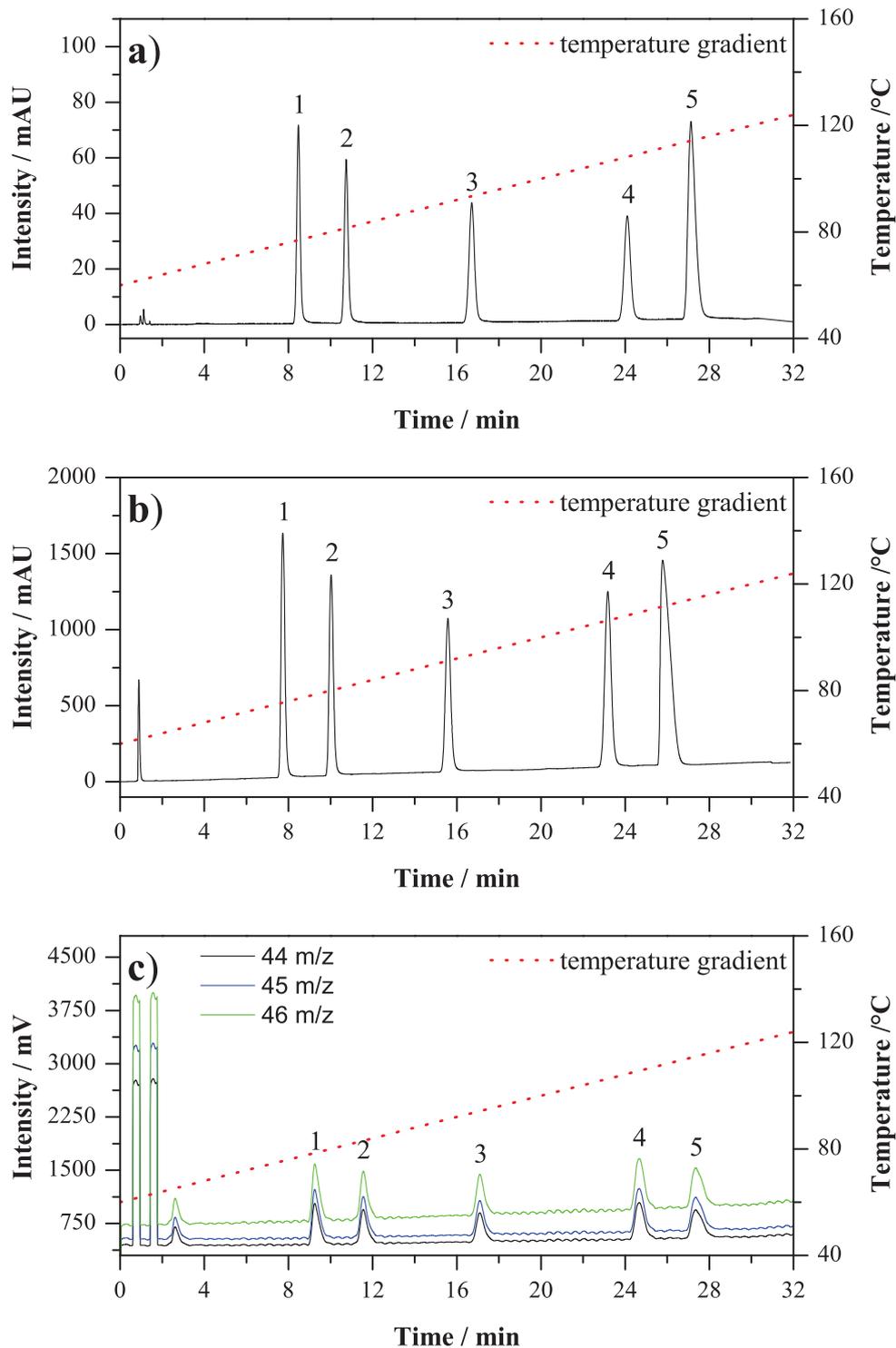


Abbildung 2-48: Trennung von Sulfonamiden mittels Temperaturgradienten-Elution. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₁₈ (100 × 3,0 mm, 3,5 μm); mobile Phase: Phosphatpuffer 10 mmol L⁻¹, pH 2,7; Temperaturgradient: siehe Abbildung. a) UV-Chromatogramm aufgenommen in der IUTA e. V., b) UV-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen, c) IRMS-Chromatogramm aufgenommen in der Universität Duisburg-Essen. Analyten: 1) Sulfadiazin, 2) Sulfathiazol, 3) Sulfamerazin, 4) Sulfamethoxazol, 5) Trimethoprim.

2.11 Analyse von Modellsubstanzgemischen mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System

2.11.1 Analyse eines Sulfonamid-Mixes mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System

Um die Funktionsfähigkeit der Gesamtkopplung zu demonstrieren, wurden Gemische der Modellsubstanzen in den Aufbau nach Abbildung 2-21 injiziert. Nach chromatografischer Trennung durch die Hochtemperatur-HPLC erfolgten im online-Messverfahren zunächst die Raman-spektroskopische Vermessung der Einzelsubstanzen sowie anschließend die Aufklärung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse mittels IRMS.

Die Charakterisierung der Sulfonamide erfolgte anhand eines 5er-Mixes von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Dazu wurden 20 μL einer 100 mg L^{-1} Stammlösung in das Gesamtsystem injiziert. Die chromatografische Trennung ist in Abbildung 2-49 a als UV-Chromatogramm dargestellt. Abbildung 2-49 b zeigt die in der Gesamtkopplung aufgenommenen IRMS-Daten der Sulfonamide.

Die Raman-Detektion erfolgte kontinuierlich über die gesamte Laufzeit der chromatografischen Trennung. Jedes Raman-Spektrum wurde über $12 \times 0,4$ s akkumuliert. Die Laserleistung betrug 1800 mW.

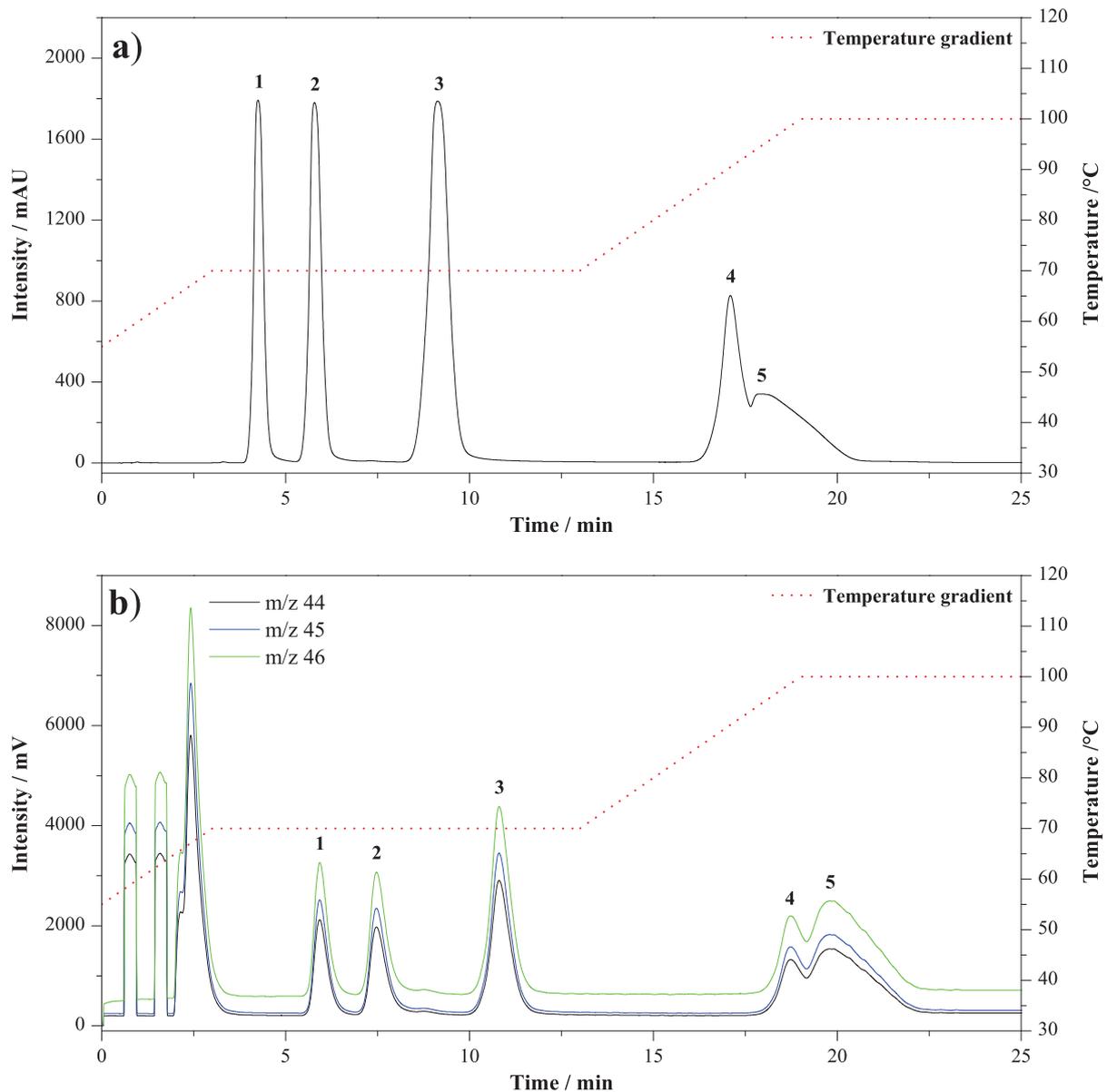


Abbildung 2-49: Trennung von fünf Sulfonamiden. a) UV-Chromatogramm, b) IRMS-Chromatogramm. Analyten: 1) Sulfadiazin 2) Sulfathiazol 3) Sulfamerazin 4) Sulfamethoxazol 5) Trimethoprim; Konzentration: $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C_{18} , $100 \times 2,1 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$; mobile Phase: 10 mmol L^{-1} Phosphatpuffer pH 3; Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; UV-Detektion bei 254 nm ; Injektionsvolumen: $20 \mu\text{L}$.

Von Sulfadiazin, Sulfathiazol und Sulfamerazin konnten Raman-Spektren aufgenommen werden, die in Abbildung 2-50 dargestellt sind. Aufgrund der optischen Verbesserungen, welche nach Kapitel 2.6 durchgeführt worden sind, konnten jetzt mehrere Schlüsselbanden detektiert werden. Dabei liegen die Peakkonzentrationen in Abhängigkeit von der Peakbreite im Chromatogramm zwischen 2 und 4 mg L^{-1} . Durch Vergleich mit der Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank (Kapitel 4.2) war eine eindeutige Identifizierung der detektierten Modellsubstanzen möglich.

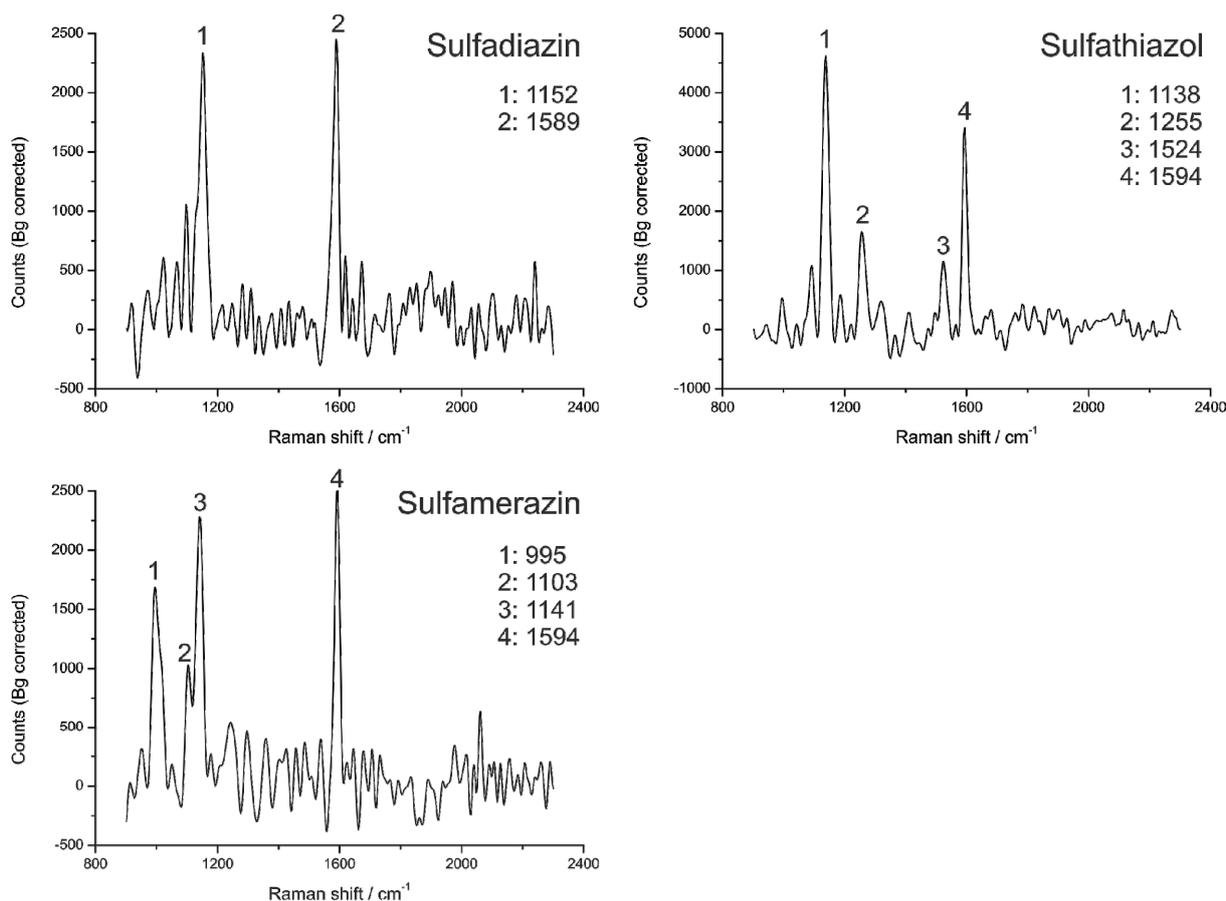


Abbildung 2-50: Raman-Spektren von Sulfadiazin, Sulfathiazol und Sulfamerazin mit Nummerierung der zugeordneten Schlüsselbanden und Angabe der relativen Wellenzahlen.

Sulfamethoxazol und Trimethoprim konnten nicht Raman-spektroskopisch detektiert werden. Allerdings zeigte sich beim Durchfließen der chromatografisch getrennten Substanzen durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter im gesamten Untergrund-Signal eine Intensitätssteigerung der Lichtausbeute. Dieser Effekt ist einer Änderung der Brechzahl der mobilen Phase zuzuordnen. Dies bedeutet, dass eine der beiden oder sogar beide Substanzen einen relativ starken Einfluss auf den Brechungsindex des Wassers nehmen und dieser während des Durchflusses über 1,33 lag. Daraus folgt eine Erhöhung des Grenzwinkels der Totalreflexion zwischen der Grenzfläche Wasser/Teflon-AF-Kapillare und somit ein erhöhter Laserlichttransport durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter.

Für das Trimethoprim war die chromatografische Trennleistung sehr schlecht. Trimethoprim lag nach der Trennung mit einer Peakkonzentration von etwa $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ vor und konnte deshalb Raman-spektroskopisch nicht detektiert werden. Hier wird deutlich, dass die Einsatzfähigkeit des Raman-Detektors sehr stark von der Qualität der chromatografischen Trennleistung abhängig ist. Besonders bei Messungen im Bereich der absoluten Nachweisgrenze sind schmale und damit höher konzentrierte Substanz-Peaks unbedingt notwendig.

2.11.2 Analyse eines Geschmacksstoff-Mixes mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System

Die Charakterisierung der Geschmacksstoffe erfolgte anhand eines 6er-Mixes von Theobromin, Theophyllin, Catechin, Koffein, Aspartam und Rutin. Dazu wurden 10 μL einer Stammlösung mit einer Konzentration von 200 mg L^{-1} je Analyt in das Gesamtsystem injiziert. Die chromatografische Trennung ist in Abbildung 2-51 a als UV-Chromatogramm dargestellt. Die Abbildung 2-51 b zeigt die in der Gesamtkopplung aufgenommenen IRMS-Daten der Geschmacksstoffe.

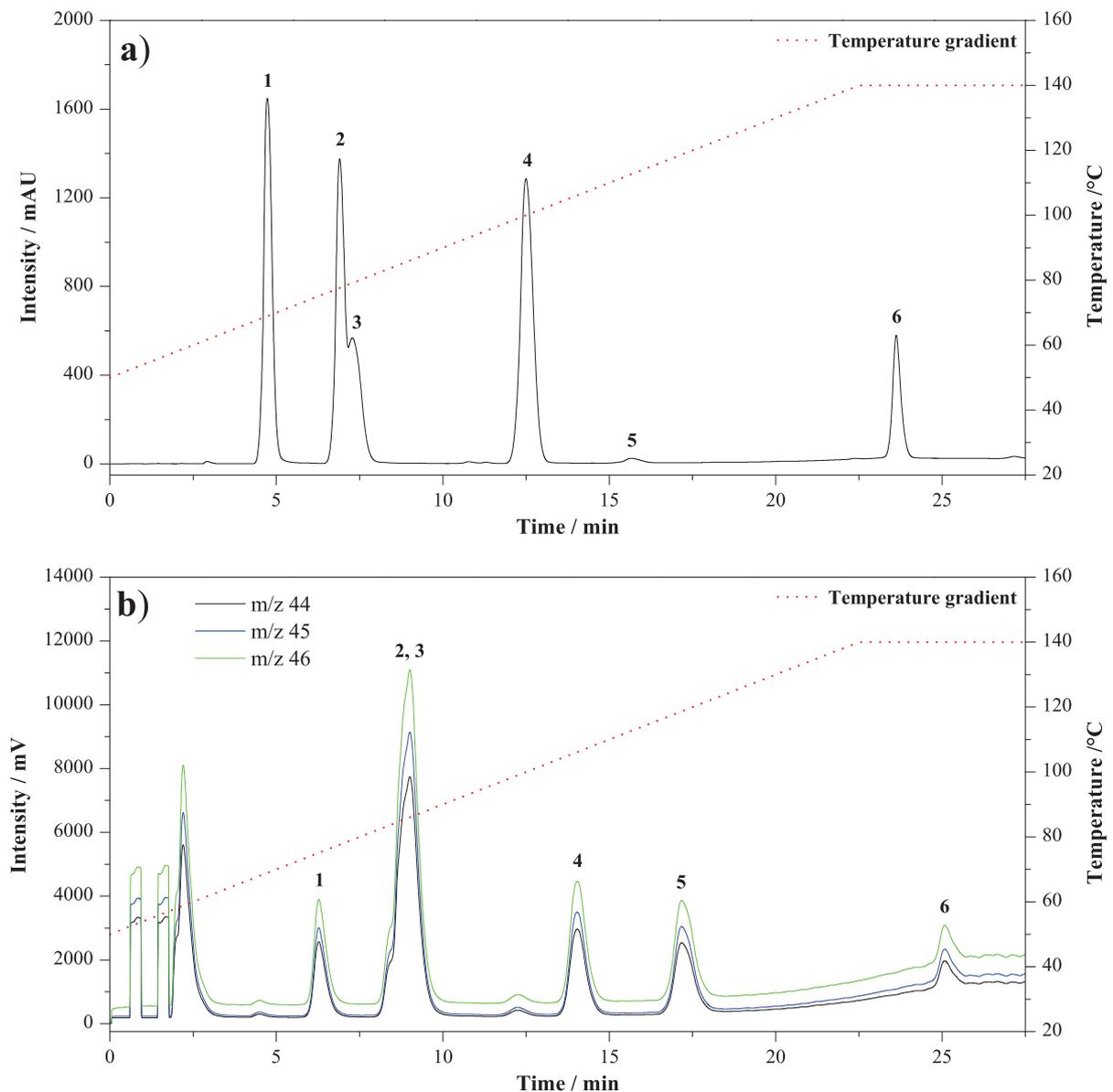


Abbildung 2-51: Trennung von sechs Geschmacksstoffen. a) UV-Chromatogramm, b) IRMS-Chromatogramm. Analyten: 1) Theobromin 2) Theophyllin 3) Catechin 4) Koffein 5) Aspartam 6) Rutin; Konzentration: $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C_{18} , $100 \times 2,1 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$; Mobile Phase: Phosphatpuffer pH 3; Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; UV-Detektion bei 254 nm ; Injektionsvolumen: $10 \mu\text{L}$.

Die Raman-Detektion erfolgte kontinuierlich über die gesamte Laufzeit der chromatografischen Trennung. Jedes Raman-Spektrum wurde über $12 \times 0,4$ s akkumuliert. Die Laserleistung betrug 1800 mW. Es konnten Raman-Spektren von Theobromin, Theophyllin, Catechin und Koffein aufgenommen werden, die in Abbildung 2-52 dargestellt sind. Die Peakkonzentrationen liegen bei etwa 4 mg L^{-1} . Die detektierten Schlüsselbanden können den jeweiligen Modellsubstanzen anhand der Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank (Kapitel 4.2) eindeutig zugeordnet werden.

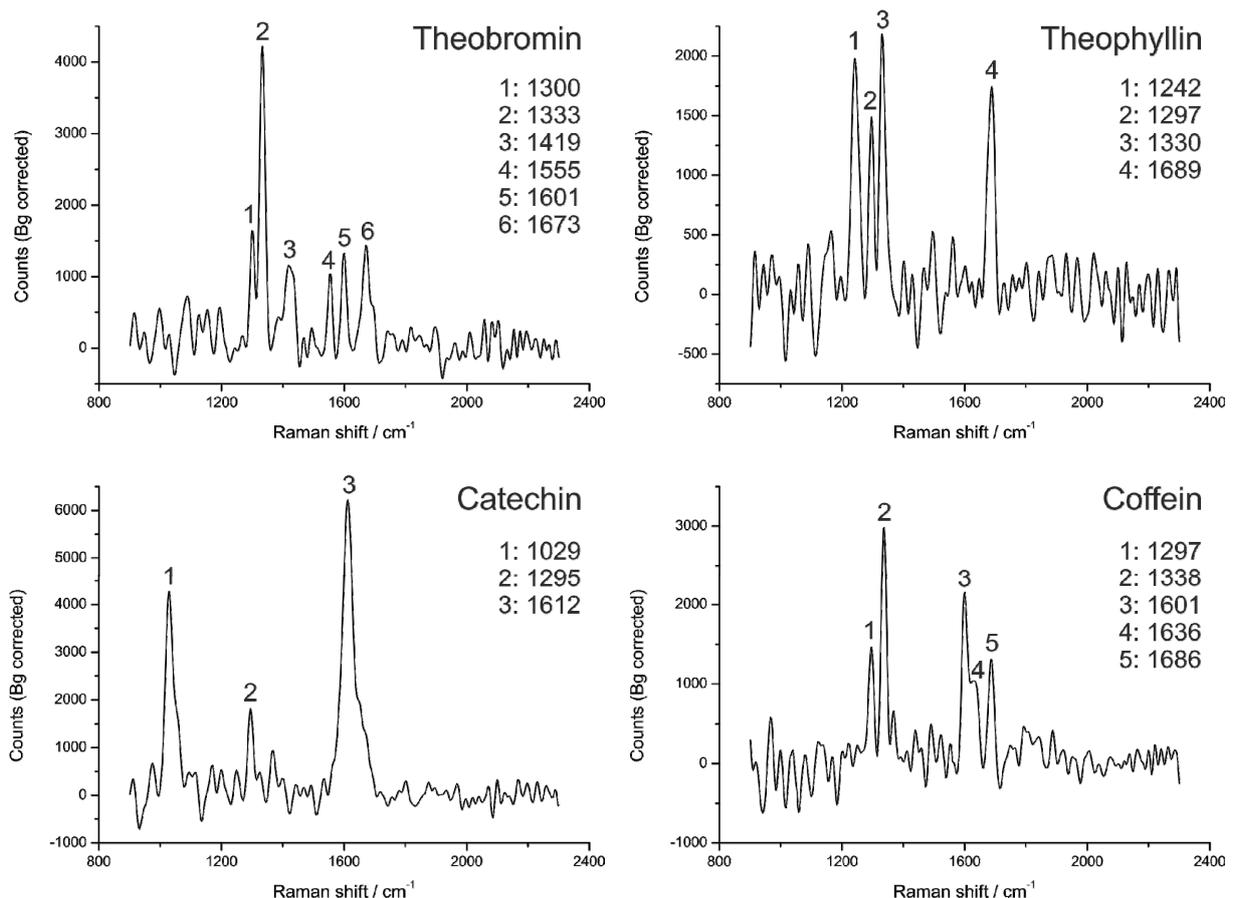


Abbildung 2-52: Raman-Spektren von Theobromin, Theophyllin, Catechin und Koffein mit Nummerierung der zugeordneten Schlüsselbanden und Angabe der relativen Wellenzahlen.

Die Koelution von Theophyllin und Catechin konnte mit Hilfe der Raman-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden. Anhand der Raman-Spektren war sehr gut zu sehen, dass Theophyllin vor Catechin eluiert. Dies wäre anhand des UV-Chromatogramms nicht zu erkennen gewesen.

Zwar konnte Rutin Raman-spektroskopisch nicht gemessen werden, allerdings war diese Substanz anhand ihrer starken Eigenfluoreszenz detektierbar [5]. Das Fluoreszenzspektrum von Rutin findet sich in Abbildung 2-53.

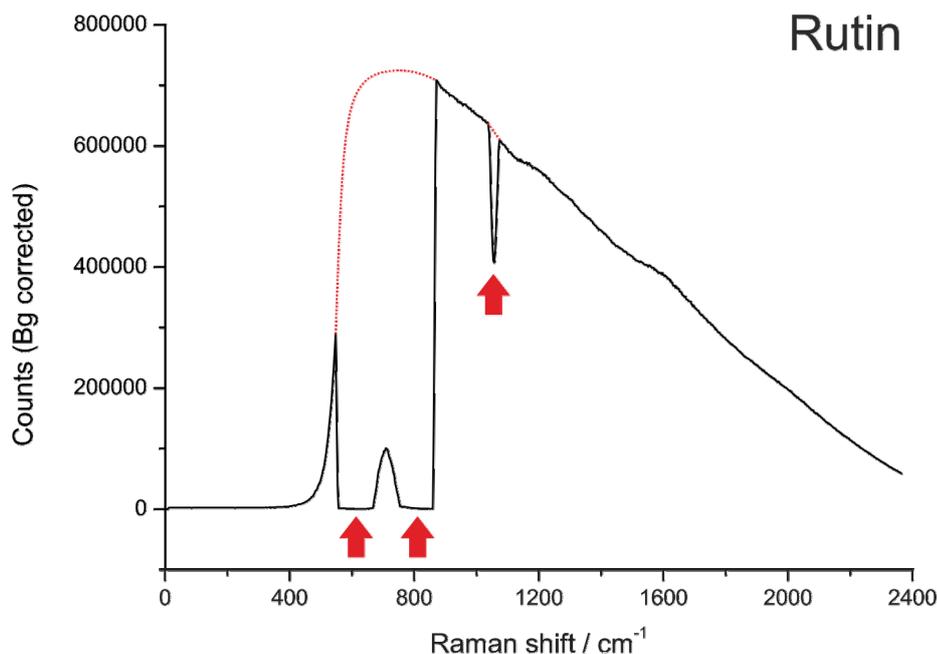


Abbildung 2-53: Fluoreszenzspektrum von Rutin, gemessen mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System; rote Pfeile: Sättigung des CCD-Chips durch Untergrund-Glas-Raman-Signale; rot gestrichelte Linie: tatsächlicher Kurvenverlauf des Rutin-Fluoreszenzspektrums.

Aufgrund der starken Fluoreszenz des Rutins liefen die Untergrund-Glas-Raman-Signale in drei Frequenzbereichen des Spektrums in die Sättigung des CCD-Chips des Detektors, markiert durch die roten Pfeile. Der tatsächliche Kurvenverlauf, der das Fluoreszenzspektrum des Rutins wiedergibt, ist durch die gestrichelte rote Linie dargestellt. Der Raman-Detektor lässt sich demnach auch als Fluoreszenz-Detektor verwenden.

Im Gegensatz dazu konnte Aspartam nicht detektiert werden. Dies liegt zum einen daran, dass die stark ausgeprägte Schlüsselbande bei 905 cm^{-1} sehr ungünstig auf der Flanke des Untergrund-Glas-Raman-Signals bei 808 cm^{-1} liegt und nach dem Referenzieren nicht mehr vom Untergrundrauschen zu unterscheiden ist. Zum anderen sind die übrigen Raman-Übergänge des Aspartams vergleichsweise schwach ausgeprägt, sodass die Substanz in diesem Konzentrationsbereich nicht detektierbar war.

2.11.3 Analyse eines Steroid-Mixes mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System

Von der Substanzklasse der Steroide wurde ein 5er-Mix aus 19-Nortestosteron, Testosteron, Epitestosteron, cis-Androsteron und 17-Hydroxyprogesteron als Stammlösung angesetzt und in das Gesamtsystem injiziert. Die chromatografische Trennung ist in Abbildung 2-54 a als UV-Chromatogramm dargestellt. Die Raman-Detektion erfolgte kontinuierlich über die gesamte Laufzeit der chromatografischen Trennung. Jedes Raman-Spektrum wurde über $12 \times 0,4\text{ s}$ akkumuliert. Die Laserleistung betrug 1800 mW.

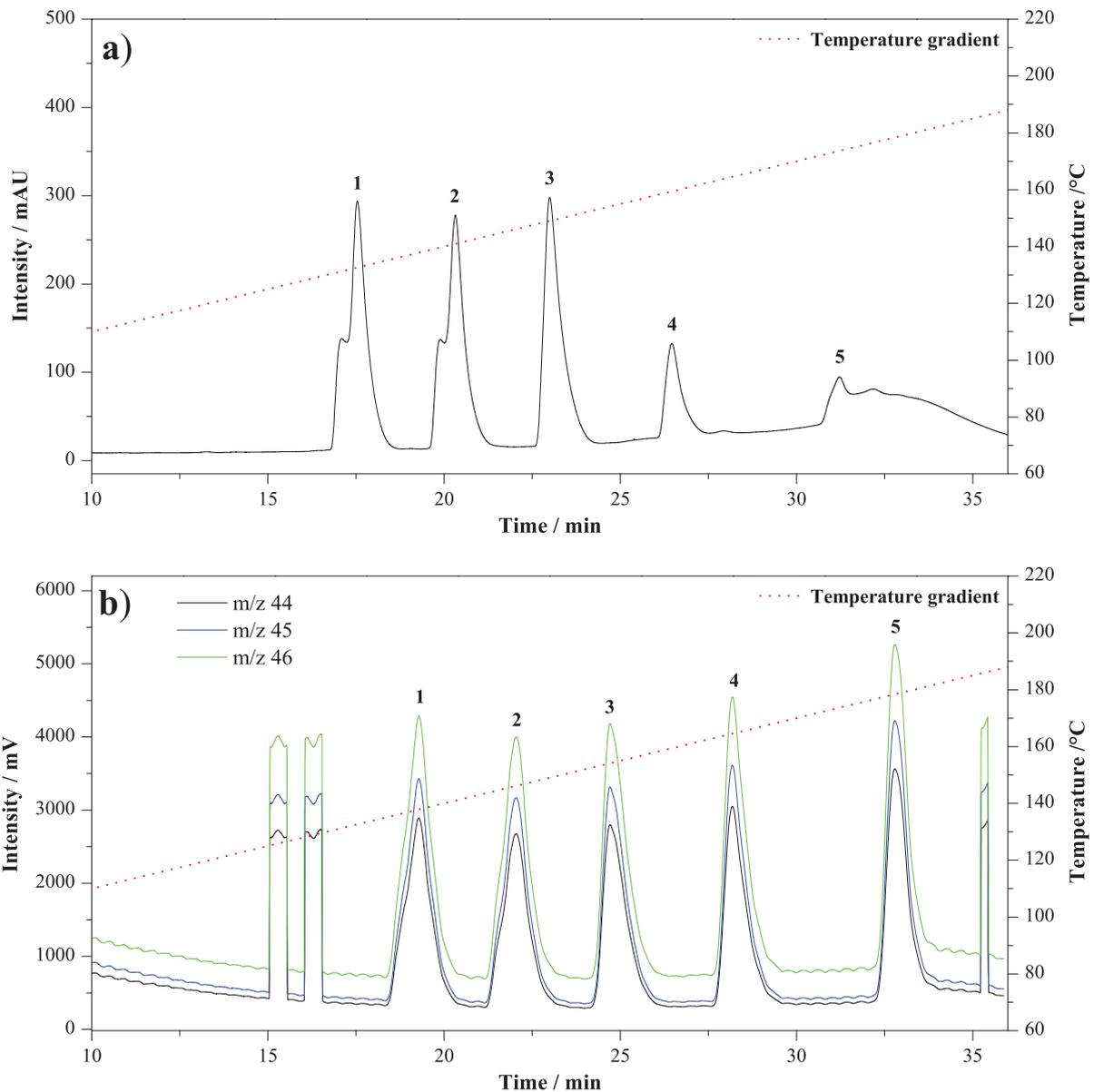


Abbildung 2-54: UV-Chromatogramm von fünf Steroiden a) UV-Chromatogramm, b) IRMS-Chromatogramm. Analyten: 1) 19-Nortestosteron 2) Testosteron 3) Epitestosteron 4) cis-Androsteron 5) 17-Hydroxyprogesteron; Konzentration: $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$; Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C_4 , $50 \times 2,1 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$; Mobile Phase: Wasser; Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; Detektion: UV bei 200 nm ; Injektionsvolumen: $10 \mu\text{L}$.

Wie auch schon in Kapitel 2.11.1 für Sulfamethoxazol und Trimethoprim beschrieben war bei allen Steroiden eine Erhöhung der Lichtintensität aufgrund einer Brechzahländerung festzustellen. Dieser Effekt war bei den Steroiden wesentlich ausgeprägter, wodurch die Raman-spektroskopische Untersuchung hinsichtlich der Bildung von Referenzspektren erschwert wurde. Für die jeweiligen Steroide konnten nur einzelne, stark ausgeprägte Schlüsselbanden detektiert werden, obwohl die Peakkonzentrationen mit etwa 3 mg L^{-1} recht hoch waren. Es war lediglich eine Identifikation von Epitestosteron, cis-Androsteron und 17-Hydroxyprogesteron möglich. Die entsprechenden Raman-Signale sind in Abbildung 2-55 zusammengefasst.

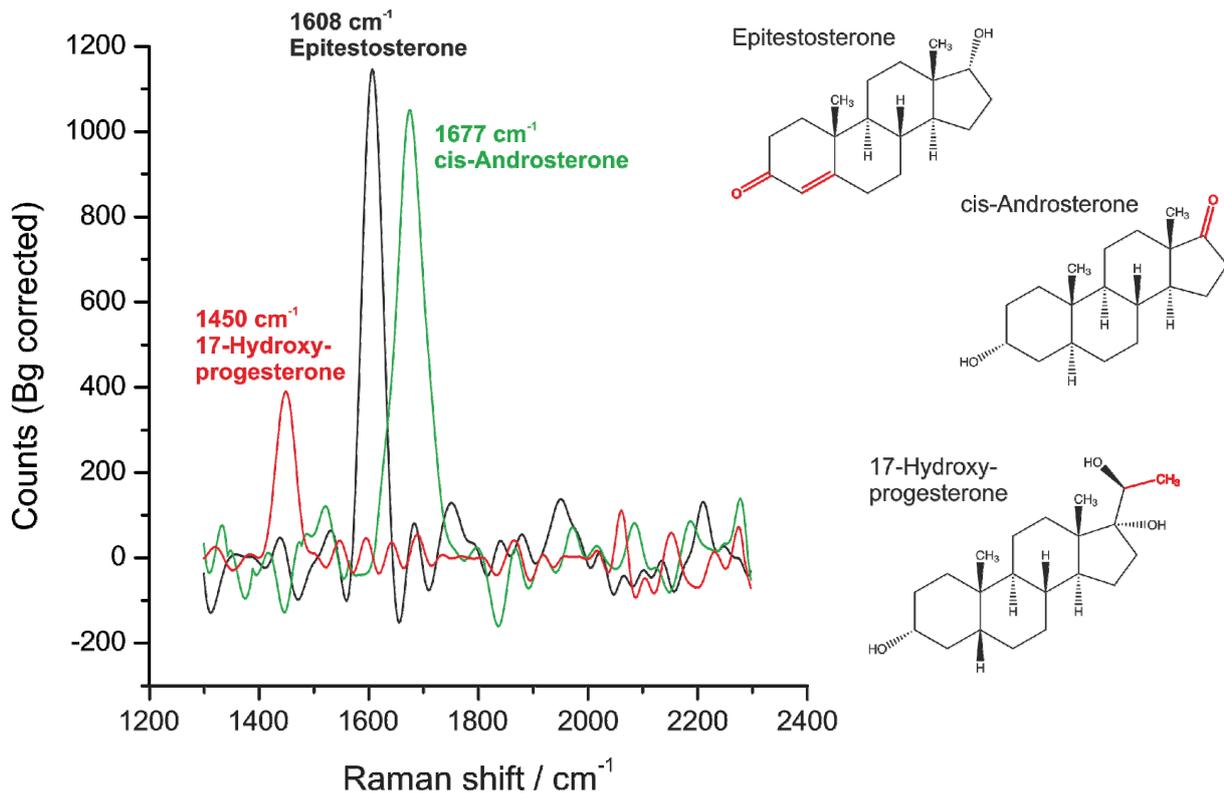


Abbildung 2-55: Raman-Spektren von Steroiden, gemessen mit dem HT-HPLC-Raman-IRMS-System.

Epitestosteron zeigt einen Raman-Übergang bei 1608 cm^{-1} , der der Ketogruppe und der Doppelbindung zuzuordnen ist. Im Raman-Spektrum der Projektreferenz-Datenbank sind diese beiden Schwingungsübergänge besser aufgelöst und getrennt zu beobachten. Aufgrund der niedrigen Konzentration und des Referenzierens gegen das Untergrund-Glas-Raman-Signal geht allerdings die spektroskopische Auflösung verloren, sodass die Informationen des Doppelsignals zu einem einzelnen Signal reduziert werden. Der grüne Graph zeigt ein Raman-Signal des cis-Androsterons bei 1677 cm^{-1} . Dieser Übergang kann der Ketogruppe am Fünfring zugeordnet werden. 17-Hydroxyprogesteron zeigt bei 1450 cm^{-1} einen stark ausgeprägten Raman-Übergang, der maßgeblich durch die freistehende Methylgruppe induziert wird. Die beschriebenen Steroide können recht gut anhand der einzelnen Schlüsselbanden voneinander unterschieden werden.

Für die Substanzen 19-Nortestosteron, Testosteron und Epitestosteron konnte nur der Raman-Übergang bei 1608 cm^{-1} detektiert werden. Eine Unterscheidung ist hier anhand dieses einzelnen Raman-Signals nicht möglich.

Wie in Abbildung 2-54 b gezeigt, konnte eine vollständige Trennung der Steroide im IRMS erreicht werden. Auch aus diesem Chromatogramm geht die Sensitivität der IRMS Messung zur Bestimmung des Kohlenstoffsignals hervor. Alle Steroide erscheinen bei gleicher Aufgabekonzentration von 3 mg L^{-1} in etwa gleicher Peakhöhe. Wie im Fall der Sulfonamide und der Geschmacksstoffe führt die hohe Konzentration zu einer Peakverbreiterung, die nicht mehr alleine auf die Umsetzung im Oxidations-Reaktor zurückzuführen ist. Da alle

Substanzen mit ausreichender Auflösung getrennt sind, sind die Isotopensignaturen unbeeinträchtigt.

2.12 Authentizitätskontrolle von Koffein

Für Hersteller und Verbraucher von Lebensmitteln ist es von Interesse, zwischen natürlichen und synthetischen Inhaltsstoffen zu differenzieren. Besonders im Fall der häufig konsumierten koffeinhaltigen Getränke nimmt das Interesse, zwischen natürlichem und synthetischem Koffein unterscheiden zu können, zu [54]. Abgesehen von natürlichen Getränken wie Kaffee, Tee, Guarana und Mate ist Koffein in Energy drinks und cola-artigen Getränken enthalten. Bei den letzten beiden wird häufig synthetisches Koffein eingesetzt. Durch ein zunehmendes Gesundheitsbewusstsein präferieren Konsumenten Nahrungs- und Genussmittel, die aus natürlichen Quellen stammen. Die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) schreibt vor, dass Koffein, das Lebensmitteln hinzugefügt wurde, entsprechend auf der Verpackung vermerkt wird [55]. In Anbetracht der erhöhten Nachfrage nach natürlichen Getränken auf der einen Seite und signifikanten Preisunterschieden zwischen natürlichen und synthetischen Koffein-Quellen auf der anderen Seite, besteht ein hohes Risiko von Falschdeklarationen. Zudem wird angenommen, dass natürliche koffeinhaltige Getränke gesünder sind als Energy drinks, die oft sehr hohe Gehalte an Koffein besitzen [54,56,57]. Diese hohen Konzentrationen können zu Angstzuständen und Schlaflosigkeit führen [58,59]. Einige Energy drinks enthalten über 400 mg Koffein, was der maximalen täglichen Aufnahme eines gesunden Erwachsenen entspricht [59,60]. Die Unterscheidung von natürlichem und synthetischem Koffein findet seit Aufkommen der ersten Energy drinks in den 1960er Jahren Anwendung. Dabei wurde die Radiokarbonmethode eingesetzt, um synthetisches von natürlichem Koffein zu unterscheiden [61,62]. Das Kohlenstoffisotopenverhältnis hängt dabei von der Herkunft des entsprechenden Materials ab. Pflanzen, die den C₃-Photosynthesemechanismus benutzen, besitzen niedrigere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als C₄-Pflanzen. Synthetische Quellen auf der Basis von Erdöl können sich von biogenen Stoffen in ihren $\delta^{13}\text{C}$ -Werten unterscheiden [63]. Richling *et al.* konnten mittels EA-IRMS von Kohlenstoff und Sauerstoff natürliches und synthetisches Koffein unterscheiden [64]. Die verwendete Methode erfordert aber eine arbeitsintensive Extraktion und Reinigung des Koffeins. Dazu wurden 42 natürliche Koffeinproben wie Kaffee, Tee, Guarana und Mate sowie 20 Koffeinproben aus unterschiedlichen synthetischen Quellen untersucht.

Die gemessenen Koffeinproben sowie die Probenvorbereitung für die EA-IRMS und die HT-HPLC-IRMS sind in Tabelle 2-13 dargestellt.

Tabelle 2-13: Koffeinhaltige Proben und ihre Probenvorbereitung für die EA- und HT-HPLC-IRMS.

Probenart	Probe	Anzahl	EA-IRMS	HT-HPLC-IRMS
Natürliche Quellen	Kaffeebohnen (Arabica)	18	Siehe Referenz [65]	Espresso Proben wurden mit einer Espressomachine (Saeco Royal Coffee Bar, Essen, Deutschland) extrahiert und um den Faktor fünf verdünnt. Anschließend werden die Proben mittels eines 0,20 µm Membranfilters gefiltert .
	Teeblätter	21	Siehe Referenz [66]	1 g fein gemahlene Teeblätter wurden in 100 g Wasser für 20 min gekocht. Anschließend wurden die Proben um den Faktor 2 verdünnt und mittels eines 0,20 µm Membranfilters gefiltert .
	Guaraná	1	Keine Referenz verfügbar	Gleiche Prozedur wie bei den Teeblättern.
	Maté	3	Keine Referenz verfügbar	Gleiche Prozedur wie bei den Teeblättern.
Synthetisches Koffein	Kommerzielle Chemikalien	2	Direkt gemessen.	100 mg L ⁻¹
	Energy drinks	18	Siehe Referenz [65]	Um den Faktor fünf verdünnt. Anschließend werden die Proben mittels eines 0,20 µm Membranfilters gefiltert.
Andere Getränke		38	Keine Referenz verfügbar	Verdünnt (wenn nötig) und mittels eines 0,20 µm Membranfilters gefiltert.

Vor den EA-IRMS Messungen wurde die Reinheit des isolierten Koffeins mittels eines 2000 Fourier Transformation Infrarot Spektrometers (PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) überprüft. Eine mögliche Isotopenfraktionierung durch die Probenvorbereitung wurde anhand von Standards überprüft [65].

In der endgültigen Methode wurde eine XBridge C₁₈ Säule (2,1 × 100 mm, 3,5 µm, Waters, Eschborn, Deutschland) mit einer XBridge C₁₈ Vorsäule (2,1 × 10 mm, 3,5 µm) eingesetzt. Zur Methodenentwicklung wurden zwei weitere Säulen des Typs XBridge C₁₈ (3,0 × 100 mm, 3,5 µm) und eine Zirchrom PBD (3,0 × 150 mm, 5 µm, Zirchrom, Anoka, USA)) getestet. Zur Untergrundsubtraktion wurde der "Individual Background" Algorithmus mit identischen Start und Stop Schwellenwerten (0,5 mV s⁻¹) eingesetzt. Zur Korrektur des Offsets bei den HT-HPLC-IRMS Messungen wurde eine Zweipunktkalibration, wie sie unter 2.3 beschrieben wurde, verwendet.

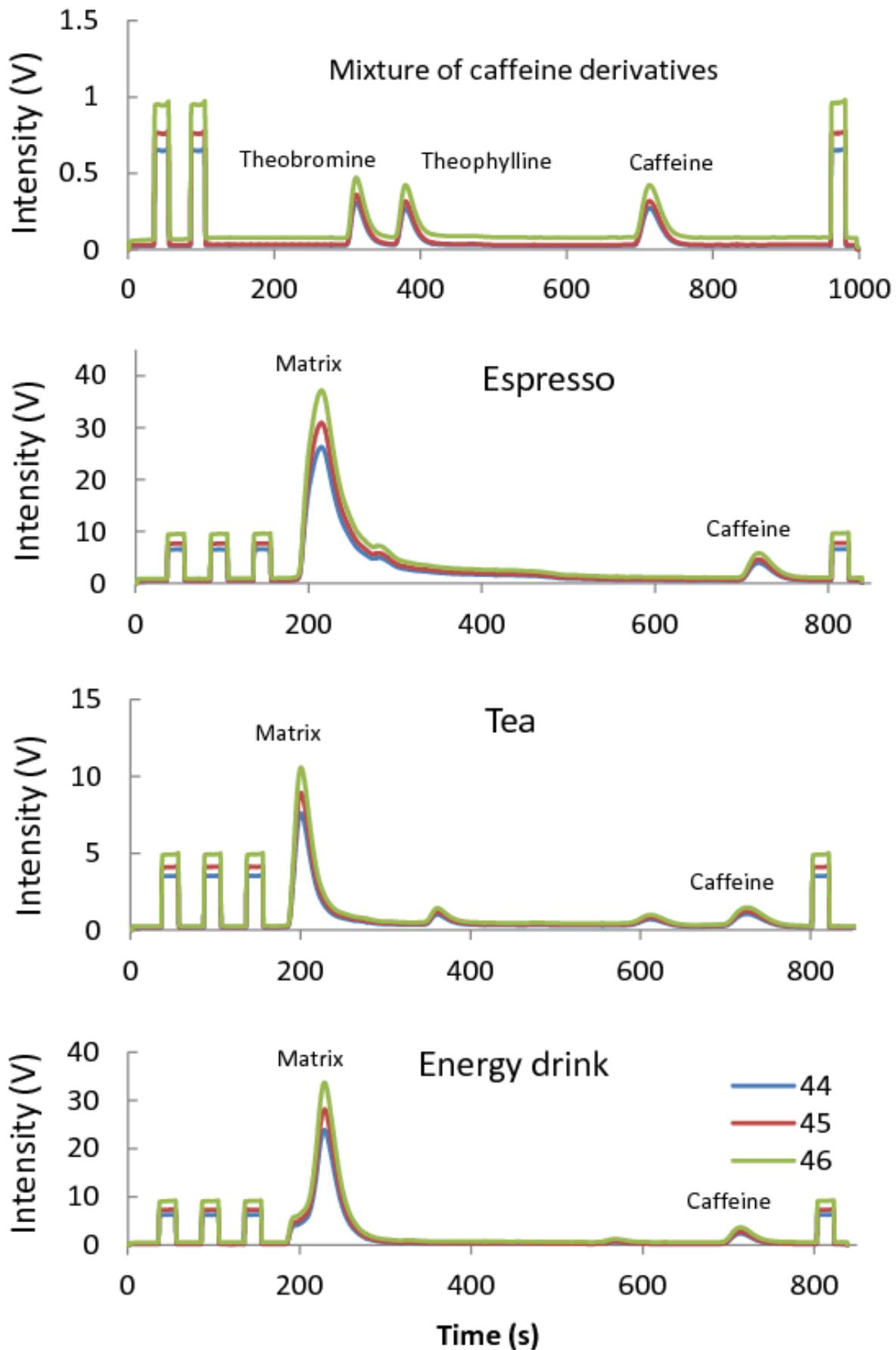


Abbildung 2-56: HT-RPLC-IRMS Chromatogramm einer Mischung von Koffeinderivaten (100 mg L^{-1}), Espresso, Tee, Energy drink. Es wurde eine XBridge C_{18} -Trennsäule ($2,1 \times 100 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$) bei einer Temperatur von 80°C verwendet (Graphik von Zhang et al. [67]).

Basierend auf dem Prinzip des „Identical Treatment“ (IT) [9] wurden zwei Laborinterne Koffeinstandards mit einer Konzentration von 100 mg L^{-1} abwechselnd mit dem HT-HPLC-IMRS gemessen.

Um präzise und akkurate Isotopensignaturen des Koffeins zu erhalten, ist eine vollständige Trennung des Koffeins von den Matrixkomponenten nötig. Basierend auf der Untersuchung der möglichen Trennsäulen [34] (siehe auch 2.8) wurden zur Methodenentwicklung eine XBridge C_{18} und eine Zirchrom PBD Trennsäule eingesetzt. Bei einer Temperatur von 80°C konnte das Koffein auf der XBridge C_{18} Säule (2,1 mm ID) innerhalb von 15 min vollständig von den Matrixkomponenten abgetrennt werden (siehe Abbildung 2-56). Die Methode ist somit schneller und einfacher als die bisherigen auf der GC-IRMS basierenden Methoden. Bis auf die in Tabelle 2-13 beschriebenen Probenvorbereitungsmaßnahmen ist keine weitere Probenvorbereitung in Form einer Derivatisierung nötig. Nach Verdünnung und Filtration können die Proben direkt injiziert werden. Der Untergrund zeigte keinerlei Auswirkung auf die Isotopensignatur des Koffeins und für alle gemessenen Proben konnte keine Coelution beobachtet werden.

Die Vorsäule wurde zum Schutz der eigentlichen Trennsäule verwendet, um mögliche irreversibel retardierende Verbindungen zurückzuhalten. In nur einem Fall wurde ein „carryover“ beobachtet. In diesem Fall wurde die Vor- und die Trennsäule durch Spülen mit Methanol regeneriert und bei 80°C mit Wasser equilibriert. Um festzustellen, ob die in Kaffee und Tee koexistierenden Koffeinderivate wie Theobromin und Theophyllin mit dem Koffein co-eluierten, wurde eine Mischung dieser Verbindungen untersucht. Wie in Abbildung 2-56 gezeigt, eluieren Theobromin und Theophyllin deutlich früher als Koffein, sodass eine Co-Elution ausgeschlossen werden konnte.

Die andere zur Methodenentwicklung eingesetzte XBridge C_{18} (3,5 mm ID) Säule war ebenfalls geeignet, um Koffein von den Matrixbestandteilen zu trennen. Dabei erhöhte sich aber die Trennzeit im Vergleich zur XBridge C_{18} (2,1 mm ID) um 3 Minuten. Die optimale Flussrate der XBridge C_{18} (2,1 mm ID) liegt bei einer Temperatur von 80°C bei $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ [32,68] Diese Flussrate ist ideal für das LC-IsoLink Interface geeignet, da die Gesamtflussrate kleiner als $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ sein muss.

Mit der Zirchrom PBD Säule konnte keine vollständige Trennung des Koffeins von der Matrix in Realproben erreicht werden. Aus diesem Grund wurde die XBridge C_{18} (2,1 mm ID) für die Applikation zur Bestimmung der Koffeinherkunft eingesetzt.

Unter den beschriebenen Bedingungen konnten mittels der verwendeten Säule ca. 800 Messungen durchgeführt werden, ohne dass eine Verschlechterung der chromatografischen Bedingungen feststellbar war. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Methode routinetauglich ist. Die Präzision der Methode wurde innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 20 bis 400 mg L^{-1} bestimmt. Die Standardabweichung von

Dreifachbestimmungen innerhalb dieses Konzentrationsbereichs war kleiner als 0,22 ‰ (Abbildung 2-57). Darüber hinaus besteht eine sehr gute lineare Korrelation ($R^2 = 0,99999$) zwischen der totalen Peakfläche und der Konzentration des Koffeins. Die Methode kann somit auch zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt werden. Bei einer Konzentration von 20 mg L^{-1} liegt der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert außerhalb des $\pm 0,5 \text{ ‰}$ Intervalls. Vor diesem Hintergrund liegt die Nachweisgrenze für die komponentenspezifische Isotopenanalyse der Methode bei $0,3 \text{ } \mu\text{g}$ Koffein auf der Trennsäule [34]. Im Vergleich hierzu liegt die Nachweisgrenze des Raman-Detektors für Koffein bei $2 \text{ } \mu\text{m}$ auf der Trennsäule (siehe Abschnitt 2.11.2). Die Genauigkeit der Methode wurde durch den Vergleich der erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit den durch die EA-IRMS ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -EA-IRMS-Werte bestimmt. Es ist aus der Literatur bekannt, dass in der LC-IRMS ein Offset zwischen den wahren EA-Werten und den LC-IRMS-Werten besteht. In Abbildung 2-58 ist der reproduzierbare Offset für den verwendeten internationalen Koffeinstandard gezeigt. Dieser Offset kann, wie in Abschnitt 2.13 erörtert, auf eine unvollständige Oxidation der Analyten im Interface zurückgeführt werden [34].

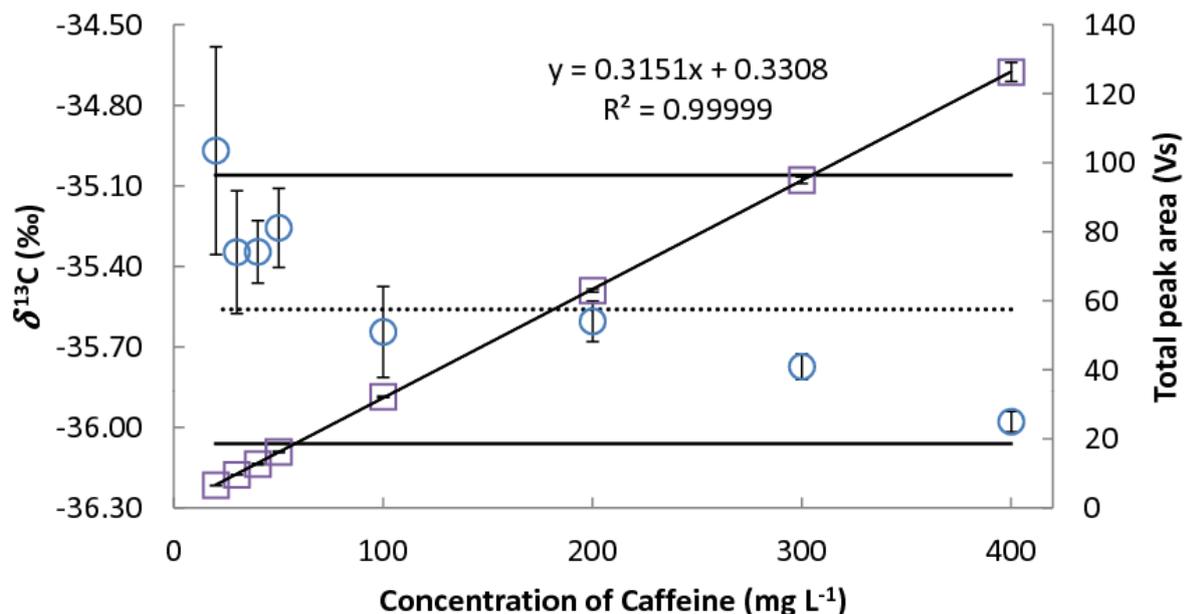


Abbildung 2-57 $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Koffein im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 400 mg L^{-1} . Die Kreise repräsentieren die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte und die Quadrate die totale Peakfläche. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Messungen ($n=3$). Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Die horizontalen, durchgezogenen Linien repräsentieren ein Intervall von $\pm 0,5 \text{ ‰}$ (Graphik von Zhang et al. [67]).

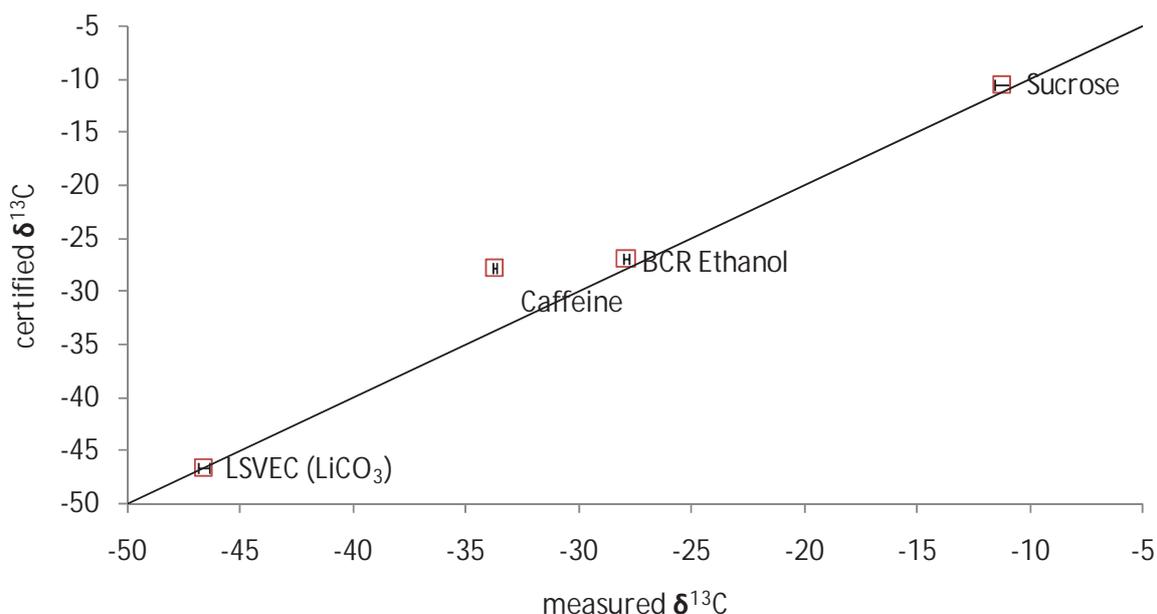


Abbildung 2-58: Offset zwischen gemessenen und wahren Kohlenstoffisotopensignaturen der oben aufgeführten internationalen Standards.

In Tabelle 2-14 ist die Größe des Offsets zwischen beiden Methoden aufgeführt. Die Differenz zwischen den HT-HPLC-IRMS Messungen und den EA-Werten $|\delta^{13}\text{C}_{\text{T,spl}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{EA-IRMS}}|$ ist für komplexe Matrices wie Tee, Espresso und Energy drinks kleiner als 0,43 ‰. Für reines synthetisches Koffein betrug diese Differenz lediglich 0,02 ‰. Um den vorhandenen Offset zu korrigieren, wurde die oben bereits erwähnte Zweipunktnormalisierungsmethode verwendet.

Tabelle 2-14: Vergleich zwischen dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Koffein aus verschiedenen Quellen, gemessen mit HT-HPLC-IRMS und EA-IRMS.

Koffeinquelle	$\delta^{13}\text{C}_{\text{T,spl}} \pm \text{SD} (n = 3)$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{EA-IRMS}} \pm \text{SD} (n = 3)$	$ \delta^{13}\text{C}_{\text{T,spl}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{EA-IRMS}} $
Kaffeebohnen 1	$-28,19 \pm 0,19$	$-28,23 \pm 0,04$	0,04
Kaffeebohnen 2	$-27,98 \pm 0,27$	$-28,19 \pm 0,07$	0,21
Teeblätter 1	$-31,27 \pm 0,20$	$-30,92 \pm 0,08$	0,35
Teeblätter 2	$-30,20 \pm 0,18$	$-29,77 \pm 0,08$	0,43
Energy drink	$-35,59 \pm 0,06$	$-35,76 \pm 0,03$	0,17
Reines Koffein	$-33,38 \pm 0,18$	$-33,36 \pm 0,08$	0,02

Durch die Untersuchung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von 42 natürlichen Koffeinquellen (Espresso, Tee, Mate, Guaraná) und 20 synthetischen Koffeinproben (Energy drinks, cola-artige Getränke und kommerziell erhältliche Chemikalien) konnten zwei Bereiche identifiziert werden (siehe Abbildung 2-59). Zudem ist die Koffeinkonzentration für Getränke, die synthetisches Koffein enthalten, höher. Abbildung 2-59 zeigt, dass die Delta-Werte des Koffeins aus natürlichen C_3 -Pflanzen als Quelle in einem Bereich zwischen -25 und -32 ‰ liegen, wobei Proben, die synthetisches Koffein enthalten, Delta-Werte zwischen -33 and -38 ‰ aufweisen.

Für die Espresso- und Tee- und Guaraná-Proben, die eine Bandbreite zwischen $-25,8$ bis $-28,7$ ‰ zeigten, lagen die Konzentrationen zwischen 663 und 950 mg L^{-1} (30 - 50 mg pro Tasse in 52 mL). Die Espresso- und Tee- und Guaraná-Proben beinhalteten 18 unterschiedliche Sorten von Kaffeebohnen variabler Herkunft (Afrika, Südamerika, Mittelamerika und Ozeanien). Im Vergleich mit anderen auf der EA-IRMS basierenden Studien, die einen Bereich zwischen $-25,1$ und $-29,9$ ‰ [65,66,69] zeigten, sind die hier erhaltenen Ergebnisse im Einklang. Außerdem korrelieren die gemessenen Koffeinkonzentrationen pro Tasse sehr gut mit Werten des International Food Information Council (30 bis 50 mg pro Tasse) [70].

Die Delta-Werte der Tee- und Guaraná-Proben lagen in einem Bereich zwischen $-26,6$ bis $-31,8$ ‰ und enthielten zwischen 64 und 459 mg L^{-1} Koffein. Der hier ermittelte Bereich der Kohlenstoffisotopie stimmt hervorragend mit Literaturwerten aus EA-IRMS Messungen überein ($-27,2$ und $-32,4$ ‰) [64,66]. Durch die Differenzierung der Bereiche kann sogar eine Unterscheidung zwischen Koffein aus Kaffee und Tee- und Guaraná-Proben gemacht werden.

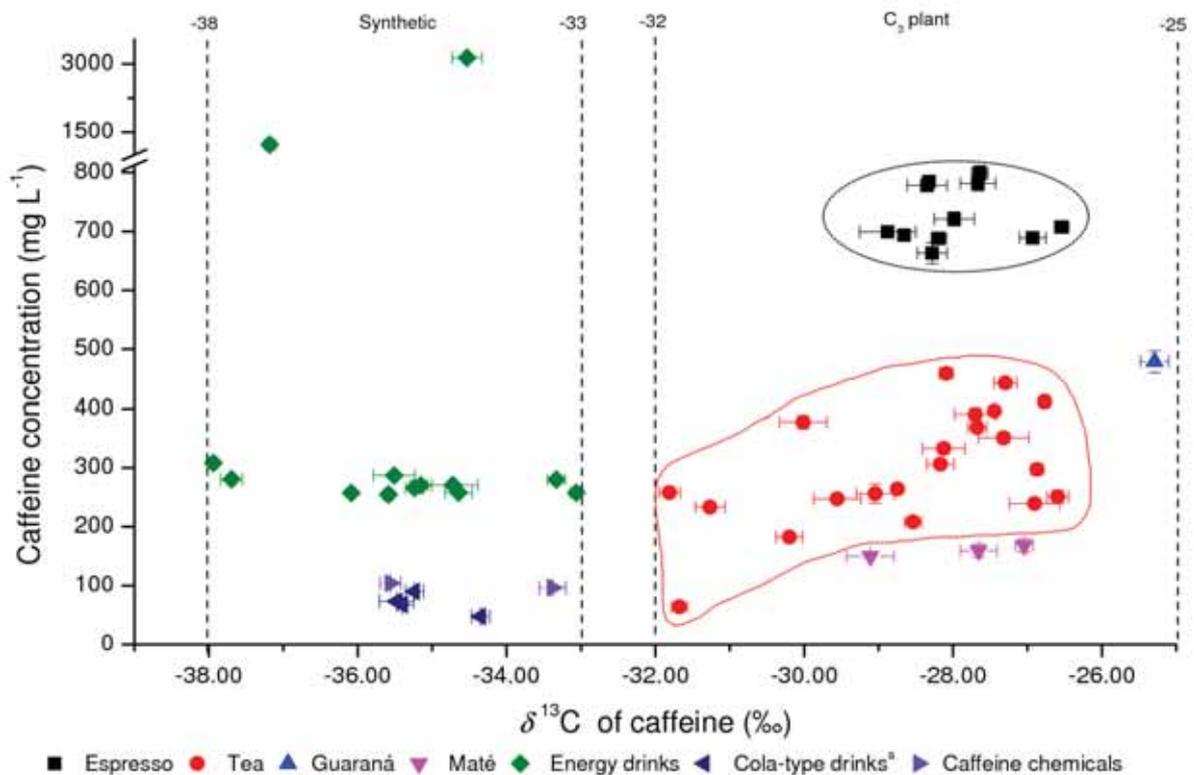


Abbildung 2-59: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte und Konzentrationen von Koffein aus unterschiedlichen Quellen. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Messungen ($n = 3$). Die vier gestrichelten Linien grenzen zwei unterschiedliche Bereiche der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ein. Werte zwischen -25 und -32 ‰ repräsentieren den Bereich des natürlichen Koffeins aus C_3 -Pflanzen. Der Bereich zwischen -33 und -38 ‰ gibt die Bandbreite des synthetischen Koffeins wieder. Cola-artige Getränke außer Coca Cola™ (Graphik von Zhang et al. [67]).

Im Vergleich zu Getränken mit natürlichem Koffein zeigten Energy drinks mit synthetischem Koffein negativere Isotopensignaturen und fallen in eine Gruppe zwischen $-33,1$ und $-37,9$ ‰. Die Konzentrationen lagen im Durchschnitt um 300 mg L^{-1} . Nur zwei Proben zeigten extrem hohe Koffeinkonzentrationen (3136 mg L^{-1} und 1223 mg L^{-1}). Der Gehalt an Koffein entsprach weitestgehend den auf der Verpackung enthaltenen Angaben.

Koffein in unterschiedlichen cola-artigen Getränken lag zwischen $-33,4$ und $-35,6$ ‰. Diese Werte fallen in den Bereich literaturbekannter Werte ($-35,8$ bis -40 ‰) [64-66].

Wie aus Abbildung 2-60 ersichtlich ist, konnten von 38 als natürlich angegebenen koffeinhaltigen Getränken vier als falsch deklariert identifiziert werden. Darunter fielen ein Instantkaffee ($-36,8$ ‰), zwei Eistee Getränke ($-33,3$ und $-35,5$ ‰) und ein Maté Getränk ($-35,3$ ‰).

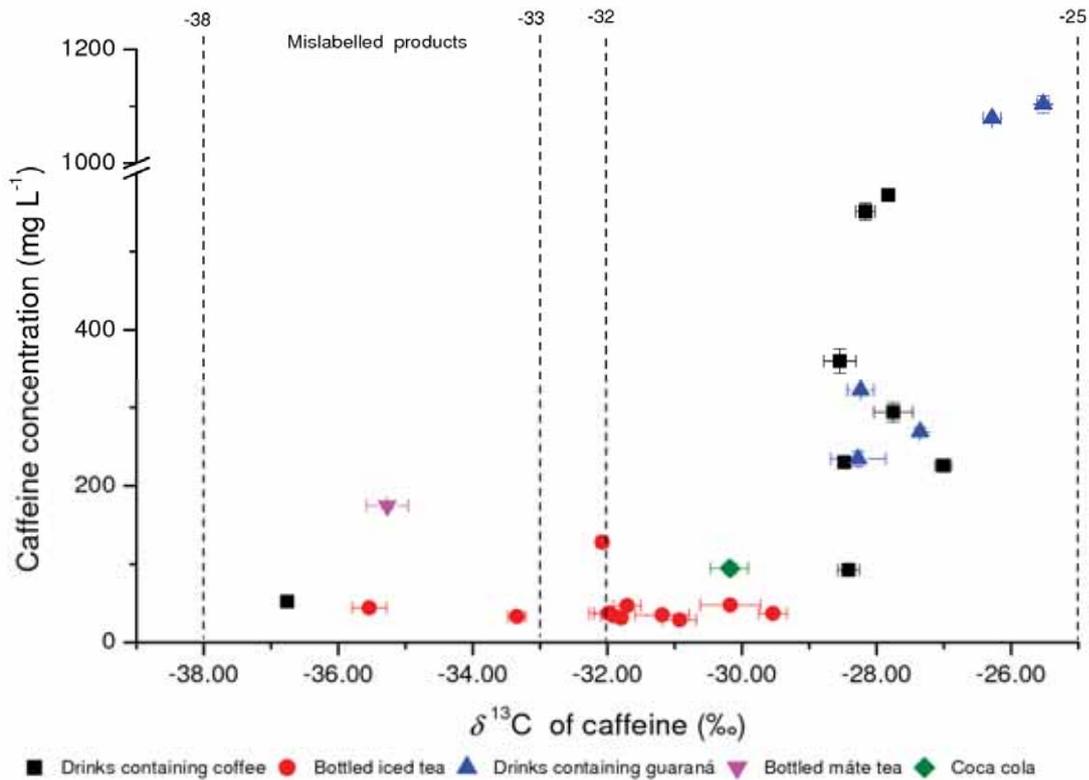


Abbildung 2-60: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte und Konzentrationen von Koffein in unterschiedlichen Getränken, die aufgrund ihrer Deklaration natürliches Koffein enthalten sollen. Es wurden vier falsch gekennzeichnete Produkte gefunden. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Messungen (Graphik von Zhang et al. [67]).

Die Bestimmung eines Schwellenwerts zur Differenzierung von synthetischem und natürlichem Koffein erfolgte auf statistischer Basis. Abbildung 2-61 zeigt eine Auftragung der δ -Werte aus Abbildung 2-59 zur Darstellung der Bereiche synthetischen und natürlichen Koffeins. Für beide Gruppen wurden einseitige Vorhersageintervalle um den Mittelwert ermittelt. Das niedrigere bzw. höhere Konfidenzintervall kann dabei durch,

$$\delta^{13}\text{C}_{nat,niedrig} = \bar{\delta}^{13}\text{C}_{nat} - t_{\alpha,df} \cdot s_{nat} \sqrt{1 + \frac{1}{n_{nat}}}$$

und

$$\delta^{13}\text{C}_{synth,niedrig} = \bar{\delta}^{13}\text{C}_{synth} - t_{\alpha,df} \cdot s_{synth} \sqrt{1 + \frac{1}{n_{synth}}}$$

beschrieben werden, wobei

$\bar{\delta}^{13}\text{C}_{nat}$ Mittelwert der δ -Werte von Proben natürlicher Herkunft

$\bar{\delta}^{13}\text{C}_{synth}$ Mittelwert der δ -Werte von Proben synthetischer Herkunft

n_{nat} Anzahl natürlicher Proben

n_{synth} Anzahl synthetischer Proben

s_{nat} Anzahl natürlicher Proben

s_{synth} Anzahl synthetischer Proben

$t_{\alpha,df}$ Student's t -Wert für ein Konfidenzintervall $1-\alpha$ und $n-1$ Freiheitsgrade.

Bei einem $\alpha = 0,01$ werden folgende Werte in Tabelle 2-15 erhalten.

Tabelle 2-15: Werte zur Ermittlung der Konfidenzintervalle.

	$\bar{\delta}^{13}C / \text{‰}$	s	n	df	$t_{\alpha,df}$	Limit des Konfidenzintervalls
Natürliche Proben	-28,1	1,422	42	41	2,420803	-31,6 ‰
Synthetische Proben	-35,3	1,299	20	19	2,539483	-31,9 ‰

Die Schwellenwerte zur Unterscheidung zwischen der natürlichen und synthetischen Herkunft von Koffein-Proben kann damit auf $\delta_{Schwellenwert} = -32 \text{ ‰}$ gesetzt werden. Wenn in einer unbekanntem Probe der ermittelte δ -Wert unterhalb dieses Schwellenwerts liegt, kann angenommen werden, dass das enthaltene Koffein synthetischer Herkunft ist. Die Fehlerwahrscheinlichkeit liegt dann bei $\alpha = 1\%$.

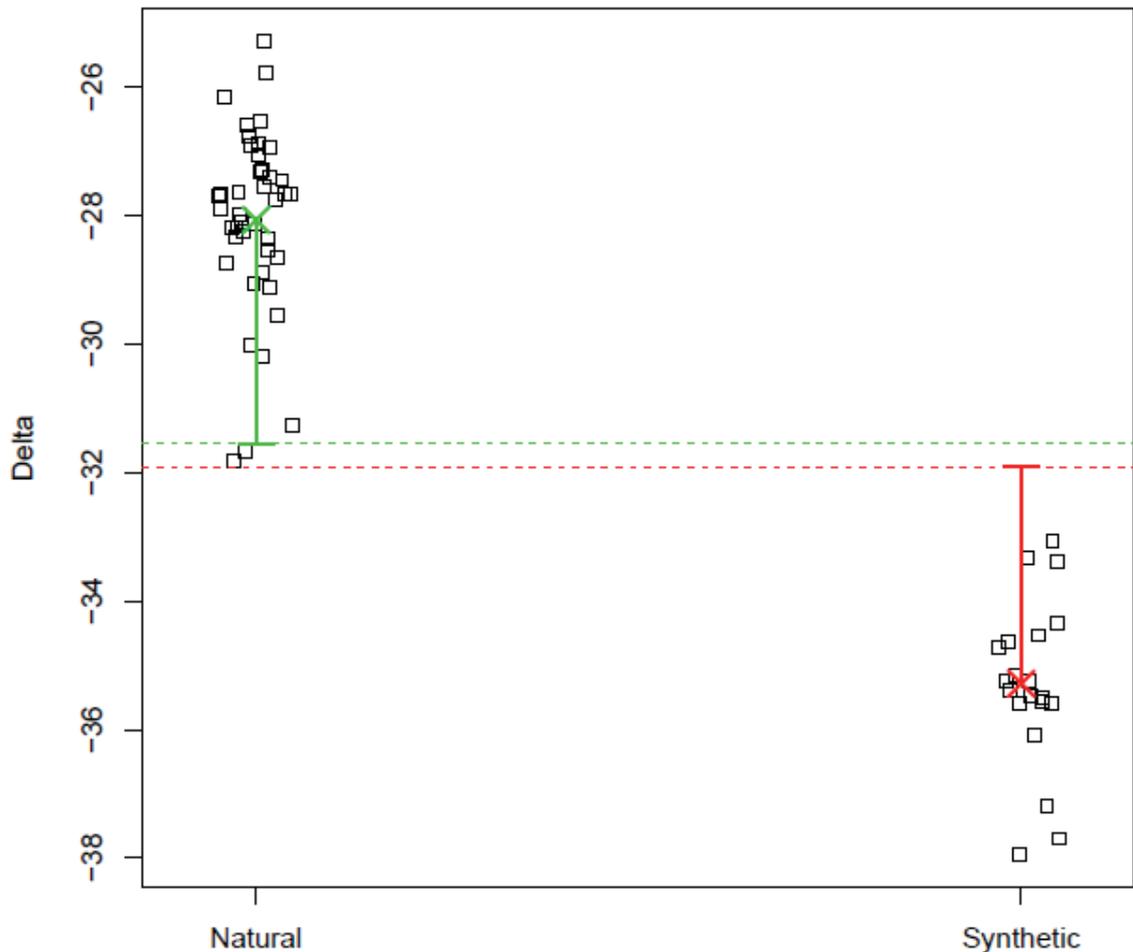


Abbildung 2-61: Einseitiges Konfidenzintervall für Proben, die natürliches bzw. synthetisches Koffein enthalten (Graphik von Zhang et al. [67]).

Abschließend kann gesagt werden, dass die Methode zur Unterscheidung von natürlichem und synthetischem Koffein genutzt werden kann und den EA-IRMS Methoden überlegen ist. Bei der hier entwickelten HT-HPLC-IRMS Methode entfällt die Reinigung und Abtrennung des Koffeins und das Koffein kann direkt aus den Getränken gemessen werden. Die hier ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte können in zwei Bereiche unterteilt werden, die den Bereichen des natürlichen und synthetischen Koffeins entsprechen.

2.13 Authentizität von Antibiotika

Besonders im pharmazeutischen Bereich ist eine Echtheitskontrolle aus Gründen des Verbraucherschutzes besonders wichtig. Aufbauend auf bereits publizierten Methoden zur quantitativen Analyse von Sulfonamiden mittels HT-HPLC [37,71,72] wurde eine HT-HPLC-Methode zur Messung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Sulfamerazin, Sulfadiazin, Sulfamethoxazol, Sulfathiazol and Trimethoprim, wie unter 2.9.2 beschrieben, transferiert und angepasst. Es konnte gezeigt werden, dass eine Messung dieser Verbindungen ohne aufwendige Probenvorbereitung möglich ist [73].

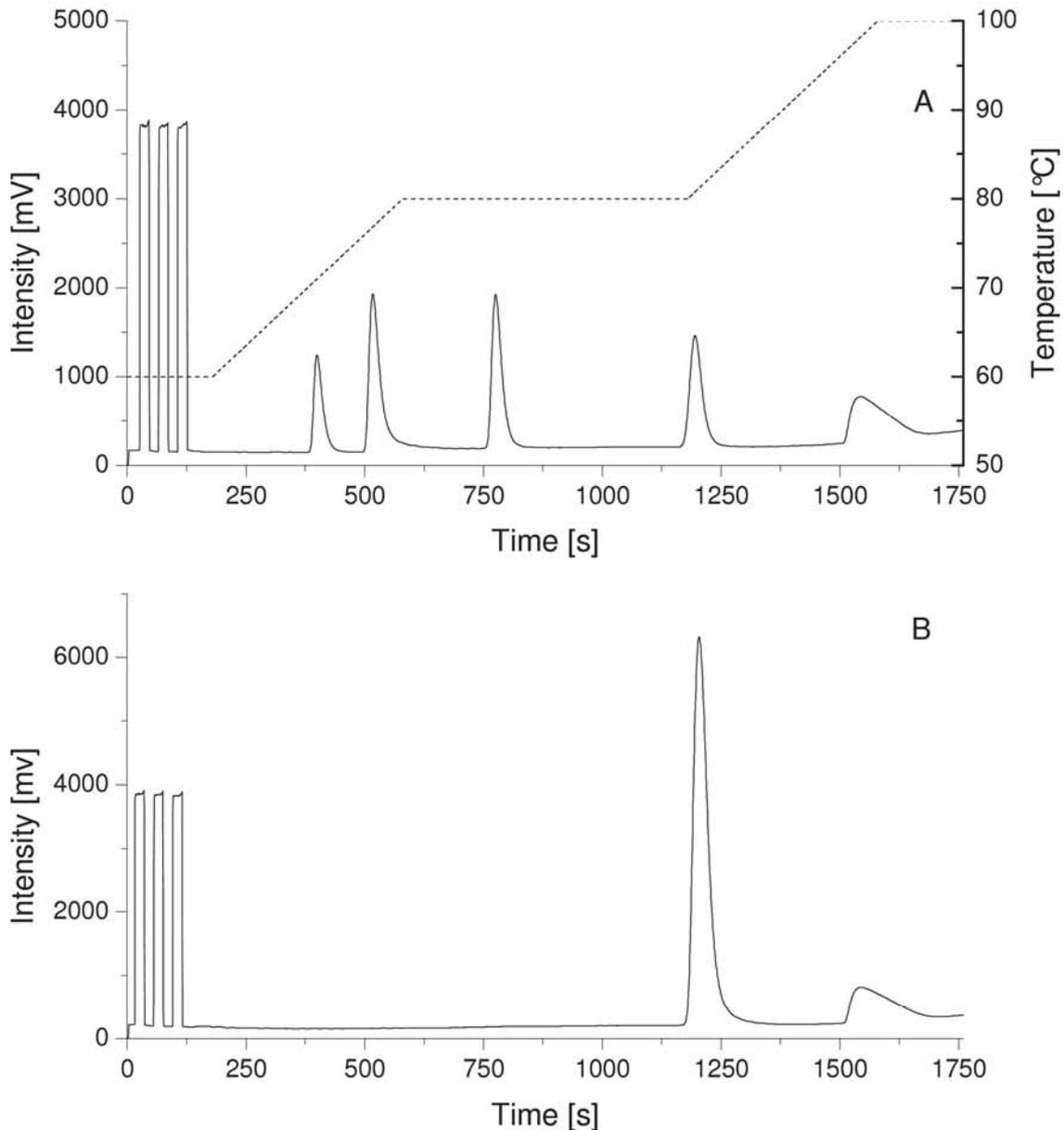


Abbildung 2-62: A) HT-HPLC-IRMS Chromatogramm (m/z 44) einer Standardmischung aus Sulfonamiden. Die gestrichelte Linie zeigt den verwendeten Temperaturgradienten. Die Peaks in Elutionsreihenfolge: Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Die Konzentration der Substanzen: 100 mg L^{-1} . B) HT-HPLC-IRMS Chromatogramm (m/z 44) einer pharmazeutischen Probe mit Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Gleiches Temperaturprogramm wie unter A) (Graphik von Kujawinski et al. [73]).

Abbildung 2-62 A zeigt ein Chromatogramm der transferierten Methode. Wie für die IRMS nötig [74], konnten mittels des verwendeten Temperaturgradienten alle Komponenten vollständig voneinander getrennt werden. Somit sind Veränderungen der Isotopensignatur durch Peaküberlagerung auszuschließen [36].

Die Trennung erfolgte auf einer einer XBridge C₁₈ Säule (100 × 2,1 mm, 3,5 μm) und einer Vorsäule gleichen Materials (10 × 2,1 mm) (Waters, Eschborn, Deutschland).

Obwohl Zhang et al. zeigen konnten, dass Gradienten zwischen $6^{\circ}\text{C min}^{-1}$ und $9^{\circ}\text{C min}^{-1}$ keine signifikanten Einbußen an Präzision und Genauigkeit der Isotopenwerte für Hybridpartikel und Zirkonium basierte Säulen ergaben, wurde ein Temperaturgradient mit einer kleinen Steigung von $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ gewählt, um den Anstieg der Basislinie so gering wie möglich zu halten. Der Anstieg des Untergrunds lag zwischen $0,17$ und $0,5 \text{ mV s}^{-1}$, sodass der von Zhang et al. empfohlene "Individual Background" Algorithmus zur Untergrundsubtraktion benutzt wurde [34].

Godin et al. beobachteten einen Einfluss auf die Isotopensignatur durch thermische Zersetzung der Analyten während der chromatografischen Trennung [32]. Bei den Untersuchungen Godins handelte es sich um Benzoesäuren, die während der Trennung decarboxylierten. Durch einen Vergleich der mittels HT-HPLC-IRMS gewonnenen Isotopenwerte mit denen der FIA-IRMS konnte, wie in Tabelle 2-16 gezeigt, keine signifikante Änderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte durch die Chromatografie beobachtet werden.

Tabelle 2-16: Methodennachweisgrenzen und Vergleich der HT-HPLC-IRMS Werte mit FIA- und EA-Werten der Sulfonamide und Trimethoprim.

Analyt	MDL*	$\delta^{13}\text{C}_{\text{HT-LC}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{FIA}}^{\ddagger}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{EA}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{EA}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{HT-LC}}$
	μg	$\text{‰}^{\#}$	$\text{‰}^{\#}$	$\text{‰}^{\#}$	‰
Sulfadiazin	0,4	$-30,8 \pm 0,1$	$-31,6 \pm 0,4$	$-29,2 \pm 0,2$	1,6
Sulfathiazol	0,3	$-28,5 \pm 0,1$	$-29,6 \pm 0,4$	$-26,64 \pm 0,04$	1,9
Sulfamerazin	0,5	$-31,3 \pm 0,3$	$-31,2 \pm 0,4$	$-28,90 \pm 0,03$	2,4
Sulfamethoxazol	0,5	$-30,7 \pm 0,3$	$-30,3 \pm 0,2$	$-27,91 \pm 0,02$	2,8
Trimethoprim	0,4	$-37,6 \pm 0,3$	$-37,6 \pm 0,2$	$-34,15 \pm 0,04$	3,4

*Absolute Masse auf der Säule

[#]Standardabweichung (n = 3)

[‡]Flussrate $500 \mu\text{L min}^{-1}$

Werden die Werte der EA-IRMS Methode mit denen der LC- und FIA-IRMS verglichen, zeigt sich eine Diskrepanz des $\delta^{13}\text{C}$ -Werts (siehe Tabelle 2-16). Diese Diskrepanz von $> 1 \text{ ‰}$ wurde auch in anderen Studien beobachtet [34,75,76]. Um den Grund für die Abweichung des EA-IRMS Werts von den LC- und FIA-IRMS Methoden aufzuklären, wurde die FIA-IRMS bei unterschiedlichen Eluent-, aber konstanten Reagenzflüssen durchgeführt. Wie aus Abbildung 2-63 ersichtlich ist, nähern sich die FIA-IRMS Werte den EA-IRMS Werten mit abnehmenden Eluentflussraten an. Zudem zeigt eine Diskrepanz zwischen den Peakflächen und der Flussrate, dass die Umsetzung im Oxidationsreaktor unvollständig ist. Mit zunehmendem Eluentfluss verkürzt sich die Aufenthaltszeit im Reaktor, sodass die Reaktion nicht vollständig ist.

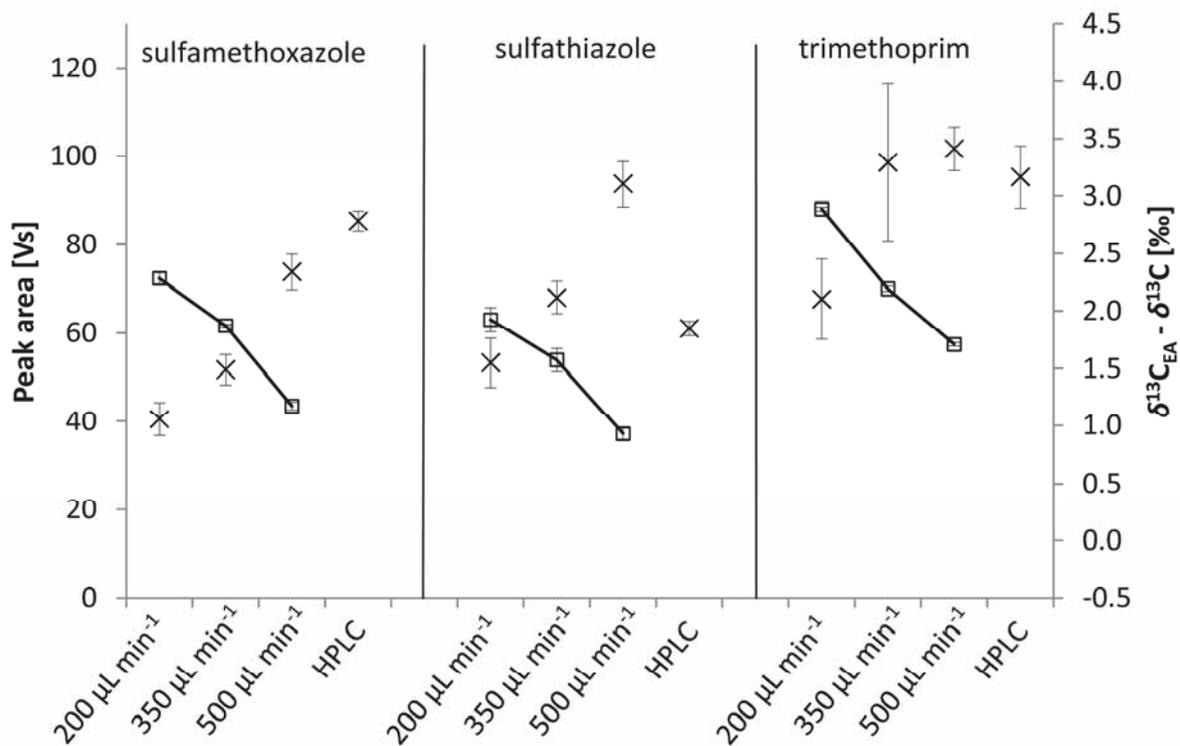


Abbildung 2-63: Peakflächen (Quadrate) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (Kreuze) gemessen mittels FIA- und HT-HPLC-IRMS bei $500 \mu\text{L min}^{-1}$ (Graphik von Kujawinski et al. [73]).

In Abbildung 2-64 wurden die gleichen Daten genutzt, um die Differenz zwischen EA-IRMS und FIA-IRMS gegen die relative Sensitivität (Peakfläche pro nmol C relativ zur Referenzgaspeakfläche) aufzuzeigen. Dieser Graphik kann entnommen werden, dass die Mineralisation der Sulfonamide einem ähnlichen Abbaumechanismus folgt, wenn davon ausgegangen wird, dass ^{13}C und ^{12}C über das Molekül gleichverteilt sind. Es kann somit gesagt werden, dass nicht eine unvollständige Extraktion des Kohlenstoffdioxids, sondern eine unvollständige Oxidation für die beobachteten, reproduzierbaren Offsets verantwortlich ist.

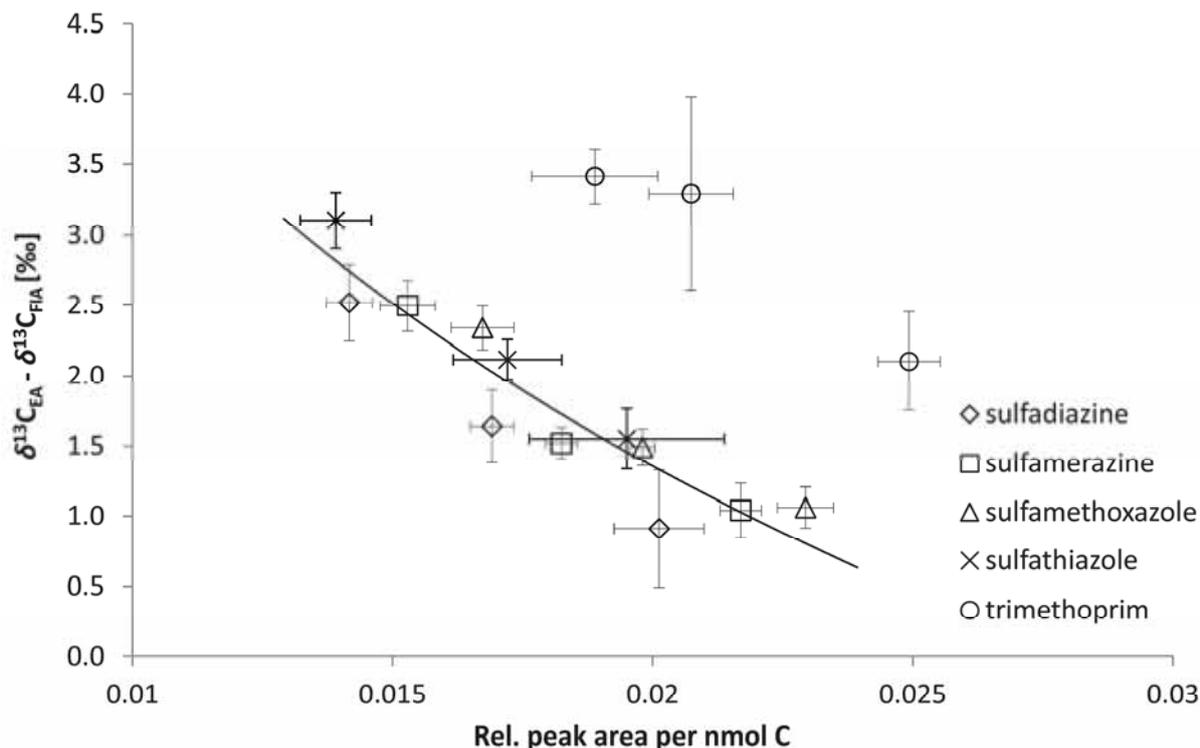


Abbildung 2-64: Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen EA-IRMS und FIA-IRMS in Abhängigkeit der relativen Peakflächen pro nmol C. Die Peakflächen pro Kohlenstoff wurden gegen den Referenzgaspeak referenziert, um Unterschiede in der Ionisation herauszumitteln. Die Kurve zeigt einen logarithmischen Zusammenhang für die Sulfonamide (Graphik von Kujawinski et al. [73]).

Kleinere Peakflächen durch unvollständige Oxidation der Analyten sind nicht erwünscht, da damit ein Sensitivitätsverlust verbunden ist. Auf der anderen Seite führt eine Reduktion der Eluentflussrate zu längeren Analysenzeiten und schlechten Peakformen. Dies ist besonders am Ende des chromatografischen Laufs bei höheren Temperaturen von Bedeutung [77]. Darüber hinaus erhöht sich die Verweilzeit der Analyten in der beheizten Säule, so dass die Wahrscheinlichkeit der Degradation der Analyten zunimmt. Um diese negativen Effekte zu minimieren, sollte immer die höchste Flussrate eingestellt werden. Es ist daher von Vorteil, Trennsäulen mit einem kleineren Innendurchmesser zu verwenden, da ihr optimaler Flussbereich niedriger ist. Ein Nachteil ist, dass Säulen mit einem kleinen Innendurchmesser bei den nötigen Substanzmengen in der LC-IRMS schnell an ihre Kapazitätsgrenze stoßen [78]. Dies gilt insbesondere für die isotherme Elution bei erhöhter Temperatur.

Bei $500 \mu\text{L min}^{-1}$ entsprechen die $\delta^{13}\text{C}_{\text{HT-HPLC}}$ Werte von Sulfamethoxazol, Sulfamerazin und Trimethoprim den $\delta^{13}\text{C}_{\text{FIA}}$ Werten, sodass eine Beeinflussung der Isotopensignaturen durch die chromatografische Trennung ausgeschlossen werden kann. Sulfadiazin und Sulfathiazol hingegen zeigten eine kleine Differenz von $0,9 \text{‰}$. Aus diesem Grund ist eine Korrektur der Isotopensignaturen über einen externen Standard unabdingbar.

Die Methodennachweisgrenze (MDL) wurde nach der in der Literatur beschriebenen „Moving Mean“ Methode bestimmt [69]. In Abbildung 2-65 ist die Bestimmung der Nachweisgrenze

für Sulfadiazin und Trimethoprim gezeigt. Dabei ist die Methodennachweisgrenze so definiert, dass die geringste benötigte Analytkonzentration, um eine Gesamtunsicherheit von $\pm 0,5\text{ ‰}$ zu erreichen, den MDL angibt. In Tabelle 2-16 sind die MDLs der ausgewählten Sulfonamide und Trimethoprim aufgeführt. Die ermittelten MDLs liegen zwischen $0,3\text{ }\mu\text{g}$ und $0,5\text{ }\mu\text{g}$ der Substanzen auf der Säule.

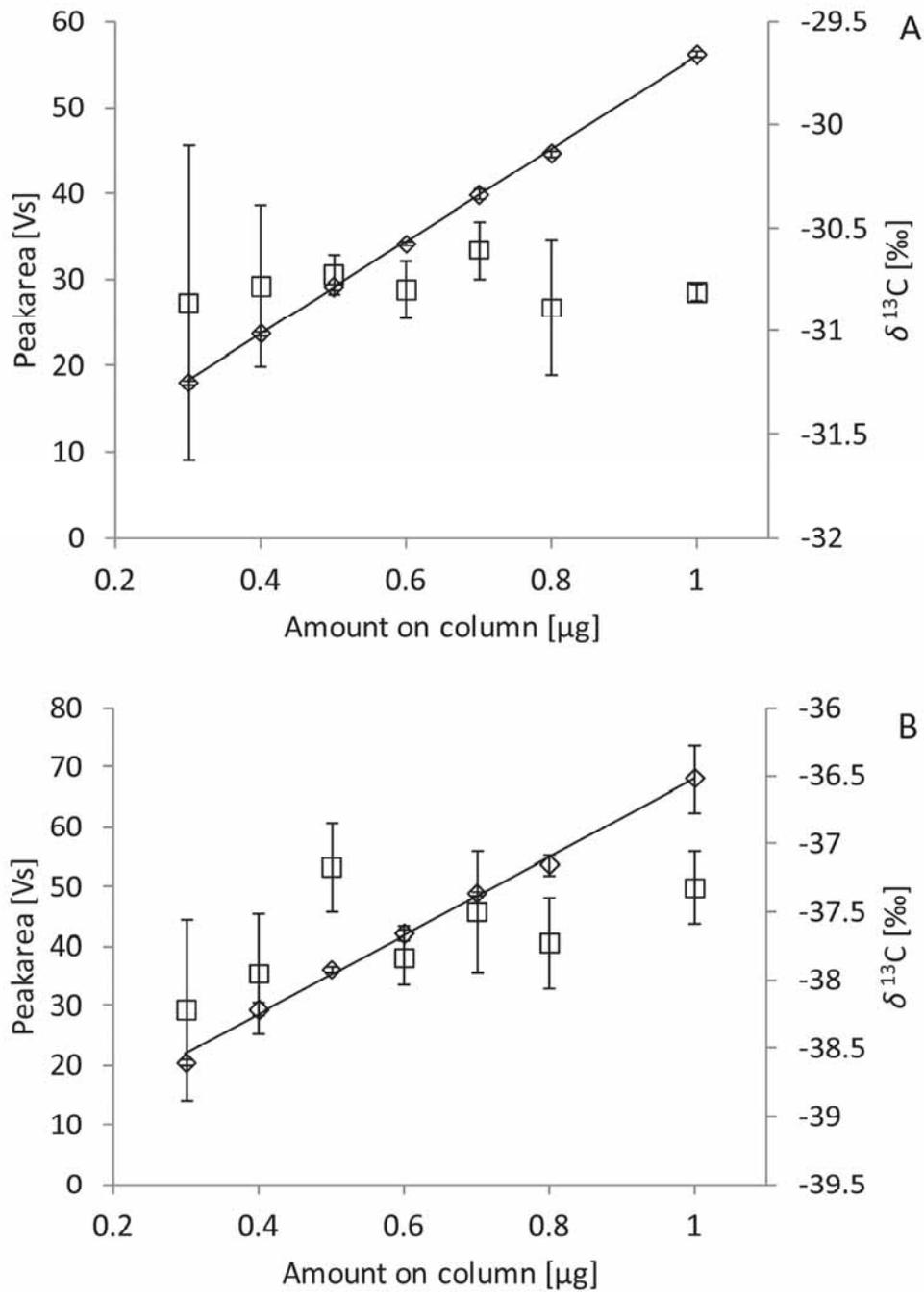


Abbildung 2-65: Kalibration von Sulfadiazin (Graph A) und Trimethoprim (Graph B). Die Rhomben zeigen die Peakfläche (m/z 44), die Quadrate die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (Graphik von Kujawinski et al. [73]).

Innerhalb des Projekts wurden pharmazeutische Proben von sechs unterschiedlichen Herstellern mit den Handelsnamen Cotrim™ und Cotrimoxazole™ untersucht. Die Proben enthalten laut Herstellerangaben 800 mg Sulfamethoxazol und 160 mg Trimethoprim. Zur Messung wurden die Proben homogenisiert und im HPLC-Eluenten gelöst, sodass jeweils eine Konzentration von 100 mg L⁻¹ der entsprechenden Verbindungen vorlag. Abgesehen von den Analyten enthielten die Tabletten Zusatz- und Füllstoffe, wie Stärke und Sterate. Wie aus dem Chromatogramm der Realprobe in Abbildung 2-62 B hervorgeht, hatte die Matrix nach dem Lösen der Tabletten im Eluenten keinen Einfluss auf die Qualität der Trennung. Der kleine Satz an gemessenen Produkten verschiedener Hersteller zeigte keine große Variation der korrigierten Kohlenstoffisotopensignaturen. Die wiederholte Messung der pharmazeutischen Proben zeigte eine gute Reproduzierbarkeit (siehe Tabelle 2-17), obwohl zwei Trennsäulen unterschiedlichen Alters verwendet wurden.

Mittels einer zweidimensionalen Auftragung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Trimethoprims gegen den des Sulfamethoxazols der sechs Proben (Abbildung 2-66) kann eine Identifizierung der Proben vorgenommen werden. Leider ist das untersuchte Set an Realproben zu klein, um statistisch untermauerte Aussagen treffen zu können. Weitere Detailinformationen können der Veröffentlichung von Kujawinski *et.al.* entnommen werden [73].

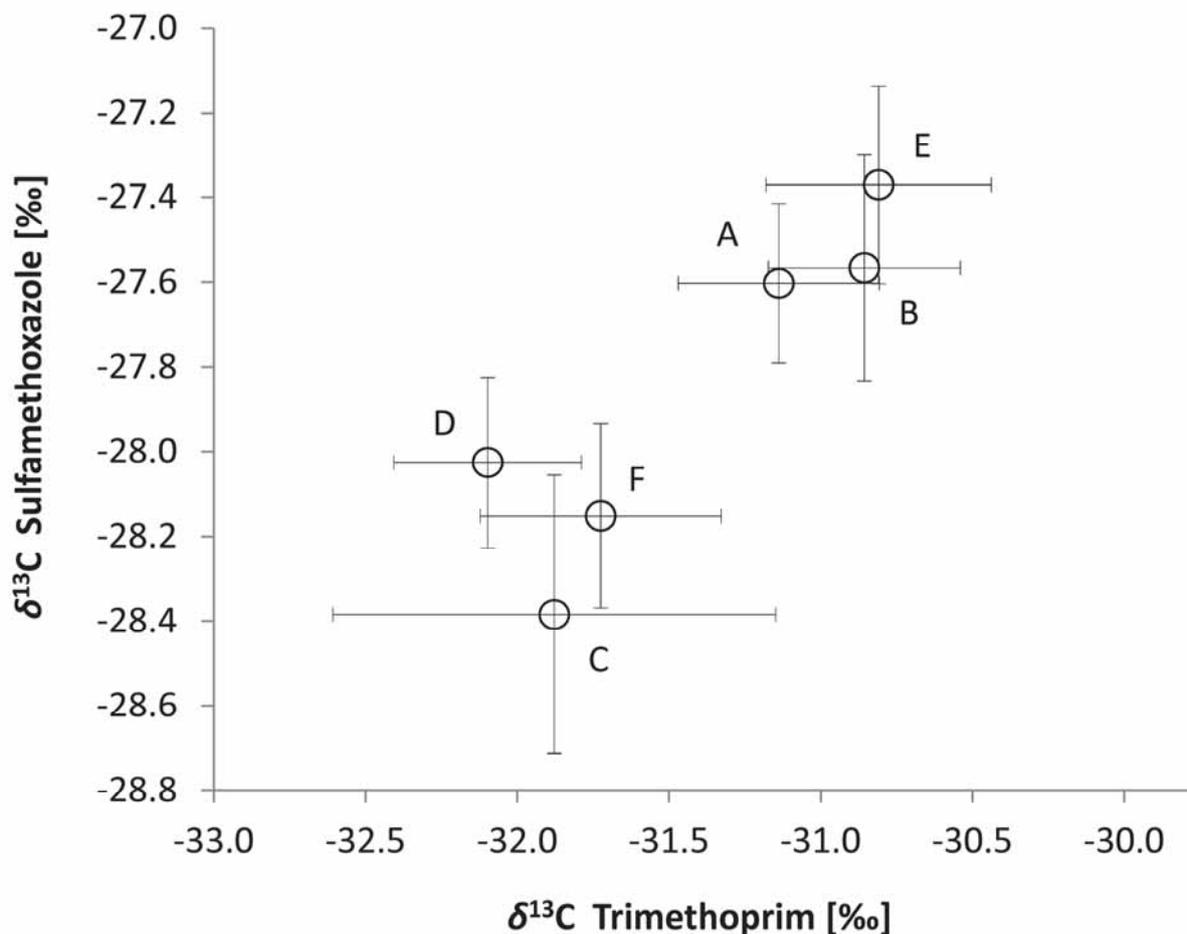


Abbildung 2-66: Korrigierte $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Trimethoprim und Sulfamethoxazol in pharmazeutischen Produkten. (Graphik von Kujawinski et al. [73]).

Tabelle 2-17: Bulk- und korrigierte CSIA-Werte der pharmazeutischen Proben.

Her- stel- ler	$10^3 \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$	Sulfamethoxazol		Trimethoprim
		$10^3 \delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$ Säule 1 XBridge C ₁₈ Säule (100 × 2,1 mm, 3,5 μm)	$10^3 \delta^{13}\text{C}$ Säule 2 XBridge C ₁₈ Säule (100 × 2,1 mm, 3,5 μm)	$10^3 \delta^{13}\text{C}$ Säule 2 XBridge C ₁₈ (100 × 2,1 mm, 3,5 μm)
A	-29,6 ± 0,1	-27,6 ± 0,2	-27,7 ± 0,4	-31,1 ± 0,3
B	-29,7 ± 0,4	-27,6 ± 0,3	-28,6 ± 0,4	-30,9 ± 0,3
C	-28,46 ± 0,09	-28,4 ± 0,3	-28,4 ± 0,2	-31,9 ± 0,7
D	-28,5 ± 0,1	-28,0 ± 0,2	-28,1 ± 0,2	-32,1 ± 0,3
E	-30,0 ± 0,4	-27,4 ± 0,2	-27,2 ± 0,4	-30,8 ± 0,4
F	-29,67 ± 0,04	-28,2 ± 0,2	-28,4 ± 0,1	-31,7 ± 0,4

3 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

3.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrags

Das Forschungsziel bestand darin, die Isotopenverhältnismassenspektrometrie (LC-IRMS) mit der Hochtemperatur-HPLC (HT-HPLC) und der Raman-Spektroskopie zu koppeln, um eine kombinierte Struktur- und Isotopenanalytik für Verbindungen, die der Gaschromatografie-IRMS Analyse nicht zugänglich sind, zu entwickeln. Mit der funktionstüchtigen Zusammenführung aller drei Komponenten am Standort Essen wurde dieses Ziel erreicht.

Im Rahmen des Projekts wurde ein online Raman-Detektor auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters entwickelt. Die Kopplung an die HT-HPLC konnte erfolgreich umgesetzt werden. Auch nach mehrwöchigem Einsatz blieb das System dicht und druckstabil. Die Nachweisgrenze des Raman-Detektors liegt bei einer Peakkonzentration von 1 mg L^{-1} in der Durchflusszelle. Dies entspricht einer absoluten Menge von 500 Nanogramm Analyt, die auf die HPLC-Trennsäule gegeben werden muss. In diesem Konzentrationsbereich sind allerdings nur einzelne, stark ausgeprägte Raman-Übergänge zu beobachten. Bei einem Multikomponenten-Gemisch wird somit eine eindeutige Zuordnung recht schwierig, da einige Schlüsselbanden der Substanzen sehr nahe beieinander liegen, zum Teil sogar deckungsgleich erscheinen. Für die Gesamtkopplung wurde daher mit höheren Konzentrationen gearbeitet. So konnten für einen Teil der Substanzen mehrere signifikante Raman-Übergänge gemessen werden und eine eindeutige Identifikation war mittels der Raman-Spektroskopie möglich. Die in der Gesamtkopplung erreichte Nachweisgrenze liegt für die ausgewählten Substanzen zwischen $2 \text{ }\mu\text{g}$ und $3 \text{ }\mu\text{g}$ Analyt auf der Trennsäule. Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze um den Faktor 5 wäre im Rahmen des Projekts prinzipiell durch die Beschichtung der Auskoppelfaser mit einem speziellen Kantenfilter möglich gewesen, konnte aber aufgrund des zu hohen technischen Aufwands (siehe Kapitel 2.6.1) nicht mehr realisiert werden.

Wie in den Forschungszielen definiert, wurden Verfahren zur Beantwortung von Fragestellungen der Authentizitäts- und Herkunftskontrolle von Produkten entwickelt. In diesem Zusammenhang sind die Entwicklung einer Methode zur Unterscheidung natürlichen und synthetischen Koffeins sowie ein Verfahren zur Authentizitätskontrolle von Antibiotika zu nennen. Beide Methoden sind bestehenden GC- und EA-IRMS Methoden dadurch überlegen, dass sie ohne Derivatisierung und arbeitsaufwendige Probenvorbereitungsschritte wie Extraktion oder Aufreinigung auskommen. Es konnte

gezeigt werden, dass im Fall der Koffeindifferenzierung lediglich eine Verdünnung der flüssigen Probe nötig ist.

Im Weiteren wurde eine Methode zur Kontrolle des Steroiddopings mittels der HT-HPLC-Raman-IRMS-Kopplung entwickelt. Auch diese Methode ist den bestehenden GC-IRMS Methoden dadurch überlegen, dass keine die Isotopensignatur verändernde Derivatisierung nötig ist.

Wie im Abschnitt 2.8.2 beschrieben, konnten die Fragen, welche stationären Phasen in welchem Temperaturbereich für die HPLC-IRMS verwendet werden können, sowie in welchem Maße die Temperaturgradiententechnik für die LC-IRMS eingesetzt werden kann, umfassend beantwortet werden.

Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht.

In einem bereits bewilligten und laufenden Anschlussantrag (IGF-FV-Nr. 17497 N mit dem Titel „Entwicklung eines Raman-Detektors für flüssigchromatografische Anwendungen zur Charakterisierung komplexer pharmazeutischer Formulierungen“) soll die Nachweisgrenze des Raman-Detektors weiter reduziert werden, um ihn als „konventionellen“ HPLC-Detektor nutzbar zu machen. Dazu muss eine Verbesserung der Nachweisstärke um den Faktor 10^4 und mehr erfolgen, um Konzentrationen von 100 pg mL^{-1} messen zu können. Dieses Ziel soll durch eine Modifikation des bestehenden Raman-Aufbaus erreicht werden. Dazu soll das Prinzip des Flüssigkern-Lichtwellenleiters mit dem SERS-Effekt (SERS: Surface Enhanced Raman Scattering) kombiniert werden. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von Metallkolloiden erreicht. Eine primäre Aufgabe des Folgeprojekts wird daher die Herstellung und Charakterisierung von Metallkolloiden sein, um diese für eine Kopplung mit dem aktuellen Raman-Experiment zu optimieren.

3.2 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihren innovativen Beitrag und ihre industriellen Anwendungsmöglichkeiten

3.2.1 Photonik und Präzisionstechnik

Laut aktueller Angaben des Fachverbands Spectaris stiegen die Umsätze der Branche Photonik und Präzisionstechnik nach der internationalen Finanz- und Wirtschaftskrise im Jahr 2010 wieder stark an. Im Inland konnten die Unternehmen der Branche um knapp 12 Prozent zulegen und erreichten ein Umsatzvolumen von knapp sieben Milliarden Euro. Der Auslandsumsatz stieg mit über 22 Prozent noch deutlicher an und erreichte gute 15 Milliarden Euro Umsatz. Bei einer Exportquote von 69,3 Prozent bedeutet dies in der Summe

ein Zuwachs um 19 Prozent. Der Gesamtumsatz liegt damit bei 22 Milliarden Euro. Auch bei den Beschäftigten gab es im Jahr 2010 Zuwächse. Mit einem Plus von 3,3 Prozent gegenüber 2009 waren fast 124 000 Menschen in der Branche beschäftigt.

Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse können von einer Vielzahl von Unternehmen aus der Branche der Photonik genutzt werden, um neue Produkte und Dienstleistungen auf Basis optischer Komponenten zu entwickeln. Es ist geplant, den in diesem Projekt entwickelten Demonstrator mit kmU bis zur Marktreife zu bringen. Erste Gespräche bez. einer Umsetzung im Rahmen des Zentralen Innovationsprogramms Mittelstand (ZIM) haben auf der analytica 2012 in München stattgefunden.

3.2.2 Lebensmitteltechnik

In den letzten Jahren hat ein zunehmender Trend bei Verbrauchern eingesetzt, Lebens- und Genussmittel auf Basis natürlicher Rohstoffe zu konsumieren. Diese Produkte zeichnen sich teilweise durch einen erheblich höheren Preis als rein industriell hergestellte Erzeugnisse aus. Die Verbraucher sind jedoch trotzdem bereit, höhere Preise zu zahlen.

Mit Hilfe der in diesem Forschungsantrag entwickelten Kopplungstechnik steht nun auch insbesondere kleinen und mittleren Unternehmen aus dem Bereich der Lebensmitteltechnik ein Verfahren zur Verfügung, das die Bestimmung der Authentizität von Geschmacks-, Aroma- oder Inhaltsstoffen erlaubt. Vor diesem Hintergrund können z. B. falsch deklarierte Lebens- und Genussmittel aufgeklärt werden. Insbesondere die Methode zur Bestimmung von natürlichem und synthetischem Koffein in koffeinhaltigen Getränken kann von einer Vielzahl von Unternehmen zur Absicherung der auf der Verpackung befindlichen Deklaration der Inhaltsstoffe genutzt werden, so dass eine Wettbewerbsverzerrung gegenüber Anbietern mit falsch deklarierten Angaben vermieden wird.

3.2.3 Umwelttechnik und pharmazeutische Analytik

Arzneimittelwirkstoffe, und hier insbesondere Antibiotika, werden nach wie vor in der Nutztierhaltung in großen Mengen eingesetzt. Über die Ausscheidungen der Tiere gelangen diese Substanzen bzw. deren Metabolite in die Umwelt. Mit der in diesem Projekt entwickelten Methode ist es möglich, diese Komponenten anhand ihrer Isotopensignatur zu bestimmen. Vor diesem Hintergrund ist eine Quellzuordnung möglich.

Im Bereich der pharmazeutischen Analytik spielt hauptsächlich die Authentizitätskontrolle der synthetisierten Wirkstoffe eine Rolle. Mit Hilfe des hier vorgestellten Verfahrens ist es möglich, eine Authentizitätskontrolle durchzuführen.

Vor diesem Hintergrund wird vielen mittelständischen Unternehmen aus den Branchen der Umwelt- und pharmazeutischen Analytik ein Werkzeug in die Hand gegeben, sowohl

Quellzuordnungen als auch Authentizitätskontrollen durchzuführen. An dieser Stelle sei insbesondere auf die bereits im Projektantrag bestehende Problematik der Produktpiraterie hingewiesen. Die HT-HPLC-Raman-IRMS-Kopplung stellt eine Methodik zur Verfügung, um Produktfälschungen nachzuweisen, die mit konventionellen Trenn- und Detektionstechniken nicht aufgeklärt werden können. Die Wichtigkeit, entsprechende technologische Verfahren für die betreffenden Unternehmen verfügbar zu machen, kann auch anhand der Tatsache abgeleitet werden, dass Strategien zur Bekämpfung von Produktfälschungen auf der im Juni 2012 stattfindendenACHEMA in großem Umfang thematisiert werden. (siehe hierzu z. B. einen Leitartikel in CHEManager Europe 6/2012, Seite 18 f).

3.3 Zusammenstellung aller Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem IGF-Vorhaben veröffentlicht wurden oder in Kürze veröffentlicht werden sollen

Folgende Arbeiten wurden bzw. werden in Kürze veröffentlicht:

Teutenberg, T.; Wiese, S.; Jochmann, M. A.; Kujawinski, D. M.; Zhang, L.; Schmidt, T. C.; Fischer, B.; Bettermann, H. Kopplungsverfahren zur Authentizitätskontrolle-Neuartige Kombination innovativer Detektionstechniken auf Basis der Isotopenverhältnismassenspektrometrie und Ramanspektroskopie. 2010. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 2010, (3).

Zhang, L., Kujawinski, D.M., Jochmann, M.A., Schmidt, T.C. 2011. High-temperature reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25: 2971-80

Zhang, L., Kujawinski, D.M., Federherr, E., Schmidt, T.C., Jochmann, M.A. 2012. Caffeine in Your Drink: Natural or Synthetic? *Analytical Chemistry* 84: 2805-10

Kujawinski, D.M., Zhang, L., Schmidt, T.C., Jochmann, M.A. 2012. Compound-specific carbon isotope ratio analysis of sulfonamides by LC/IRMS; eingereicht bei *Analytical Chemistry*.

Wiese, S., Teutenberg, T., Schmidt, T.C. 2011. General Strategy for Performing Temperature Programming in High Performance Liquid Chromatography: Prediction of Linear Temperature Gradients. *Analytical Chemistry* 83: 2227-33

Wiese, S., Teutenberg, T., Schmidt, T.C. 2011. A general strategy for performing temperature-programming in high performance liquid chromatography-Prediction of segmented temperature gradients. *Journal of Chromatography A* 1218: 6898-06

Wiese, S., Teutenberg, T., Schmidt, T.C. 2012. A general strategy for performing temperature-programming in high performance liquid chromatography-Further improvements in the accuracy of retention time predictions of segmented temperature gradients. *Journal of Chromatography A* 1222: 71-80

Doktor, K., Computerunterstützte Methodenentwicklung in der HPLC mittels Temperaturgradienten und unter isothermen Bedingungen von ausgewählten Lebensmittelzusatzstoffen für die HPLC-IRMS-Kopplung. Fachbereich Chemie, Hochschule Niederrhein, Krefeld, 2012, Bachelor thesis.

Wiese, S., A General Strategy for Performing Temperature Programming in High Performance Liquid Chromatography, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2012, Dissertation

Haun, J., Oeste, K., Teutenberg, T., Schmidt, T. C. High-temperature stability of modern commercially available stationary phases, *Journal of Chromatography A*, Manuskript in Vorbereitung.

Fischer, B., Entwicklung eines Raman-Detektors zur Online Analyse von wässrigen HPLC-Eluaten“, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Dissertation in Vorbereitung.

3.4 Angaben über gewerbliche Schutzrechte, sofern sie erworben wurden, oder ihre Anmeldung beabsichtigt ist

Es wurden keine gewerblichen Schutzrechte erworben. Die Anmeldung gewerblicher Schutzrechte ist nicht geplant.

3.5 Einschätzung der Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und ggf. aktualisierten Transferkonzepts

Im Rahmen des abgeschlossenen Projekts wurden die Ergebnisse den Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses in drei Sitzungen präsentiert und ausgiebig diskutiert. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse einem breiten Interessentenkreis durch Vorträge und Poster auf nationalen und internationalen Tagungen und Kongressen vorgestellt. Während

der gesamten Projektlaufzeit haben zahlreiche Beratungsgespräche, vornehmlich mit KMU aus dem Bereich der Analysetechnik, stattgefunden, um die weiteren technischen Maßnahmen zu diskutieren. Alle Angaben finden sich in der nachfolgenden Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1: Aktualisierter und fortgeschriebener Plan zum Transfer der Ergebnisse in die industrielle Praxis.

Datum/Zeitraum	Bereits umgesetzte Maßnahmen	Erläuterung
09.01.-12.01.2010	Vortrag 20. Doktorandenseminar in Hohenroda. „Method development in liquid chromatography using temperature gradients.“	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des 20. Doktorandenseminars des Arbeitskreises Separation Science der Fachgruppe Analytische Chemie der GDCh. Das Seminar bietet Doktoranden/innen, die auf dem Gebiet der analytischen Trenntechniken tätig sind, die Gelegenheit, ihre Forschungsergebnisse zu präsentieren. Darüber hinaus dient das Seminar dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.
04.03. 2010	Erster Projektbegleitender Ausschuss in Duisburg.	Vorstellung des Projekts und Diskussion der ersten Ergebnisse.
23.03.-26.03.2010	Posterbeiträge Analytica 2010 in München: „Development of a novel hyphenation system based on liquid chromatography, isotope ratio mass spectrometry and Raman spectroscopy.“ “Evaluation of Stationary Phases for High Temperature-Liquid Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry.“	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der Analytica. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle, Mess- und Prüftechnik sowie Biotechnologie, Life Sciences und Diagnostika.
15.04.-16.04.2010	Posterbeiträge BASIS Benelux IRMS Users Group Meeting: “Carbon Stable Isotope Analysis of Sulfonamides by online High Temperature - High Performance Liquid Chromatography - Isotope Ratio Mass Spectrometry.“ “Evaluation of Stationary Phases for High Temperature-Reversed Phase Liquid Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry.“	BASIS ist die Benelux Association for Stable Isotope Scientists. Auf den jährlichen Treffen steht die Messung und Anwendung stabiler Isotope im Vordergrund.
21.06.-25.06.2010	Posterbeiträge ISI 2010 - The Fifth International Symposium on Isotopomers: “Carbon Stable Isotope Analysis of Sulfonamides by online High Temperature - High Performance Liquid Chromatography - Isotope Ratio Mass Spectrometry.“ “High Temperature Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry.“	Die ISI ist eines der führenden Symposien auf dem Gebiet der stabilen Isotopenanalyse. Ein wichtiger Punkt ist dort die Vorstellung und Nutzung neuer Analysemethoden in verschiedenen Gebieten der Life Sciences.

12.09.-16.09.2010	<p>Vorträge und Posterbeitrag International Symposium on Chromatography (ISC) 2010 in Valencia, Spanien:</p> <p>Titel des Vortrags: "Liquid-Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry: Opportunities and challenges for a new hyphenation."</p> <p>Titel des Vortrags: "Method Development in Liquid Chromatography using temperature gradients."</p> <p>Titel des Posters: "Development of a novel hyphenation system based on liquid chromatography, isotope ratio mass spectrometry and Raman spectroscopy."</p>	<p>Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des International Symposium on Chromatography (ISC). Die ISC ist eine der größten internationalen Tagungen auf dem Gebiet der chromatografischen Trenntechnik und dient dem Austausch zwischen Industrie und Wissenschaft.</p>
21.09.-23.09.2010	<p>Vortrag und Posterbeitrag ProcessNet Jahrestagung 2010 in Aachen:</p> <p>Titel des Vortrags: „Methodenentwicklung in der Flüssigchromatografie unter Verwendung von Temperaturgradienten.“</p> <p>Titel des Posters: „Neuartige Kombination innovativer Detektionstechniken auf Basis der Isotopenmassenspektrometrie und Ramanspektroskopie.“</p>	<p>Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der ProcessNet-Jahrestagung 2010. Die ProcessNet Jahrestagung ist eine gemeinsame Plattform der Chemischen Technik und Verfahrenstechnik von DECHEMA und VDI-GVC. Es besteht die Möglichkeit, sich über neueste industrielle Entwicklungen zu informieren und Kontakte zu Firmen zu knüpfen.</p>
08.11.-09.11.2010	<p>Posterbeitrag 7. Langenauer Wasserforum in Langenau.</p> <p>“Development of a novel hyphenation system based on liquid chromatography, isotope ratio mass spectrometry and Raman spectroscopy.”</p>	<p>Vorstellung von Teilergebnissen innerhalb des Langenauer Wasserforums (LWF). Das LWF widmet sich den aktuellen Entwicklungen im Bereich der Wasser- und Umweltanalytik.</p>
23.11.-24.11.2010	<p>Vortrag und Poster LC-IRMS users meeting Oxford:</p> <p>Titel des Vortrags: „Carbon Stable Isotope Analysis of Sulfonamides and Trimethoprim by High Temperature – LC–IRMS.“</p> <p>Titel des Posters: “High temperature reversed phase liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry.”</p>	<p>Das LC-IRMS users meeting wurde zum ersten Mal abgehalten und richtet sich an alle europäischen Nutzer von LC-IRMS Systemen. Dabei stehen grundlegende Strategien zur Methodenentwicklung im Vordergrund.</p>
09.01.-11.01.2011	<p>Vortrag 21. Doktorandenseminar in Hohenroda.</p> <p>Titel des Vortrags: „Entwicklung eines Raman-Detektors zur Kopplung von HPLC / Raman / IRMS -Detektionstechniken.“</p>	<p>Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des 21. Doktorandenseminars des Arbeitskreises Separation Science der Fachgruppe Analytische Chemie der GDCh. Das Seminar bietet Doktoranden/innen, die auf dem Gebiet der analytischen Trenntechniken tätig sind, die Gelegenheit, ihre Forschungsergebnisse zu präsentieren. Darüber hinaus dient das Seminar dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.</p>
17.02.2011	<p>Zweiter Projektbegleitender Ausschuss in Düsseldorf.</p>	<p>Vorstellung der erzielten Ergebnisse und Diskussion der weiteren Arbeiten.</p>

17.03.-18.03.2011	Vortrag BASIS Benelux IRMS Users Group Meeting: "High temperature liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry."	BASIS ist die Benelux Association for Stable Isotope Scientists. Auf den jährlichen Treffen steht die Messung und Anwendung stabiler Isotope im Vordergrund.
22.03.-25.03.2011	Vorträge ANAKON 2011 in Zürich. "Liquid Chromatography-Isotope Ratio Mass Spectrometry: Opportunities and Challenges for a New Hyphenation." "Compound-specific Carbon Isotope Ratio Determination of Sulfonamides by online High Temperature Liquid Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry." Posterbeitrag ANAKON 2011 in Zürich. "Development of a novel hyphenation system based on liquid chromatography, isotope ratio mass spectrometry and Raman spectroscopy".	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der Anakon. Die Anakon ist die deutschsprachige Analytik-Tagung, die u. a. dem Gebiet der analytischen Trenntechniken großen Platz einräumt und die Gelegenheit gibt, Forschungsergebnisse zu präsentieren. Darüber hinaus dient die Tagung dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.
19.06.-23.06.2011	Posterbeiträge HPLC 2011 in Budapest. "High temperature stability of commercially available HPLC columns" "Development of a Raman detector for hyphenation with high-temperature liquid chromatography and isotope ratio mass spectrometry".	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der HPLC 2011. Die HPLC ist eine der größten Tagungen im Bereich der Flüssigchromatografie.
27.06.-28.06.2011	Vortrag Central European Meeting for Isotope Users, CEMIU 2011, Bremen "LC-IRMS -- Opportunities and Challenges for a New Hyphenation."	Vorstellung des Projekts auf dem europäischen Workshop der Firma Thermo. Anwesend sind Anwender aus der Industrie und dem universitären Bereich.
08.01.-10.01.2012	Vortrag 22. Doktorandenseminar in Hohenroda. "A New Hyphenation of High-Temperature Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry."	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen des 22. Doktorandenseminars des Arbeitskreises Separation Science der Fachgruppe Analytische Chemie der GDCh. Das Seminar bietet Doktoranden/innen, die auf dem Gebiet der analytischen Trenntechniken tätig sind, die Gelegenheit, ihre Forschungsergebnisse zu präsentieren. Darüber hinaus dient das Seminar dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.
01.02.-03.02.2012	Vortrag HTC-12 Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers "Development of a Raman Detector for hyphenation with high-temperature liquid chromatography and isotope ratio mass spectrometry"	Das Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers ist die renommierteste Tagung im Bereich analytischer Kopplungstechniken. Darüber hinaus findet ein breiter Austausch zwischen Vertretern aus Wissenschaft und Industrie statt.
29.02.2012	Dritter Projektbegleitender Ausschuss in Essen.	Vorstellung aller erzielten Ergebnisse und Abschlussdiskussion.

Datum/Zeitraum	Maßnahmen nach Projektende	Erläuterung
17.04.-19.04.2012	<p>Posterbeiträge Analytica 2012 in München: „Caffeine in Your Drink: Natural or Synthetic?“ “Hyphenation of high-temperature liquid chromatography with online Raman-Spectroscopy”.</p> <p>Vorträge analytica conference 2012 in München „High-Temperature Liquid Chromatography – Advances, Challenges and Limitations“ „A General Strategy for Performing Temperature Programming in High Performance Liquid Chromatography“</p>	Vorstellung von Anwendungen im Rahmen der Analytica. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle, Mess- und Prüftechnik sowie Biotechnologie, Life Sciences und Diagnostika.
18.06.-22.06. 2012	<p>VortragACHEMA 2012 “Development of a Raman Detector for hyphenation with high-temperature liquid chromatography and isotope ratio mass spectrometry”</p>	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen derACHEMA. DieACHEMA ist weltweit die einzige Gesamtschau aller Investitionsgüter für die chemische Prozessindustrie.
02.09-07.09.2012	Vortrag JESIUM 2012 in Leipzig	Vorstellung der Methodenentwicklungen der HT-HPLC-IRMS auf der Europäischen Isotopentagung
Kontinuierlich	Beratung von kmU	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend über die gesamte Projektlaufzeit durchgeführt.
Ab 2012	Aus- und Weiterbildung	Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projektes erzielten Forschungsergebnisse über Seminare und Fortbildungsveranstaltungen. Die Seminare verbinden theoretische Grundkenntnisse mit der praktischen Tätigkeit im Labor und richten sich an HPLC-Anwender.
Ab 2012	Akademische Ausbildung	Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projekts erzielten Forschungsergebnisse in die Lehrveranstaltungen zur Analytischen Chemie an der Universität Duisburg-Essen sowie zur Physikalischen Chemie an der Universität Düsseldorf.

Das vorgeschlagene Transferkonzept konnte in allen wesentlichen Punkten erfolgreich umgesetzt werden. Es ist geplant, die Ergebnisse des Forschungsvorhabens auch auf weiteren Tagungen, Messen und Konferenzen vorzustellen.

Wie im Anhang unter 4.4 belegt, zeigte die Applikationsentwicklung zur Koffeinauthentizität großes wissenschaftliches sowie öffentliches Interesse. Nach Erscheinen des Artikels von Zhang et al. „Caffeine in Your Drink: Natural or Synthetic?“ in Analytical Chemistry gab die

American Chemical Society eine Pressemitteilung heraus, auf welche ein Artikel in Chemical & Engineering News folgte. Der Artikel von Zhang *et al.* wurde danach zeitweilig zur meistgelesenen Originalarbeit in Analytical Chemistry. Etwas später folgte ein Artikel in Welt Online unter dem Titel „Ist das Koffein echt?“.

4 Anhang

4.1 Basiskomponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus

Tabelle 4-1: Spezifikationen der Basiskomponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus.

Laser		
Hersteller:	Spectra-Physics	
Modell:	Millenia Pro 2s (diodengepumpter Festkörperlaser)	
Leistung (cw):	> 2 W	
Wellenlänge:	532 nm (frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser)	
TEM-Mode	TEM ₀₀ , M ² < 1,1	
Strahldurchmesser	2,3 mm ± 10%	
Strahldivergenz	< 0,5 mrad	
Polarisation	> 100:1, vertikal	
Leistungsstabilität	± 1%	
Rauschen	< 0,04% rms	
Monochromator		
Hersteller:	Kaiser Optical Systems	
Modell:	HoloSpec f/1.8i VIS	
Gitter:	HSG-532-LF	
Spektralbereich:	-29 bis 2388 cm ⁻¹	
Durchschnittliche reziproke lineare Dispersion:	2,4 cm ⁻¹ / pixel	
Spaltbreite:	100 µm	
CCD-Kamera		
Hersteller:	Andor Technology	
Modell:	Newton DU920P-BV	
Aktive Pixel:	1024 x 255	
Pixel Größe:	26 x 26 µm	
Image Fläche:	26,7 x 6,7 mm	
Min. Temperatur:	-80 °C / -100 °C bei zusätzlicher Wasserkühlung	
Zusatzoption:	VIS Entspiegelung	
Quanteneffizienz:	> 95% bei 550 nm	

Abbildung 4-1: Spectra-Physics Millennia Pro 2s diodengepumpter Festkörperlaser.

Abbildung 4-2: Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VIS Monochromator (offen).

Abbildung 4-3: Andor Newton DU920P CCD-Kamera.

4.2 Projektreferenz-Ramanspektrendatenbank

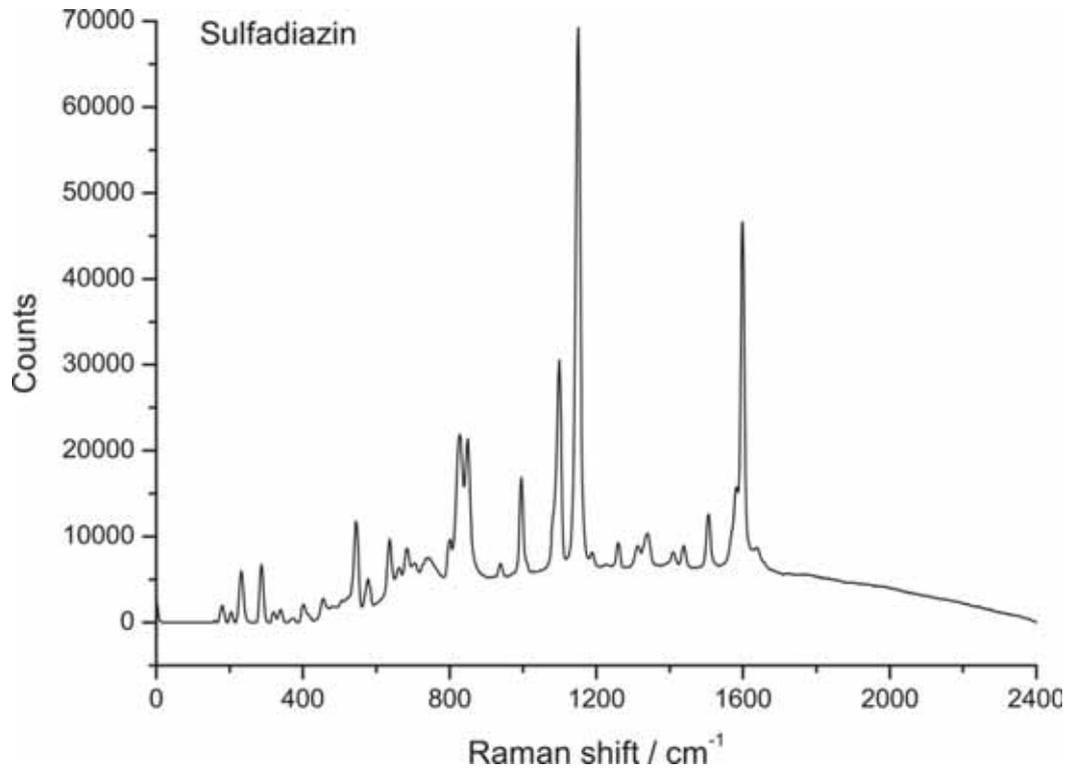


Abbildung 4-4: Raman-Spektrum von Sulfadiazin.

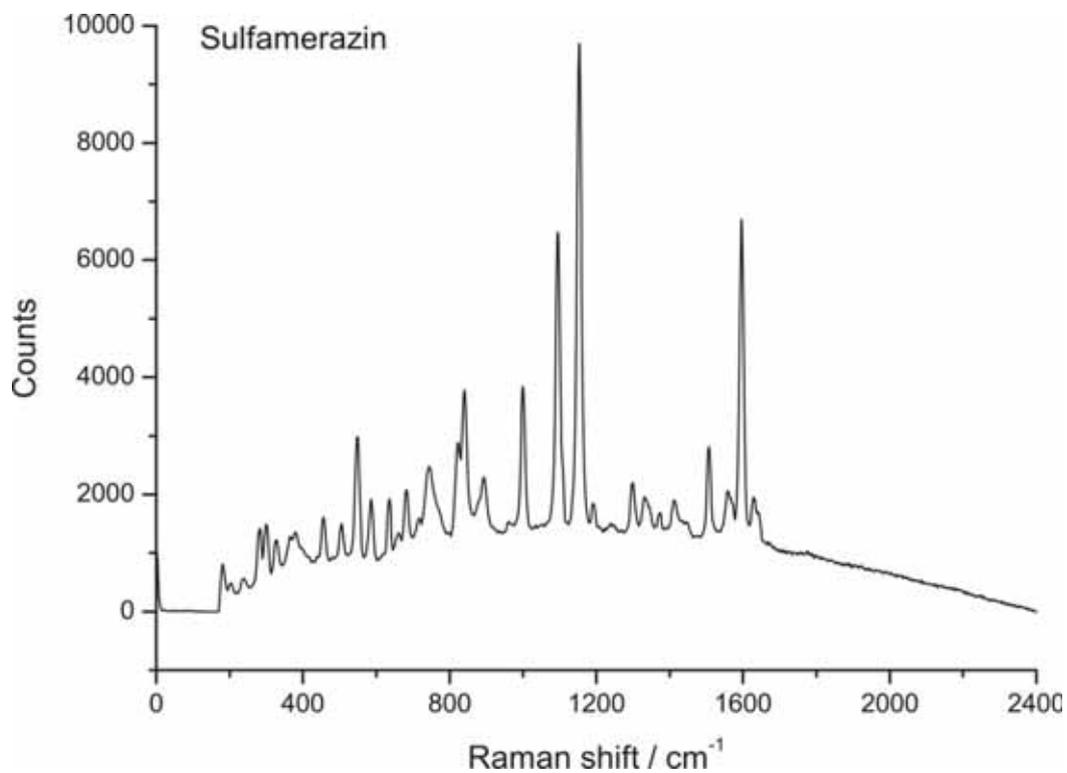


Abbildung 4-5: Raman-Spektrum von Sulfamerazin.

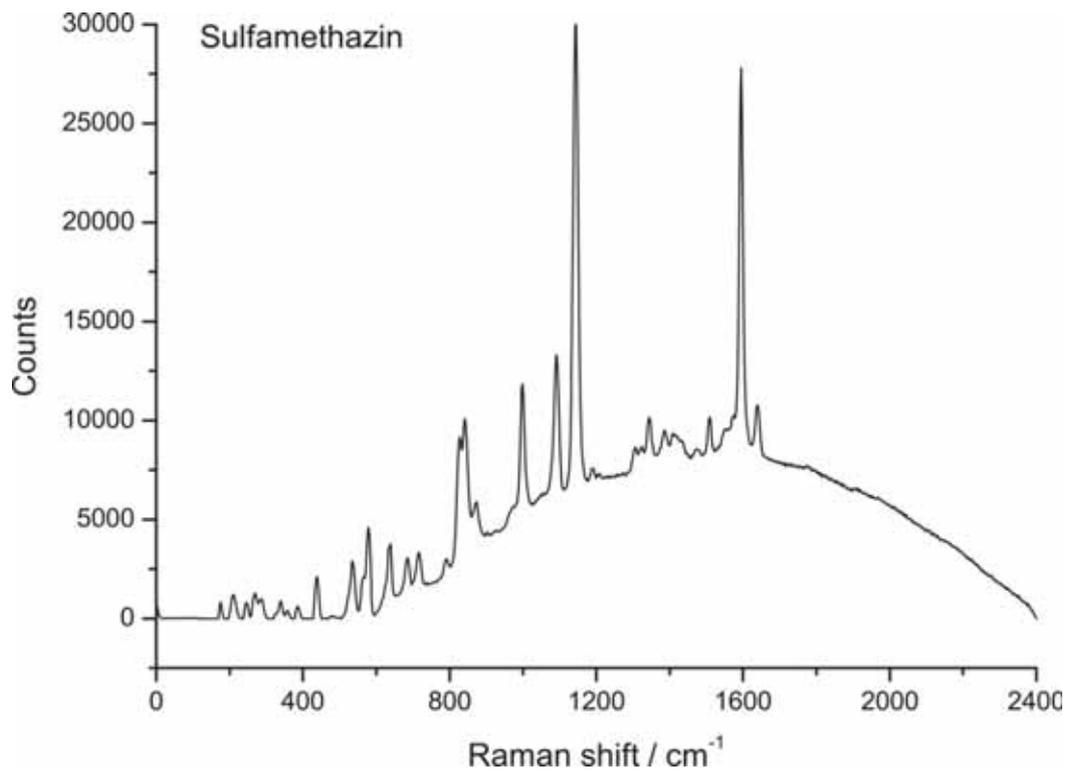


Abbildung 4-6: Raman-Spektrum von Sulfamethazin.

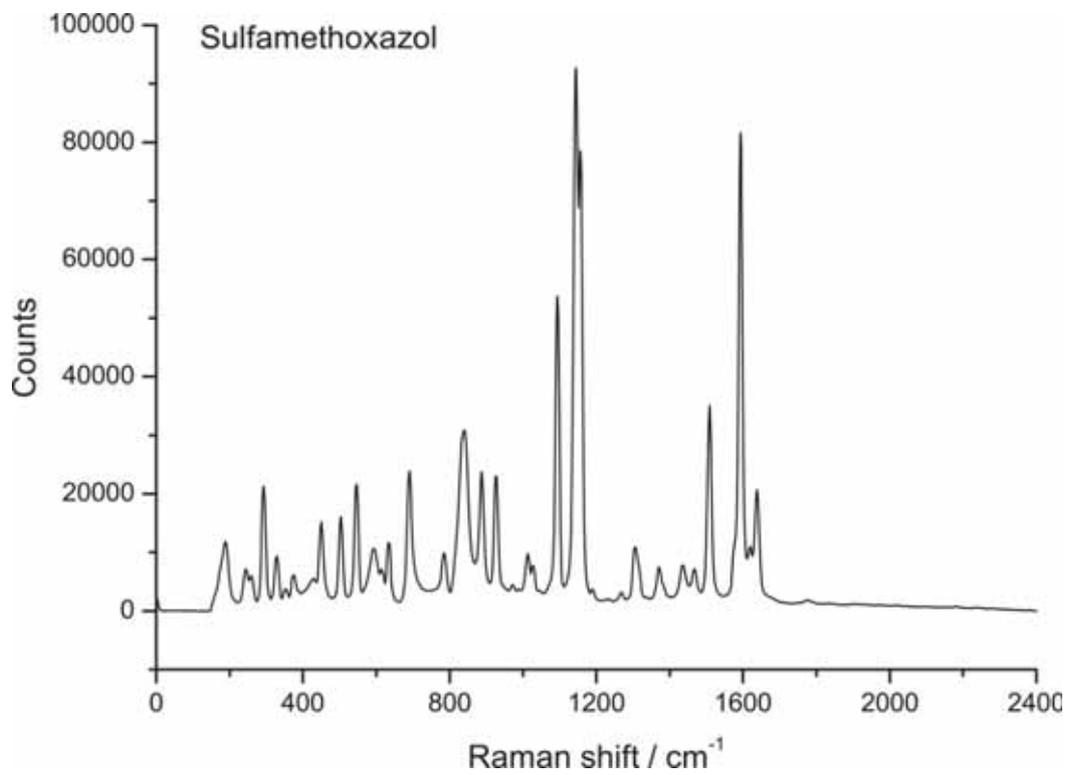


Abbildung 4-7: Raman-Spektrum von Sulfamethoxazol.

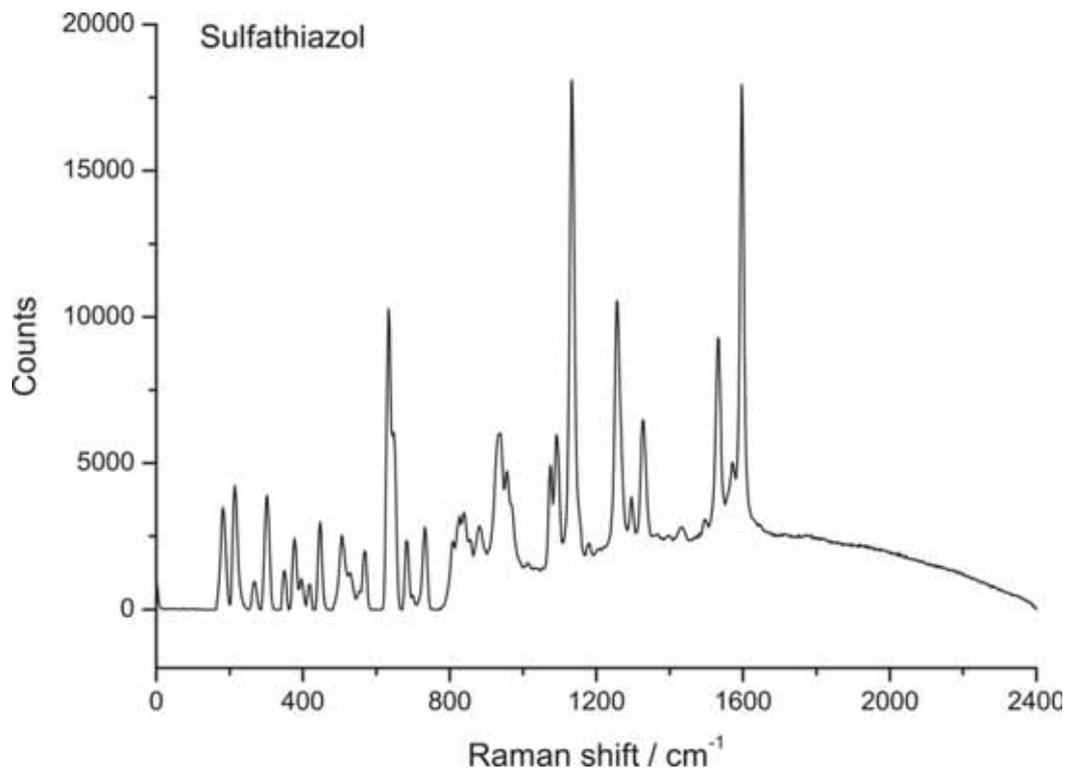


Abbildung 4-8: Raman-Spektrum von Sulfathiazol.

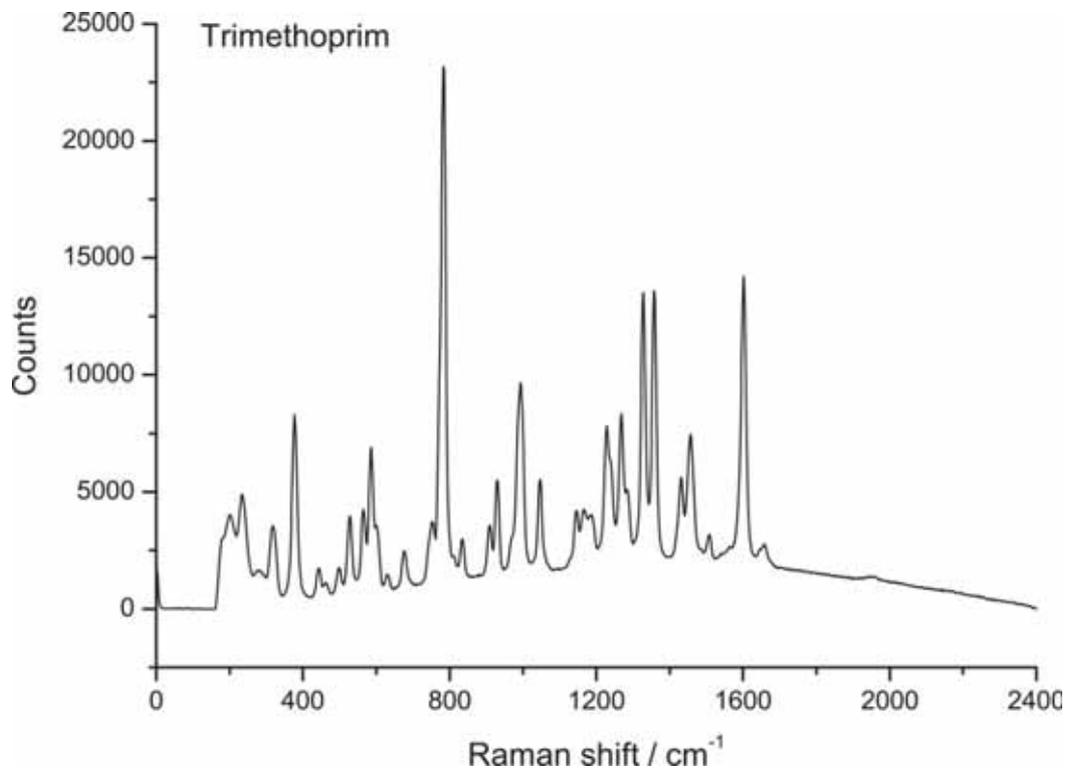


Abbildung 4-9: Raman-Spektrum von Trimethoprim.

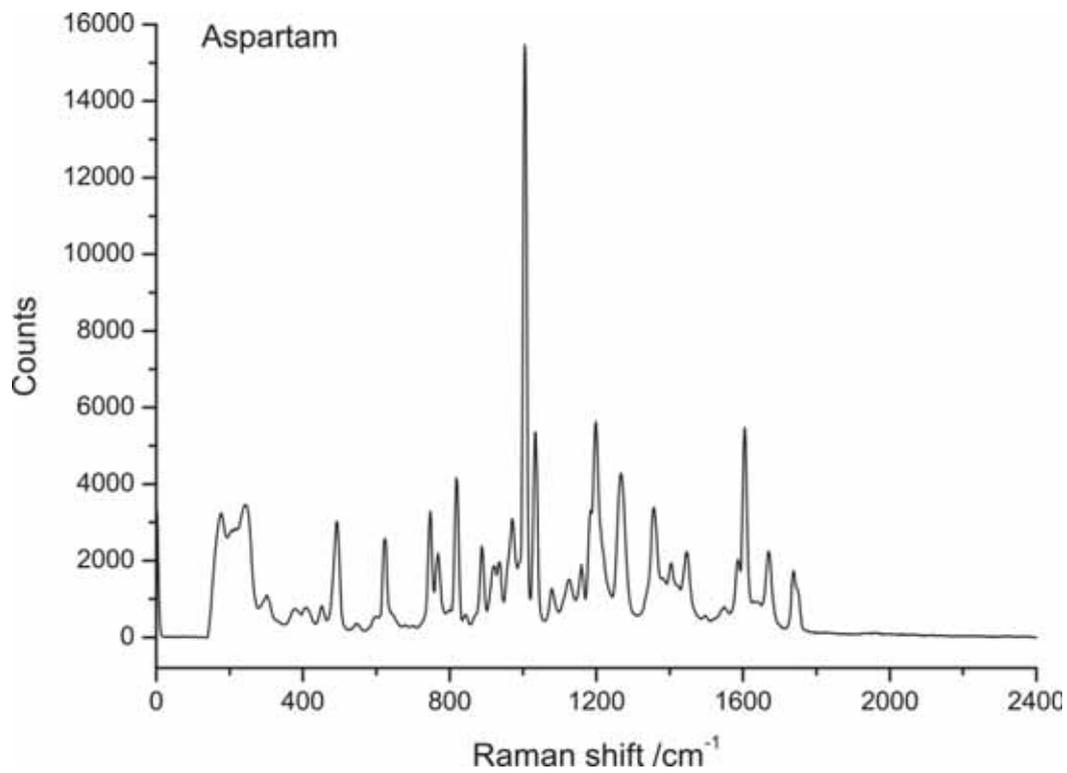


Abbildung 4-10: Raman-Spektrum von Aspartam.

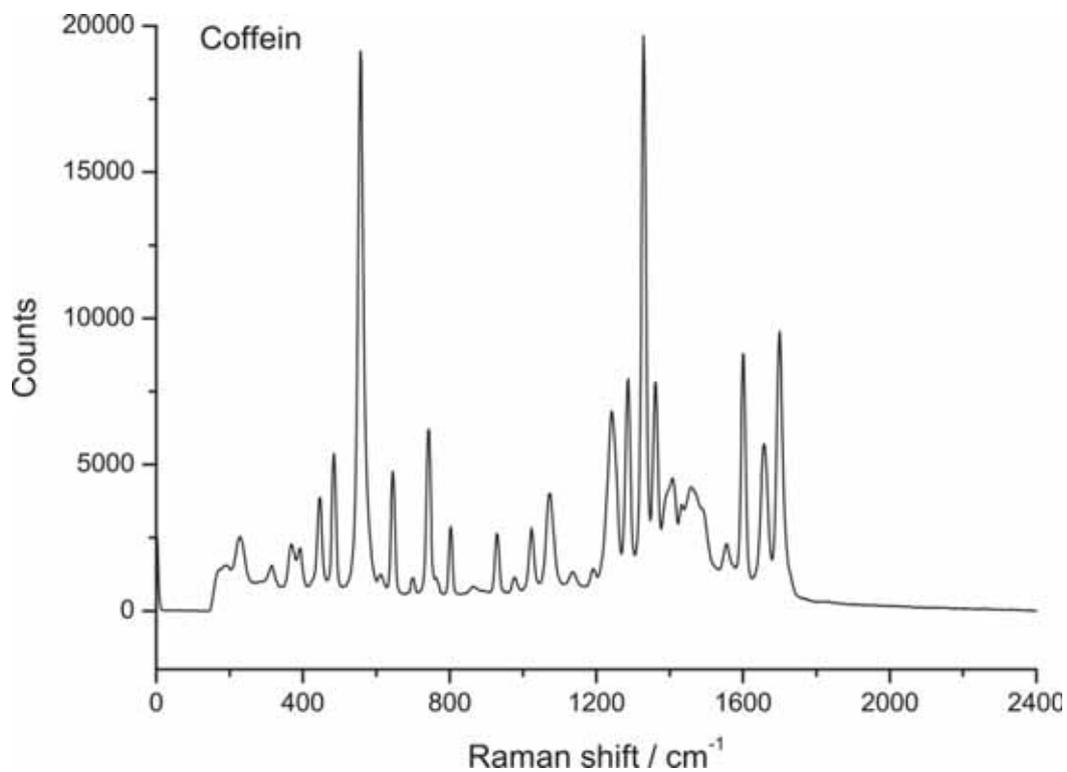


Abbildung 4-11: Raman-Spektrum von Koffein.

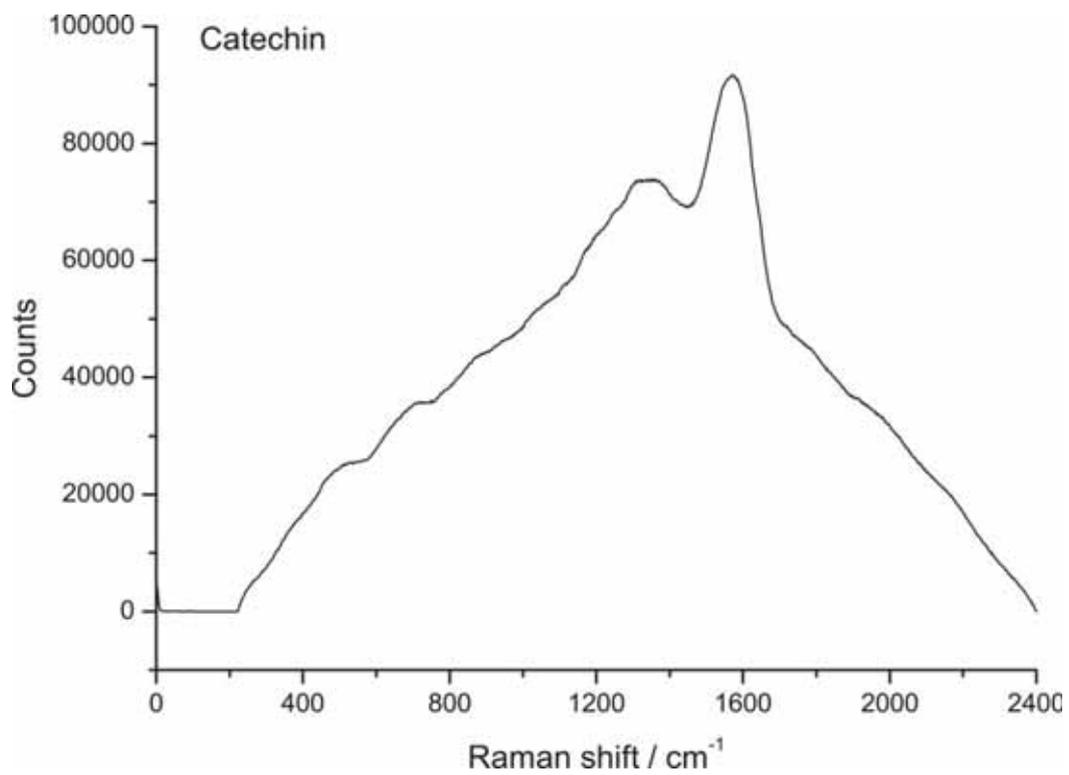


Abbildung 4-12: Raman-Spektrum von Catechin.

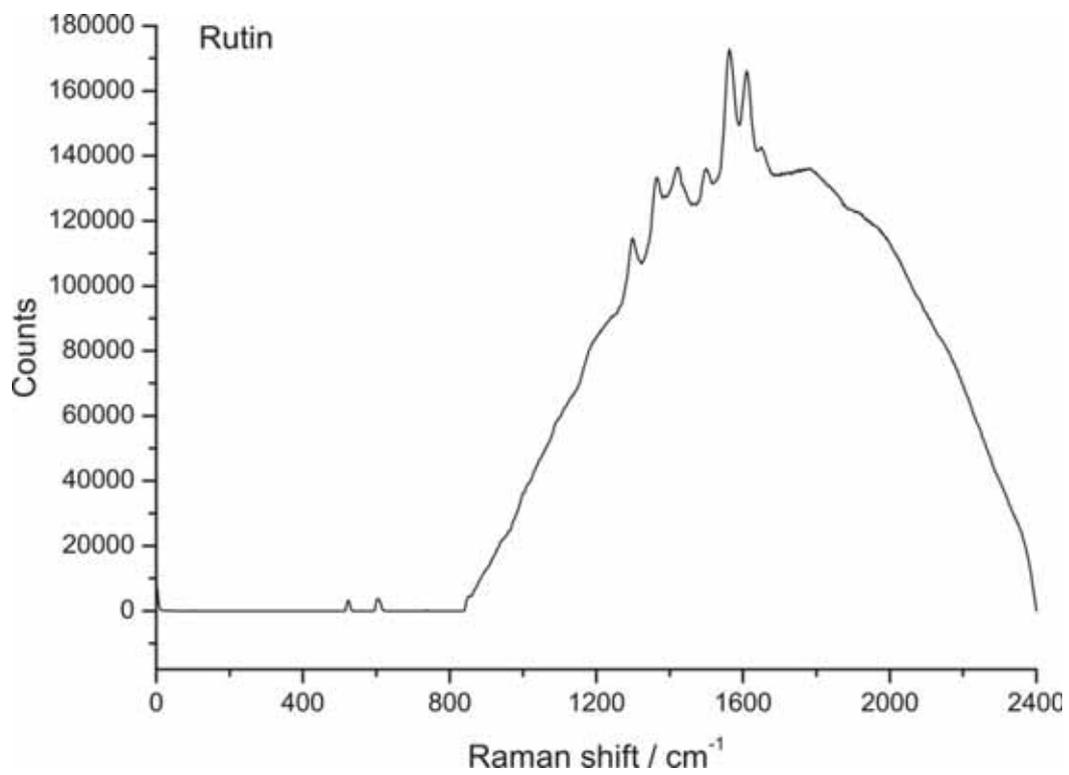


Abbildung 4-13: Raman-Spektrum von Rutin.

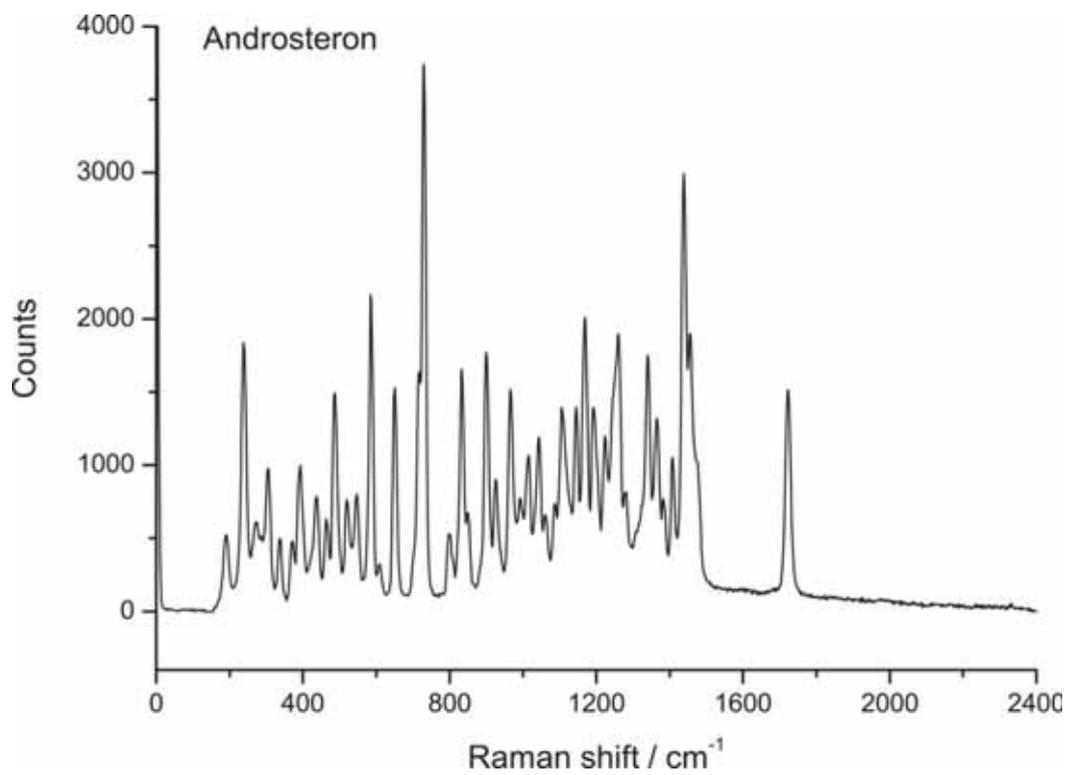


Abbildung 4-14: Raman-Spektrum von Androsteron.

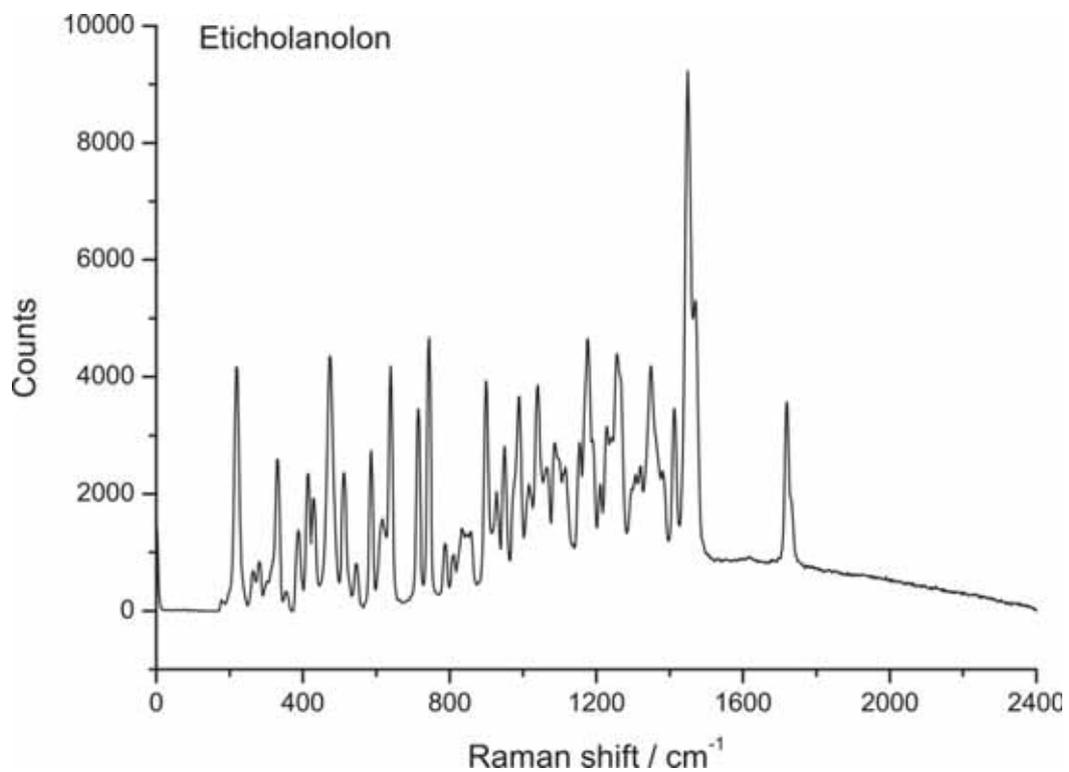


Abbildung 4-15: Raman-Spektrum von Eticholanolon.

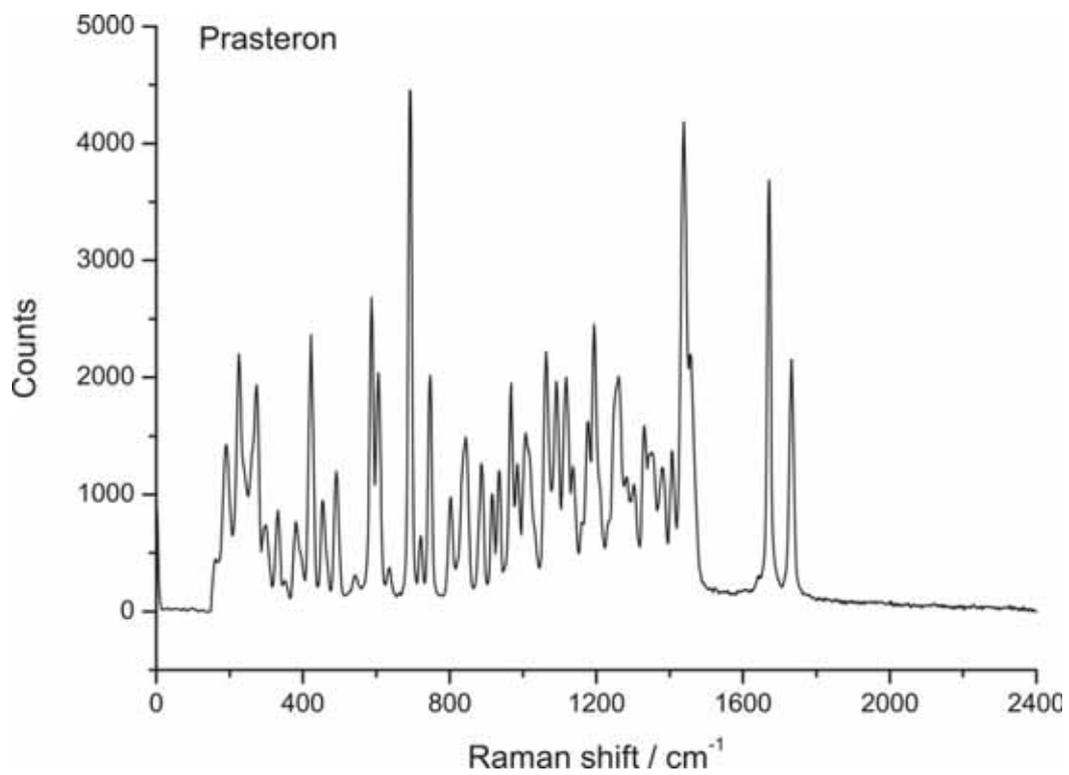


Abbildung 4-16: Raman-Spektrum von Prasteron.

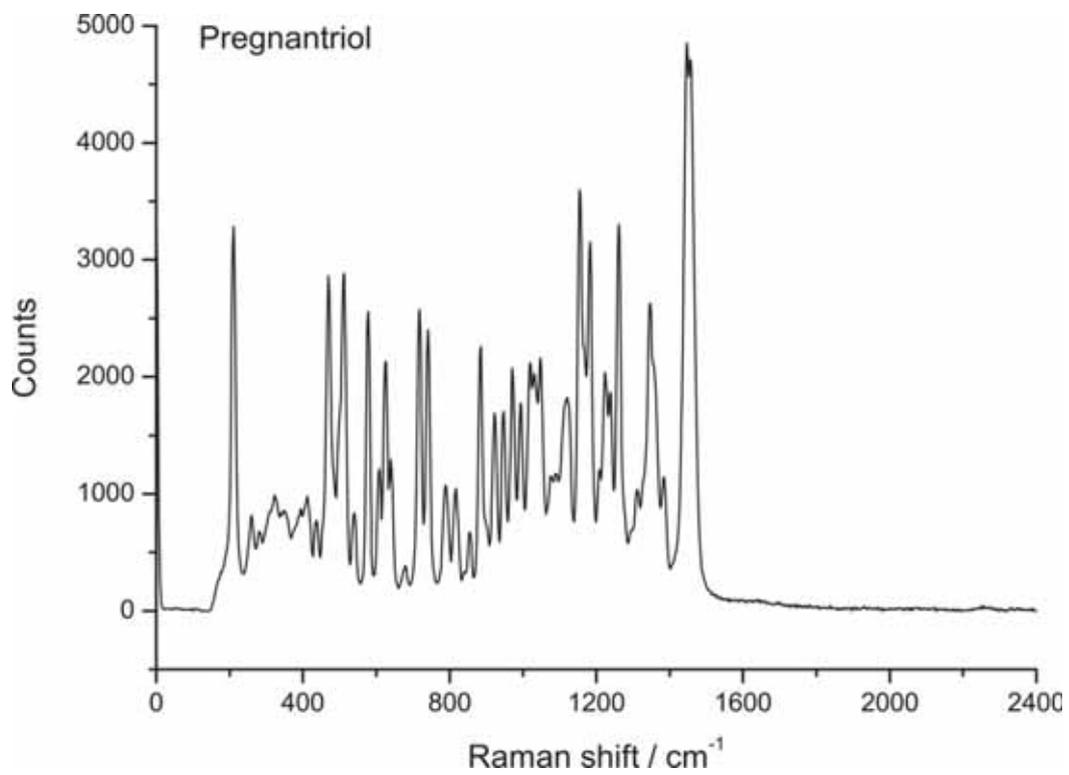


Abbildung 4-17: Raman-Spektrum von Pregnantriol.

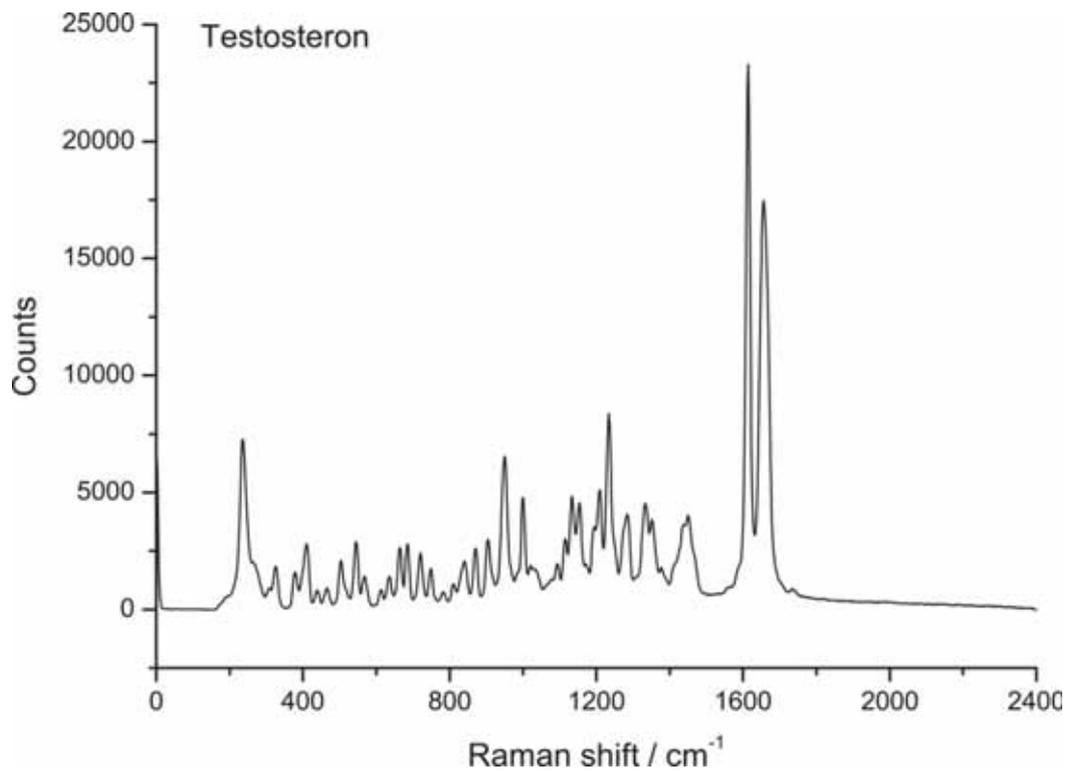


Abbildung 4-18: Raman-Spektrum von Testosteron.

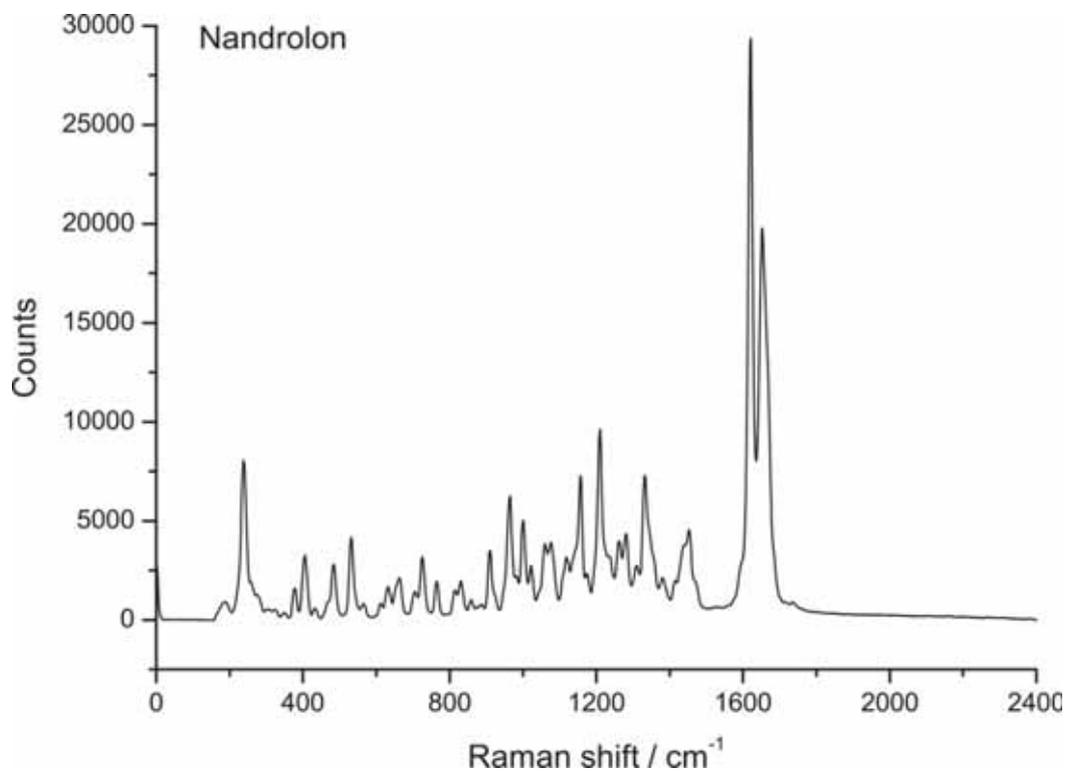


Abbildung 4-19: Raman-Spektrum von Nandrolon.

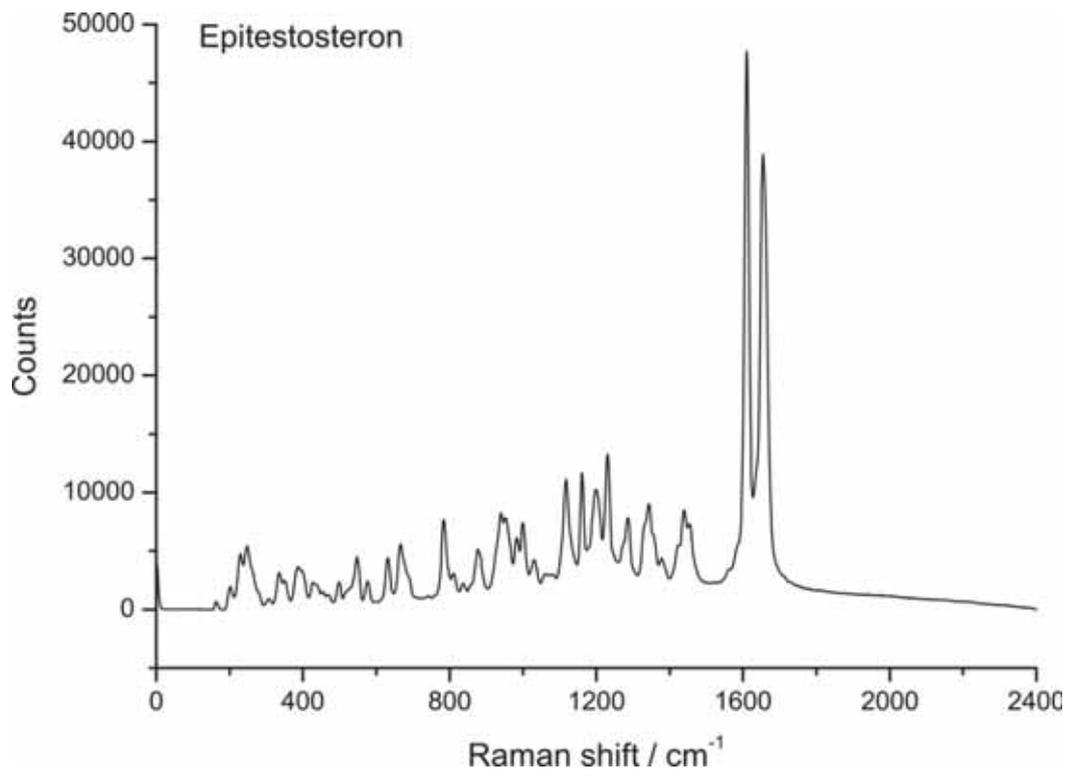


Abbildung 4-20: Raman-Spektrum von Epitestosteron.

4.3 Untersuchung weiterer stationärer Phasen

4.3.1 Interchim Silice Upti-prep Strategy C₁₈-2

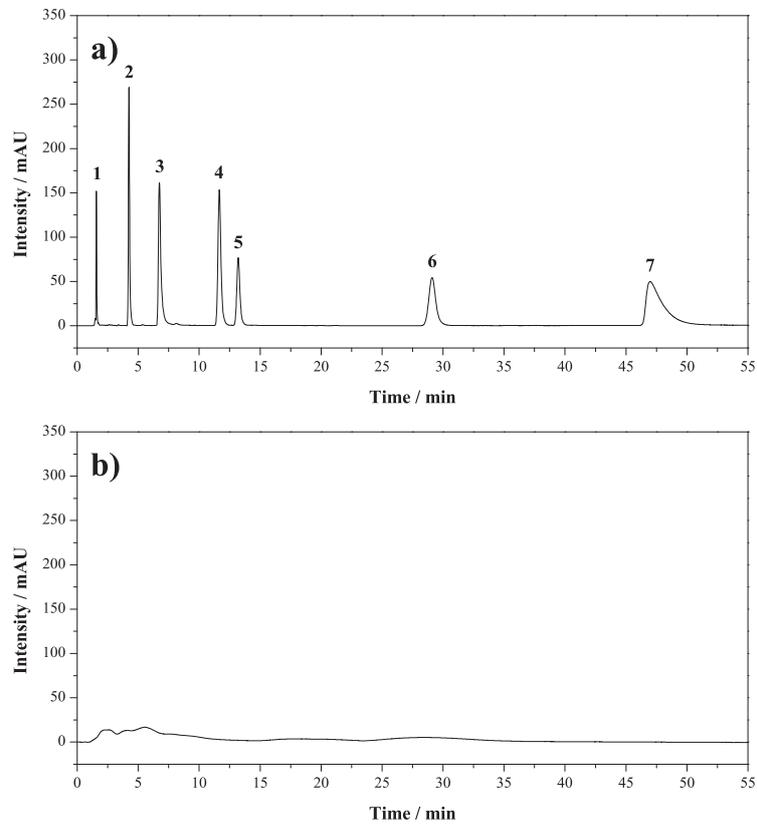


Abbildung 4-21: Testchromatogramme der Interchim Silice Upti-Prep Strategy C₁₈-2. a) fabrikneue Phase, b) nach der 4. Heizphase (neutral). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Interchim Silice Upti-Prep Strategy C₁₈-2 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].

4.3.2 Interchim Silice Upti-prep Strategy C₁₈-3

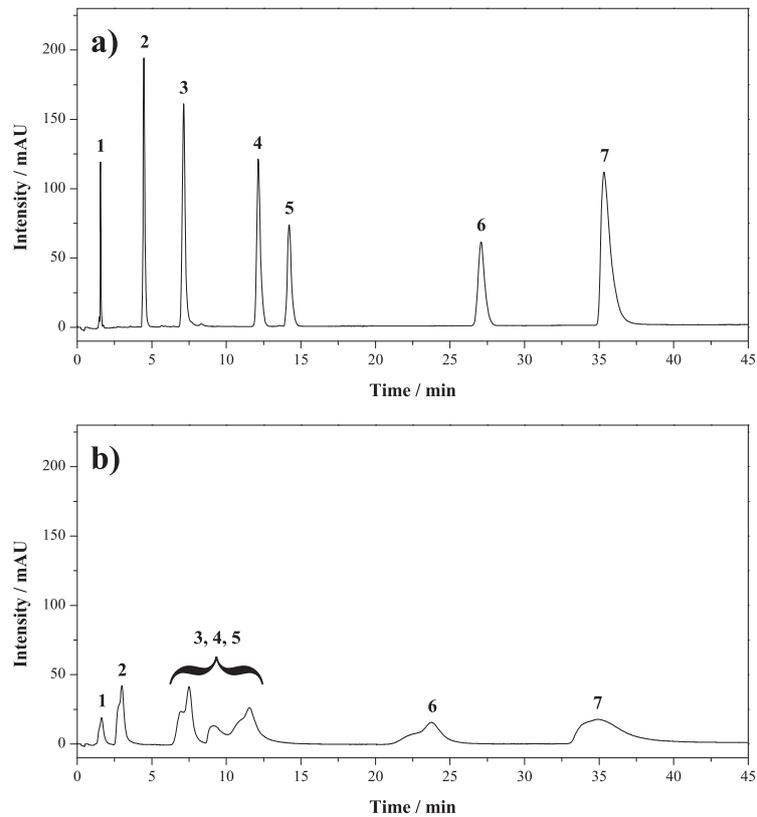


Abbildung 4-22: Testchromatogramme der Interchim Silice Upti-Prep Strategy C₁₈-3. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Interchim Silice Upti-Prep Strategy C₁₈-3 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].

4.3.3 Supelco Ascentis Express C₁₈

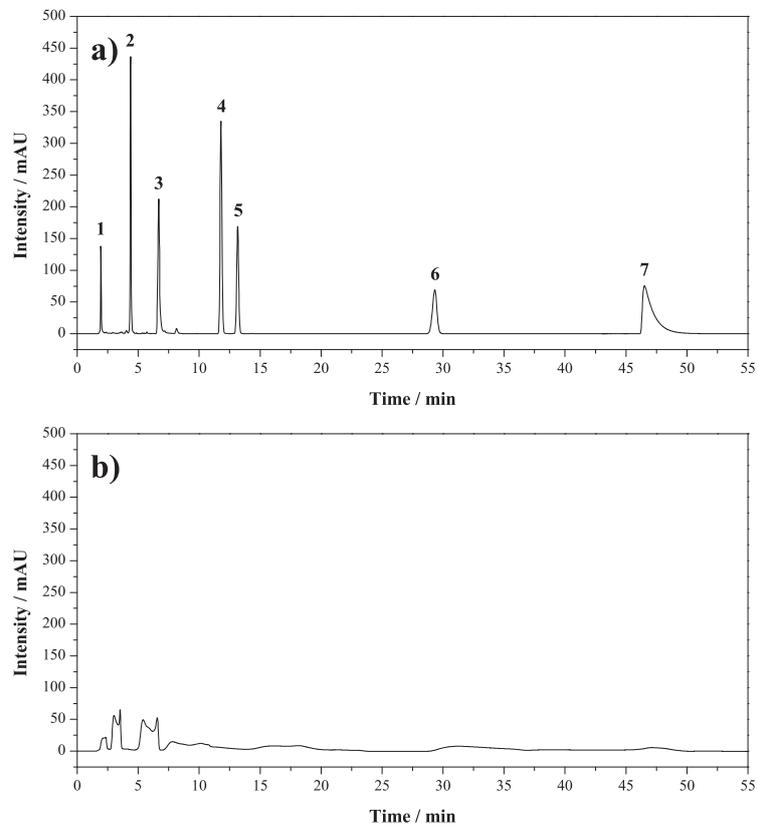


Abbildung 4-23: Testchromatogramme der Supelco Ascentis Express C₁₈. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Supelco Ascentis Express C₁₈ (150 mm × 4,6 mm; 2,7 μm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 0,7 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyacetone, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].

4.3.4 AkzoNobel Kromasil Eternity-2.5-C₁₈

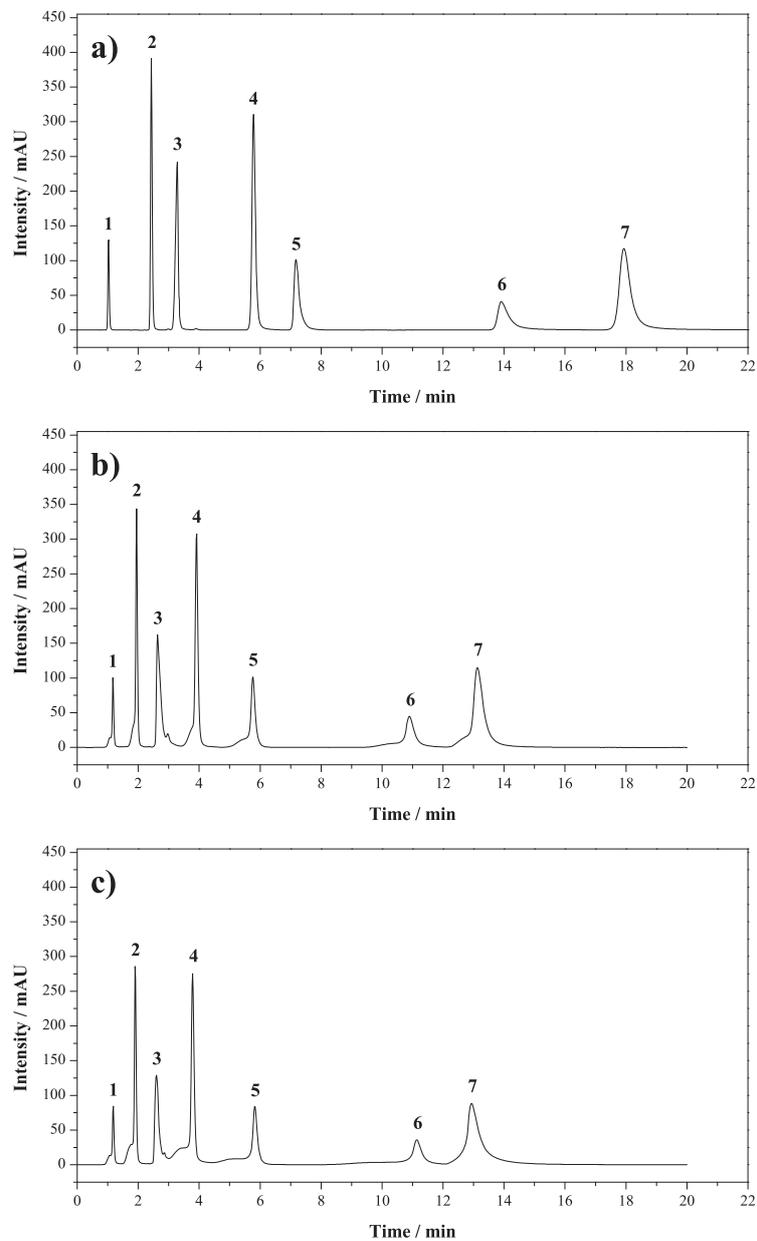


Abbildung 4-24: Testchromatogramme der AkzoNobel Kromasil Eternity-2.5-C₁₈. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 6. Heizphase (sauer). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: AkzoNobel Kromasil Eternity-2.5-C₁₈ (150 mm × 4,6 mm; 2,5 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) 20 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH 7/Methanol; Flussrate: 1,0 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Dihydroxyaceton, 2) Propylparaben, 3) Propranolol, 4) Dipropylphthalat, 5) Naphthalin, 6) Acenaphthen, 7) Amitriptylin [21].

4.3.5 Showa Denko – Shodex ET-RP1 4D

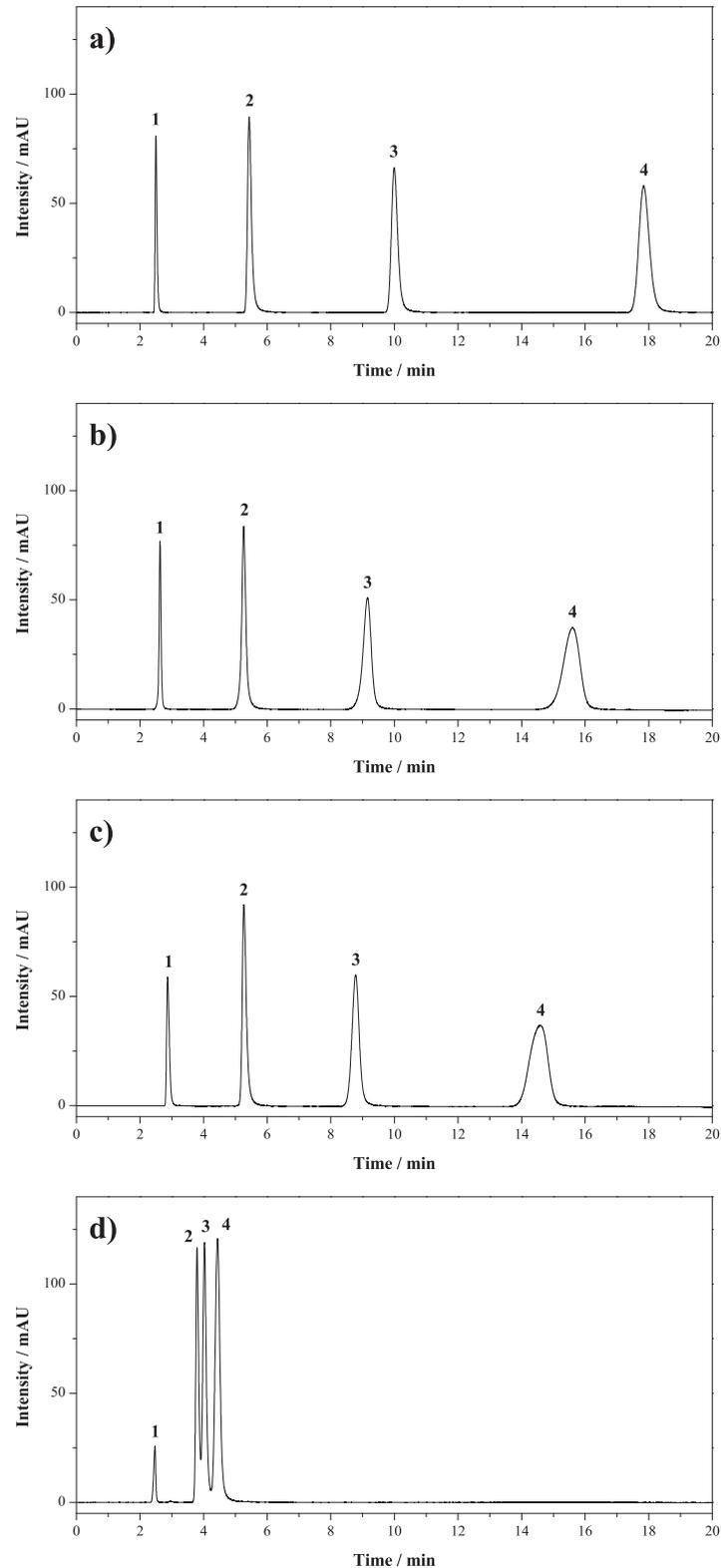


Abbildung 4-25: Testchromatogramme der Showa Denko Shodex ET-RP1 4D. a) fabrikneue Phase, b) nach der 5. Heizphase (neutral), c) nach der 10. Heizphase (sauer), d) nach der 15. Heizphase (basisch). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Showa Denko Shodex ET-RP1 4D (150 mm × 4,6 mm; 4 µm); mobile Phase: 35/65 (v/v) Wasser/Acetonitril; Flussrate: 0,6 mL min⁻¹; Temperatur: 30°C; Detektion: UV bei 254 nm. Analyten: 1) Uracil, 2) Methylbenzoat, 3) Butylbenzoat, 4) Hexylbenzoat [21].

4.4 Reaktion der Presse und der analytischen Community auf die Anwendung zur Koffeinauthentizität

Im Folgenden sind die Pressemitteilung der American Chemical Society, der in Chemical and Engineering News sowie der in der Welt online erschienenene Artikel angehängt.

FOR IMMEDIATE RELEASE

ACS News Service Weekly PressPac: March 7, 2012

That caffeine in your drink – is it really “natural?”

“Caffeine in Your Drink: Natural or Synthetic?”
Analytical Chemistry

That caffeine in your tea, energy drink or other beverage — is it really natural? Scientists are reporting successful use for the first time of a simpler and faster method for answering that question. Their report appears in the American Chemical Society (ACS) journal *Analytical Chemistry*.

Maik A. Jochmann, Ph.D., and colleagues point to the growing consumer preference for foods and beverages that contain only natural ingredients. Coffee, tea, colas, energy drinks and other caffeine-containing drinks are the most popular beverages in the world. Food regulatory agencies require that caffeine be listed on package labels, but do not require an indication of whether the caffeine is from natural or synthetic sources. The scientists set out to develop a faster, simpler method for categorizing caffeine's origins.



Credit: iStock

In the study, they describe use of a technique called stable-isotope analysis to differentiate between natural and synthetic caffeine. The test makes use of differences in the kinds of carbon isotopes – slight variations of the same element – found in caffeine made by plants and caffeine made in labs with petroleum-derived molecular building blocks. Their analysis, which takes as little as 15 minutes, found four products that contained synthetic caffeine, despite a “natural” label.

The authors acknowledge funding from the [German Federal Ministry of Economics and Technology](#) and the [German Research Foundation](#).

Contact

Science Inquiries: [Michael Woods](#), Editor, 202-872-6293
General Inquiries: [Michael Bernstein](#), 202-872-6042

Home > Caffeine Source: A Bean, A Leaf, Or A Lab

February 29, 2012 | Latest News

Caffeine Source: A Bean, A Leaf, Or A Lab

Food Analysis: A new method quickly distinguishes between natural and synthetic caffeine

By Rajendrani Mukhopadhyay



Department: Science & Technology

Keywords: caffeine, carbon isotope ratio, mass spectrometry



Caffeine Control

A new method makes it easy to pin down whether caffeine in drinks is natural or synthetic.

Credit: Shutterstock

Is your caffeinated buzz from a natural or artificial source? Researchers in Germany have now developed an easy way to determine **whether drinks contain natural or synthetic caffeine** (*Anal. Chem.*, DOI: [10.1021/ac203197d](https://doi.org/10.1021/ac203197d)).

Under **Food & Drug Administration regulations**, when manufacturers add caffeine to drinks, such as sodas or energy drinks, they must mention it on the label. But labels for tea, coffee, and other naturally caffeinated drinks don't need to list caffeine. Because synthetic caffeine is less expensive than natural caffeine, unscrupulous manufacturers may slip in the synthetic version and pass off the drink as a naturally caffeinated beverage, ignoring the labeling requirement.

Existing methods to discriminate between natural and synthetic caffeine require extracting the caffeine from the drink, which makes them time consuming and laborious, explains analytical chemist **Maik A. Jochmann** at the **University of Duisburg-Essen** in Germany. To test beverages directly and avoid extraction, Jochmann and colleagues developed a method with high-temperature liquid chromatography and isotope ratio mass spectrometry. By analyzing 42 naturally caffeinated and 20 artificially caffeinated drinks, the investigators showed that the carbon isotope ratios could distinguish between the two types of caffeine. Carbon isotope ratios depend on the origin of the material, explains Jochmann: plants versus petroleum-based laboratory chemicals.

Jochmann and colleagues next analyzed 38 drinks purchased at grocery stores. They found four—an instant coffee, two iced teas, and one maté, which is a South American herb that can be brewed like tea—that explicitly claimed to contain natural caffeine but contained synthetic. Jochmann declines to reveal the identity of the mislabeled brands but says his lab's approach "has the potential to become a routine method for authenticity control of caffeine-containing drinks."

Chemical & Engineering News
ISSN 0009-2347
Copyright © 2012 American Chemical Society

Ist das Koffein echt?

Eine Analyse offenbart, ob der Wachmacher in der Cola oder im Energydrink synthetisch ist *Von Wolfgang W. Merkel*

DIE WELT

Dieser Artikel erschien in der Zeitung DIE WELT.



Testen Sie DIE WELT jetzt 14 Tage kostenfrei.

[Hier bestellen](#)

Kaffee, Tee, Energydrinks und Cola-Limonaden gehören zu den beliebtesten Getränken weltweit. Der unbedarfte Konsument nimmt an, dass der darin enthaltene Wachmacher, das psychoaktiv wirkende Stimulans Koffein, natürlichen Ursprungs ist - also etwa aus dem Kaffeebaum oder aus der Guaraná-Liane stammt. Doch das muss nicht so sein.

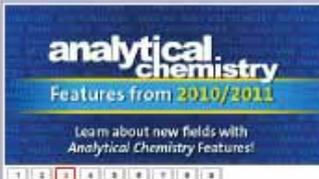
Oft ist es für die Hersteller günstiger, statt des Naturproduktes eine stofflich identische, aber künstlich hergestellte Substanz zu nutzen. Doch Natur steht bei Verbrauchern hoch im Kurs. Deshalb gehört es zum Marketing mancher Hersteller, naturbelassen zu produzieren, um "naturbelassen" auf die Verpackung zu schreiben. Bislang war es schwierig, Schummler zu enttarnen.

Doch mithilfe einer Isotopenanalyse gelang es nun Wissenschaftlern um Maik Jochmann von der Universität Duisburg-Essen, nachzuweisen, ob Koffein in einem Getränk aus einer Pflanze stammt oder aus dem chemischen Reaktor. Im US-Fachmagazin "Analytical Chemistry" beschreiben sie, wie das möglich ist. Grundlage ist die Verteilung der verschiedenen Isotope von Kohlenstoffatomen in den Getränke-Ingredienzien. Isotope sind unterschiedliche Varianten von Atomen. Sie unterscheiden sich durch die Zahl der Neutronen im Atomkern, im chemischen Verhalten sind sie aber fast identisch.

Fast - denn Pflanzen bauen bei der Photosynthese Kohlenstoffatome so in ihren Organismus ein, dass sie eine etwas andere Isotopenzusammensetzung aufweisen als Substanzen aus erdölbasierten Rohstoffen. Das nutzt die neue Methode aus, und sie schafft das sogar mit dem kompletten Getränk. Vergleichbare Isotopenanalysen waren bisher teuer und zeitaufwendig, weil man die Kohlenstoffverbindungen in ihnen erst aufwendig trennen musste. Doch jetzt ist ein schneller und kostengünstiger Koffeintest möglich.

Bleibt die Frage: Natürlich oder aus der Chemiefabrik - macht das in Bezug auf Qualität oder Reinheit überhaupt einen Unterschied? Meist nicht, denn künstlich bedeutet nicht unbedingt schlechter. Der Konsument profitiert in der Regel vom künstlichen Produkt, weil es bei gleicher Qualität günstiger zu haben ist als das aufwendig aus der Natur gewonnene Original.

Zudem war der Artikel zeitweilig die am meisten gelesene Originalarbeit des international renommiertesten analytisch-chemischen Journals „Analytical Chemistry“ (Impact Factor 2010: 5,874)



analytical chemistry
Features from 2010/2011

Learn about new fields with Analytical Chemistry Features!

2010 Articles Published **1,877**

Editor: [Jonathan V. Sweedler](#)

- Submit
- About the Journal
- Author Center
- Recommened This Journal

ACS Divisions

- Analytical Chemistry

Browse By Issue

Select Decade

Select Volume

Select Issue

[List of Issues](#)

Most Read Articles New showing 1-5 [View All](#)

Most Read articles are updated on a monthly basis and available in 1 month and 12 month lists. Below is a Top 5 excerpt from the 1 month list.

Select All For Selected Content:

Difficult writing of an award research paper Abstract

Boyan Horvath

2011, 83 (1), pp 633-633

Publication Date (Web): January 12, 2011 (Editorial)

DOI: 10.1021/ac200199

[Full Text HTML](#)
[High-Res PDF \[596K\]](#)
[PDF w/ Links \[559K\]](#)

[Subscriber Access](#)

Caffeine in Your Drink: Natural or Synthetic? Abstract | Supporting Info

Lijun Zhang, Dorotea M. Kujawinski, Eugen Federherber, Timothee C. Schmidt, and Mark A. Jochims

2011, 83 (1), pp 1805-1810

Publication Date (Web): February 17, 2012 (Article)

DOI: 10.1021/ac201978

[Section: Food and Feed Chemistry](#)

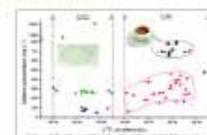


Figure 1 of 6

3D Imaging by Mass Spectrometry: A New Frontier Abstract

Tim H. Seeley and Richard M. Caprioli

2011, 83 (1), pp 2105-2110

Publication Date (Web): January 24, 2012 (Feature)

DOI: 10.1021/ac201977

[Section: Biochemical Methods](#)



Figure 1 of 7

analytical SCENE

Trapping Targets Of Methylating Enzymes
April 8, 2012

Protein Action Capture
April 8, 2012

Oxygen Generics
April 8, 2012

[View SCENE Articles](#)

CHEM Latest News

Check out Analytical Chemistry on Facebook 

Recent Reviews, Perspectives, and Features

- Perspectives of Comprehensive Phosphoproteome Analysis Using Shotgun Strategy
- In Situ Photooxidation Analysis: Diverse's Plurality of Roles at the Section
- Neurotoxicity (Spatial) Maps in Neuroanalysis: Crossing the Valley of Death
- Electroanalytical Sensitive Trapping on Single Cell Communication
- Structural Mass Spectrometry of Proteins Using Hydroxy Radicals Based Protein Footprinting

Virtual Issues

- Novel Optical Probe for Advanced Chemical Imaging Virtual Issue - Now Available Online!
- 2010 (2011) Features
- Microfluidics
- New Virtual Issues

Special Issues

- Atmospheric Analysis in Relation to Climate Change
- Fundamental and Applied Reviews in Analytical Chemistry
- New Special Issue

155

5 Literaturverzeichnis

- [1] T.C. Schmidt, L. Zwank, M. Elsner, M. Berg, R.U. Meckenstock, S.B. Haderlein, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 283.
- [2] Z. Muccio, G.P. Jackson, *Analyst* 134 (2009) 213.
- [3] G. Vanhoenacker, A.D. Pereira, T. Kotsuka, D. Cabooter, G. Desmet, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3217.
- [4] Semrock Inc. <http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=LPD01-532RU-25>, 31.05.2012
- [5] P. Vinas, C. Lopez-Erroz, J.J. Marin-Hernandez, M. Hernandez-Cordoba, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 85.
- [6] T.B. Coplen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 2538.
- [7] T.B. Coplen, in D. Beauchemin, D. Matthews (Editors), *Elemental and Isotope Ratio Mass Spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, 2010, p. 802.
- [8] T.B. Coplen, W.A. Brand, M. Gehre, M. Gröning, H.A.J. Meijer, B. Toman, R.M. Verkouteren, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2439.
- [9] R.A. Werner, W.A. Brand, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 501.
- [10] M.A. Jochmann, D. Steinmann, S. Manuel, T.C. Schmidt, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 10489.
- [11] Polymicro Technologies
http://www.polymicro.com/products/capillarytubing/products_capillarytubing_win.htm, 31.05.2012
- [12] T.D.N. Hong, M. Jouan, N.Q. Dao, M. Bouraly, F. Mantsi, *J. Chromatogr. A* 743 (1996) 323.
- [13] R.J. Dijkstra, A.N. Bader, G.P. Hoornweg, U.A.T. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4575.
- [14] B.J. Marquardt, P.G. Vahey, R.E. Synovec, L.W. Burgess, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4808.
- [15] R.J. Dijkstra, G.J. Slooten, A. Stortelder, J.B. Buijs, F. Ariese, U.A.T. Brinkman, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 25.
- [16] S. Tanikkul, J. Jakmunee, M. Rayanakorn, K. Grudpan, B.J. Marquardt, G.M. Gross, B.J. Prazen, L.W. Burgess, G.D. Christian, R.E. Synovec, *Talanta* 59 (2003) 809.
- [17] R.J. Dijkstra, H.F.M. Boelens, J.A. Westerhuis, F. Ariese, U.A.T. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 129.
- [18] M.K. Yang, R.H. French, E.W. Tokarsky, *J. Micro/Nanolith. MEMS MOEMS* 7 (2008).
- [19] T. Teutenberg, K. Hollebekkers, S. Wiese, A. Boergers, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1262.
- [20] K.D. Wyndham, J.E. O'Gara, T.H. Walter, K.H. Glose, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla, P.C. Iraneta, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6781.
- [21] J. Haun, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *J. Chromatogr. A* (2012) Manuscript in preparation.
- [22] T. Teutenberg, J. Tuerk, M. Holzhauser, S. Giegold, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1101.
- [23] T. Teutenberg, J. Tuerk, M. Holzhauser, T.K. Kiffmeyer, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 197.
- [24] M. Krummen, A.W. Hilker, D. Juchelka, A. Duhr, H.J. Schlüter, R. Pesch, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2260.
- [25] A.I. Cabañero, J.L. Recio, M. Rupérez, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9719.
- [26] H. Schierbeek, T.C.W. Moerdijk-Poortvliet, C.H.P. van Den Akker, F.W.J. te Braake, H.T.S. Boschker, J.B. van Goudoever, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 3824.
- [27] J.P. Godin, J. Hau, L.B. Fay, G. Hopfgartner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2689.
- [28] J. McCullagh, J. Gaye-Siessegger, U. Focken, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1817.
- [29] J.S.O. McCullagh, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 483.

- [30] J.S.O. McCullagh, D. Juchelka, R.E.M. Hedges, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2761.
- [31] M. Raghavan, J.S.O. McCullagh, N. Lynnerup, R.E.M. Hedges, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 541.
- [32] J.P. Godin, G. Hopfgartner, L. Fay, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7144.
- [33] S. Shen, H. Lee, J. McCaffrey, N. Yee, C. Senanayake, N. Grinberg, J. Clark, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 29 (2006) 2823.
- [34] L. Zhang, D.M. Kujawinski, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 2971.
- [35] J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229.
- [36] M. Blessing, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 591.
- [37] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6898.
- [38] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2227.
- [39] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 1222 (2012) 71.
- [40] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, WILEY-Interscience, 1979.
- [41] C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1530.
- [42] S.D. Allmon, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5106.
- [43] M. Salo, H. Vuorela, J. Halmekoski, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 127.
- [44] P. Dugo, K. Buonasera, M.L. Crupi, F. Cacciola, G. Dugo, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1125.
- [45] S. Shen, H. Lee, J. McCaffrey, N. Yee, C. Senanayake, N. Grinberg, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 2823.
- [46] L.A. Al-Khateeb, R.M. Smith, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1255.
- [47] L. Al-Khateeb, R.M. Smith, *J. Chromatogr. A* 1201 (2008) 61.
- [48] R. Plumb, J.R. Mazzeo, E.S. Grumbach, P. Rainville, M. Jones, T. Wheat, U.D. Neue, B. Smith, K.A. Johnson, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1158.
- [49] P.K. Zarzycki, R. Smith, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 45.
- [50] T. Teutenberg, *Anal. Chim. Acta* 643 (2009) 1.
- [51] G. Vanhoenacker, P. Sandra, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1822.
- [52] S. Gerstenhöfer, Master Thesis, Fachbereich Chemie, Niederrhein University of Applied Sciences, Krefeld, 2008
- [53] J. Haun, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *J. Sep. Sci.*, doi:10.1002/jssc.201101092 (2012).
- [54] Y. Wang, C.T. Ho, *J. Agr. Food Chem.* 57 (2009) 8109.
- [55] G. Bank, *Nutraceuticals World* July/August (2005).
- [56] D.L. McKay, J.B. Blumberg, *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (2002) 1.
- [57] C.S. Yang, J.M. Landau, *J. Nutr.* 130 (2000) 2409.
- [58] A.A. Modi, J.J. Feld, Y. Park, D.E. Kleiner, J.E. Everhart, T.J. Liang, J.H. Hoofnagle, *Hepatology* 51 (2010) 201.
- [59] P. Nawrot, S. Jordan, J. Eastwood, J. Rotstein, A. Hugenholtz, M. Feeley, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 1.
- [60] C.J. Reissig, E.C. Strain, R.R. Griffiths, *Drug Alcohol Depend* 99 (2009) 1.
- [61] A.B. Allen, *J. Agric. Food Chem.* 9 (1961) 294.
- [62] O.J. Weinkauff, R.W. Radue, R.E. Keller, H.R. Crane, 9 (1961) 397.
- [63] A.M. Gioacchini, A. Roda, A. Cipolla, M. Parenti, M. Baraldini, 9 (1995) 1106.
- [64] E. Richling, C. Höhn, B. Weckerle, F. Heckel, P. Schreier, *Eur. Food Res. Technol.* 216 (2003) 544.
- [65] B. Weckerle, E. Richling, S. Heinrich, P. Schreier, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 886.
- [66] J. Dunbar, A.T. Wilson, *Anal. Chem.* 54 (1982) 590.
- [67] L.J. Zhang, D.M. Kujawinski, E. Federherr, T.C. Schmidt, M.A. Jochmann, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2805.
- [68] F. Lestremau, A. de Villiers, F. Lynen, A. Cooper, R. Szucs, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 120.

- [69] M.A. Jochmann, M. Blessing, S.B. Haderlein, T.C. Schmidt, Rapid Commun. Mass Spectrom. 20 (2006) 3639.
- [70] International food information council foundation review www.ific.org, 14.12.2011
- [71] L. Pereira, S. Aspey, H. Ritchie, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1115.
- [72] S. Giegold, T. Teutenberg, J. Tuerk, T. Kiffmeyer, B. Wenclawiak, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3497.
- [73] D.M. Kujawinski, L. Zhang, T.C. Schmidt, M.A. Jochmann, eingereicht bei Analytical Chemistry (2012).
- [74] J.V. Hinshaw, LC GC Eur. 23 (2010) 362.
- [75] C.I. Smith, B.T. Fuller, K. Choy, M.P. Richards, Anal. Biochem. 390 (2009) 165.
- [76] S. Reinnicke, A. Bernstein, M. Elsner, Anal. Chem. 82 (2010) 2013.
- [77] T. Teutenberg, High-Temperature Liquid Chromatography - A User's Guide for Method Development, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010.
- [78] J.P. Godin, D. Breuille, C. Obled, I. Papet, H. Schierbeek, G. Hopfgartner, L.B. Fay, J. Mass Spectrom. 43 (2008) 1334.

6 Projektmitarbeiter und Autoren des Abschlussberichts

6.1 Projektmitarbeiter IAC Universität Duisburg-Essen

Dr. rer. nat. Maik A. Jochmann
Akademischer Rat am Lehrstuhl Prof. Schmidt

M.Sc. Dorothea M. Kujawinski
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

M.Sc. Lijun Zhang
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

B. Sc. Benjamin Wolbert
Wissenschaftliche Hilfskraft

M. Sc. Eugen Federherr
Wissenschaftliche Hilfskraft

6.2 Projektmitarbeiter Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.

Dr. rer. nat. Thorsten Teutenberg
Projektleiter

Dr. rer. nat. Steffen Wiese
Wissenschaftlicher Mitarbeiter

M.Sc. Jakob Haun
Wissenschaftlicher Mitarbeiter

B.Sc. Kamil Doktor
Mitarbeit während der Anfertigung der Bachelor Thesis, Hochschule Niederrhein, Krefeld

6.3 Projektmitarbeiter Universität Düsseldorf

Prof. Dr. Hans Bettermann

Leiter der Arbeitsgruppe für Flüssigphasen-Laserspektroskopie

Dipl.-Chem. Björn Fischer

Wissenschaftlicher Mitarbeiter