

Schlussbericht

zu dem IGF-Vorhaben

**Entwicklung und Evaluierung eines Gesamtkonzepts für den Einsatz eines
Flammenionisationsdetektors in der Flüssigchromatografie**

der Forschungsstelle(n)

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. und

Universität Duisburg-Essen, Institut für Chemie, Instrumentelle Analytische Chemie

Das IGF-Vorhaben 17113 N der Forschungsvereinigung Umwelttechnik wurde über die



im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Duisburg, 23. 6. 2014

Essen, 16. 6. 2014

Ort, Datum

Dr. Thorsten Teutenberg

Dr. Maik A. Jochmann

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

Two handwritten signatures in blue ink. The first signature is for Thorsten Teutenberg and the second is for Maik A. Jochmann. Both signatures are written over horizontal lines.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	12
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	16
1 EINLEITUNG	21
2 WISSENSCHAFTLICH TECHNISCHE UMSETZUNG	23
2.1 Auswahl geeigneter Modellsubstanzen	23
2.2 Erstellung eines Hydrophobizitätsindexes für die Hochtemperatur-HPLC	24
2.2.1 Anforderungen der Flammen-Ionisationsdetektion in der Flüssigkeitschromatografie	24
2.2.2 Anforderung und Voraussetzungen des Hydrophobizitätsindexes	24
2.2.3 Versuchsdesign	27
2.2.4 Auswahl einer unabhängigen tabellierten Größe für den Hydrophobizitätsindex	30
2.2.4.1 Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient	30
2.2.4.2 D-Wert	32
2.2.4.3 Vergleich der Eignung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und des D-Wertes für den Hydrophobizitätsindex.....	35
2.3 Alternative Vorgehensweise zur Abschätzung der Hydrophobizität	37
2.3.1 Verwendung von Retentionsmodellen zur Vorhersage wässriger Retentionsfaktoren	37
2.3.1.1 Anwendung einfacher linearer Retentionsmodelle (Linear Solvent Strength Relationship, LSS).....	38
2.3.1.2 Anwendung komplexer Retentionsmodelle	42
2.3.2 Ausblick	45
2.3.2.1 Polyparameter-Linear-Free-Energy Relationship	45
2.4 Entwicklung eines Interface für die LC-FID-Kopplung	47
2.4.1 Evaluierung und Optimierung des Interface	51
2.4.1.1 Ermittlung der Zerstäuber-/ FID-Betriebstemperatur.....	51
2.4.1.2 Bestimmung des optimalen Wasserstoffflusses.....	53
2.4.1.3 Bestimmung des optimalen Make-up Gasflusses	57
2.4.2 Optimierung und Evaluierung des entwickelten Interface für den Nano-Flussbereich	58
2.4.2.1 Vergleich der Nachweisempfindlichkeit bei Verwendung der Original-FID-Düse und dem entwickelten Interface.....	58
2.4.2.2 Optimierung der Betriebsparameter	60
2.5 Besondere Problemstellungen der Nano-HPLC-FID-Kopplung	62
2.5.1 Verstopfen der Fused-Silica Transferkapillare	62
2.5.1.1 Raster-Elektronen-Mikroskopie mit integrierter Elementaranalyse	63

2.5.1.2	Maßnahmen zur Reduktion der Auskristallisation von gelöstem Siliziumdioxid	65
2.5.2	Basislinienrauschen und Störpeaks (Spikes)	66
2.6	Anwendung der HPLC-FID Kopplung	68
2.6.1	Untersuchung des Säulenblutens.....	68
2.6.1.1	Phenomenex Synergi RP-C 18 und Knauer BlueOrchid RP-C 18.....	68
2.6.1.2	Thermo Hypercarb.....	69
2.6.1.3	Untersuchung des Säulenblutens bei der Nano-HPLC-FID Kopplung.....	70
2.6.2	Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittelpeaks	73
2.6.2.1	Kapillar-HPLC-Zerstäuber-FID-Kopplung.....	73
2.6.2.2	Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittelpeaks bei der Nano-HPLC-FID Kopplung	75
2.6.3	Untersuchungen zum Einfluss von Puffern und Additiven	77
2.6.3.1	Puffer und Additive bei der Kapillar-HPLC-Zerstäuber-FID-Kopplung.....	77
2.6.3.2	Puffer und Additive bei der Nano-HPLC-FID Kopplung	80
2.6.4	Untersuchung des Response für ausgewählte Modellsubstanzen	84
2.6.4.1	Klassifizierung der Modellsubstanzen	84
2.6.4.2	Untersuchung des Response volatiler Substanzen.....	85
2.6.4.3	Untersuchung des Response semi-volatiler Substanzen.....	88
2.6.4.4	Untersuchung des Response nicht-volatiler Substanzen.....	89
2.6.4.5	Vergleich des Response für alle Substanzklassen	90
2.6.5	Bewertung der Nachweisempfindlichkeit der LC-FID-Kopplung	91
2.6.5.1	Nachweisempfindlichkeit der Kapillar-HPLC-FID Kopplung.....	91
2.6.5.2	Nachweisempfindlichkeit der Nano-HPLC-FID-Kopplung.....	91
3	ZUSAMMENFASSENDE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	94
3.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrages.....	94
3.1.1	Kopplung zwischen HPLC und FID	94
3.1.2	Stationäre Phasen und Säulenhardware.....	95
3.1.2.1	Stationäre Phasen	95
3.1.2.2	Hardware	95
3.1.2.3	Monolithische Trennphasen	96
3.1.3	Mobile Phase	96
3.1.4	Nachweisstärke	97
3.1.5	Universelle Detektion und Response	97
3.2	Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der Ergebnisse – Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten	98
3.2.1	Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft.....	99
3.2.1.1	Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses	99
3.2.1.2	Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA ...	99

3.2.1.3	Wissenschaftliche Publikationen wie Dissertationen und Beiträge in Fachzeitschriften	99
3.2.1.4	Vorstellung der Ergebnisse durch Vorträge und Posterpräsentationen	100
3.2.1.5	Übernahme der Ergebnisse in die akademische Lehre oder berufliche Weiterbildung	100
3.2.1.6	Bau eines Demonstrators bzw. Funktionsmusters	100
3.2.1.7	Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen	101
4	LITERATUR	103
5	ANHANG.....	104
5.1	Hydrophobizitätsindices der ZirChrom-PS Trennsäule	104
5.2	Chromatografische Rohdaten für den Hydrophobizitätsindex	107
5.3	Herstellung von edelstahlbasierten Zerstäubernadeln.....	121
5.4	Weiterführende Informationen zur Optimierung der FID-Parameter für den Nano-Flussbereich.....	122
5.5	Untersuchung verschiedener Wasserarten.....	123
5.6	Weiterführende Informationen zur Optimierung der Nano-LC-FID Kopplung	124
5.7	Untersuchung des Response für ausgewählte Modellsubstanzen	127
5.7.1	Untersuchung des Response volatiler Modellsubstanzen	127
5.7.2	Untersuchung des Response semi-volatiler Modellsubstanzen.....	130
5.7.3	Untersuchung des Response nicht-volatiler Modellsubstanzen.....	131

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1: Beispieldarstellung des Hydrophobizitätsindexes mit einem linearen Zusammenhang zwischen Retention unterschiedlich polarer Komponenten und einer tabellierten Größe..... 26
- Abbildung 2-2: Auftragung des dekadischen Logarithmus der Retentionsfaktoren der Modellanalyten gegen den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Modellanalyten in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a) deionisiertes Wasser, pH 2,7, b) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: a) 100 °C, b) 90 °C. 31
- Abbildung 2-3: Auftragung des dekadischen Logarithmus der Retentionsfaktoren der Modellanalyten gegen den D-Wert der Modellanalyten in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a) deionisiertes Wasser, pH 2,7, b) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: a) 100 °C, b) 90 °C..... 34
- Abbildung 2-4: Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: a, b) 100 °C, c, d) 90 °C..... 35
- Abbildung 2-5: Auftragung des dekadischen Logarithmus der Retentionsfaktoren gegen den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure; Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; Temperatur: 100 °C. Punkte: Bisphenol A, ❶; Paraverin, ❷..... 36
- Abbildung 2-6: Darstellung des Logarithmus des Retentionsfaktors gegen den Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: A: deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Temperatur: 100 °C. 37

Abbildung 2-7:	Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine mobile Phase von 80/20(v/v) Wasser/Methanol. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von a) 9,8 % B min ⁻¹ und 3,26% B min ⁻¹ , b) 1,09 % B min ⁻¹ und 0,36% B min ⁻¹ ; Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,35 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 254 nm.....	40
Abbildung 2-8:	Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine wässrige mobile Phase. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von a) 9,8 % B min ⁻¹ und 3,26 % B min ⁻¹ , b) 1,09 % B min ⁻¹ und 0,36 % B min ⁻¹ ; Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,35 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 254 nm.....	41
Abbildung 2-9:	Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine a) mobile Phase bestehend aus 80/20 (v/v) Wasser/Methanol und b) wässrige mobile Phase. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von 9,8 % B min ⁻¹ , 3,26 % B min ⁻¹ , 1,63 % B min ⁻¹ , b) 1,09 % B min ⁻¹ und 0,36 % B min ⁻¹ ; Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,35 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 254 nm.....	43
Abbildung 2-10:	Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine wässrige mobile Phase. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von a) 9,8 % B min ⁻¹ , 3,26 % B min ⁻¹ , 1,63 % B min ⁻¹ und 1,09 % B min ⁻¹ ; b) 9,8 % B min ⁻¹ , 3,26 % B min ⁻¹ und 1,63 % B min ⁻¹ . Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,35 mL min ⁻¹ ; Detektion: UV bei 254 nm.	44
Abbildung 2-11:	Schematische Darstellung (links) und Bild des entwickelten Interfaces (rechts). a) Innere Transferkapillare, b) Düsen, c) Zerstäuberkorpus.....	48
Abbildung 2-12:	Prinzipieller Aufbau eines konventionellen FID, wie er in der Gaschromatografie eingesetzt wird (links), und dem für die LC-FID Kopplung modifizierten FID-Interface (rechts) – in Anlehnung an Referenz [19].	49

Abbildung 2-13:	a) Edestahlkapillare vor Polierung; b) frühes Stadium der Polierung 1; c) finale konische Spitze nach Polierung.	50
Abbildung 2-14:	Darstellung des Einflusses der FID-Zerstäubertemperatur auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis $c(\text{Koffein}) = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{Air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: Fließinjektionsanalyse; mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: $100 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$	51
Abbildung 2-15:	Visualisierung des Zerstäubernebels bzw. Thermospray a) mit Bildung von Tröpfchen, die im weiterem Verlauf auf den Detektor prallen und so Störsignale verursachen und b) ohne Tröpfchenbildung.	52
Abbildung 2-16:	Zunahme der Basislinienfluktuation und deren Auswirkung auf das Signal/Rausch-Verhältnis im Temperaturbereich von $275 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $350 \text{ }^\circ\text{C}$. LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Koffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$	53
Abbildung 2-17:	Einfluss des Wasserstoffflusses auf die Signalintensität. Dargestellt sind der durch einen Wasserstofffluss von 200 mL min^{-1} verursachte Anstieg der Basislinie von ca. 210 mV auf 410 mV , sowie die Injektionspeaks bei dem Schalten des Injektors und die Koffeinpeaks. LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Koffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$	55
Abbildung 2-18:	Einfluss des Wasserstoffflusses auf das Signal/Rausch-Verhältnis im Bereich von 50 mL min^{-1} bis 200 mL min^{-1} . LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Koffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$	56
Abbildung 2-19:	Einfluss von Make-up Gas auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Bereich von 0 mL min^{-1} bis 100 mL min^{-1} . LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Koffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$	57
Abbildung 2-20:	Versuchsaufbau der Nano-HPLC-FID-Kopplung.	59
Abbildung 2-21:	Foto einer verstopften Fused-Silica Kapillare ($75 \mu\text{m ID}$).	62
Abbildung 2-22:	Verstopfung einer Fused-Silica Kapillare ($75 \mu\text{m ID}$) unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung. Aufgrund der Länge der Verstopfung ist nur der Abschnitt dargestellt, der zum Ende der Kapillare zeigt. Dort, in Richtung der FID-Flamme, ist klar zu erkennen, dass die Verstopfung innerhalb der Kapillare endet (oben).	63

Abbildung 2-23:	REM-Aufnahmen der Verstopfung. Es handelt sich hierbei um die Aufnahme des Querschnitts der Kapillare. In den beiden oberen Bildern ist der Vergleich zwischen einer freien (a) und einer verstopften (b) Fused-Silica-Kapillare zu sehen. In den beiden unteren Bildern ist die Verstopfung bei 2000-facher (c) und 6000-facher (d) Vergrößerung wiedergegeben.....	64
Abbildung 2-24:	REM-EDX-Aufnahmen der Verstopfung bei 2000-facher Vergrößerung. Wieder ist der Querschnitt zu sehen, mit der Kapillare außen und der Verstopfung in der Mitte. a) ist Sauerstoff und b) Silizium.	65
Abbildung 2-25:	Aufzeichnung der verrauschten Basislinie des FID. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: 5 $\mu\text{L min}^{-1}$; Säule: keine; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min^{-1} H_2 , 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: 275 $^\circ\text{C}$	66
Abbildung 2-26:	Chromatogramm eines durch Spikes deformierten Peaks von Methanol. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: 5 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 0,05 Vol.-%ige Methanollösung; Säule: keine; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min^{-1} H_2 , 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: 275 $^\circ\text{C}$	67
Abbildung 2-27:	FID-Signal der Basislinie bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 40 bis 90 $^\circ\text{C}$. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min^{-1} mit 1/10 Split auf 0,1 mL min^{-1} ; Detektion: FID.....	69
Abbildung 2-28:	Aufzeichnung eines Langzeittests über 12 Stunden für eine Thermo Hypercarb-Säule. Aufgezeichnet wurde die Basislinie bei einer Temperatur von 100 $^\circ\text{C}$. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb (100 mm \times 2,1 mm; 5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 0,05 mL min^{-1} ; Detektion: FID.....	70
Abbildung 2-29:	Overlay von drei Chromatogrammen der Trennung von Theophyllin. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Agilent Zorbax SB-C18 (150 \times 0,3 mm, 3,5 μm) mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 10 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 350 nL; Analytkonzentration: 1 mg mL^{-1} ; Säulentemperatur: 60 $^\circ\text{C}$; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min^{-1} H_2 , 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: 275 $^\circ\text{C}$	71
Abbildung 2-30:	Vergleich der Chromatogramme der Elution von Methanol. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: 5 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 0,1 Vol.-%ige Methanollösung; Säule: (a) keine, (b) Monolithische Nano-HPLC-Säule (150 \times 0,1 mm); Temperatur: Raumtemperatur; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min^{-1} H_2 , 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: 275 $^\circ\text{C}$	72

- Abbildung 2-31: Einfluss des Lösungsmittelgehaltes auf das detektierte Signal. LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Methanol $C_{\text{Abs.}}(\text{C}) = 3$ bis 3000 ng ; mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min^{-1} Split: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \text{ }\mu\text{L}$ 73
- Abbildung 2-32: Analyse einer mit $0,001 \text{ Vol.}\%$ Methanol gespikten Koffeinlösung mit einer Thermo Hypercarb Säule. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min^{-1} ; Split $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $20 \text{ }\mu\text{L}$ 74
- Abbildung 2-33: Methanol-Signaltest ($t_{\text{R}} = 1,16 \text{ min}$) zur Untersuchung der Detektorsättigung. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: $5 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL ; Analytkonzentration: $10 \text{ Vol.}\%$ ige Methanollösung; Säule: keine; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$, $450 \text{ mL min}^{-1} \text{ Luft}$ (kein Makeup-Gas); Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$ 75
- Abbildung 2-34: Zerstäuberdüse vor (links) und nach (rechts) Verwendung eines $0,1$ molaren $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ Puffers. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$; $4 \text{ }\mu\text{m}$); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit $0,1 \text{ M NaH}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{HSO}_4$; Flussrate: 1 mL min^{-1} mit $1/20$ Split auf $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ 78
- Abbildung 2-35: Auftrennung eines Alkoholgemisches unter Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase (schwarz) eines $0,01$ molaren $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ Puffers (Blau). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$; $4 \text{ }\mu\text{m}$); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit $0,01 \text{ M NaH}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{HSO}_4$; Flussrate: 1 mL min^{-1} mit $1/20$ Split auf $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Detektion: FID. 79
- Abbildung 2-36: Vergleich der Chromatogramme der Alkoholtrennung von Methanol (1), Ethanol (2), Isopropanol (3) und iso-Butanol (4). Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: a) Wasser; b) Wasser mit $9,66 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HCl}$; Flussrate: $10 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 100 nL ; Analytkonzentration: $1 \text{ Vol.}\%$ ige Alkohollösung; Säule: Agilent Zorbax SB C-18 ($150 \times 0,3 \text{ mm}$, $3,5 \text{ }\mu\text{m}$); Temperatur: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$, $450 \text{ mL min}^{-1} \text{ Luft}$ (kein Makeup-Gas); Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$ 81
- Abbildung 2-37: Vergleich der Chromatogramme von Methanol. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser (durchgezogene Linie), Wasser mit $0,1 \%$ Ameisensäure (gestrichelte Linie); Flussrate: $2 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL ; Analytkonzentration: $1 \text{ Vol.}\%$ ige Methanollösung; Säule: VisionHT; Temperatur: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$, $450 \text{ mL min}^{-1} \text{ Luft}$; Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$ 82
- Abbildung 2-38: Auftrennung eines Alkoholgemisches mit Propanol, Butanol, Pentanol und Hexanol ($C_{\text{Abs}} = 0,1 \text{ }\mu\text{g C mL}^{-1}$ bis $12 \text{ }\mu\text{g C mL}^{-1}$). LC-Bedingungen: $20 \text{ }\mu\text{L}$ Probenschleife, Split: $1:20$ auf $50 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$; Mobile Phase: 100% Wasser; $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$ 85

Abbildung 2-39:	Strukturformeln für Koffein (links) und Cumarin (rechts).	90
Abbildung 2-40:	Chromatogramm der Elution von Methanol auf einer monolithischen Nano-HPLC-Trennsäule. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: $5 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 0,01 Vol.-% Methanol; Säule: Monolith; Temperatur: Raumtemperatur; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$; 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$	91
Abbildung 5-1:	Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom PS ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $3,0 \mu\text{m}$); Detektion: UV bei 254 nm ; Flussrate: $0,35 \text{ mL min}^{-1}$; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: $30 \text{ }^\circ\text{C}$	104
Abbildung 5-2:	Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom PS ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $3,0 \mu\text{m}$); Detektion: UV bei 254 nm ; Flussrate: $0,35 \text{ mL min}^{-1}$; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: $60 \text{ }^\circ\text{C}$	105
Abbildung 5-3:	Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom PS ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $3,0 \mu\text{m}$); Detektion: UV bei 254 nm ; Flussrate: $0,35 \text{ mL min}^{-1}$; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: $90 \text{ }^\circ\text{C}$	106
Abbildung 5-4:	Schematische Darstellung der Polierapparatur.	121
Abbildung 5-5:	Planarer (links) und versetzter (rechts) Einbau der Kapillare in die FID-Interface-Düse.	125
Abbildung 5-6:	Fließinjektionsanalyse von Koffein mit $20 \mu\text{L}$ Probenvolumen und $F_{\text{Wasser}} = 0,05 \mu\text{L min}^{-1}$, $T_{\text{FID}} = 275^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{Air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$. Die Kalibration ist für einen Konzentrationsbereich von $c(\text{C}_{\text{Abs}}) = 0,1 - 12 \mu\text{g L}^{-1}$ gemessen worden. Bestimmtheitsmaß (R^2), die Vertrauensbanden sind in rot dargestellt.	127
Abbildung 5-7:	Kalibration Propanol von $c(\text{C}_{\text{Abs}}) = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, LC-Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	127
Abbildung 5-8:	Kalibration Butanol von $c(\text{C}_{\text{Abs}}) = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, LC-Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	128

Abbildung 5-9:	Kalibration Pentanol von $c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	129
Abbildung 5-10:	Kalibration Hexanol von $c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase:100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	129
Abbildung 5-11:	Fließinjektionsanalyse des Duftstoffes Cumarin im Bereich $c(C_{\text{Abs}}) = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ LC Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	130
Abbildung 5-12:	Fließinjektionsanalyse von Cumarin im Bereich $c(C_{\text{Abs}}) = 14,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $429 \mu\text{g mL}^{-1}$ LC Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase:100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	130
Abbildung 5-13:	Fließinjektionsanalyse von Sulfamethoxazol im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase:100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	131
Abbildung 5-14:	Fließinjektionsanalyse von Hydrokortison im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase:100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	131
Abbildung 5-15:	Fließinjektionsanalyse von Thymin im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 15,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $238 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase:100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	132
Abbildung 5-16:	Fließinjektionsanalyse von Thymin im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $500 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase:100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Ausgewählte Substanzen.	23
Tabelle 2-2:	Übersicht der verwendeten stationären Phasen.....	27
Tabelle 2-3:	Übersicht der experimentellen Parameter und deren Variation zur Erhebung des Basisdatensatzes zur Erstellung des Hydrophobizitätsindexes.....	29
Tabelle 2-4:	Zusammenfassung verschiedener analytischer Parameter von Adenin und Chrysen.	33
Tabelle 2-5:	Übersicht der gefertigten Düsenöffnungen und der korrespondierenden Gasflussrate.....	47
Tabelle 2-6:	Abmessungen des Interfaces [19].	48
Tabelle 2-7:	Kopplungen von SFC und LC mit Flammen-Ionisationsdetektoren.....	54
Tabelle 2-8:	Experimentelle Parameter zur Ermittlung der Nachweisgrenze von Koffein mittels FID mit und ohne Interface.....	59
Tabelle 2-9:	Vergleich der Einbautiefen der Kapillaren in der FID-Düse diverser Arbeitsgruppen.	61
Tabelle 2-10:	Für die Untersuchung des Säulenblutens verwendete HPLC Säulen.	68
Tabelle 2-11:	Einfluss von anorganischen Puffern. Angegeben sind die verwendeten Pufferkonzentrationen, der pH-Bereich, das Basislinienrauschen sowie die Zeit bis zur Verstopfung des Zerstäubers. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb (100 mm x 2,1 mm; 4 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min ⁻¹ mit 1/20 Split auf 0,05 mL min ⁻¹ ; Detektion: FID.....	77
Tabelle 2-12:	Einfluss von gepufferten Laufmitteln auf die Sensitivität des FID, gezeigt an der Peakhöhe, den Peakflächen und dem ermittelten S/N-Verhältnis. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb (100 mm x 2,1 mm; 4 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,01 M NaH ₂ SO ₄ /Na ₂ HSO ₄ ; pH = 2,5; Flussrate: 1 mL min ⁻¹ mit 1/20 Split auf 0,05 mL min ⁻¹ ; Detektion: FID.....	79
Tabelle 2-13:	Einteilung der analysierten Substanzen nach Siedetemperatur in die Klassen volatil, semi-volatil und nicht-volatil.....	84
Tabelle 2-14:	Wiederholungsmessungen für Hexanol c(C _{Abs}) = 6 µg mL ⁻¹ . Angegeben sind die Peakfläche, Peakhöhe und Peakbreite mit Standardabweichung.....	86
Tabelle 2-15:	Statistische Parameter des aufgetrennten Alkohol-Mix. LC-Bedingungen: 20 µL Probenschleife; Split: 1:20 auf 50 µL min ⁻¹ ; mobile Phase: 100 % Wasser; T _{FID} = 275 °C; F _{H₂} = 50 mL min ⁻¹ , F _{Luft} = 450 mL min ⁻¹ ; Kalibrationsbereich: 0,1 bis 12 µg mL ⁻¹	86

Tabelle 2-16:	Relativer Kohlenstoff-Response der vier analysierten Alkohole mit Mittelwert und relativer Standardabweichung. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split: 1:20 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275\text{ }^{\circ}\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50\text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{Luft}} = 450\text{ mL min}^{-1}$	87
Tabelle 2-17:	Kalibrierfunktionen der analysierten Alkohole für den Konzentrationsbereich von $c(C_{\text{Abs}}) = 0,1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split: 1:20 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$; mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275\text{ }^{\circ}\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50\text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{air}} = 450\text{ mL min}^{-1}$	87
Tabelle 2-18:	Statistische Parameter der mittels Fließinjektionsanalyse untersuchten Substanzen Cumarin und Uracil. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split: 1:10 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$; mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275\text{ }^{\circ}\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50\text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{Luft}} = 450\text{ mL min}^{-1}$	88
Tabelle 2-19:	Statistische Parameter der mittels Fließinjektionsanalyse untersuchten Modellsubstanzen. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split 1:20 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$; $T_{\text{FID}} = 275\text{ }^{\circ}\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50\text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450\text{ mL min}^{-1}$; mobile Phase: 100 % Wasser; Konzentrationsbereich: $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$	89
Tabelle 2-20:	Relativer Response in mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$ für verschiedene Analyten.	90
Tabelle 2-21:	Vergleich der entwickelten LC-FID-Kopplung mit in der Literatur beschriebenen Ansätzen auf Basis aliphatischer Alkohole.	93
Tabelle 3-1:	Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.	101
Tabelle 5-1:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C8 (50 \times 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 100 $^{\circ}\text{C}$	107
Tabelle 5-2:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 \times 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Methanol mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 90 $^{\circ}\text{C}$	108
Tabelle 5-3:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 \times 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 60 $^{\circ}\text{C}$	109

Tabelle 5-4:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 90 °C. 110
Tabelle 5-5:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 120 °C..... 111
Tabelle 5-6:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L ⁻¹ Ammoniumacetat pH 9, B) Methanol mit 20 mmol L ⁻¹ Ammoniumacetat, pH 9. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 60 °C. 112
Tabelle 5-7:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L ⁻¹ Ammoniumacetat pH 9, B) Methanol mit 20 mmol L ⁻¹ Ammoniumacetat, pH 9,0. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 90 °C. 113
Tabelle 5-8:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C ₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L ⁻¹ Ammoniumacetat pH 9,0, B) Methanol mit 20 mmol L ⁻¹ Ammoniumacetat, pH 9. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 120 °C. 114
Tabelle 5-9:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 30 °C. 115
Tabelle 5-10:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 60 °C. 116
Tabelle 5-11:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 90 °C. 117

Tabelle 5-12:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Acetonitril mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 30 °C.	118
Tabelle 5-13:	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Acetonitril mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 60 °C.	119
Tabelle 5-14	Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Acetonitril mit 20 mmol L^{-1} Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 90 °C.	120
Tabelle 5-15:	Zusammenhang zwischen Ausgehen und „Ploppen“ der FID-Flamme bei unterschiedlichen Betriebsparametern.	122
Tabelle 5-16:	pH-Werte der unterschiedlichen Reinstwässer.	123
Tabelle 5-17:	Zusammenhang zwischen Ausgehen und „Ploppen“ der FID-Flamme bei unterschiedlichen Betriebsparametern.	124
Tabelle 5-18:	Vergleich der Einbautiefen der Kapillaren in der FID-Düse diverser Arbeitsgruppen.	126

Abkürzungsverzeichnis

Griechische Formelzeichen

ϑ	kinetische Viskosität
φ	Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase
Σ	Summe
δ -Therm	Erweiterung des Modells

Lateinische Formelzeichen

A	Strömungsquerschnitt
A	Azidität der Wasserstoffbrücken
B	Basizität der Wasserstoffbrücken
c	Regressionskonstante
$c(x)_{\text{Oktanol}}$	Konzentration Substanz x in Oktanol
$c(x)_{\text{Wasser}}$	Konzentration Substanz x in Wasser
c_1, c_2, c_3	anzupassende Modellparameter
D_h	hydraulischer Durchmesser
E	Exzess-Molrefraktion
e, s, a, b, v	Säulenparameter
K	Verteilungskoeffizient
k	Retentionsfaktor
K_{OW}	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
k_w	Retentionsfaktor des Analyten bei einer wässrigen mobilen Phase
$\log D$	Dekadischer Logarithmus des D-Wertes
$\log K_{\text{OW}}$	Dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
pK_a	Englische Schreibweise von pK_s
pK_s	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstanten
Re	Reynoldszahl
Re_{krit}	kritische Reynoldszahl

S	Dipolaritäts-Polaritätsparameter
S	Stoffspezifische Konstante
t_r	Retentionszeit
U	Umfang des Strömungsquerschnitts
V	Molekülvolumen nach McGowan
v_m	mittlere Strömungsgeschwindigkeit

Abkürzungen

(v/v)	Zusammensetzung der mobilen Phase in Volumenprozent angegeben
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
bzw.	beziehungsweise
C ₁ – C ₅ Alkohole	C ₁ : Alkohol mit 1 C-Atom – Methanol C ₂ : Alkohol mit 2 C-Atomen – Ethanol C ₃ : Alkohol mit 3 C-Atomen – Propanol C ₄ : Alkohol mit 4 C-Atomen – Butanol C ₅ : Alkohol mit 5 C-Atomen – Pentanol
C ₁₈	Octadecyl
C ₄	Butyl
C ₈	Octyl
Ca	Calcium
ca.	circa
C-Atom	Kohlenstoffatom
CFD	Computational Fluid Dynamics (Numerische Strömungsmechanik)
cm	Zentimeter
CO	Kohlen(stoff)monoxid
CO ₂	Kohlen(stoff)dioxid
d. h.	das heißt

e. V.	eingetragener Verein
ECN	Effective Carbon Number (Effektive Kohlenstoff(an)zahl)
EDX	Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)
et al.	et alii (et aliae; et alia)
etc.	et cetera
FA	Formic Acid (Ameisensäure)
FIA	Fließinjektionsanalyse
FID	Flammen-Ionisationsdetektor
FS-Kapillare	Fused-Silica-Kapillare
g	Gramm
GC	Gaschromatografie
Gl.	Gleichung
h	hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HCN	Cyanwasserstoff
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)
HT	Hochtemperatur
ICP	inductively coupled plasma (induktiv gekoppeltes Plasma)
i. d. R.	in der Regel
ID	Innendurchmesser
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik
K	Kelvin
k. A.	keine Angabe
L	Liter
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatografie - hier auch: flüssigchromatografisches Trennsystem)
ln	Natürlicher Logarithmus
LSS	Linear Solvent Strength
m	Meter

MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MR	Messreihe
MS	Massenspektrometrie
mV	Millivolt
mVs	Millivoltsekunden
ng	Nanogramm
nL	Nanoliter
nm	Nanometer
NWG	Nachweisgrenze
o. Ä.	oder Ähnliches
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PC	Personal Computer (hier: Auswerterechner)
PDB	Polydivinylbenzol
PE	Polyethylen
PECP	Pulse Electrochemical Polishing
PEEK	Polyetheretherketon
PGC	Porous Graphitic Carbon / Porous Graphitized Carbon (poröser grafitisierter Kohlenstoff)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Hydroniumionen
pp-LFERs	Polyparameter – Linear Free Energy Relationships
PS	Polystyrol
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SiO ₂	Siliziumdioxid
UVD	UV-Detektor
V	Volt
vgl.	vergleiche

Vol.-%

z. B.

z. T.

Volumenprozent

zum Beispiel

zum Teil

1 Einleitung

In allen Bereichen der Life Sciences, die die Medizin, Biotechnologie und Pharmakologie umfassen, spielt der Prozess des „Drug Discovery“, durch den neue Wirkstoffe gefunden oder speziell synthetisiert werden, eine zentrale Rolle. Dieser Prozess beinhaltet die Identifizierung geeigneter Moleküle, die Synthese, Charakterisierung, das Screening und die Durchführung verschiedener Assays, um die therapeutische Wirksamkeit zu belegen. Hat sich eine Komponente beim Durchlaufen der verschiedenen Prozeduren bewährt, schließen sich weitere Phasen an, bis das Medikament oder der Wirkstoff schließlich zugelassen werden.

Trotz großer technologischer Fortschritte sowie der Erweiterung des Verständnisses biologischer Systeme, ist der Prozess des Drug Discovery immer noch extrem zeitaufwändig und verursacht einen nicht unerheblichen Anteil der Kosten während der Wirkstoffentwicklung. Die entscheidende Frage, die innerhalb des Drug Discovery beantwortet werden muss ist, ob eine bestimmte Komponente weiter aufgereinigt werden muss oder ob die Anforderungen an die Reinheit für nachfolgende Verfahrensprozesse erfüllt sind. Wie im Projektantrag erläutert, gibt es derzeit kein analytisches Verfahren, das die Quantifizierung und umfassende bzw. universelle Detektion neu synthetisierter Verbindungen und deren Verunreinigungen ohne Referenzstandards erlaubt. Es wird geschätzt, dass die Kosten innerhalb des Drug Discovery bei Verfügbarkeit einer entsprechenden Technologie um ca. 10 bis 15 % gesenkt werden können, da dann belastbare Daten vorliegen, die eine präzisere Abschätzung der Reinheit des synthetisierten Wirkstoffes möglich machen. Laut Angaben der Pharmahersteller belaufen sich die Kosten in der Phase „Research & Development“ für einen Wirkstoff auf etwa 100 Millionen Euro. Gelingt es, mit Hilfe der hier zu entwickelnden Technologie eine Kostenreduzierung um 10 % zu erzielen, lässt sich eine Gesamtersparnis von mehreren Millionen Euro pro Jahr erreichen. Dies würde sich insbesondere auf die Wettbewerbsfähigkeit der im Bereich der Pharmaentwicklung tätigen KMU auswirken.

Im Rahmen dieses Projektes wird deshalb ein analytisches Verfahren entwickelt und evaluiert, das die direkte und universelle Detektion unbekannter Verbindungen ermöglicht. Dieser Ansatz verknüpft die Flüssigkeitschromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) mit einem Flammen-Ionisationsdetektor (FID). Das Forschungsvorhaben soll die Frage beantworten, ob der Einsatz eines FID in Kombination mit der HPLC die umfassende bzw. universelle Detektion aller in einer Synthesemischung enthaltenen kohlenstoffhaltigen Verbindungen erlaubt. Darüber hinaus wird die Quantifizierung unbekannter kohlenstoffhaltiger

ger Nebenkomponenten in Bezug zur Hauptkomponente mit einer Fehlertoleranz von maximal 20 % angestrebt.

Um diese Kopplung zu ermöglichen, sind zunächst entsprechende Interface-Systeme zu entwickeln, die sich für kleine ($0,5$ bis $10 \mu\text{L min}^{-1}$) bzw. größere ($10 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L min}^{-1}$) Flussraten eignen. Innerhalb des Projektes wird die Verwendung von Kapillar- und sogar Nano-HPLC-Säulen mit einem Innendurchmesser bis zu $75 \mu\text{m}$ untersucht und mit der konventionellen HPLC verglichen. Hierzu soll ein spezielles, für die Kapillar- und Nano-HPLC geeignetes System verwendet werden. Dabei müssen die Gerätekonfiguration und die Betriebsparameter so angepasst werden, dass ein stabiler Betrieb des Systems bei einem minimalen Totvolumen gewährleistet ist.

2 Wissenschaftlich technische Umsetzung

2.1 Auswahl geeigneter Modellsubstanzen

Zu Beginn des Projektes erfolgte die gemeinsame Abstimmung mit dem Projektbegleitenden Ausschuss, welche Substanzen für die geplanten Untersuchungen verwendet werden sollen. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1: Ausgewählte Substanzen.

Substanzname	CAS Nummer	Lieferant
Koffein	58-08-2	Sigma-Aldrich
Theophyllin	58-55-9	Sigma-Aldrich
Ibuprofen	15687-27-1	Sigma-Aldrich
Fenopropfen (Ca * H ₂ O)	53746-45-5	Sigma-Aldrich
Hydrocortison	50-23-7	Sigma-Aldrich
Ketoprofen	22071-15-4	Sigma-Aldrich
Cytosin	71-30-7	Sigma-Aldrich
Sulfamethoxazol	723-46-6	Sigma-Aldrich
Sulfamethizol	144-82-1	Sigma-Aldrich
Procainamid (HCl)	614-39-1	Sigma-Aldrich
Cumarin	91-64-5	Sigma-Aldrich
Flavon	525-82-6	Sigma-Aldrich
Propranolol (HCl)	318-98-9	Sigma-Aldrich
Amitriptylin (HCl)	549-18-8	Sigma-Aldrich
Adenin	73-24-5	Sigma-Aldrich
Thymin	65-71-4	Sigma-Aldrich
Uracil	66-22-8	Sigma-Aldrich
Prednison	53-03-2	Sigma-Aldrich
Prednisolon	50-24-8	Sigma-Aldrich
Papaverin (HCl)	61-25-6	Sigma-Aldrich
Diethylphthalat	84-66-2	Sigma-Aldrich
Bisphenol A	80-05-07	Sigma-Aldrich
Chrysen	218-01-9	Sigma-Aldrich
Benzo[a]pyren	50-32-8	Sigma-Aldrich
Benz[a]anthracen	56-55-3	Sigma-Aldrich

Die in Tabelle 2-1 aufgeführten Substanzen stellen eine für die pharmazeutische Industrie relevante Mischung aus sauren, basischen und neutralen Stoffen dar. Darüber hinaus sind stark apolare Substanzen wie zum Beispiel Benzo[a]pyren oder Chrysen vertreten, um die Grenzen der LC-FID Technik zu evaluieren.

2.2 Erstellung eines Hydrophobizitätsindexes für die Hochtemperatur-HPLC

2.2.1 Anforderungen der Flammen-Ionisationsdetektion in der Flüssigkeitschromatografie

Für die Anwendung der Flammen-Ionisationsdetektion (FID) in der Flüssigkeitschromatografie müssen bestimmte Rahmenbedingungen erfüllt sein. Eine essentielle Voraussetzung ist, dass die mobile Phase frei von organischen Lösungsmitteln ist. Die Verwendung organischer Lösungsmittel, die normalerweise in der HPLC verwendet werden, um die Elutionsstärke der mobilen Phase einzustellen, ist aufgrund eines extrem hohen Signaluntergrundes nicht möglich. Dies hat zur Folge, dass die Änderung der Elutionsstärke der mobilen Phase nicht mit Hilfe eines Lösungsmittelgradienten erfolgen kann. Besonders problematisch ist dies bei Trennungen von komplexen Stoffgemischen, bei denen sich die Polarität der einzelnen Substanzen stark unterscheidet. Wasser bei Raumtemperatur besitzt eine zu geringe Elutionskraft, um alle Komponenten in einer komplexen Mischung in einer für HPLC-Anwendungen typischen Laufzeit zu eluieren. Zur Änderung der Elutionsstärke der mobilen Phase ist deshalb die Anwendung höherer Temperaturen bzw. der Temperaturgradienten-Elution notwendig [1-3]. Dies gelingt, da Wasser mit steigender Temperatur unpolarer wird und sich dadurch ähnlich wie ein organisches Lösungsmittel verhält. Auf diese Weise kann die Elutionsstärke der mobilen Phase erhöht werden, so dass prinzipiell auch Trennungen von Stoffgemischen mit stark unterschiedlicher Polarität möglich sind.

2.2.2 Anforderung und Voraussetzungen des Hydrophobizitätsindexes

Die größte Herausforderung einer rein wässrigen Elution mit anschließender Flammen-Ionisationsdetektion ist sicherzustellen, dass die für die pharmazeutische Industrie relevanten Substanzen unter den gewählten experimentellen Bedingungen von der Trennsäule eluiert werden können. Sind die Hydrophobizität der stationären und mobilen Phase sowie der Analyten nicht aufeinander abgestimmt, ist es möglich, dass unpolare Komponenten eines Substanzgemisches erst nach mehreren Stunden oder gar nicht von der Trennphase eluieren. Obwohl eine Vielzahl an Daten zur Trennung von Substanzgemischen mit wässrigen mobilen Phasen vorliegt, gibt es keine systematischen Studien, die eine Korrelation zwischen der Polarität der Analyten und der Elutionsstärke der mobilen Phase erlauben. In der pharmazeutischen Industrie ist es üblich, Struktur-Eigenschaftsbeziehungen über bestimmte tabellierte oder experimentell leicht zugängliche Größen vorzunehmen. Bevorzugt wird z. B. der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient verwendet, um eine Vorhersage hinsichtlich der

Wirksamkeit eines Arzneistoffes vorherzusagen bzw. abzuschätzen [4]. Vor diesem Hintergrund sollte innerhalb des hier durchgeführten Forschungsvorhabens ein sogenannter Hydrophobizitätsindex erstellt werden, der eine Abschätzung der Elutionszeit einer Verbindung in Abhängigkeit der frei wählbaren experimentellen HPLC-Parameter erlaubt. Hierzu zählen die Temperatur, der pH-Wert der wässrigen mobilen Phase, das Phasenmaterial und die geometrischen Maße der Trennsäule.

Die große Anzahl der wechselseitig abhängigen chromatografischen Parameter erfordert die Verwendung von Simulations- und Modulationssoftware wie zum Beispiel DryLab [5], ChromSwordAuto [6] oder Osiris [7], um eine Retentionsvorhersage, Methodenentwicklung oder Methodenübertragung durchzuführen. Diese Softwaretools besitzen den Vorteil, dass Retentionsvorhersagen für wässrige Trennungen auf Grundlage von wenigen Basismessungen möglich sind. Gleichzeitig definieren die unterschiedlichen Retentionsmodelle der Softwaretools, wie die erforderlichen Basisdaten experimentell ermittelt werden müssen. Auf diese Thematik wird in Abschnitt 2.2.3 weiter eingegangen.

In Bezug auf die zuvor beschriebenen Anforderungen sollte der Hydrophobizitätsindex auf einer unabhängigen Größe basieren, welche belastbar mit der Retention von Substanzen unterschiedlicher Polarität bei einer wässrigen mobilen Phase korreliert werden kann. Dazu ist in Abbildung 2-1 ein Beispieldiagramm des Hydrophobizitätsindex dargestellt, wie es zu Projektbeginn angestrebt wurde. Die Abbildung zeigt einen linearen Zusammenhang einer tabellierten Größe mit der Retention bzw. dem Retentionsfaktor verschiedener Modellsubstanzen. In diesem rein hypotetischen Fall kann dann die Hydrophobizität einer Komponente, der ein bestimmter Wert der tabellierten Größe zugeschrieben wird, exakt berechnet werden, ohne dass hierzu aufwendige experimentelle Messungen notwendig sind. Anhand dieser Auftragung ist somit eine Abschätzung möglich, ob diese Substanz der LC-FID Technik zugänglich ist.

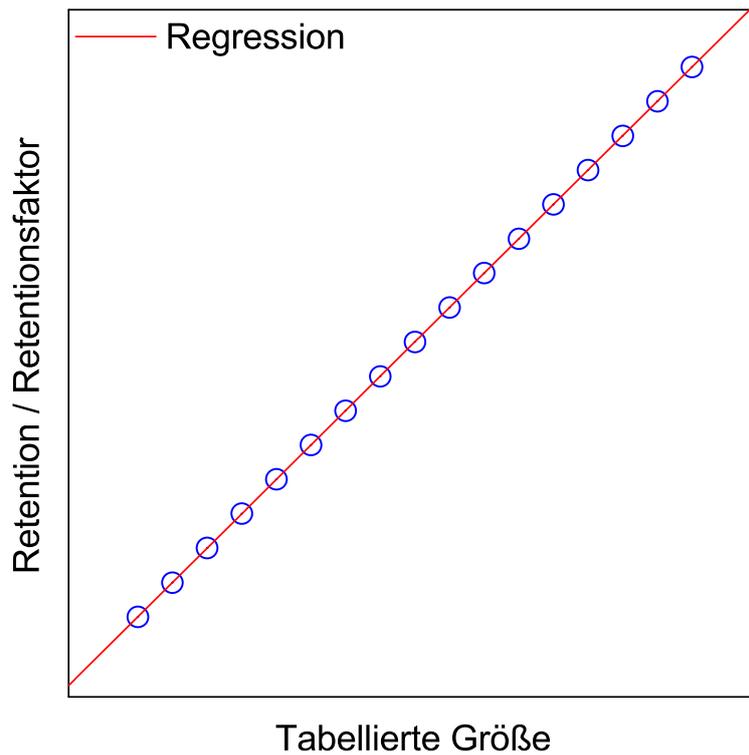


Abbildung 2-1: Beispieldarstellung des Hydrophobizitätsindexes mit einem linearen Zusammenhang zwischen Retention unterschiedlich polarer Komponenten und einer tabellierten Größe.

Ein weiteres Auswahlkriterium der gesuchten unabhängigen Größe ist, dass diese für eine Vielzahl pharmazeutisch relevanter Komponenten bereits tabelliert ist und im Fall von neuen Verbindungen experimentell als auch mathematisch leicht zugänglich ist. Als Zielvorgabe für die Vorhersage der Retention unterschiedlicher Komponenten für eine wässrige mobile Phase wurde ein Fehler von $\pm 20\%$ definiert.

2.2.3 Versuchsdesign

Da der Hydrophobizitätsindex mit der Retention der Modellsubstanzen in Abhängigkeit der Temperatur, dem pH-Wert der wässrigen mobilen Phase, dem Phasenmaterial der Trennsäule, der chemischen Modifizierung des Phasenmaterials und der Dimension der Trennsäule korreliert werden soll, mussten die experimentellen Retentionsdaten in Abhängigkeit dieser Parameter ermittelt werden. Dazu wurden als Trennsäulen eine silica-basierte Waters XBridge C₈- sowie eine metalloxidbasierende ZirChrom-PS Phase verwendet. Die Dimensionen dieser Trennsäulen sind in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten stationären Phasen.

Trennsäule	Länge in mm	Durchmesser in mm	Partikelgröße in µm	Porengröße in Å
Waters XBridge C ₈	50	2,1	2,5	135
ZirChrom-PS	100	2,1	3,0	300

Die Auswahl dieser Trennsäulen erfolgte aufgrund ihrer außerordentlich guten Temperatur- und pH-Stabilität [8,9]. Auf die Verwendung von C₁₈ Umkehrphasen wurde bewusst verzichtet, da diese Trennsäulen für einige der apolaren Modellsubstanzen eine starke Retention aufweisen und hier die Gefahr besteht, dass die Modellsubstanzen erst nach mehreren Stunden oder gar nicht von der Trennsäule eluieren. Die Verwendung von temperaturstabilen C₈ Umkehrphasenmaterialien anstelle von C₁₈ Trennphasen stellt hier einen guten Kompromiss zwischen Retention und Analysendauer dar. Dennoch besteht bei Verwendung von C₈ Umkehrphasen die Möglichkeit, dass für einige der apolaren Modellsubstanzen eine wässrige Elution aufgrund der starken Retention nicht möglich ist. Vor diesem Hintergrund wurden die Versuche zusätzlich auf einer metalloxidbasierenden ZirChrom-PS Trennsäule durchgeführt. Hintergrund ist, dass die Hydrophobizität der metalloxidbasierenden Trennsäulen deutlich geringer ist als die Hydrophobizität von silicabasierenden C₈ oder C₁₈ Trennsäulen. Dadurch ist es möglich, stark apolare Modellsubstanzen rein wässrig zu eluieren.

Die Temperatur der chromatografischen Trennung wurde in einem Bereich von 30 °C bis 120 °C variiert. Darüber hinaus wurde die Retention der Modellsubstanzen in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase evaluiert. Dazu wurde ein saurer pH-Wert von 2,7 als auch ein basischer pH-Wert von 9,0 eingestellt. Wie bereits in Abschnitt 2.2.2 erwähnt, ermöglichen Simulationssoftwaretools die Vorhersagen zum Retentionsverhalten unterschiedlicher Substanzen für eine wässrige mobile Phase, auch wenn die erforderlichen experimentellen Basisdaten im Lösungsmittelgradientenmodus aufgenommen werden. Vor diesem Hintergrund wurden ebenfalls organisch-wässrige mobile Phasen untersucht. Für die Experimente mit der Waters XBridge Trennsäule wurde Methanol als protisches Lösungsmittel verwendet,

wohingegen das aprotische Lösungsmittel Acetonitril in Kombination mit der ZirChrom-PS Säule untersucht wurde.

Darüber hinaus wurden unterschiedliche Strategien zur Generierung der temperaturabhängigen Retentionsdaten evaluiert. Zum einen die isokratische Arbeitsweise, bei der die Zusammensetzung und somit die Elutionsstärke der mobilen Phase während der chromatografischen Trennung konstant bleibt. Im Gegensatz dazu wird bei der Anwendung von Lösungsmittelgradienten der Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase kontinuierlich von einer in der Regel stark polaren zu einer stark apolaren mobilen Phase verändert. Diese Arbeitsweise bedingt eine kontinuierliche Änderung der Elutionsstärke der mobilen Phase während der gesamten Trennung. Beide Messmodi besitzen individuelle Vor- und Nachteile und wurden im Rahmen dieses Projektes zur Ermittlung der erforderlichen Retentionsdaten evaluiert.

Eine detaillierte Übersicht der experimentellen Parameter der Basismessungen zur Erstellung des Hydrophobizitätsindex ist in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Tabelle 2-3: Übersicht der experimentellen Parameter und deren Variation zur Erhebung des Basisdatensatzes zur Erstellung des Hydrophobizitätsindexes.

Stationäre Phase	pH-Wert mobile Phase	Messmodus	Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase in %	Dauer des Lösungsmittelgradienten in Minuten	Steigung des Lösungsmittelgradienten in % B min ⁻¹	Temperatur in °C
XBridge C ₈	2,7	a	0 bis 20 in 5 % Intervall	---		100
XBridge C ₈	9,0	a	0 bis 30 in 5 % Intervall	---		90
XBridge C ₈	2,7	b	2 bis 100	30, 60, 90, 270	9,80, 3,27, 1,63, 1,09, 0,36	60
XBridge C ₈	2,7	b	2 bis 100	30, 60, 90, 270	9,80, 3,27, 1,63, 1,09, 0,36	90
XBridge C ₈	2,7	b	2 bis 100	30, 60, 90, 270	9,80, 3,27, 1,63, 1,09, 0,36	120
XBridge C ₈	9,0	b	2 bis 100	30, 60, 90, 270	9,80, 3,27, 1,63, 1,09, 0,36	60
XBridge C ₈	9,0	b	2 bis 100	30, 60, 90, 270	9,80, 3,27, 1,63, 1,09, 0,36	90
XBridge C ₈	9,0	b	2 bis 100	30, 60, 90, 270	9,80, 3,27, 1,63, 1,09, 0,36	120
ZirChrom-PS	2,7	a	0 bis 70 in 5 % Intervall	---		30
ZirChrom-PS	2,7	a	0 bis 70 in 5 % Intervall	---		60
ZirChrom-PS	2,7	a	0 bis 70 in 5 % Intervall	---		90
ZirChrom-PS	9,0	a	0 bis 70 in 5 % Intervall	---		30
ZirChrom-PS	9,0	a	0 bis 70 in 5 % Intervall	---		60
ZirChrom-PS	9,0	a	0 bis 70 in 5 % Intervall	---		90

a) isokratische Messung, b) Anwendung eines Lösungsmittelgradienten

2.2.4 Auswahl einer unabhängigen tabellierten Größe für den Hydrophobizitätsindex

2.2.4.1 Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

Eine unabhängige Größe, welche zur Erstellung des Hydrophobizitätsindex herangezogen werden kann, stellt der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log K_{ow}$) dar. Dieser Parameter bietet sich an, da er mit Hilfe der Flüssigkeitschromatografie für eine Vielzahl an Verbindungen leicht experimentell bestimmt werden kann und in der wissenschaftlichen Literatur belastbare Korrelationen zwischen dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem Logarithmus des Retentionsfaktors für unterschiedliche Substanzklassen beschrieben werden. Weiterhin sind für sehr viele pharmazeutisch relevante Substanzen die entsprechenden $\log K_{ow}$ -Werte bekannt und tabelliert. Darüber hinaus können diese aber auch mit Hilfe von Softwaretools aus der Struktur abgeleitet und berechnet werden [6].

Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ist definiert als der dekadische Logarithmus des Quotienten der Konzentration einer Substanz X in der Oktanolphase $c(X)_{Oktanol}$ und der Konzentration der Substanz in der Wasserphase $c(X)_{Wasser}$ (1).

$$\log K_{ow} = \log \frac{c(X)_{Oktanol}}{c(X)_{Wasser}} \quad (1)$$

Molnár et al. beschrieb bereits 1977 eine lineare Korrelation zwischen dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und den logarithmierten Retentionsfaktoren für acht unterschiedliche Aminosäuren [10], obgleich spätere Arbeiten zeigten, dass ein expliziter linearer Zusammenhang bei chemisch unterschiedlichen Substanzen bzw. Substanzklassen nicht zwingend gegeben ist [11].

2.2.4.1.1 Ausgewählte Ergebnisse

In einem ersten Schritt wurde die prinzipielle Eignung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten zur Erstellung eines Hydrophobizitätsindex evaluiert. Dazu wurden ausschließlich experimentell ermittelte Retentionsfaktoren, die mit einer wässrigen mobilen Phase bestimmt wurden, berücksichtigt und in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase gegen die Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Modellsubstanzen aufgetra-

gen. Die resultierenden Plots für eine C₈-Umkehrphase mit den entsprechenden linearen Korrelationen sind in Abbildung 2-2 dargestellt.

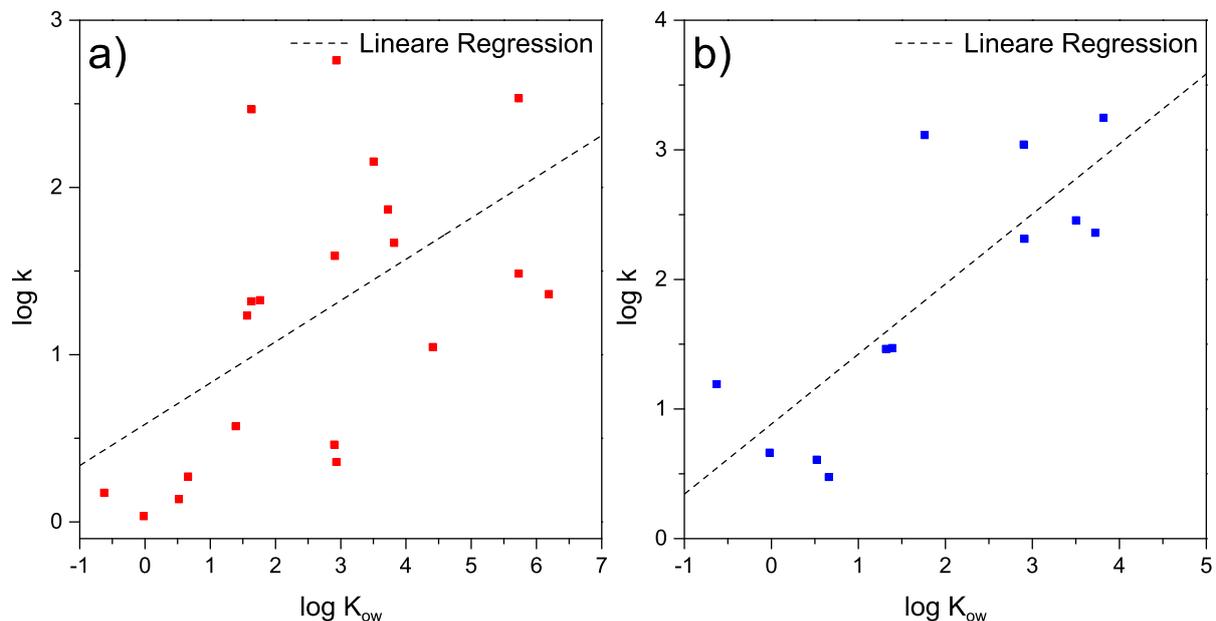


Abbildung 2-2: Auftragung des dekadischen Logarithmus der Retentionsfaktoren der Modellanalyten gegen den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Modellanalyten in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 x 2,1 mm, 2,5 µm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a) deionisiertes Wasser, pH 2,7, b) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: a) 100 °C, b) 90 °C.

Bei Betrachtung der Plots wird deutlich, dass eine einfache lineare Korrelation der Messdaten nicht gelingt. Die Streuung ist sehr groß und umfasst bis zu 2,5 Logarithmus-Einheiten. Dies gilt für beide untersuchten pH-Werte der mobilen Phase, obgleich die lineare Anpassung bei einem pH-Wert von 9,0 besser erscheint. Dies ist zum einen dadurch bedingt, dass für einige der in Tabelle 2-1 aufgelisteten Substanzen keine experimentellen Daten bei einem pH-Wert von 9,0 und einer Temperatur von 90 °C vorliegen. Diese Substanzen werden auf der C₈-Umkehrphase sehr stark retardiert und konnten bei einer Temperatur von 90 °C nicht in einer angemessenen Zeit (≤ 2 Stunden) eluiert werden. Im Gegensatz dazu weisen kleine Moleküle wie Uracil oder Thymin keine ausreichende Retention auf und die experimentell ermittelten Retentionszeiten dieser Analyten liegen im Bereich der Ungenauigkeit. Vor diesem Hintergrund konnten für die Erstellung des Hydrophobizitätsindex bei einem pH-Wert von 9,0 lediglich 12 der 25 Modellsubstanzen berücksichtigt werden. Für eine saure mobile Phase konnte demgegenüber auf Daten von 20 der 25 Modellanalyten zurückgegriffen werden.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass vergleichbare Ergebnisse für die ZirChrom-PS Trennsäule beobachtet wurden. Die entsprechenden Hydrophobizitätsplots sind im Anhang (siehe Abschnitt 5.1) dargestellt.

Die im Rahmen dieser Untersuchungen erzielten Ergebnisse sind sehr überraschend, denn in der pharmazeutischen Industrie wird der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient häufig verwendet, um Informationen über die Hydrophobizität oder die Bioverfügbarkeit unterschiedlicher Substanzen zu erhalten. Darüber hinaus werden stets lineare Korrelationen zwischen dem Retentionsfaktor auf einer C₁₈-Umkehrphase und dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten mit maximalen Abweichungen von 0,05 Logarithmus-Einheiten beschrieben [12]. Im Vergleich dazu wurden im Rahmen der Untersuchungen in diesem Projekt deutlich größere Abweichungen von mehreren Logarithmus-Einheiten beobachtet, obgleich die Messungen auf einer C₈-Umkehrphase durchgeführt wurden und theoretisch besser mit dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten korreliert bzw. verglichen werden können. In Anbetracht der erzielten Ergebnisse ist ein Hydrophobizitätsindex basierend auf der Auftragung des Retentionsfaktors der Modellspezies gegen den Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten für die Fragestellung in diesem Projekt nicht geeignet. Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse, dass bei Substanzen aus unterschiedlichen Stoffgruppen mehr als nur eine Stoffeigenschaft berücksichtigt werden sollte.

2.2.4.2 D-Wert

In einem nächsten Schritt wurde der sogenannte D-Wert betrachtet. Der Vorteil des D-Wertes im Vergleich zum Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten besteht darin, dass die Ionisierbarkeit und damit einhergehend die Retention der Modellspezies in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase berücksichtigt wird.

Der D-Wert ist definiert als der Quotient der Summe aller Spezies einer Substanz X in der Oktanolphase und der Summe aller Spezies dieser Substanz in der Wasserphase (2).

$$\log D = \log \frac{\sum_i c(X_i)_{\text{Oktanol}}}{\sum_i c(X_i)_{\text{Wasser}}} \quad (2)$$

Auch für den D-Wert existieren viele tabellierte Werte für unterschiedliche Substanzen bzw. Substanzklassen. Bei diesen Werten handelt es sich jedoch in der Regel um berechnete Werte, da eine experimentelle Bestimmung extrem aufwendig ist.

Um den Unterschied zwischen dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem D-Wert in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase zu verdeutlichen, sind in Tabelle 2-4 diese Werte für das ionisierbare Adenin und das nicht ionisierbare Chrysen zusammengefasst.

Tabelle 2-4: Zusammenfassung verschiedener analytspezifischer Parameter von Adenin und Chrysen.

Analyt	$\log K_{ow}$	$\log D(\text{pH}3)$	$\log D(\text{pH}9)$	$\text{p}K_s$
Adenin	0,023	-4,13	-2,55	4,15
Chrysen	5,73	5,77	5,73	---

Für das unpolare Chrysen spielt der pH-Wert der mobilen Phase während der chromatografischen Trennung keine Rolle. Die $\log K_{ow}$ - als auch die $\log D$ -Werte für Chrysen bei unterschiedlichen pH-Werten der mobilen Phase sind nahezu identisch. Im Vergleich dazu unterscheiden sich für Adenin die $\log K_{ow}$ - aber auch die $\log D$ -Werte in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase deutlich. Vor diesem Hintergrund wird erwartet, dass die Korrelation des Retentionsfaktors der Modellsubstanzen mit ihren korrespondierenden D-Werten bei unterschiedlichen pH-Werten der mobilen Phase zu einer besseren Übereinstimmung führt als die Korrelation mit dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.

2.2.4.2.1 Ausgewählte Ergebnisse

Analog zur Erstellung des Hydrophobizitätsindex basierend auf dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten wurde im ersten Schritt die Eignung des D-Wertes für die Erstellung des Indexes untersucht. Dazu sind in Abbildung 2-3 der Logarithmus der Retentionsfaktoren der Modellsubstanzen auf einer C_8 -Umkehrphase gegen ihren D-Wert in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase aufgetragen. Auch hier sind die linearen Anpassungen in den Hydrophobizitätsplots eingefügt. Die dargestellten Plots verdeutlichen auch hier, dass eine einfache lineare Regression nicht gelingt und Fehler von mehreren Logarithmus-Einheiten erhalten werden. Da für die Erstellung des Hydrophobizitätsindex auf Basis des D-Wertes der gleiche experimentelle Datensatz wie in Abschnitt 2.2.4.1.1 verwendet wurde, konnten für den basischen pH-Wert von 9,0 lediglich 12 der 25 Modellsubstanzen berücksichtigt wer-

den. Bei der Erstellung des Hydrophobizitätsindex für eine saure mobile Phase konnte auf Daten von 20 der 25 Modellanalyten zurückgegriffen werden. Analog zur Erstellung des Hydrophobizitätsindex basierend auf experimentellen Daten auf der C₈-Umkehrphase wurden vergleichbare Ergebnisse für die ZirChrom-PS Trennsäule beobachtet. Die korrespondierenden Plots sind im Anhang (siehe Abschnitt 5.1) aufgeführt.

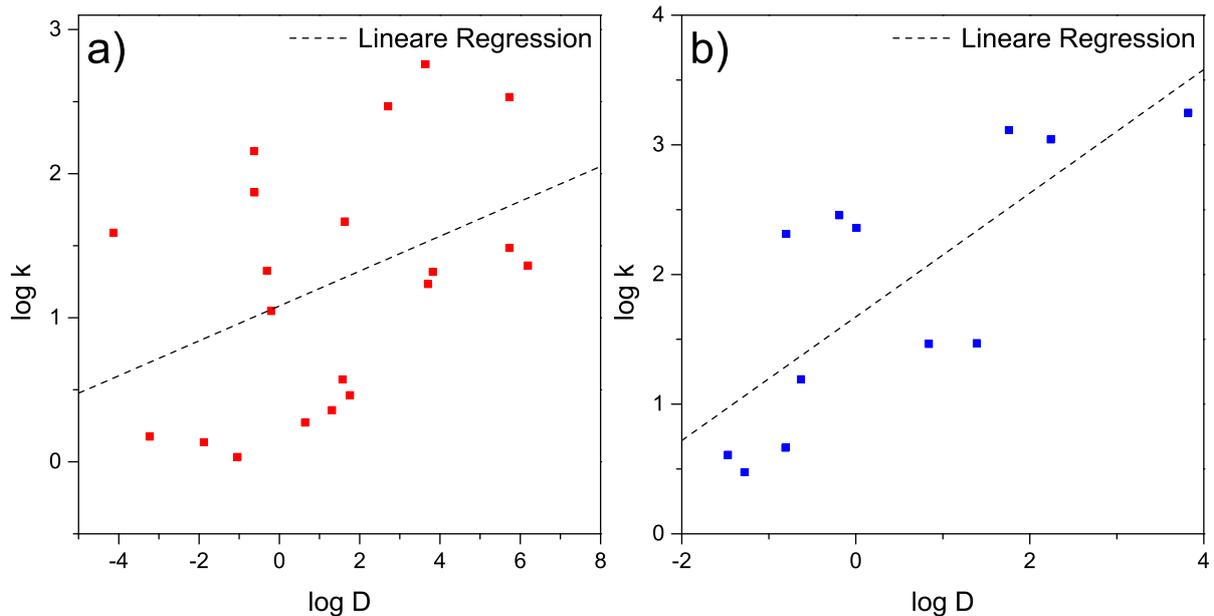


Abbildung 2-3: Auftragung des dekadischen Logarithmus der Retentionsfaktoren der Modellanalyten gegen den D-Wert der Modellanalyten in Abhängigkeit des pH-Wertes der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a) deionisiertes Wasser, pH 2,7, b) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: a) 100 °C, b) 90 °C.

In Bezug auf die Erstellung des Hydrophobizitätsindex auf Basis des D-Wertes der Modellanalyten muss auch hier festgehalten werden, dass sich der D-Wert nicht zur Erstellung des Hydrophobizitätsindex eignet. Durch die Fehler von mehreren Logarithmus-Einheiten ist es mit diesem Index nicht möglich, verlässlich abzuschätzen, ob eine bestimmte Substanz mit Hilfe der LC-FID Technologie analysiert werden kann.

2.2.4.3 Vergleich der Eignung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und des D-Wertes für den Hydrophobizitätsindex

In Abbildung 2-4 ist ein Vergleich der unterschiedlichen Auftragungen der Retentionsfaktoren der Modellsubstanzen gegen den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten sowie des D-Wertes zusammengefasst. Diese Darstellung verdeutlicht, dass weder der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient noch der D-Wert als tabellierte Größe geeignet sind, um als Basis zur Erstellung des Hydrophobizitätsindex Anwendung zu finden.

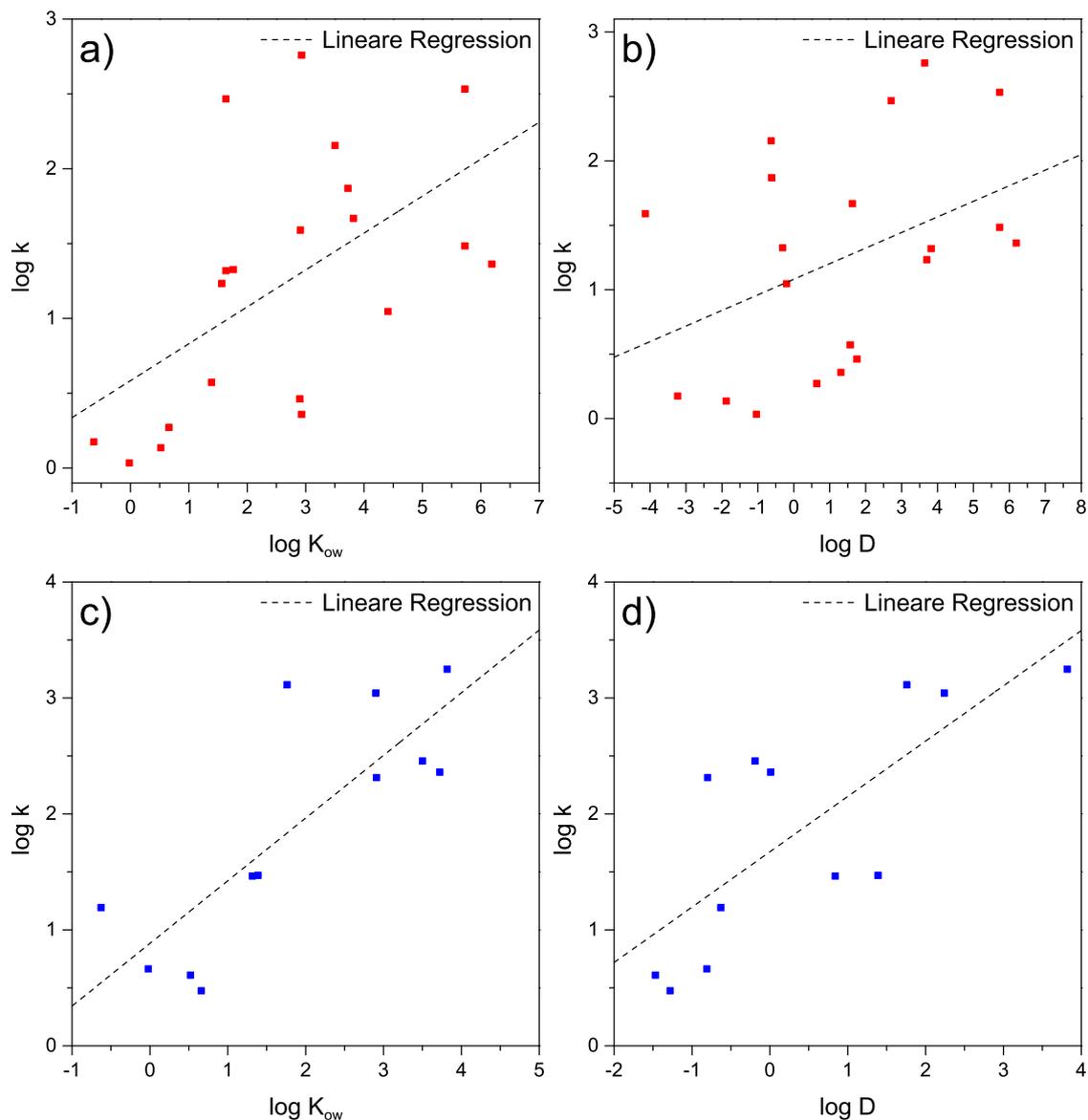


Abbildung 2-4: Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: a, b) 100 °C, c, d) 90 °C.

Darüber hinaus kann basierend auf dem aktuellen Datensatz nicht abschließend beurteilt werden, ob der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient oder der D-Wert präzisere Vorhersagen der Retention und dadurch indirekt der Hydrophobizität, ermöglicht. Sowohl der $\log K_{ow}$ als auch der $\log D$ liefern bei der Vorhersage des Retentionsverhalten einen Fehler in der gleichen Größenordnung. In diesem Zusammenhang sollen nachfolgend die zu erwartenden Fehler in der Retentions- bzw. Hydrophobizitätsvorhersage basierend auf den erstellten Hydrophobizitätsindices verdeutlicht werden. Dazu ist in Abbildung 2-5 ein Hydrophobizitätsindex auf Basis des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten dargestellt. Weiterhin sind bei diesem Plot zwei Substanzen, Bisphenol A (❶) und Papaverin (❷), hervorgehoben. Diese besitzen entsprechend der Angaben aus der Literatur den gleichen $\log K_{ow}$ von 2,93, unterscheiden sich jedoch sehr stark in den experimentell ermittelten Retentionsfaktoren. Papaverin (❷) weist unter den experimentellen Bedingungen einen Retentionsfaktor von circa 2 auf, wohingegen für Bisphenol A (❶) ein Retentionsfaktor von circa 500 bestimmt wurde. Dies entspricht einer Abweichung von 2,4 Logarithmuseinheiten, was einem Faktor von circa 250 entspricht. Dieser große Fehler belegt eindeutig, dass die Indices auf Basis des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten sowie des D-Wertes der Modellanalyten nicht geeignet sind, um die Elution von Verbindungen mit einem Fehler von $\leq 20\%$ vorherzusagen.

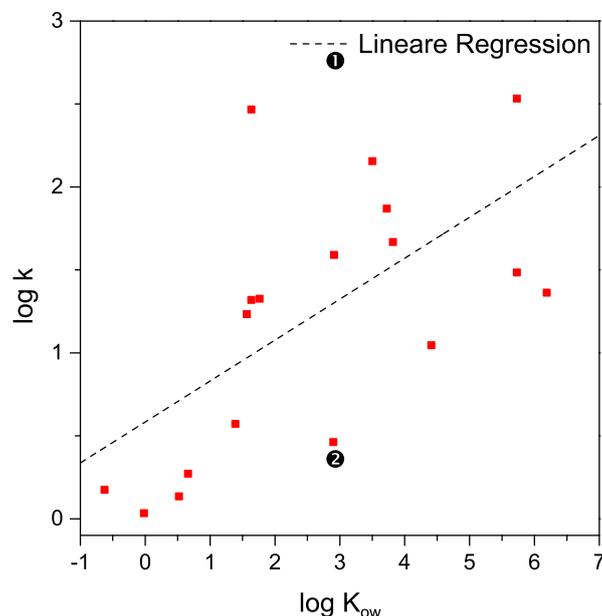


Abbildung 2-5: Auftragung des dekadischen Logarithmus der Retentionsfaktoren gegen den Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure; Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; Temperatur: 100 °C. Punkte: Bisphenol A, ❶; Paraverin, ❷.

2.3 Alternative Vorgehensweise zur Abschätzung der Hydrophobizität

2.3.1 Verwendung von Retentionsmodellen zur Vorhersage wässriger Retentionsfaktoren

Im Rahmen der Methodenentwicklung in der Flüssigkeitschromatografie gibt es verschiedene kommerzielle als auch frei verfügbare akademische Softwaretools. Mit Hilfe dieser Programme ist es möglich, die Entwicklung neuer Methoden systematisch, zeit- und kostensparend durchzuführen. Auf Grundlage weniger experimenteller Retentionsdaten verwenden diese Methodenentwicklungstools unterschiedliche Retentionsmodelle, welche den Zusammenhang zwischen dem Retentionsfaktor der Analyten und dem Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase beschreiben. Diese Beziehung ist für die Modellanalyten Prednison und Flavon in Abbildung 2-6 mit den entsprechenden quadratischen Anpassungen für beide Analyten dargestellt.

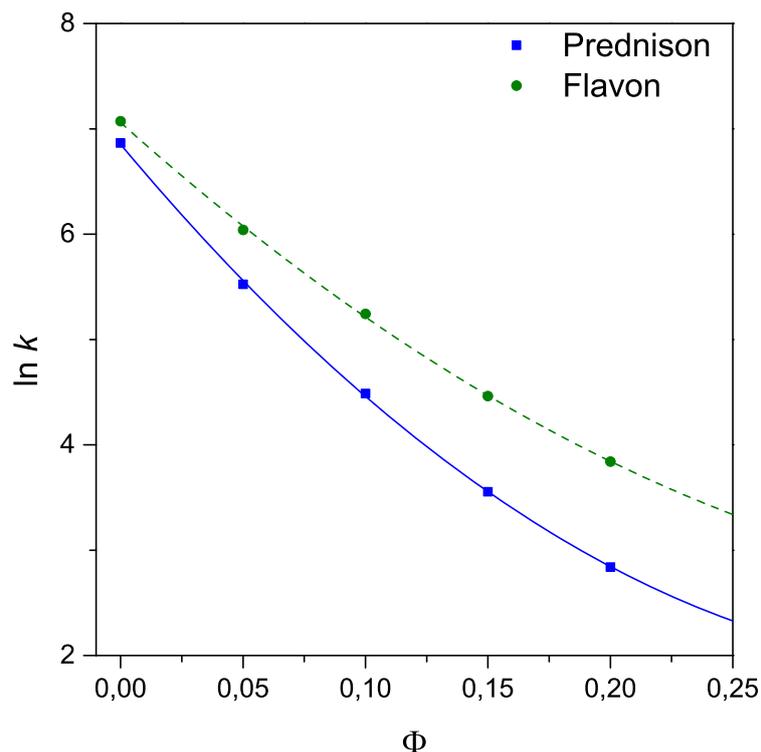


Abbildung 2-6: Darstellung des Logarithmus des Retentionsfaktors gegen den Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: A: deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Temperatur: 100 °C.

In Abhängigkeit des verwendeten Methodenentwicklungstools stehen dem Anwender dabei unterschiedlich komplexe Retentionsmodelle zur Verfügung, um diese an einen experimentellen Datensatz anzupassen und anschließend die Retention der Analyten am Computer zu

modellieren. Vor dem Hintergrund der LC-FID Kopplung ist der Retentionsfaktor für den Grenzfall $\varphi = 0$ entscheidend und kann nach der Anpassung des jeweiligen Retentionsmodells aus der Mittelwertfunktion berechnet werden. Diese Vorgehensweise ist erforderlich, da eine Vielzahl pharmazeutisch relevanter Substanzen bei der Elution mit einer wässrigen mobilen Phase Retentionszeiten von mehreren Stunden aufweisen können. Dies ist ebenfalls anhand der Auftragung in Abbildung 2-6 gut zu erkennen. Bei $\varphi = 0$ wurde für Prednison eine experimentelle Retentionszeit von 202 Minuten ermittelt und Flavon eluiert sogar erst nach 248 Minuten von der Trennsäule. In Anbetracht dieser langen Retentionszeiten erscheint es sinnvoller, die Retentionsdaten mit einer organisch-wässrigen mobilen Phase zu generieren und anschließend mit Hilfe von Modellierungsprogrammen die Retention für eine wässrige mobile Phase zu berechnen. Die auf diese Weise berechneten Retentionsfaktoren für $\varphi = 0$ sind mit einem Fehler, bedingt durch das verwendete Retentionsmodell, behaftet und werden nachfolgend für verschiedene Retentionsmodelle evaluiert, indem experimentell bestimmte Retentionszeiten mit den vorhergesagten verglichen werden. Hierbei ist anzumerken, dass diese Vorgehensweise wesentlich aufwendiger ist als die ursprünglich getroffene Annahme, allein auf Grundlage eines Kalibrierdatensatzes eine Abschätzung der Elution unter den für die LC-FID-Kopplung vorgegebenen Randparametern zu realisieren.

2.3.1.1 Anwendung einfacher linearer Retentionsmodelle (Linear Solvent Strength Relationship, LSS)

Eines der am häufigsten genutzten Retentionsmodelle ist das Linear Solvent Strength (LSS) Modell [13], welches einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Retentionsfaktors der Analyten und dem Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase unterstellt. Das LSS-Modell ist wie folgt definiert (Gleichung (3)):

$$\ln k = \ln k_w - S\varphi \quad (3)$$

Darin sind k_w der Retentionsfaktor des Analyten bei einer wässrigen mobilen Phase ($\varphi = 0$), φ ist der Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase und S beschreibt eine stoffspezifische Konstante. Das LSS Modell besitzt den Vorteil, dass die anzupassenden Funktionsparameter von Gleichung (3) nur auf zwei Messungen mit einem Lösungsmittelgradienten berechnet werden können, was im Rahmen dieses Projektes mit Hilfe der DryLab-Software durchgeführt wurde. Zur Vorhersage von Retentionsfaktoren für $\varphi = 0$ wird

für das LSS Modell empfohlen, Lösungsmittelgradienten mit Steigungen zwischen 1 % B min⁻¹ und 4 % B min⁻¹ oder kleiner zu verwenden. Im Rahmen der Evaluierung dieses Retentionsmodells wurden Gradientensteigungen von 9,8, 3,26, 1,09 und 0,36 % B min⁻¹ angewendet. Anschließend wurden die Retentionsfaktoren der Modellanalyten für eine mobile Phase bestehend aus 80/20 (v/v) Wasser/Methanol berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abbildung 2-7 in Abhängigkeit der verwendeten Gradientendaten dargestellt. Für die in Abbildung 2-7 a aufgeführten Werte wurden Retentionsdaten der Modellanalyten der Gradienten mit Steigungen von 9,8 und 3,26 % B min⁻¹ genutzt, wohingegen für die in Abbildung 2-7 b wiedergegebenen Werte Retentionsdaten aus den Gradientenmessungen mit Steigungen von 1,09 und 0,37 % B min⁻¹ herangezogen wurden. Der Vergleich zeigt, dass Retentionsvorhersagen basierend auf den flacheren Gradientensteigungen (Abbildung 2-7 b) zu präziseren Retentionszeitvorhersagen führen. Die vorhergesagten Retentionszeiten befinden sich innerhalb der definierten Fehler-toleranz von ≤ 20 %. Im Vergleich dazu ist die Vorhersage der Retentionszeiten bei Anwendung von Gradientendaten mit größeren Gradientensteigungen weniger präzise (Abbildung 2-7 a), so dass nicht alle Retentionszeiten der Modellanalyten mit einem Fehler ≤ 20 % vorhergesagt werden können. Darüber hinaus gelingt nicht für alle Modellsubstanzen die Anpassung an das Retentionsmodell, so dass nicht alle Komponenten berücksichtigt werden konnten und lediglich Vorhersagen für Modellsubstanzen mit einer Retentionszeit von ≤ 20 Minuten möglich sind.

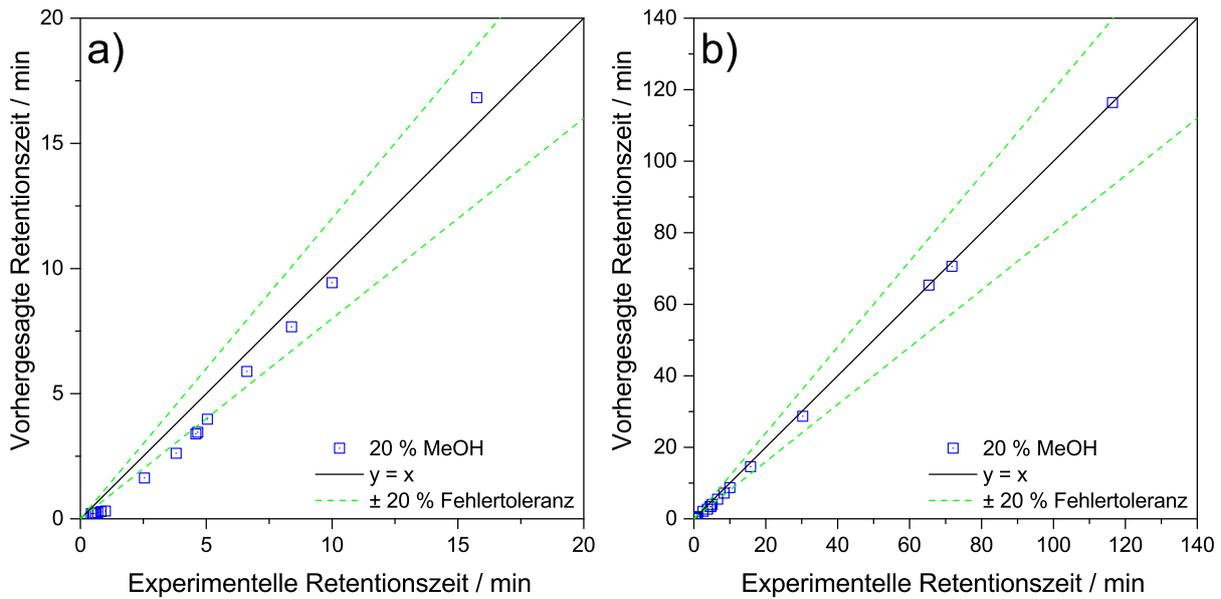


Abbildung 2-7: Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine mobile Phase von 80/20(v/v) Wasser/Methanol. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von a) 9,8 % B min⁻¹ und 3,26% B min⁻¹, b) 1,09 % B min⁻¹ und 0,36% B min⁻¹; Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; Detektion: UV bei 254 nm.

Im nächsten Schritt wurden die Retentionszeiten der Modellanalyten für eine wässrige mobile Phase durchgeführt, was direkt den experimentellen Bedingungen der LC-FID Kopplung entspricht. Auch hier wurden die experimentellen mit den vorhergesagten Retentionszeiten der Modellanalyten in Abhängigkeit der Gradientensteigung der Basismessungen verglichen und in Abbildung 2-8 zusammengefasst. Hier wird deutlich, dass es mit Hilfe des LSS Modells nur für wenige Modellsubstanzen möglich ist, die Retentionszeiten mit einem Fehler ≤ 20 % vorherzusagen. Für den größten Teil der Verbindungen resultieren Fehler von ≥ 20 %, unabhängig von der Steigung der Gradienten der Basismessungen.

Dennoch können gewisse Unterschiede in beiden Plots auf die verwendeten Basisdaten zurückgeführt werden. Bei der Retentionszeitvorhersage auf Grundlage von Retentionsdaten aus Messungen mit steileren Gradienten (Abbildung 2-8 a) wird eine größere Streuung der Retentionszeiten beobachtet. Im Vergleich dazu sind bei Verwendung von flachen Gradienten (Abbildung 2-8 b) die vorhergesagten Retentionszeiten der Modellanalyten in der Regel kleiner als die experimentell ermittelten Retentionszeiten. Daraus kann abgeleitet werden, dass bei der Anwendung steiler Gradienten die Datenanpassung mit einem größeren Fehler behaftet ist und die simulierten Retentionszeiten stärker streuen. Abbildung 2-8 b verdeutlicht jedoch auch, dass es systematische Abweichungen gibt. Dies ist ein Indiz dafür, dass das

zugrundeliegende Retentionsmodell nicht für die Vorhersage von Retentionsfaktoren für $\varphi = 0$ geeignet ist.

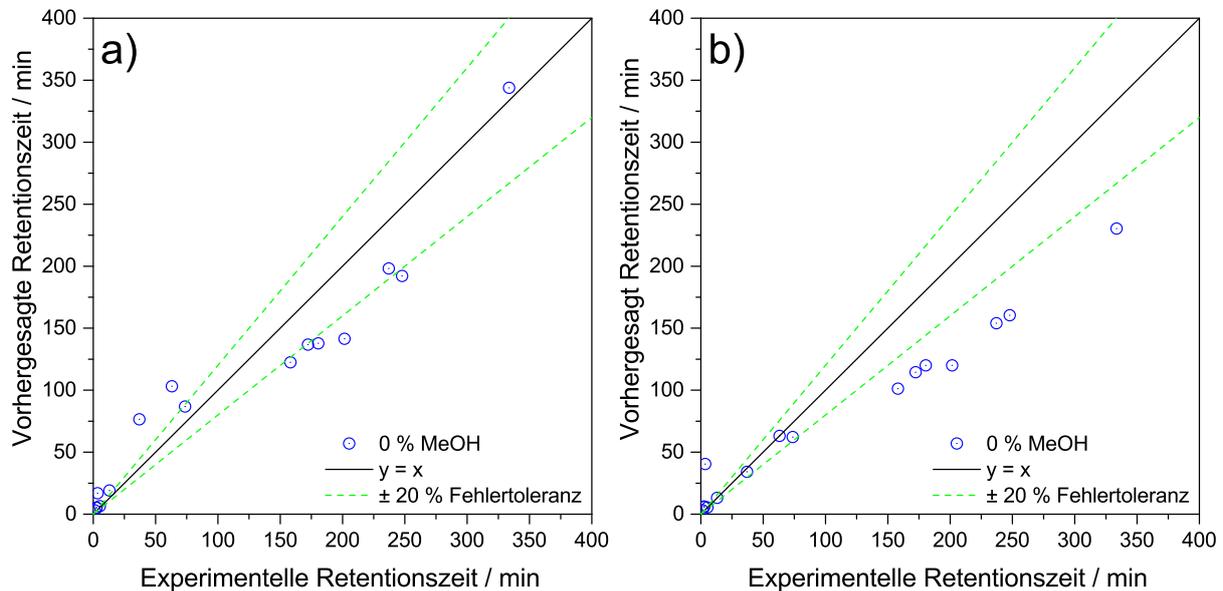


Abbildung 2-8: Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine wässrige mobile Phase. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von a) $9,8\% \text{ B min}^{-1}$ und $3,26\% \text{ B min}^{-1}$, b) $1,09\% \text{ B min}^{-1}$ und $0,36\% \text{ B min}^{-1}$; Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C_8 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $2,5 \mu\text{m}$); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit $0,1\%$ Ameisensäure, B) Methanol mit $0,1\%$ Ameisensäure; Flussrate: $0,35 \text{ mL min}^{-1}$; Detektion: UV bei 254 nm .

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein einfaches lineares Retentionsmodell wie das LSS Modell nicht geeignet ist, um Retentionsfaktoren für $\varphi = 0$ mit einem akzeptablen Fehler $\leq 20\%$ vorherzusagen. Dies ist unabhängig von der Steigung der Lösungsmittelgradienten, welche zur Ermittlung der Basismessungen angewendet wurden.

2.3.1.2 Anwendung komplexer Retentionsmodelle

Die Verwendung komplexer Retentionsmodelle erhöht in der Regel die Präzision der Vorhersage von Retentionszeiten bzw. Retentionsfaktoren, erfordert aber gleichzeitig einen höheren experimentellen Aufwand, da ein größerer Datensatz erforderlich ist, um an komplexere Modelle gefittet zu werden. Darüber hinaus erfolgt die Anpassung der experimentellen Daten in der Regel als nicht linearer Fit. Dies bedeutet, dass im ungünstigsten Fall eine Lösung nicht konvergiert, wenn die Startwerte zur Berechnung der Funktionsparameter falsch gewählt wurden.

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wurde ein vielversprechendes dreiparametrisches Retentionsmodell der Arbeitsgruppe Nikitas et al. auf die Eignung zur Vorhersage von Retentionsfaktoren für $\varphi = 0$ näher untersucht. Der Funktionszusammenhang ist in Gleichung (4) dargestellt [14].

$$\ln k = c_1 - \frac{c_3 \varphi}{1 + c_2 \varphi} \quad (4)$$

k beschreibt auch hier den Retentionsfaktor des Analyten, φ den Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase und c_1, c_2, c_3 sind anzupassende Modellparameter. Zur Anpassung der experimentellen Daten an dieses Retentionsmodell wurde ein von der Arbeitsgruppe Nikitas zur Verfügung gestelltes Tool verwendet. Zur Evaluierung der Eignung dieses Retentionsmodells wurden fünf experimentelle Datensätze verwendet und die darauf basierenden vorhergesagten Retentionszeiten der Modellanalyten mit den experimentellen Daten verglichen. Abbildung 2-9 zeigt den Vergleich zwischen vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine mobile Phase aus 80/20 (v/v) Wasser/Methanol (Abbildung 2-9 a) sowie für die wässrige Elution (Abbildung 2-9 b). Es ist deutlich zu erkennen, dass es mit Hilfe von Gleichung (4) möglich ist, sowohl für wässrig-organische als auch rein wässrige mobile Phasen die Retentionszeiten der Modellanalyten mit einem Fehler kleiner 20 % vorherzusagen.

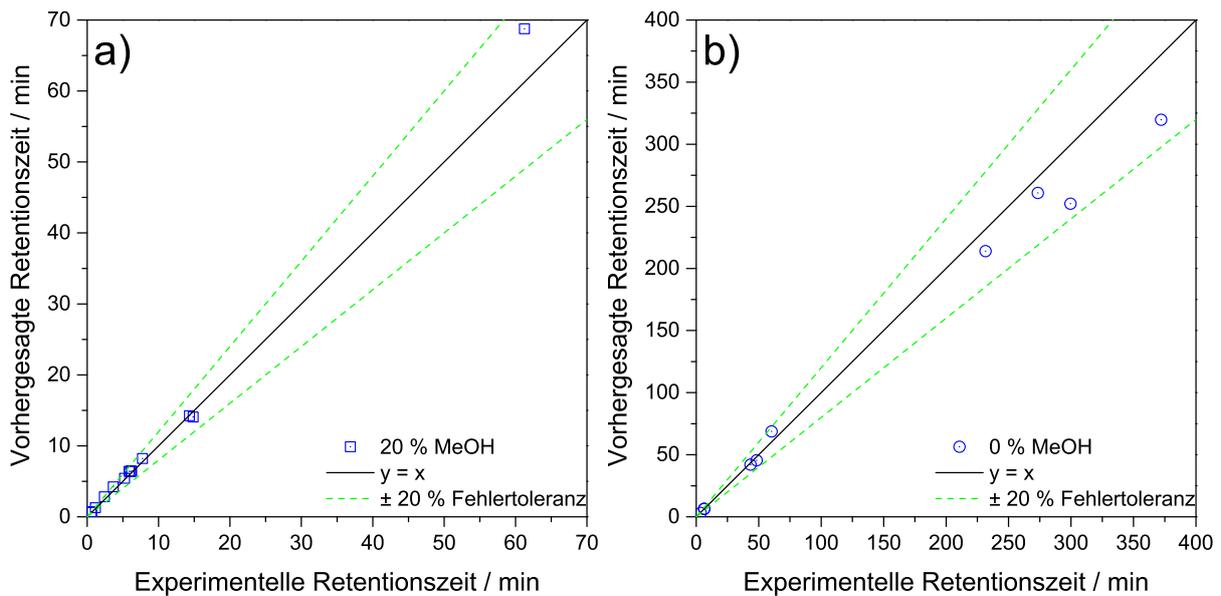


Abbildung 2-9: Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine a) mobile Phase bestehend aus 80/20 (v/v) Wasser/Methanol und b) wässrige mobile Phase. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von $9,8\% \text{ B min}^{-1}$, $3,26\% \text{ B min}^{-1}$, $1,63\% \text{ B min}^{-1}$, b) $1,09\% \text{ B min}^{-1}$ und $0,36\% \text{ B min}^{-1}$; Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C_8 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $2,5 \mu\text{m}$); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit $0,1\%$ Ameisensäure, B) Methanol mit $0,1\%$ Ameisensäure; Flussrate: $0,35 \text{ mL min}^{-1}$; Detektion: UV bei 254 nm .

Wie bereits erwähnt, erfordert die Anwendung komplexer Retentionsmodelle in der Regel eine größere Anzahl experimenteller Daten, um die Anpassung durchzuführen. Bezogen auf Gleichung (4) wäre ein Datensatz bestehend aus drei Messungen ausreichend, um vollständig bestimmt zu sein. Aufgrund der nichtlinearen Anpassung des Retentionsmodells an die experimentellen Daten ist davon auszugehen, dass ein Datensatz mit drei Messungen nicht ausreicht, um den Fit durchzuführen. Diese Problematik soll anhand von Abbildung 2-10 verdeutlicht werden. Der Vergleich zwischen den vorhergesagten und den experimentell bestimmten Retentionszeiten in Abbildung 2-10 a basiert auf einem Fit, für den vier Datensätze verwendet wurden. Dabei wird deutlich, dass sehr große Abweichungen zwischen den experimentellen und simulierten Retentionszeiten der Modellanalyten von mehreren 1000 Minuten berechnet werden. Der Grund dafür ist, dass die Anpassung auf Basis von nur vier Messungen nicht gelingt und der Fit nicht konvergiert. Dieses Verhalten wird wie erwartet auch bei einer weiteren Reduzierung des verwendeten Datensatzes auf drei Messungen beobachtet, wie in Abbildung 2-10 b dargestellt.

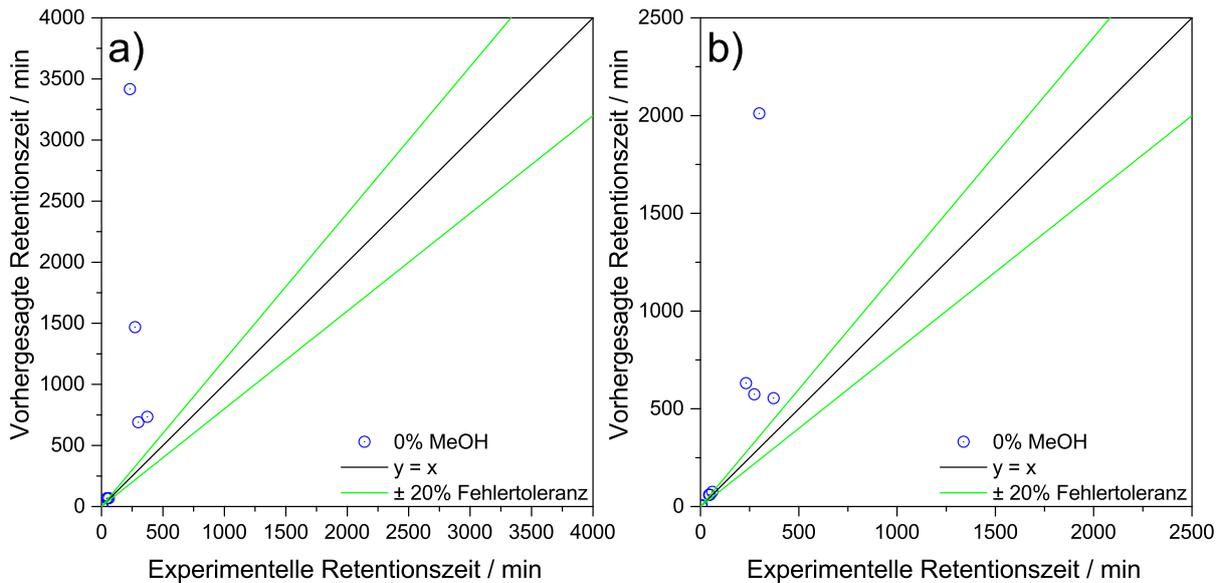


Abbildung 2-10: Vergleich zwischen vorhergesagten Retentionszeiten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Modellanalyten für eine wässrige mobile Phase. Berechnungen basieren auf Lösungsmittelgradienten von 2 % bis 100 % mit Steigungen von a) 9,8 % B min⁻¹, 3,26 % B min⁻¹, 1,63 % B min⁻¹ und 1,09 % B min⁻¹; b) 9,8 % B min⁻¹, 3,26 % B min⁻¹ und 1,63 % B min⁻¹. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (100 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) deionisiertes Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; Detektion: UV bei 254 nm.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das in Gleichung (4) dargestellte Retentionsmodell sehr gut geeignet ist, um Retentionsfaktoren für $\varphi = 0$ für unbekannte Komponenten zu berechnen. Dies gilt jedoch nur, wenn eine ausreichend große Anzahl von experimentellen Daten für den Fit zur Verfügung steht. Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Anwendung von Retentionsmodellen dazu genutzt werden kann, um abzuschätzen, ob eine unbekannte pharmazeutisch relevante Komponente der LC-FID Technik zugänglich ist. Dabei ist darauf zu achten, dass mindestens fünf Basisdatensätze zur Verfügung stehen, um sicher zu stellen, dass der Fit durchgeführt werden kann. Gleichzeitig wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass der Fit konvergiert und belastbare Retentionsvorhersagen liefert.

2.3.2 Ausblick

2.3.2.1 Polyparameter-Linear-Free-Energy Relationship

Eine weitere Alternative zur Abschätzung der Hydrophobizität unbekannter Verbindungen stellen so genannte „Polyparameter – Linear Free Energy Relationships (pp-LFERs)“ dar. Diese Beziehungen werden genutzt, um die Verteilung umweltrelevanter Komponenten in unterschiedlichen Matrices zu untersuchen und zu beschreiben. Hier hat sich das Modell von Abraham et al. bewährt, das auch zunehmend in der Flüssigkeitschromatographie angewendet wird [15]. In diesem Modell werden verschiedene Wechselwirkungen zwischen den Lösemitteln und der gelösten Komponente durch je einen Parameter für das Solventenpaar und den gelösten Stoff als superpositionierbare Beiträge zur Gibbs'schen Freien Enthalpie beschrieben. Die Parameter können über verschiedene experimentelle und theoretische sowie computergestützte, statistische Verfahren bestimmt werden und gestatten anschließend die Berechnung von Verteilungskonstanten wie beispielsweise einem Retentionsfaktor. Die Berechnung erfolgt gemäß Gleichung (5).

$$\log K = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (5)$$

Darin sind K der Verteilungskoeffizient, E beschreibt die Exzess-Molrefraktion, S ist ein Dipolaritäts- bzw. Polaritätsparameter, A beschreibt die Azidität der Wasserstoffbrücken, B die Basizität der Wasserstoffbrücken, V das Molekülvolumen nach McGowan, C ist die Regressionskonstante und die Parameter e, s, a, b, v sind Säulenparameter.

Die Abraham-Parameter sind für viele tausend Substanzen tabelliert und können unter anderem über eine Internetseite abgerufen werden [16]. Das Modell hat jedoch den Nachteil, dass ionische Wechselwirkungen der Substanzen nicht erfasst werden. In diesem Zusammenhang gibt es jedoch Erweiterungen des Modells. Gleichung (5) wird dann um konstante Korrekturterme, zum Beispiel für Carbonsäuren oder pH und pK_s -abhängige δ -Terme erweitert. Wenn das Abraham-Modell auf die HPLC angewendet wird, beschreiben die großgeschriebenen Parameter in Gleichung (5) nicht mehr ein Lösemittelpaar, sondern stattdessen das Paar stationäre und mobile Phase und K wird mit dem Retentionsfaktor assoziiert. Die Säulenparameter (e, s, a, b, v) sind von den chromatografischen Bedingungen abhängig und können über eine multilineare Regression mit den Abraham-Deskriptoren als Prediktorvariablen bestimmt werden. Die Anwendung dieses Modells war innerhalb des Projektes nicht mehr möglich, da ein weitaus größerer Datensatz verwendet werden muss. Es muss auch

kritisch hinterfragt werden, inwieweit das Abraham-Modell für die im Rahmen des Projektes zu bearbeitende Fragestellung wirklich geeignet ist.

2.4 Entwicklung eines Interface für die LC-FID-Kopplung

Die Entwicklung des Interface orientiert sich im Wesentlichen an den aus der ICP bekannten Meinhard Zerstäuber, welche mit Flüssen von $F_{\text{Mobil}} = 5$ bis $50 \mu\text{L min}^{-1}$ und einem Gasfluss von 1 mL min^{-1} arbeiten. Der Korpus sowie die innere Transferkapillare dieser Zerstäuber sind üblicherweise aus Glas gefertigt, die innere Kapillare ist fest mit dem Korpus verbunden. Bei der Entwicklung der hier vorgestellten LC-FID-Kopplung wurde versucht, durch eigene Modifikationen einen robusten Zerstäuber mit geringem Gasfluss zu entwickeln, der durch einfache Handhabung an verschiedene Flussbereiche angepasst werden kann. Die Verwendung von Stahl für den Korpus hat den Vorteil, dass der Stahlkörper gegenüber Hitze unempfindlicher ist. Für die Transferkapillare wurde zunächst Fused Silica verwendet. Dieses Material war jedoch ungeeignet, da die Kapillaren während der Entwicklungstests aufgrund von Auskristallisation durch Silikate blockierten.

Um Gasmenge und mobile Phase besser variieren zu können, wurde der Korpus so konzipiert, dass Düsen mit verschiedenen Innendurchmessern verwendet werden können. Die Verschraubung am unteren Ende des Zerstäubers ermöglicht das Austauschen der inneren Transferkapillare. Dies ist notwendig, da je nach Volumen der mobilen Phase verschiedene Kapillaren verwendet und im Fall eines Verstopfens der Kapillare, diese schnell und kostengünstig ausgetauscht werden können.

Die Düsen des Zerstäubers wurden in den in Tabelle 2-5 gelisteten Größen angefertigt und getestet. Die inneren Kapillaren wurden ebenfalls entsprechend der Düsenöffnung ausgewählt und besaßen einen um ca. $0,02 \text{ mm}$ geringeren Durchmesser als die Düse. Der notwendige Minimalgasfluss zum Zerstäuben wurde bei einer Flussrate von $100 \mu\text{L min}^{-1}$ visuell durchgeführt. Unter Berücksichtigung der maximalen Flussrate für Flammenionisationsdetektoren wurde die Düse mit einem Durchmesser von $0,3 \text{ mm}$ und einem Zerstäubergasfluss von 200 mL min^{-1} gewählt. Das zur Kopplung verwendete Interface ist in Abbildung 2-11 dargestellt und hat die in Tabelle 2-6 aufgeführten Dimensionen.

Tabelle 2-5: Übersicht der gefertigten Düsenöffnungen und der korrespondierenden Gasflussrate.

Düsenöffnung in mm	1	0,7	0,3
Gasfluss in L min^{-1}	3	1	0,2

Die ebenfalls in der ICP zum Einsatz kommenden Microflow Zerstäuber, wie in den Arbeiten von Young et al. [17,18] verwendet, wurden für die Tests nicht berücksichtigt, da diese aus Polymermaterialien bestehen und lediglich Temperaturen bis $250 \text{ }^\circ\text{C}$ aushalten.

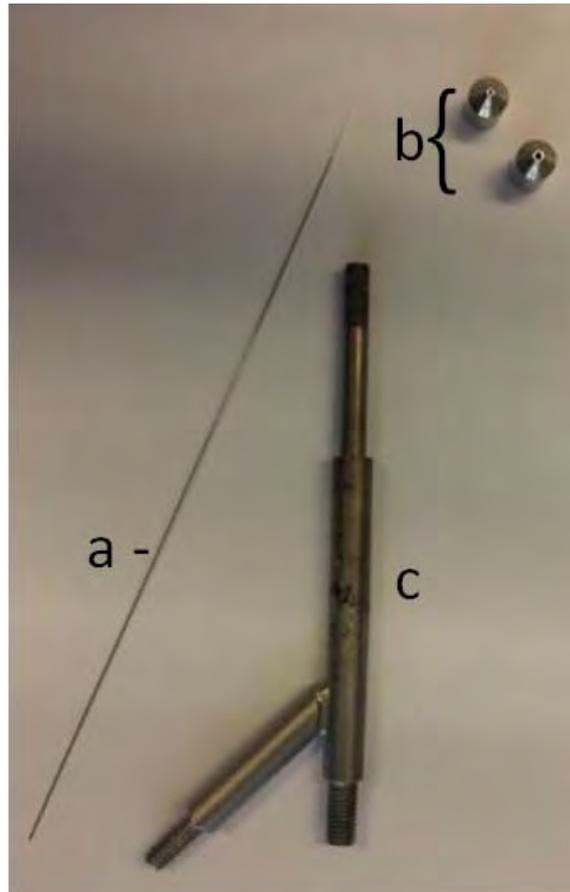
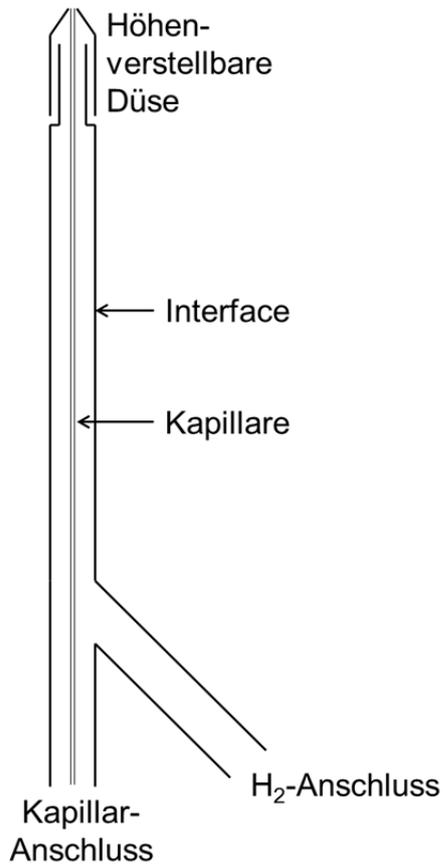


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung (links) und Bild des entwickelten Interfaces (rechts). a) Innere Transferkapillare, b) Düsen, c) Zerstäuberkorpus.

Tabelle 2-6: Abmessungen des Interfaces [19].

Interface	
Länge	100 mm
Außendurchmesser	6 mm (4 - 6,25 mm)
Innendurchmesser	1 mm (1,5 – 2 mm)
Austrittsöffnung der Düse	0,3 mm

Durch den unteren Anschluss wird die Transferkapillare von der HPLC kommend eingeführt und mit seitlich zugeführtem Wasserstoff umspült. Das Ende der Kapillare wird planar in der Spitze des Interfaces positioniert. Durch eine Verengung an dieser Spitze wird der Wasserstoff dicht an der Kapillare vorbeigeleitet und beschleunigt. Der so entstehende Gasstrom zerstäubt die mobile Phase sowie den darin gelösten Analyten und transportiert ihn in die Flamme. Das Interface wird direkt in die Basis des FID eingebaut und ersetzt die ursprüngliche FID-Düse (siehe Abbildung 2-12).

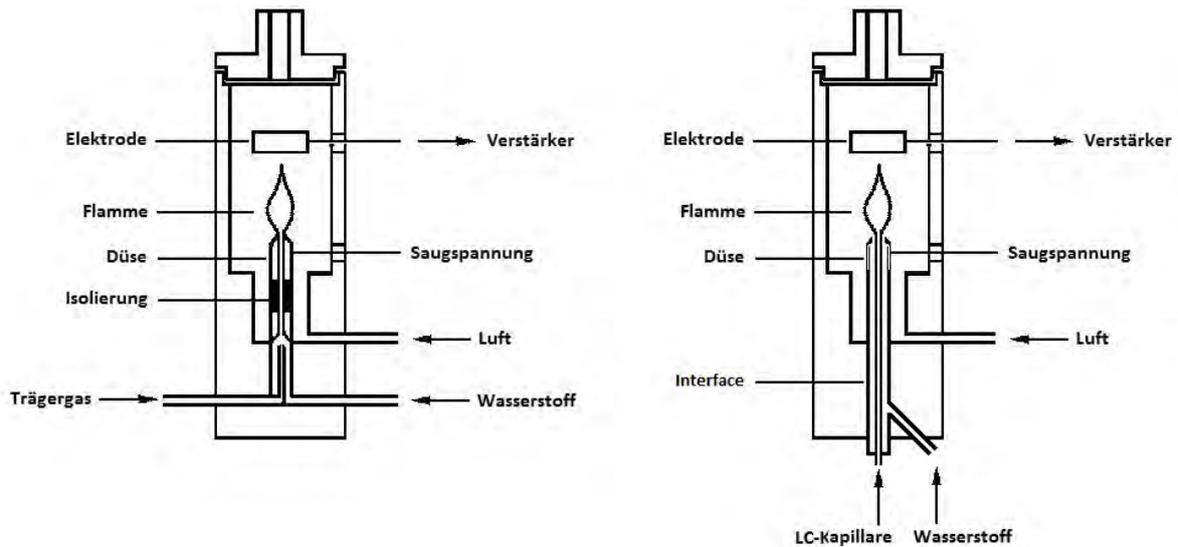


Abbildung 2-12: Prinzipieller Aufbau eines konventionellen FID, wie er in der Gaschromatografie eingesetzt wird (links), und dem für die LC-FID Kopplung modifizierten FID-Interface (rechts) – in Anlehnung an Referenz [19].

Essentiell für die Erzeugung eines Nebels unter Vermeidung großer Tropfen ist die Präparation der inneren Kapillare. Der Innendurchmesser der Kapillare beträgt 0,16 mm, der Außendurchmesser 0,32 mm. Am Kopf der Kapillare muss der Außendurchmesser konisch auf 0,28 mm verjüngt werden, um ein gleichmäßiges und kontinuierliches Versprühen des Eluenten bei Flüssen von 10 bis 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ zu gewährleisten.

Um die Zerstäubereffizienz bzw. die Scherkräfte am Kapillarausgang zu erhöhen, war ein konischer Abschluss der Kapillare notwendig. Da dies bei Kapillaren dieser Größe auf rein mechanische Weise wie beispielsweise Schleifen nicht möglich ist, musste auf elektrochemisches Pulspolieren (pulse electrochemical polishing - PECP) als Methode der Wahl zurückgegriffen werden. Die genauen Versuchsparameter finden sich im Anhang in Kapitel 5.3.

Die Veränderung der schrittweisen Modifikation von Anfangskapillare, verjüngter Kapillare und konischer Kapillare sind in Abbildung 2-13 a bis c dargestellt.

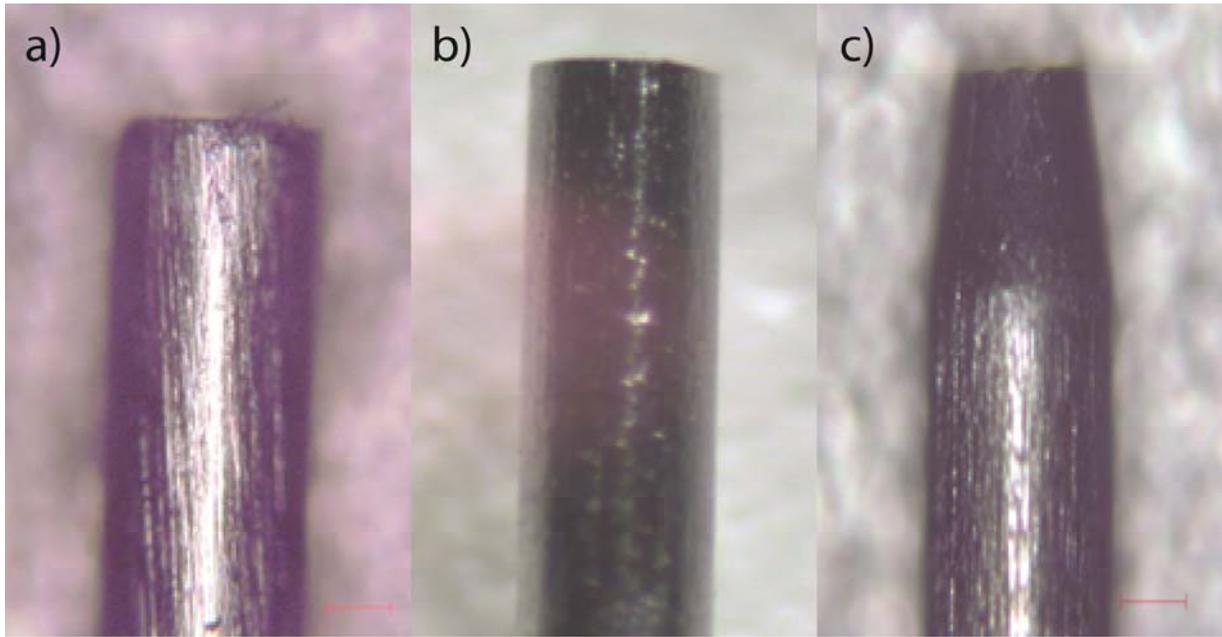


Abbildung 2-13: a) Edestahlkapillare vor Polierung; b) frühes Stadium der Polierung 1; c) finale konische Spitze nach Polierung.

2.4.1 Evaluierung und Optimierung des Interface

2.4.1.1 Ermittlung der Zerstäuber-/ FID-Betriebstemperatur

Um die maximale Nachweisempfindlichkeit der Flammen-Ionisationsdetektion zu erreichen, war es zunächst erforderlich, die einzelnen Parameter des FID systematisch zu untersuchen, um die optimalen Einstellungen für eine Kopplung mit der Flüssigkeitschromatografie zu erzielen. Die Optimierung erfolgte im Hinblick auf die Maximierung des Signal-zu-Rausch (S/N)-Verhältnisses von Koffein als Modells substanz. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis beschreibt die Qualität des Analytsignals und ist der Quotient aus der maximalen Peakhöhe und dem mittleren Basisliniensignal. Ein entscheidender LC-FID-Parameter ist die Zerstäubertemperatur, welche in einem Temperaturbereich von 225 °C bis 350 °C untersucht wurde. Die Temperatur des Kapillarjet ist ein entscheidender Faktor, da die Temperatur mit zunehmender Flussrate der mobilen Phase erhöht werden muss, um ein adäquates Verdampfen zu gewährleisten. Dazu ist in Abbildung 2-14 das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des in diesem Projekt entwickelten LC-FID-Interfaces für den betrachteten Temperaturbereich dargestellt. Hier wird deutlich, dass es bei Temperaturen über bzw. unter 275 °C zu einer Abnahme des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um ca. 50 % kommt.

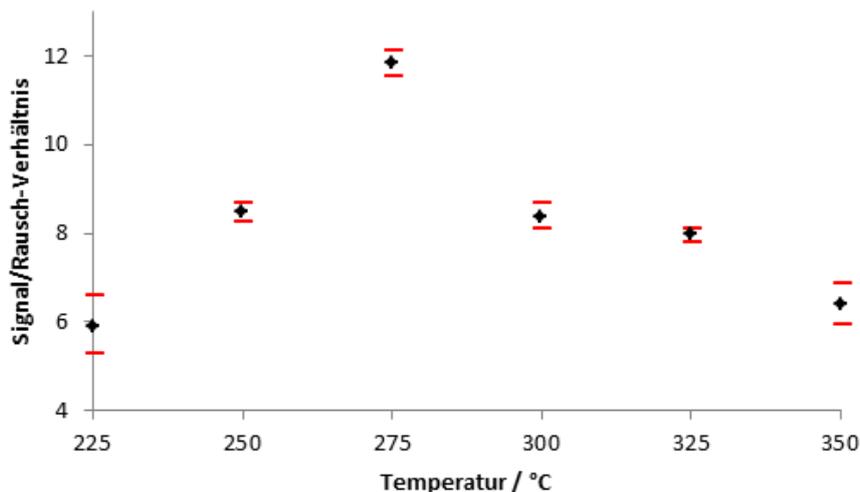


Abbildung 2-14: Darstellung des Einflusses der FID-Zerstäubertemperatur auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis $c(\text{Koffein}) = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{Air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: Fließinjektionsanalyse; mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: $100 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$.

Für den Temperaturbereich $\leq 275 \text{ °C}$ ist dies auf eine unvollständig ausgebildete Wasserdampfwolke zurückzuführen. Die wässrige mobile Phase kommt hierbei nur teilweise in verdampfter Form aus der Transferkapillare und die Ansammlung von mobiler Phase an der

Zerstäuberspitze führt zum gelegentlichen Ablösen von Wassertropfen am oberen Ende der Transferkapillare (Abbildung 2-15), welche auf das Detektorrohr prallen.

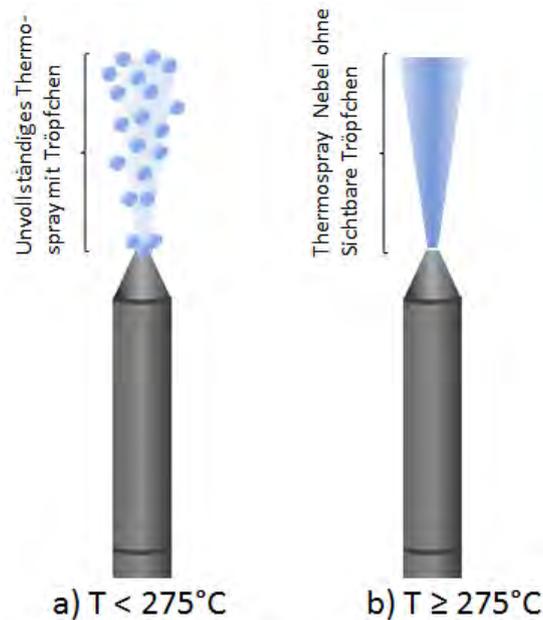


Abbildung 2-15: Visualisierung des Zerstäubernebel bzw. Thermospray a) mit Bildung von Tröpfchen, die im weiteren Verlauf auf den Detektor prallen und so Störsignale verursachen und b) ohne Tröpfchenbildung.

Die hierbei erzeugten Spannungsschwankungen erzeugen Spikes, welche zu einer deutlichen Minderung des S/N-Verhältnisses führen. Die Erhöhung der Temperatur auf 275°C führte zu einer Stabilisierung des Thermosprays, wodurch eine Reduktion der Spikes und damit eine Erhöhung des S/N-Verhältnisses erzielt wurde. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit denen von Guillaume et al. publizierten Daten, welche eine Erhöhung des S/N-Verhältnisses bei Kapillartemperaturen größer 275°C zeigen [20]. Die von Ingelse et al. [21] beschriebene inkrementelle Zunahme des Signals bei FID-Temperaturen $\geq 300^\circ\text{C}$ ist für das entwickelte LC-FID-Interface nicht beobachtet worden. Temperaturen $\geq 275^\circ\text{C}$ führten gegenteilig zu einer starken Fluktuation der Basislinie und einer deutlichen Reduktion des S/N-Verhältnisses (siehe Abbildung 2-16).

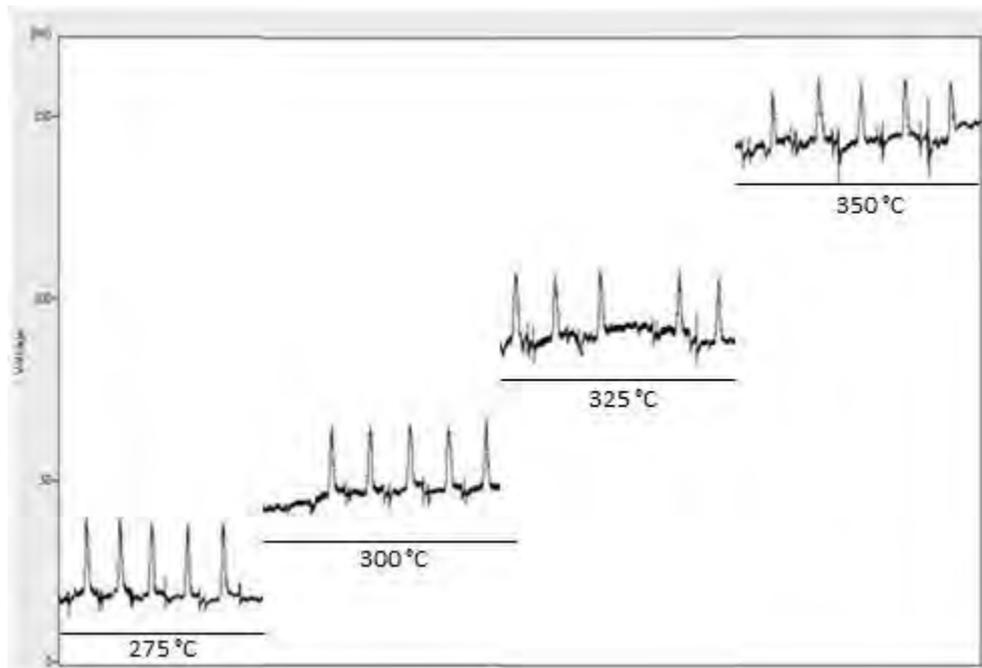


Abbildung 2-16: Zunahme der Basislinienfluktuation und deren Auswirkung auf das Signal/Rausch-Verhältnis im Temperaturbereich von 275 °C bis 350 °C. LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Coffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: 0,1 mL min⁻¹; Injektionsvolumen: 2 µL.

Im Vergleich zu den Messungen bei 275 °C konnte ein temperaturbedingter Anstieg der Basislinie von ca. 40 mV bei 300 °C, 80 mV bei 325 °C auf 140 mV bei 350 °C beobachtet werden. Die Abnahme des detektierten Signals und gleichzeitige Zunahme des Rauschens der Basislinie ist auf die inkrementelle Erhöhung der Temperatur zurückzuführen. Dies bewirkt, dass der Detektor zum einen unempfindlicher für Analytionen wird und erklärt die Abnahme des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (siehe Abbildung 2-14).

Die weitere Optimierung der FID-Einstellungen wurde bei einer Temperatur von 275 °C durchgeführt.

2.4.1.2 Bestimmung des optimalen Wasserstoffflusses

Im Anschluss an die Optimierung der FID-Zerstäubertemperatur wurden systematische Untersuchungen zum Einfluss der Wasserstoffflussrate durchgeführt. In der Vergangenheit wurde von den einzelnen Arbeitsgruppen ein Verhältnis der Flussraten der mobilen Phase und Wasserstoff von 1:1000 ($F_{\text{mobil}}:F_{\text{H}_2}$) für den Betrieb der Kapillar-LC-FID Kopplung gewählt. Eine Ausnahme stellt lediglich die mit flüssigem Kohlenstoffdioxid arbeitende SFC-FID-Kopplung von u. a. Chester [22] und Rawdon [23] dar sowie die von Veening et al. [24] aufgegriffene Methode der Kopplung mittels eines Moving Wire Interface. Bei letzterer ist ein Wasserstofffluss von 35 mL min⁻¹ ausreichend, da der Analyt nicht direkt mit der mobilen

Phase in den Detektor gelangt, sondern die mobile Phase im Vorfeld durch einen Ofen verdampft wird [24].

Tabelle 2-7: Kopplungen von SFC und LC mit Flammen-Ionisationsdetektoren.

Jahr	Author	Kopplung	F_{Mobil} ($\mu\text{L min}^{-1}$)	$F_{\text{Wasserstoff}}$ (mL min^{-1})	Verhältnis $F_{\text{H}_2} / F_{\text{mobil}}$
1984	Chester	SFC-Kapillar-FID	-	-	-
1984	Rawdon	SFC-Kapillar-FID	700 ^{*1}	120	170
1986	Veening et al.	Moving Wire	60-100	35	- ^{*2}
1997	Miller et al.	Kapillar-FID	20 - 200	20-300	1000-1500
1998	Ingelse et al.	Kapillar-FID	50 - 100	100	1000-2000
1999	Quigley et al.	Drop Interface	10	30	3
2000	Hooijschuur et al.	Eluent Jet/FID	10		-
2005	Guillarme et al.	Kapillar-FID	20-100	40-100	1-2
2012	Young et al.	Nebulizer/Spray Chamber	160	147	0,9

^{*1} mobile Phase CO_2

^{*2} Lösungsmittel wird verdampft, daher kann das Verhältnis nicht angegeben werden.

Das hier entwickelte Interface ist so konzipiert worden, dass es mit einem Wasserstofffluss $\leq 100 \text{ mL min}^{-1}$ betrieben werden kann. Dies lässt sich dadurch begründen, dass konventionelle GC-FID Systeme in der Regel mit H_2 Massendurchflussreglern ausgerüstet werden, die in der Lage sind, einen maximalen Wasserstofffluss von 100 mL min^{-1} zu regulieren. Hintergrund ist, dass höhere Wasserstoffflussraten bei der konventionellen GC-FID Kopplung in der Regel nicht erforderlich sind. Um höhere Wasserstoffflussraten im Rahmen der Optimierung zu untersuchen, wurde der FID mit einem externen Massendurchflussregler der Firma Brook ausgerüstet und direkt mit dem entwickelten Interface verbunden. Im Rahmen der Op-

timierung der Wasserstoffflussrate wurde ein Bereich von 50 mL min^{-1} bis 200 mL min^{-1} untersucht.

Die Anwendung höherer Wasserstoffflussraten ($F_{\text{Wasserstoff}} \geq 100 \text{ mL min}^{-1}$) führt dazu, dass sich der Detektor auf über 350 °C aufheizt, was zu einer Reduzierung der Empfindlichkeit führt. Da mit zunehmender Temperatur die spezifische Leitfähigkeit des Metalls der FID-Elektrode (siehe Abbildung 2-12) deutlich reduziert wird, nimmt die Signalintensität der während der Pyrolyse erzeugten Ionen ab. Zudem kann der durch die Wasserstoffflamme erhitzte FID-Kollektor die erzeugte Wärme nicht schnell genug abgeben, sodass es zu Fluktuationen der Basislinie kommt, welche das S/N-Verhältnis reduziert. In Abbildung 2-17 ist die Abnahme des S/N-Verhältnisses durch die Steigerung des Wasserstoffflusses von 150 mL min^{-1} auf 200 mL min^{-1} gezeigt.

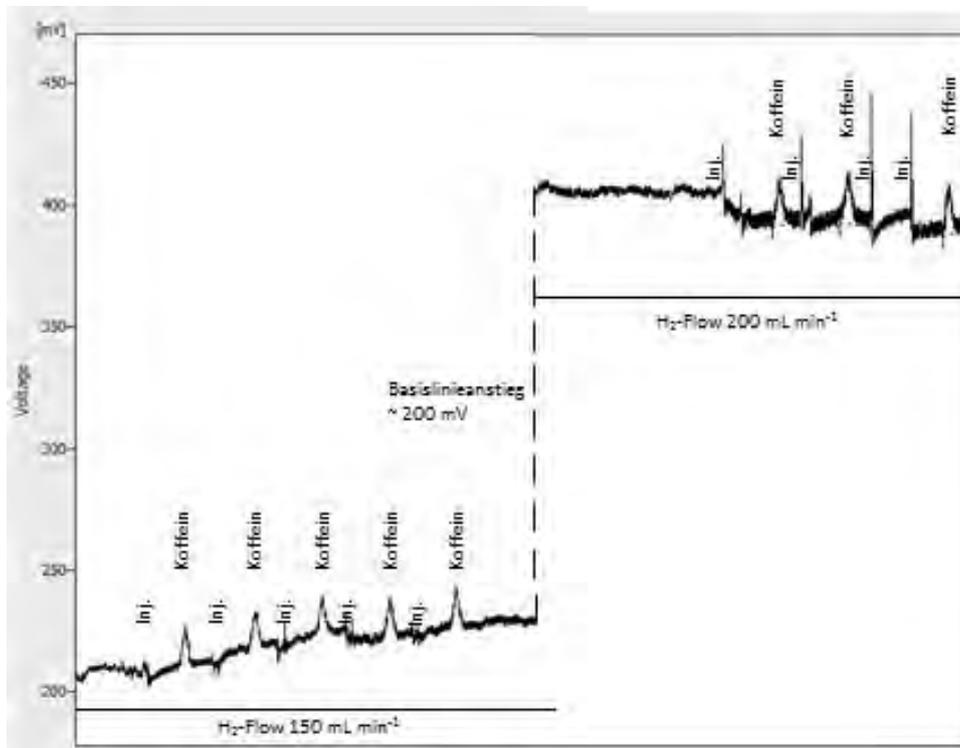


Abbildung 2-17: Einfluss des Wasserstoffflusses auf die Signalintensität. Dargestellt sind der durch einen Wasserstofffluss von 200 mL min^{-1} verursachte Anstieg der Basislinie von ca. 210 mV auf 410 mV , sowie die Injektionspeaks bei dem Schalten des Injektors und die Koffeinpeaks. LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Koffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der direkt mit der Wasserstoffflussrate und der dadurch generierten Temperatur beachtet werden muss, ist das verwendete Material der Abstandshalter und Dichtringe innerhalb des FID. Bei dem im Rahmen dieses Projektes verwendeten DANI Master GC bestehen diese Dichtungen und Abstandshalter aus Teflon und weisen eine Temperaturbeständigkeit von ca. 250 °C auf. Bei der bereits erwähnten inadäquaten Wärmeableitung kommt es daher zum Schmelzen dieser Abstandshalter bzw. Dichtringe, was zu

einem Defekt der Geräte führen kann. Um dies zu vermeiden, ist es notwendig, einen Gasfluss $< 200 \text{ mL min}^{-1}$ einzustellen.

Die Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses von der Wasserstoffflussrate ist in Abbildung 2-18 grafisch dargestellt. Hier wird deutlich, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um ca. 75 % von 50 mL min^{-1} bis 200 mL min^{-1} abnimmt. Die optimale Wasserstoffflussrate lag bei $F_{\text{Wasserstoff}} = 50 \text{ mL min}^{-1}$ mit einem S/N-Verhältnis von ~ 12 . Bei Betrachtung der kontinuierlichen Zunahme des S/N-Verhältnisses mit abnehmendem H_2 -Fluss lässt dies die Annahme zu, dass das Optimum bei dem betrachteten H_2 -Fluss von 50 mL min^{-1} noch nicht erreicht ist, daher wurden im Rahmen der Optimierung ebenfalls H_2 -Flüsse $< 50 \text{ mL min}^{-1}$ verwendet. Hierbei wurde jedoch festgestellt, dass ein Zünden des FID nicht mehr möglich ist.

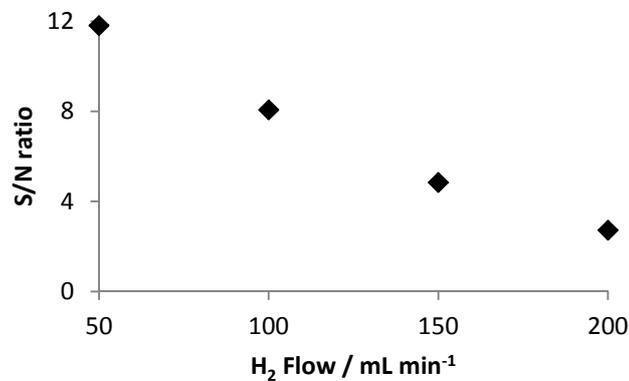


Abbildung 2-18: Einfluss des Wasserstoffflusses auf das Signal/Rausch-Verhältnis im Bereich von 50 mL min^{-1} bis 200 mL min^{-1} . LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Koffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$.

Die Betrachtung der für die LC-FID-Analyse publizierten Werte in Tabelle 2-7 verdeutlicht, dass das im Rahmen des Projektes entwickelte LC-FID-Interface mit einem H_2 -Fluss von 100 mL min^{-1} einen um 30 % geringeren Verbrauch aufweist, als die zurzeit verwendeten Kapillar-Jet Kopplungen [25] oder die von Young et al. in 2012 vorgestellte Nebulizer/Spray Chamber [17,18].

2.4.1.3 Bestimmung des optimalen Make-up Gasflusses

Wie in Abschnitt 2.4.1.2 beschrieben, führen hohe Wasserstoffflussraten ($\geq 100 \text{ mL min}^{-1}$) zu einem Aufheizen des FID-Interface. Zur Reduzierung der Wärmeentwicklung als auch zur Kühlung und Stabilisierung der Flamme, wurde der Einfluss von Stickstoff als Make-up Gas auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis untersucht. Abbildung 2-19 zeigt die Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses von der Stickstoffflussrate. Hier wird deutlich, dass die Verwendung von Stickstoff als Make-up Gas keine signifikante Verbesserung des S/N-Verhältnisses bewirkt, da dieses mit zunehmendem Stickstofffluss sinkt.

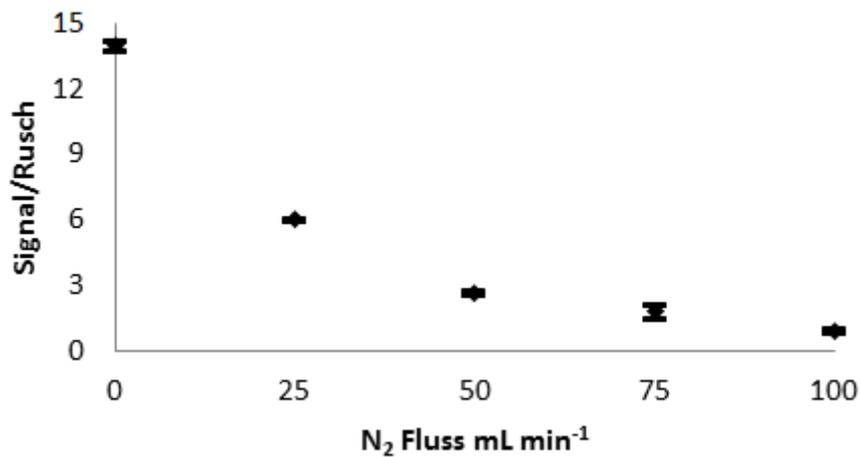


Abbildung 2-19: Einfluss von Make-up Gas auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Bereich von 0 mL min^{-1} bis 100 mL min^{-1} . LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Koffein als Testsubstanz. Mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $2 \mu\text{L}$.

Basierend auf den in Abbildung 2-19 dargestellten Ergebnissen wurde im weiteren Verlauf der Arbeiten auf die Anwendung von Stickstoff als Make-up Gas verzichtet.

2.4.2 Optimierung und Evaluierung des entwickelten Interface für den Nano-Flussbereich

2.4.2.1 Vergleich der Nachweisempfindlichkeit bei Verwendung der Original-FID-Düse und dem entwickelten Interface

Neben der herkömmlichen HPLC wurde ein Nano-LC-System der Firma Eksigent für die Kopplung mit dem FID im Nano-Flussbereich verwendet. Zur Kopplung der Nano-HPLC und des FID wurde zunächst das in Abschnitt 2.4 entwickelte Interface genutzt. Im Vergleich zur Kapillar-LC-FID Kopplung ist es für den Nano-Flussbereich nicht möglich, die elektrochemisch behandelte Interface-Nadel aus Edelstahl zu verwenden. Der Innendurchmesser dieser Nadeln ist mit 160 μm zu groß, sodass es bei Anwendung im Nano-Flussbereich zu einer nicht akzeptablen Verbreiterung der Peakbanden kommt. Darüber hinaus war es im Rahmen des Projektes nicht möglich, Edelstahl-Interface-Nadeln mit einem Innendurchmesser $\leq 50 \mu\text{m}$ anzufertigen. Vor diesem Hintergrund wurden als Interface-Nadeln zum Zerstäuben der mobilen Phase Fused Silica Kapillaren mit einem Innendurchmesser zwischen 10 μm und 75 μm und einem Außendurchmesser von 280 μm genutzt.

Aufgrund der geringen Flussraten von weniger als 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ ist es trotz der Volumenexpansion der verdampfenden mobilen Phase möglich, Gasströme zu erreichen, die im Bereich der konventionellen Kapillar-GC-FID Kopplung zwischen 1 mL min^{-1} und 2 mL min^{-1} Trägergasstrom liegen. Vor diesem Hintergrund sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob im Low-Flow-Bereich eine direkte Kopplung der HPLC-Trennsäule mit der Originaldüse des FID möglich ist. Dazu wurde der in Abbildung 2-20 dargestellte Systemaufbau realisiert. Der in Reihe geschaltete UV-Detektor sollte zunächst dazu genutzt werden, Systemfehler leichter zu erkennen. Für den Vergleich des Interfaces und der Original-FID-Düse wurde ebenfalls Koffein als Modellsubstanz verwendet.

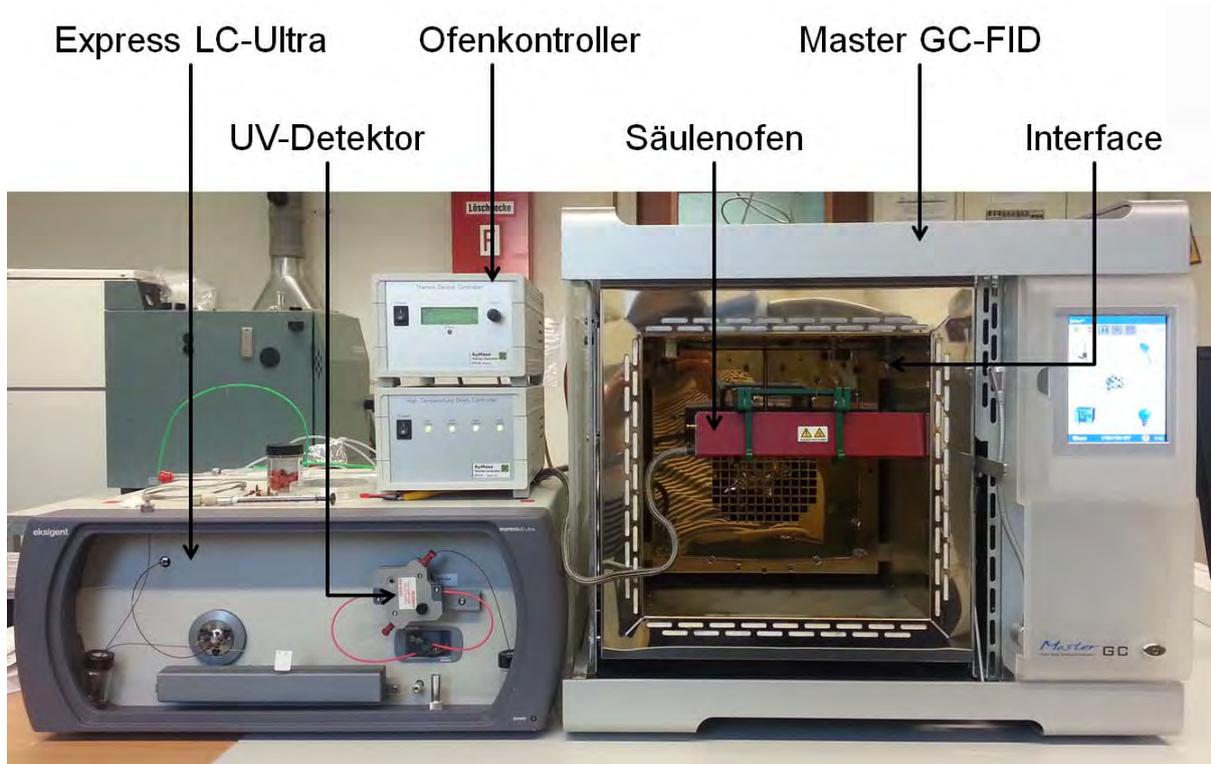


Abbildung 2-20: Versuchsaufbau der Nano-HPLC-FID-Kopplung.

Zunächst wurde die Nachweisgrenze von Koffein über das Signal-Rausch-Verhältnis von drei zu eins bestimmt. Als Rauschen wird dabei die Differenz zwischen Minimum und Maximum der Basislinie definiert. Tabelle 2-8 zeigt den Vergleich der relevanten Daten für die Messung mit dem Interface und der Original-FID-Düse.

Tabelle 2-8: Experimentelle Parameter zur Ermittlung der Nachweisgrenze von Koffein mittels FID mit und ohne Interface.

Parameter	Interface	Original-FID-Düse
Konzentration der Koffein-Lösung	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Peakhöhe	~ 6,7 mV	~ 7,5 mV
Rauschen	~ 1,0 mV	~ 0,5 mV
Nachweisgrenze (bei 50 nL Injektionsvolumen)	225 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Nachweisgrenze (absolut)	11 ng	5 ng

Anhand der in Tabelle 2-8 aufgeführten Daten wird ersichtlich, dass eine um den Faktor 2,2 geringere Nachweisgrenze für Koffein resultiert, wenn die Original-FID-Düse verwendet wird. Darüber hinaus ist auch das Rauschen deutlich reduziert. Somit stellt die Verwendung des Interfaces für den Low-Flow-Bereich keinen Vorteil gegenüber der Original-FID-Düse dar.

Aufgrund der signifikant besseren Nachweisempfindlichkeit wurde die Original-FID-Düse für alle weiteren Arbeiten im Nano-Flussbereich verwendet. Da sich mit der Original-FID-Düse auch die Handhabung erheblich vereinfacht, wurde das Interface in allen weiteren Experimenten in Verbindung mit der Nano-LC nicht mehr verwendet.

2.4.2.2 Optimierung der Betriebsparameter

Analog zur Optimierung der FID-Parameter für den Kapillar-Flussbereich (siehe Abschnitt 2.4.1), erfolgte die Optimierung dieser Parameter für die Anwendung im Nano-Flussbereich. Unabhängig davon, ob das entwickelte Interface oder die Original-Düse verwendet wurde, stellte die Stabilität der FID-Flamme ein großes Problem dar. Zum einen ging die Flamme bei speziellen Betriebsparametern scheinbar willkürlich aus, zum anderen kam es bei unterschiedlichen Einstellungen zum „Ploppen“. Hierbei handelt es sich um das schnelle, konsekutive Aus- und Wiederangehen der FID-Flamme. Dabei wird diese durch die verdampfende mobile Phase vermutlich entweder sehr stark abgekühlt, wodurch die Flamme nahezu ausgeht, oder der sich ausdehnende Wasserdampf verdrängt kurzzeitig das Brenngas der Flamme. Hierbei könnte es sich auch um eine Art Siedeverzug in der Kapillare handeln. Zur Untersuchung dieser Problematik wurde in Abhängigkeit des Innendurchmessers der Transferkapillare, der Flussrate der mobilen Phase als auch der Temperatur der Basis des Detektors, die Stabilität der FID-Flamme evaluiert. Die Auswertung dieser Versuchsreihe zeigte, dass es keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen der Stabilität der FID-Flamme und den oben beschriebenen Parametern gibt. Weiterführende Informationen zu dieser Thematik sind im Anhang in Abschnitt 5.3 aufgeführt.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Position der Transferkapillare im Flammen-Ionisationsdetektor die Stabilität der FID-Flamme definiert. Vor diesem Hintergrund wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Kapillare kontinuierlich um jeweils 1 mm nach unten von der Düsenöffnung positioniert wurde. Eine stabile Flamme wird erhalten, wenn die Transferkapillare circa 7 mm bis 10 mm unterhalb der FID-Düse positioniert wird. Vergleichbare Bedingungen wurden von Miller et al. beschrieben [25]. Die Autoren dieser Studie erzielten ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei einer Einbautiefe von 30 mm. Ab einer Einbautiefe von 20 mm trat jedoch so starkes Rauschen auf, dass eine Messung nicht mehr möglich war. Miller et al. arbeiteten allerdings mit einer viel höheren Basistemperatur von 400 °C als in diesem Forschungsprojekt (275 °C) und einer Flussrate der mobilen Phase von 20 bis 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ [25]. Im Vergleich hierzu betrug die Flussrate in den eigenen Experimenten 0,5 bis 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Tabelle 2-9 stellt die Einbautiefen anderer Arbeitsgruppen gegenüber und gibt eine Übersicht über die jeweils verwendeten Versuchsparameter.

Tabelle 2-9: Vergleich der Einbautiefen der Kapillaren in der FID-Düse diverser Arbeitsgruppen.

Arbeitsgruppe	Einbautiefe in mm	LC-Fluss in $\mu\text{L min}^{-1}$	FID-Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Referenz
IUTA e. V.	7 - 10	0,5 - 10	275	-
Guillarme et al.	30 - 50	20 - 200	300 - 400	[20]
Hooijschuur et al.	30	20 - 50	k. A.	[26]
Ingelse et al.	20 - 30	50	400	[21]
Miller et al.	(10) 30	20 - 200	400	[25]
Wu et al.	30 - 35	10	≥ 390	[27]
Yarita et al.	30	10	k. A.	[28]

k. A.: keine Angabe

Im Zusammenhang mit der Optimierung der FID-Zerstäubertemperatur, der Wasserstoffflussrate und der Anwendung von Stickstoff als Make-up Gas wurden für den hier angewendeten Nano-Flussbereich nahezu identische optimale Einstellungen gefunden, wie bereits in Abschnitt 2.4.1 beschrieben.

2.5 Besondere Problemstellungen der Nano-HPLC-FID-Kopplung

2.5.1 Verstopfen der Fused-Silica Transferkapillare

In Abschnitt 2.4.2.1 wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Anwendung von elektrochemisch behandelten Edelstahlkapillaren als Zerstäuber-Nadeln für das entwickelte Interface im Nano-Flussbereich nicht möglich ist. Der große Innendurchmesser von 127 μm führt im Nano-Flussbereich zu einer nicht akzeptablen Verbreiterung der Peakbanden. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der Kopplung von Nano-HPLC und FID Fused Silica Transferkapillaren mit unterschiedlichen Innendurchmessern (10 μm bis 75 μm) genutzt. Diese stellen jedoch das gravierendste Problem bei der Nano-HPLC-FID Kopplung dar, weil sie bereits nach wenigen Betriebsstunden verstopfen. Die Verstopfung bildet sich dabei in dem Abschnitt der Kapillaren, der im Interface bzw. der FID-Düse steckt (vgl. Abschnitt 2.4). Die Verstopfung tritt, in Abhängigkeit einiger Faktoren, in regelmäßigen Abständen auf. Sowohl mit bloßem Auge (Abbildung 2-21) als auch unter dem Lichtmikroskop (Abbildung 2-22) ist die Verstopfung klar zu erkennen.



Abbildung 2-21: Foto einer verstopften Fused-Silica Kapillare (75 μm ID).

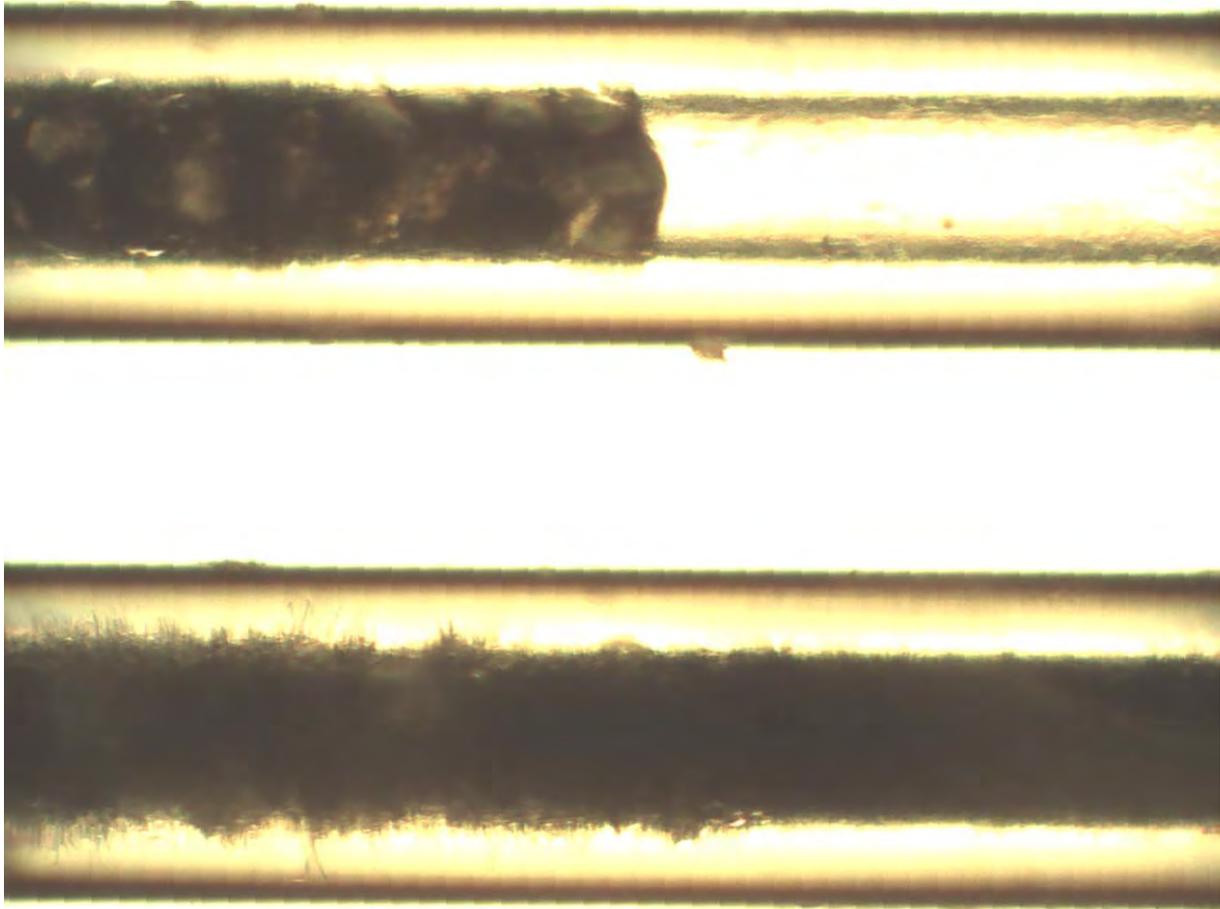


Abbildung 2-22: Verstopfung einer Fused-Silica Kapillare (75 μm ID) unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung. Aufgrund der Länge der Verstopfung ist nur der Abschnitt dargestellt, der zum Ende der Kapillare zeigt. Dort, in Richtung der FID-Flamme, ist klar zu erkennen, dass die Verstopfung innerhalb der Kapillare endet (oben).

Besonders hervorzuheben ist, dass die Verstopfung sogar in die Kapillarwand eingedrungen ist (Abbildung 2-22, unten links).

Darüber hinaus ist ungewöhnlich, dass die Kapillare nicht direkt am Ende verstopft, sondern einige Millimeter davon entfernt im Inneren. Dies legt nahe, dass die mobile Phase bereits innerhalb der Kapillaren verdampft und alle in der mobilen Phase gelösten Bestandteile, die nicht durch den Aggregatswechsel der mobilen Phase mit in die Flamme gerissen werden bzw. selber verdampfen, kurz vor dem Kapillarende auskristallisieren.

2.5.1.1 Raster-Elektronen-Mikroskopie mit integrierter Elementaranalyse

Da die Verstopfung der Fused-Silica Transferkapillare stets nach wenigen Betriebsstunden auftrat, wurde der verstopfte Kapillarbereich mit Hilfe eines Raster-Elektronen-Mikroskops (REM) mit integrierter energiedispersiver Röntgenspektroskopie-Einheit (EDX) zur Elementaranalyse weiterführend untersucht. Abbildung 2-23 zeigt REM-Aufnahmen einer durchgängigen frisch geschnittenen Kapillaren (Abbildung 2-23 a) im Vergleich zu der kristallinen Ver-

stopfung innerhalb der Transferkapillare mit unterschiedlichen Vergrößerungen (Abbildung 2-23 b, c, d). Anhand der abgebildeten Kristallstruktur der Verstopfung war es nicht möglich, nähere Informationen zu deren Herkunft abzuleiten.

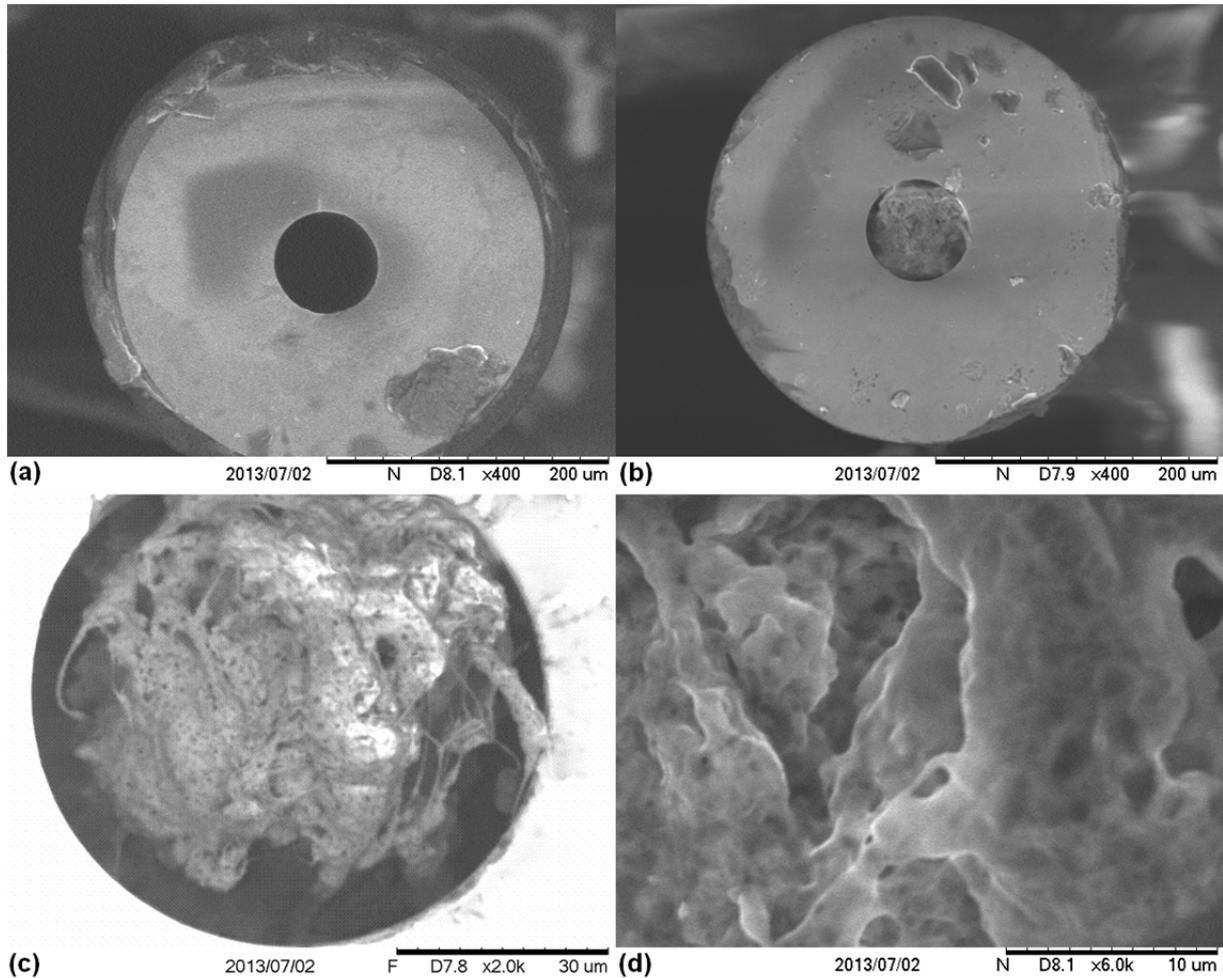


Abbildung 2-23: REM-Aufnahmen der Verstopfung. Es handelt sich hierbei um die Aufnahme des Querschnitts der Kapillare. In den beiden oberen Bildern ist der Vergleich zwischen einer freien (a) und einer verstopften (b) Fused-Silica-Kapillare zu sehen. In den beiden unteren Bildern ist die Verstopfung bei 2000-facher (c) und 6000-facher (d) Vergrößerung wiedergegeben.

In diesem Zusammenhang wurden während der REM-Aufnahmen auch Untersuchungen mittels EDX an verschiedenen Positionen des Kapillarquerschnittes und Eindringtiefen der Verstopfung durchgeführt. Neben Spuren von Kohlenstoff und Natrium wurden als einzige Hauptkomponenten Silizium und Sauerstoff identifiziert. Die korrespondierenden REM-EDX Aufnahmen sind in Abbildung 2-24 für die Hauptkomponenten Sauerstoff (Abbildung 2-24 a) und Silizium (Abbildung 2-24 b) dargestellt.

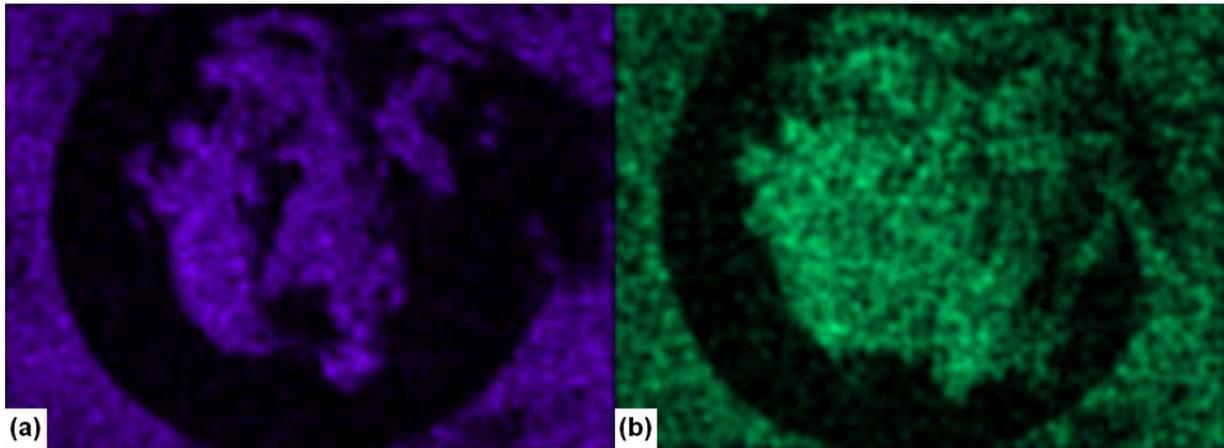


Abbildung 2-24: REM-EDX-Aufnahmen der Verstopfung bei 2000-facher Vergrößerung. Wieder ist der Querschnitt zu sehen, mit der Kapillare außen und der Verstopfung in der Mitte. a) ist Sauerstoff und b) Silizium.

Auf Grundlage der REM-EDX Aufnahmen ist die Schlussfolgerung zulässig, dass die Verstopfung der Transferkapillare aus Siliziumdioxid bzw. Kieselsäurederivaten besteht. Dies bedeutet, dass die mobile Phase Siliziumdioxid aus den verbauten Fused-Silica Kapillaren löst, welches am Punkt des Verdampfens der mobilen Phase in der Transferkapillare wieder auskristallisiert.

2.5.1.2 Maßnahmen zur Reduktion der Auskristallisation von gelöstem Siliziumdioxid

Um ein Auskristallisieren des gelösten Siliziumdioxids zu unterbinden bzw. die Menge zu reduzieren, wurden verschiedene HPLC- als auch Reinstwässer untersucht. Jedoch konnte das Verstopfen der Transferkapillare nach wenigen Betriebsstunden nicht verhindert werden. Auch die Einstellung eines sauren pH-Wertes der mobilen Phase, zur Reduzierung der Löslichkeit von Siliziumdioxid, konnte das Verstopfen der Kapillare nicht verhindern. Die Kapillare verstopfte bei allen verwendeten Reinstwässern. Weiterführende Informationen zur Untersuchung unterschiedlicher Wasserarten sind im Anhang in Abschnitt 5.5 aufgeführt.

Eine weitere Maßnahme bestand darin, den Innendurchmesser der Transferkapillare weiter zu reduzieren, um die mobile Phase am Ende der Transferkapillare aufgrund des resultierenden höheren Gegendrucks zu versprühen. Diese Maßnahme konnte das Verstopfen der Transferkapillare ebenfalls nicht verhindern.

2.5.2 Basislinienrauschen und Störpeaks (Spikes)

Bedingt durch den kontinuierlichen Prozess des Lösens und Auskristallisierens von Siliziumdioxid kommt es während des Betriebs der Nano-HPLC-Kopplung zu einem starken, nicht reproduzierbarem Rauschen der Basislinie als auch zur Ausbildung von Störpeaks (Spikes). Dies ist dadurch bedingt, dass das Siliziumdioxid nicht vollständig im Inneren der Kapillare abgeschieden und durch die verdampfende mobile Phase mit in die FID-Flamme gerissen wird. Dort führen die Partikel zu einem hohen, nicht reproduzierbarem Rauschen als auch zu Störpeaks, wie dies in Abbildung 2-25 dargestellt ist. Diese Störpeaks besitzen eine unterschiedliche Intensität und sind unter anderem ein Grund dafür, dass unter diesen Bedingungen keine gute Nachweis- und Bestimmungsgrenze auf Grundlage des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses resultiert.

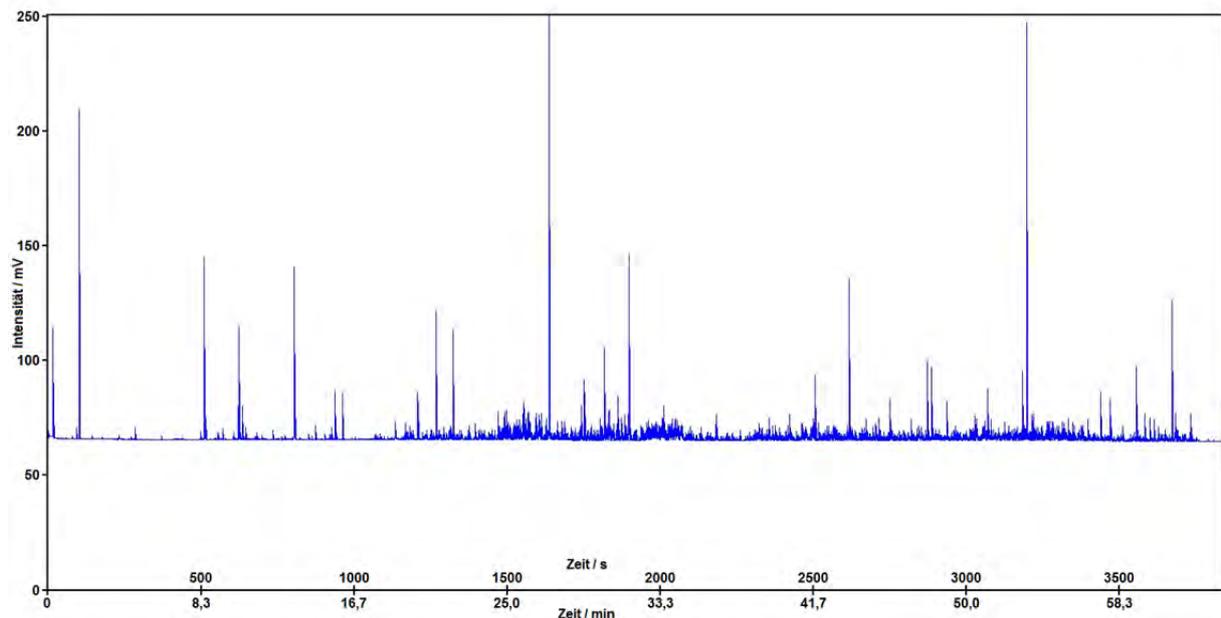


Abbildung 2-25: Aufzeichnung der verrauschten Basislinie des FID. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: $5 \mu\text{L min}^{-1}$; Säule: keine; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$, $450 \text{ mL min}^{-1} \text{ Luft}$; Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$.

Das Auftreten von Spikes bei gleichzeitig stark verrauschter Basislinie beeinflusst ebenfalls die Auswertung bzw. Integration der LC-FID Chromatogramme. Dies ist in Abbildung 2-26 veranschaulicht. Kommt es während der Elution eines Analytpeaks zum Auftreten von Spikes, wird die Peakfläche des Analyten stark verfälscht. Die Auswertung solcher Peaks ist dann nicht möglich.

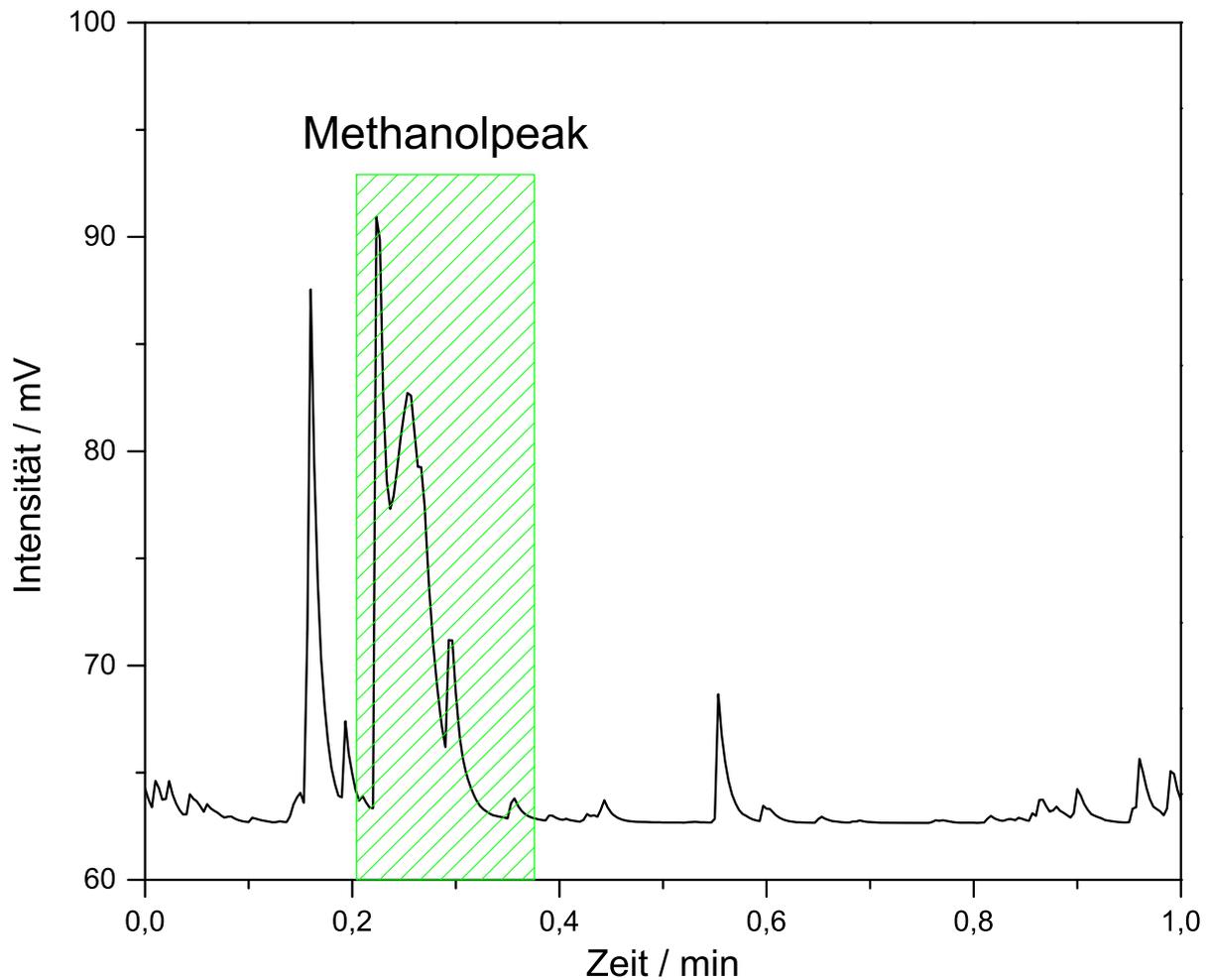


Abbildung 2-26: Chromatogramm eines durch Spikes deformierten Peaks von Methanol. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: $5 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 0,05 Vol.-%ige Methanollösung; Säule: keine; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min^{-1} H_2 , 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass das Auftreten von Spikes weder durch die Änderung der Gaseinstellung des FID noch durch die Anwendung von Stickstoff als Make-up Gas verhindert oder minimiert werden konnte.

2.6 Anwendung der HPLC-FID Kopplung

2.6.1 Untersuchung des Säulenblutens

Der Flammen-Ionisationsdetektor reagiert hoch sensitiv auf jeglichen Kohlenstoff in der mobilen Phase, so dass im Rahmen der LC-FID Kopplung lediglich Trennsäulen mit einer ausreichenden Temperaturstabilität verwendet werden können. Andernfalls kommt es durch den Austrag von Kohlenstoff aus den Trennsäulen zu erheblichem Rauschen. Da die meisten Umkehrphasen-Trennsäulen auf einem Silica-Grundmaterial basieren, welches mit Alkylketten chemisch modifiziert wurde, ist ein Austrag von Kohlenstoff durch die Anwendung hoher Temperaturen nicht zu verhindern. Zur Abschätzung des Einflusses des Säulenblutens auf das FID-Signal wurden drei konventionelle HPLC-Säulen unterschiedlicher Hersteller in Abhängigkeit der Temperatur untersucht. Die geometrischen Daten der Trennphasen (Länge, Durchmesser, Porengröße) können Tabelle 2-10 entnommen werden.

Tabelle 2-10: Für die Untersuchung des Säulenblutens verwendete HPLC Säulen.

Hersteller	Bezeichnung	Packungs- material	Länge in mm	Durchmesser in mm	Porengröße in μm
Phenomenex	Synergi	RP-C18	150	4,6	4,0
Knauer	BlueOrchid	RP-C18	50	2,0	1,8
Thermo	Hypercarb	grafitisierter Kohlenstoff	100	2,1	5,0

2.6.1.1 Phenomenex Synergi RP-C 18 und Knauer BlueOrchid RP-C 18

Als stationäre Phase für die Phenomenex Synergi RP-C 18 und Knauer BlueOrchid RP-C18 dient modifiziertes Kieselgel, an das hydrophobe C-18 Alkylketten kovalent gebunden sind. Der unpolare Charakter der C-18 Umkehrphasen bewirkt, dass unpolare Analyten stärker mit der stationären Phase wechselwirken können als polare und somit eine längere Verweildauer innerhalb der Säule aufweisen.

Die Knauer BlueOrchid RP-C 18 und die Phenomenex Synergi RP-C 18 weisen im Temperaturbereich $\leq 40\text{ °C}$ keine durch Säulenbluten verursachten Störungen des FID Signals auf. Langzeitversuche über 24 h zeigten ebenfalls keine Erhöhung der Basislinie oder Störungen des Detektorsignals.

Eine inkrementelle Erhöhung der Temperaturen auf 60 °C bei der Knauer BlueOrchid und auf bis zu 90 °C bei der Phenomenex Synergi RP-C 18 führte bei beiden Säulen zu einem zunehmenden Säulenbluten. Abbildung 2-27 verdeutlicht die Zunahme des Basislinienrau-

schens unter der Verwendung der Phenomenex Synergi RP-C 18 von 0,8 mV bei 40 °C bis auf 5 mV bei 90 °C.

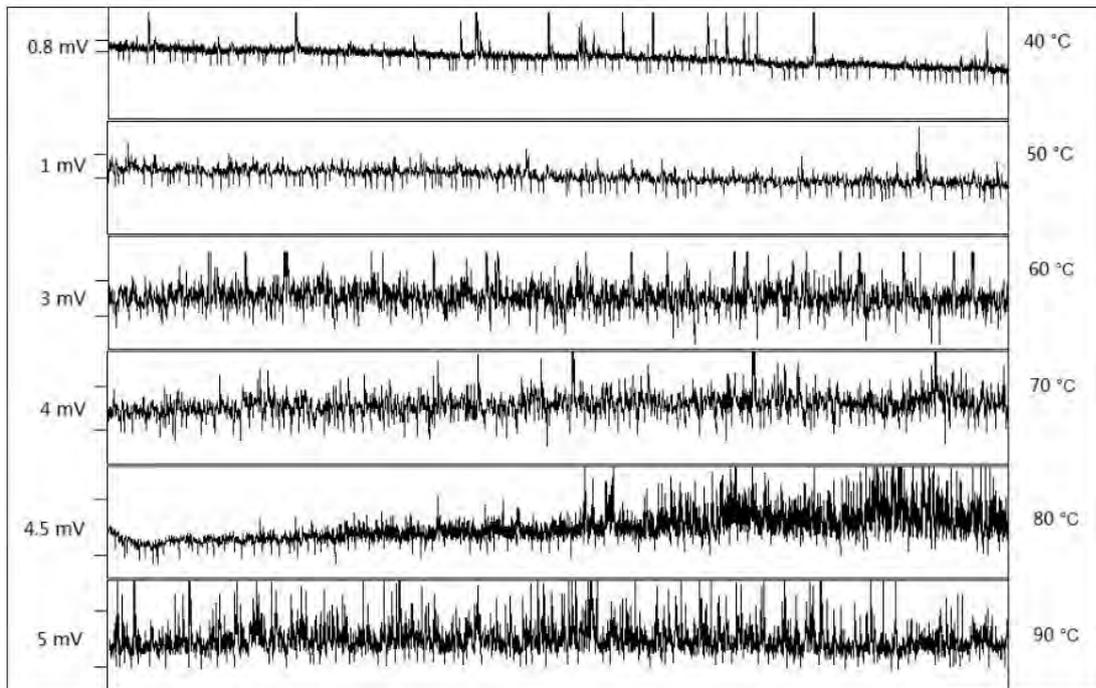


Abbildung 2-27: FID-Signal der Basislinie bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 40 bis 90 °C. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min⁻¹ mit 1/10 Split auf 0,1 mL min⁻¹; Detektion: FID.

2.6.1.2 Thermo Hypercarb

Im Gegensatz zu den C-18 Umkerphasen der Knauer BlueOrchid und Phenomenex Synergi, welche einen Kohlenstoffanteil von 10 % bzw. 12 % aufweisen, besteht die stationäre Phase der Thermo Hypercarb Säule aus 100 % Kohlenstoff. Bei diesem Material handelt es sich um ein poröses Grafit (porous graphitic carbon - PGC). Die eigentliche Phase besteht aus porösen sphärischen Partikeln und ist auf molekularer Ebene aus hexagonal angeordneten Kohlenstoffatomen aufgebaut, wobei die C-Atome vollkommen gesättigte Valenzen besitzen. Die Oberfläche des Materials ist kristallin und besitzt keine aktiven Zentren. Die Phase zeichnet sich durch eine außerordentliche pH- und Temperaturstabilität aus. Die Selektivität unterscheidet sich sehr deutlich von Umkehrphasen auf Silikagelbasis. Die Thermo Hypercarb kann beispielsweise für die Trennung von sehr polaren und ionischen Verbindungen, sowie auch für die Analyse von Stereoisomeren verwendet werden, die mittels konventioneller Umkehrphasen nicht zu trennen sind. Die Annahme liegt nahe, dass die rein kohlenstoffhaltige stationäre Phase durch eventuellen Materialverschleiß zu kurzfristigen oder permanenten Störsignalen führen kann, welche das FID-Signal negativ beeinflussen.

Entgegen dieser Annahme zeigte die Hypercarb Säule jedoch keinerlei Störeinflüsse, wie beispielsweise eine Veränderung der detektierten Signale, respektive der Basislinie. Im Einklang mit den Ergebnissen von Guillaume et al [20] konnten über den gesamten untersuchten Temperaturbereich (40 – 100 °C) keine durch Säulenbluten verursachten Störsignale festgestellt werden. Abbildung 2-28 zeigt ein bei 100 °C über eine Dauer von 12 Stunden aufgezeichnetes Chromatogramm für eine Thermo Hypercarb Säule. Im Vergleich zu den herkömmlichen Säulen betrug die Schwankung der Basislinie lediglich 0,6 mV.

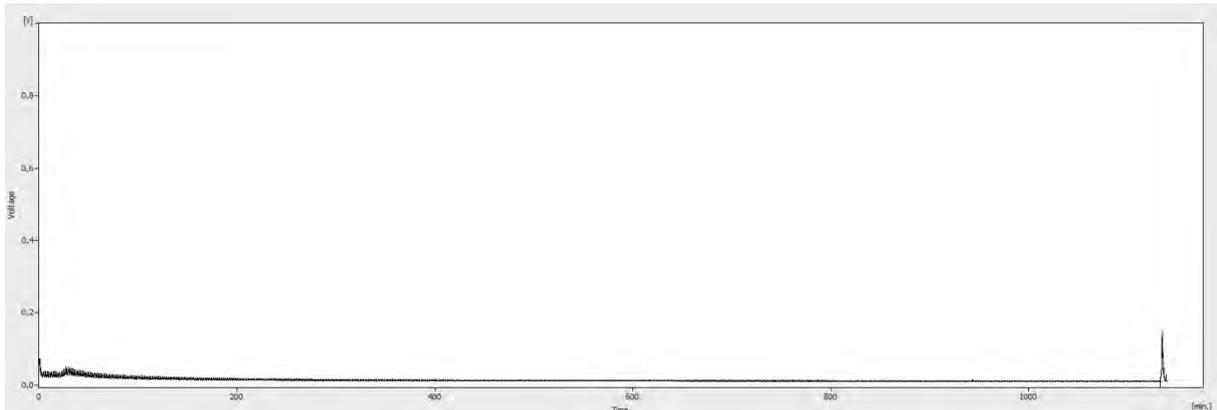


Abbildung 2-28: Aufzeichnung eines Langzeittests über 12 Stunden für eine Thermo Hypercarb-Säule. Aufgezeichnet wurde die Basislinie bei einer Temperatur von 100 °C. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb (100 mm × 2,1 mm; 5 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 0,05 mL min⁻¹; Detektion: FID.

2.6.1.3 Untersuchung des Säulenblutes bei der Nano-HPLC-FID Kopplung

2.6.1.3.1 Partikuläre Nano- und Kapillar-HPLC Trennsäulen

Aufgrund der in Abschnitt 2.5 dargestellten Probleme in Bezug auf die Verstopfung der Kapillaren wurde das Säulenbluten für die Nano-HPLC-FID Kopplung nur eingeschränkt untersucht. Messungen bei erhöhten Temperaturen von bis zu 80 °C zeigten keine bzw. unregelmäßige Auffälligkeiten, deren Ursachen nicht eindeutig zuordenbar sind.

Anhand der in Abbildung 2-29 wiedergegebenen Chromatogramme wird deutlich, dass die Höhe der Basislinie bei den Wiederholungsmessungen stets gleich ist und keinen Schwankungen bzw. einem Anstieg unterliegt.

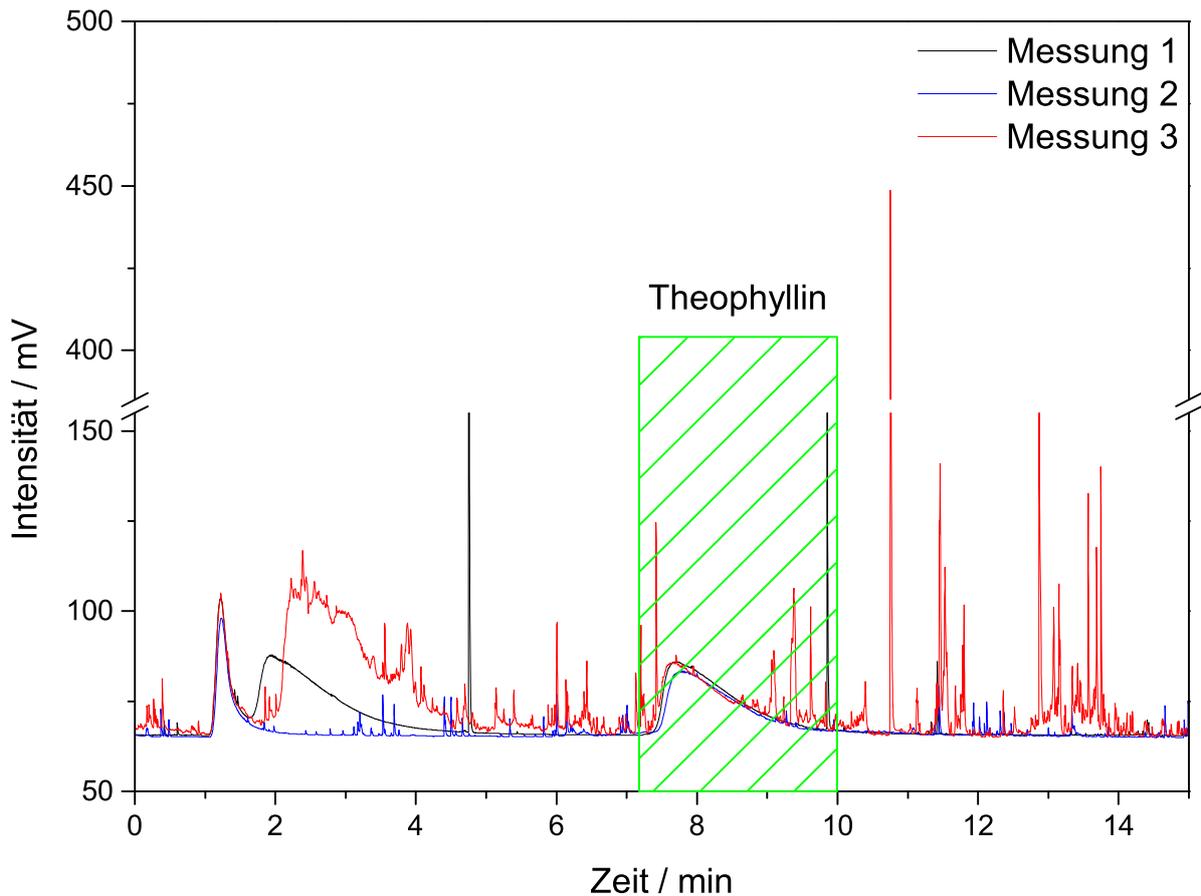


Abbildung 2-29: Overlay von drei Chromatogrammen der Trennung von Theophyllin. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Agilent Zorbax SB-C18 (150 × 0,3 mm, 3,5 µm) mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 10 µL min⁻¹; Injektionsvolumen: 350 nL; Analytkonzentration: 1 mg mL⁻¹; Säulentemperatur: 60 °C; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min⁻¹ H₂, 450 mL min⁻¹ Luft; Basistemperatur: 275 °C.

2.6.1.3.2 Monolithische Nano-HPLC-Trennsäule

Einen Sonderfall stellt eine monolithische Nano-HPLC-Säule dar, die aus Polystyrol-Divinylbenzol besteht. Neben der Rauschunterdrückung und der daraus resultierenden erheblichen Empfindlichkeitssteigerung, der Minimierung von Totvolumina und Kapillarverbindern, sowie der sehr einfachen Handhabung, ist die stationäre Phase bei einer wässrigen mobilen Phase bis ca. 250 °C temperaturstabil [29]. Ähnliche Temperaturen herrschten auch im FID, in den die monolithische Säule direkt eingebaut werden konnte. Werden Injektor und FID mit Hilfe einer Transferkapillare miteinander verbunden, kommt es zur Ausbildung von Spikes, bedingt durch entstehende und mitgerissene Partikel beim Verdampfen der mobilen Phase (Abbildung 2-30 a). Wird die Transferkapillare durch eine monolithische Trennsäule ausgetauscht (Abbildung 2-30 b), werden keine Störpeaks im FID-Signal beobachtet. Darüber hinaus reduziert sich das Rauschen der Basislinie. Dies sind Indizien dafür, dass der Phasenübergang der mobilen Phase im FID durch die direkte Kopplung der monolithischen

Trennsäule an die FID-Düse begünstigt wird. Es ist davon auszugehen, dass die mobile Phase gleichmäßiger von einer großen Oberfläche verdampft wird. Weiterhin werden die durch die Verdampfung entstehenden nicht volatilen Bestandteile der mobilen Phase vermutlich auf der monolithischen Trennsäule abgeschieden, so dass diese nicht in die FID-Flamme gelangen und dort Störpeaks erzeugen können.

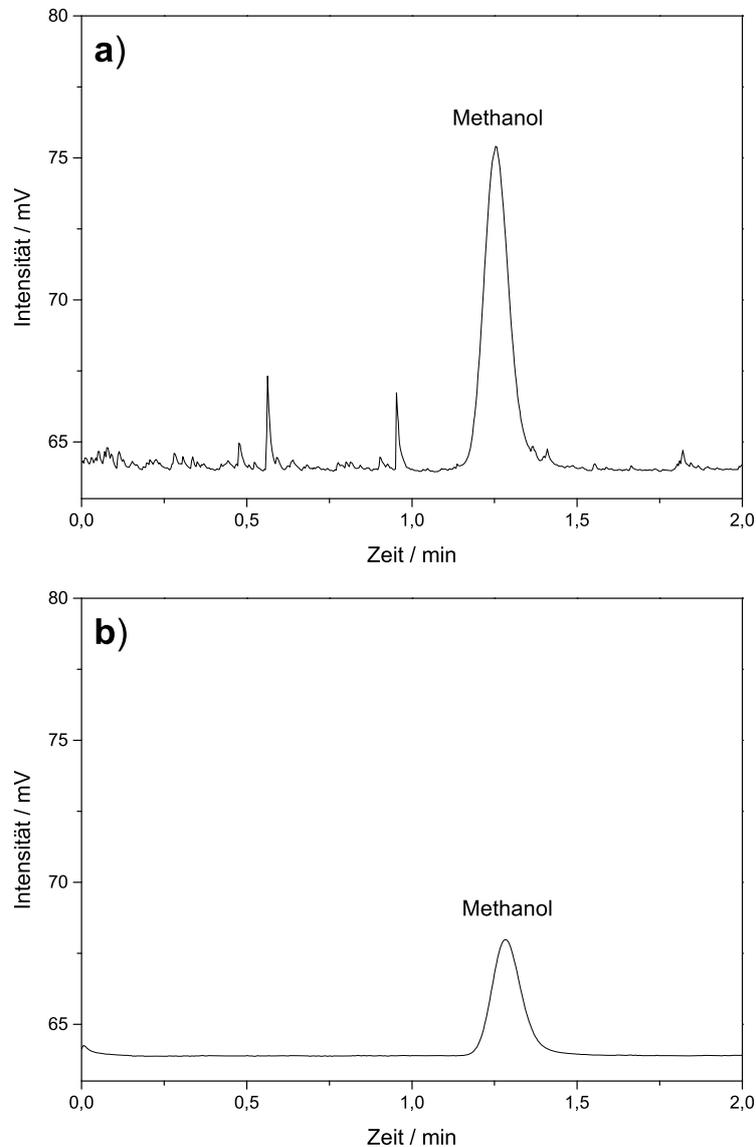


Abbildung 2-30: Vergleich der Chromatogramme der Elution von Methanol. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: $5 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 0,1 Vol.-%ige Methanollösung; Säule: (a) keine, (b) Monolithische Nano-HPLC-Säule ($150 \times 0,1 \text{ mm}$); Temperatur: Raumtemperatur; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$, 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.6.2 Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittelpeaks

2.6.2.1 Kapillar-HPLC-Zerstäuber-FID-Kopplung

In der Flüssigkeitschromatografie muss die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel in das HPLC-System überführt werden. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit einiger pharmazeutischer Verbindungen bei Raumtemperatur kann der Zusatz organischer Lösungsmittel wie Methanol, Aceton oder Acetonitril erforderlich sein, um die Löslichkeit dieser Verbindungen zu erhöhen. Darüber hinaus kann die zu injizierende Probenlösung bereits einen hohen organischen Anteil aufweisen, wenn im Vorfeld der HPLC-Analytik eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) oder Anreicherung erforderlich war. Bei der eigentlichen chromatografischen Trennung eluieren diese Lösungsmittel in der Regel mit der Totzeit. Hierbei muss sichergestellt werden, dass die übrigen zu analysierenden Komponenten nicht auf dem Tailing des Lösungsmittelpeaks eluieren, da ansonsten die Auswertung verfälscht wird. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss des Lösungsmittelpeaks auf die Detektion als auch auf die Auftrennung eines Substanzgemisches untersucht, was nachfolgend am Beispiel von Methanol diskutiert wird.

Dazu wurden methanolische Standards in einem Konzentrationsbereich von 0,001 bis 1 Volumenprozent in Wasser hergestellt. Abbildung 2-31 zeigt das resultierende Chromatogramm der Fließinjektionsanalyse (FIA) für die Dreifachbestimmung jeder Konzentrationsstufe. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass bei einer Methanolkonzentration von 1 % in der Injektionslösung die Detektorsättigung von 1000 mV erreicht wird. Bei dieser Versuchsreihe wurde eine absolute Kohlenstoffmenge zwischen 0,003 und 3 µg betrachtet.

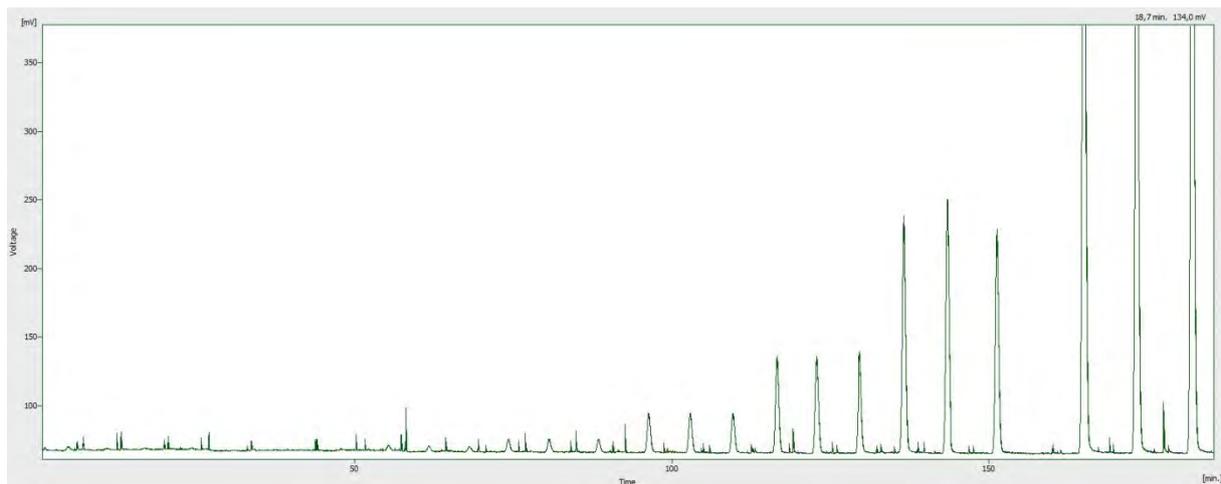


Abbildung 2-31: Einfluss des Lösungsmittelgehaltes auf das detektierte Signal. LC-Bedingungen: Fließinjektionsanalyse mit Methanol $c_{\text{Abs.}}(C) = 3$ bis 3000 ng; mobile Phase: Deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min^{-1} Split: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 2 µL .

Darüber hinaus wurden auch die Lösungsmittel Aceton und Acetonitril untersucht. Bei einem Verhältnis von 90/10 (v/v) bis 10/90 (v/v) Wasser/org. Lösungsmittel in der Injektionslösung wurde stets die Übersättigung des Detektors beobachtet.

Im Anschluss an diese Untersuchungen wurde der Einfluss auf die Elution eines benachbarten Peaks, in diesem Fall Koffein, untersucht. Dazu wurde ein Koffeinstandard mit Methanol versetzt, um eine Methanolkonzentration von 0,01 % in der Injektionslösung einzustellen. Anschließend wurde die Trennung des Lösungsmittel-Substanzgemisches durchgeführt. Das korrespondierende Chromatogramm ist in Abbildung 2-32 dargestellt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass Methanol und Koffein sehr gut voneinander getrennt sind, sodass auch höhere Lösungsmittelkonzentrationen in der Injektionslösung verwendet werden können. Lösungsmittelkonzentrationen $\geq 1\%$ in der Injektionslösung führen, wie bereits beschrieben, zu einer Übersättigung des FID, welche in Abhängigkeit der Flussrate und Injektionsmenge zwischen 30 Sekunden und mehreren Minuten andauern kann. Bezogen auf das in Abbildung 2-32 dargestellte Chromatogramm würde eine Erhöhung des Methanolanteils auf 1 % zu einer langfristigen Übersättigung des Detektors führen, sodass dieser ggf. blind für Substanzen mit Retentionszeiten < 6 min wird. Weiterhin verdeutlicht Abbildung 2-32, dass die Zugabe von organischen Lösungsmitteln in sehr kleinen Konzentrationen zu der Probe für die Kapillar-HPLC-FID Kopplung kein Problem darstellt.

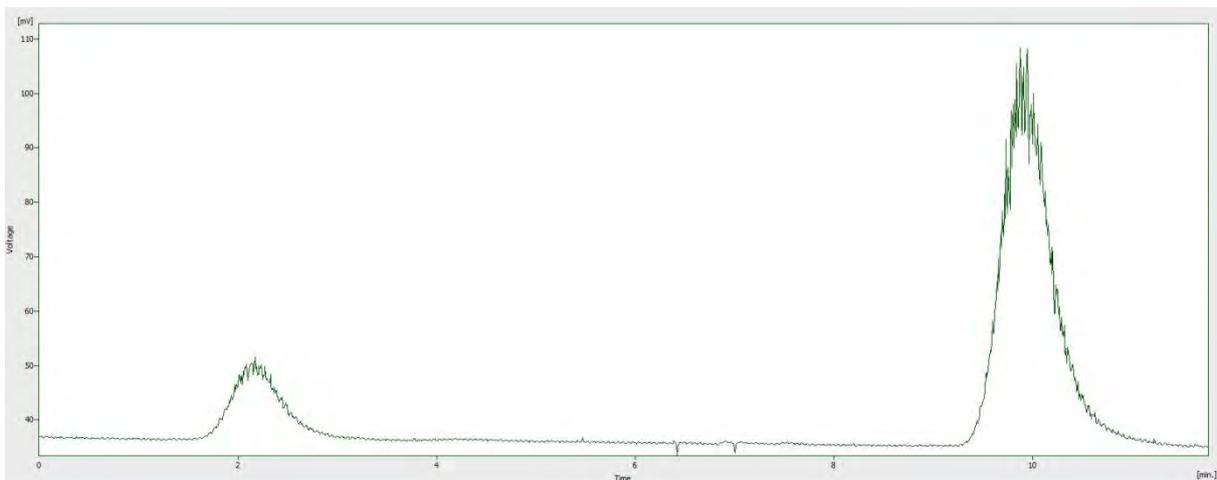


Abbildung 2-32: Analyse einer mit 0,001 Vol.% Methanol gespikten Koffeinelösung mit einer Thermo Hypercarb Säule. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min^{-1} ; Split $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; Injektionsvolumen: $20 \mu\text{L}$.

Abschließend ist festzuhalten, dass die in diesem Projekt verwendeten Modellsubstanzen auf den hier untersuchten Trennsäulen in der Regel stärker retardiert werden als die in der Flüssigkeitschromatografie verwendeten Lösungsmittel wie z. B. Aceton, Acetonitril oder Methanol. Bei kleinen Konzentrationen dieser Lösungsmittel in der Probenlösung gelingt eine adäquate Abtrennung des Lösungsmittelpeaks von den Analytpeaks. Sind höhere Lösungsmittelnkonzentrationen erforderlich, ist eine Verdünnung der Probenlösung zu empfehlen.

2.6.2.2 Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittelpeaks bei der Nano-HPLC-FID Kopplung

In Anlehnung an die in Abschnitt 2.6.2.1 vorgestellten Untersuchungen zum Einfluss des Lösungsmittelpeaks auf das Detektorsignal bei der Kapillar-HPLC-FID-Kopplung, wurden korrespondierende Versuche für den Nano-Flussbereich durchgeführt.

Während der Inbetriebnahme und Optimierung der Nano-HPLC-FID-Kopplung wurden häufig methanolische Injektionslösungen verwendet. Das in Abbildung 2-33 dargestellte Chromatogramm einer 10 Vol.-%igen Methanollösung zeigt, dass bei einem Injektionsvolumen von 50 nL die Detektorsättigung (≤ 1000 mV) nicht erreicht wird. Bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau wurde zunächst auf den Einbau einer Trennsäule verzichtet, sodass die Elutionszeit von 70 s gleichzeitig der Systemdurchflusszeit vom Injektor bis zum FID entspricht.

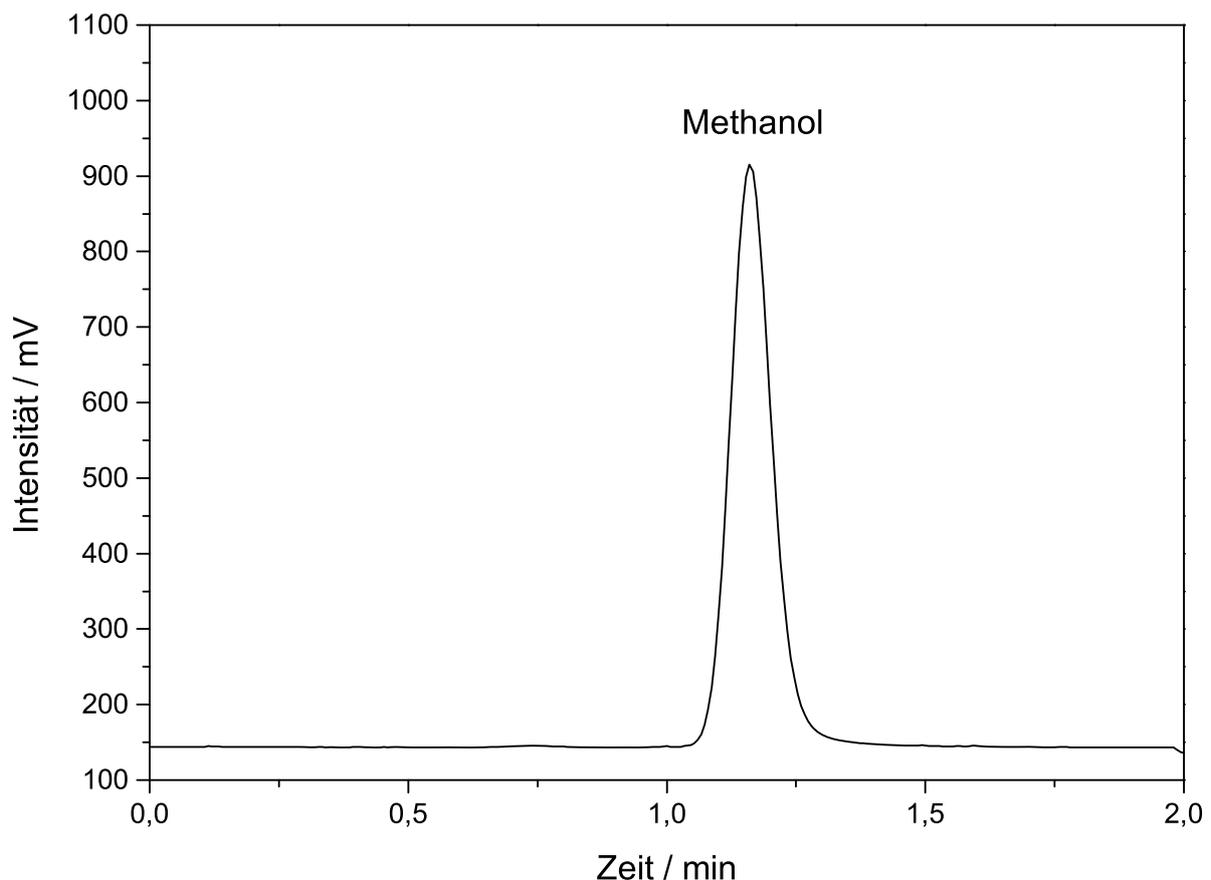


Abbildung 2-33: Methanol-Signaltest ($t_R = 1,16$ min) zur Untersuchung der Detektorsättigung. Elutionsbedingungen: Mobile Phase: Wasser; Flussrate: $5 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 10 Vol.-%ige Methanollösung; Säule: keine; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$, 450 mL min^{-1} Luft (kein Makeup-Gas); Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$.

Im Vergleich zur Kapillar-HPLC-Zerstäuber-FID-Kopplung (siehe Abschnitt 2.6.2.1) ist es im Nano-Flussbereich möglich, höhere Konzentrationen eines organischen Lösungsmittels in der Injektionslösung zu verwenden, ohne dass die Detektorsättigung erreicht wird. Hintergrund ist, dass der FID die absolute Menge an eingetragenen Kohlenstoff registriert und die Injektionsvolumina aufgrund der Miniaturisierung in der Nano-HPLC deutlich geringer sind als für die konventionelle HPLC-FID-Kopplung.

2.6.3 Untersuchungen zum Einfluss von Puffern und Additiven

2.6.3.1 Puffer und Additive bei der Kapillar-HPLC-Zerstäuber-FID-Kopplung

Viele moderne pharmazeutische Wirkstoffe sind schwache Säuren bzw. Basen, bei denen der pH-Wert der mobilen Phase einen entscheidenden Einfluss auf die chromatografische Trennung ausübt. Daher ist es erforderlich, den pH-Wert der mobilen Phase mit Hilfe von Puffern auf einen definierten Wert einzustellen. Problematisch ist jedoch, dass die meisten der in der Flüssigkeitschromatografie verwendeten Puffer Kohlenstoff enthalten und ebenfalls vom FID erfasst werden, sodass anorganische Puffer-Systeme für die Kopplung mit dem FID präferiert werden. In diesem Zusammenhang wird nachfolgend der Einfluss von Puffern bei der HPLC-FID-Kopplung untersucht. Dazu wurden für den sauren pH-Bereich von 1 bis 3 anorganische Sulfatpuffer und für den pH-Bereich von 6 bis 8 Phosphatpuffer in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. In einem ersten Versuch wurde die Zeit bis zum Verstopfen der FID-Zerstäubernadel als auch der Einfluss auf das Basisliniensignal des FID in Abhängigkeit der Pufferkonzentration ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Tabelle 2-11 zusammengefasst.

Tabelle 2-11: Einfluss von anorganischen Puffern. Angegeben sind die verwendeten Pufferkonzentrationen, der pH-Bereich, das Basislinienrauschen sowie die Zeit bis zur Verstopfung des Zerstäubers. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb (100 mm × 2,1 mm; 4 µm); mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 1 mL min⁻¹ mit 1/20 Split auf 0,05 mL min⁻¹; Detektion: FID.

Puffer	Konzentration Puffer in mmol L ⁻¹	pH	Basislinienrauschen in mV	Zeit bis zum Verstopfen in h
-	-	2,5 ¹	0,03	-
NaH ₂ SO ₄ /Na ₂ HSO ₄	10	2,5	0,06	≥ 72
NaH ₂ SO ₄ /Na ₂ HSO ₄	100	2,5	2,0	~ 8

¹Zum Ansäuern der rein wässrigen mobilen Phase wurde Salzsäure verwendet.

Dabei wird deutlich, dass sich das Rauschen der FID-Basislinie bei Anwendung von 10 mmol L⁻¹ Sulfatpuffer, im Vergleich zu einer pufferfreien mobilen Phase, verdoppelt. Werden höhere Pufferkonzentrationen von bis zu 100 mmol L⁻¹ genutzt, kommt es zu einer Erhöhung des Rauschens der Basislinie um einen Faktor 67. Darüber hinaus führen die nicht volatilen anorganischen Puffer, zu einer Verstopfung der FID-Zerstäubernadel aufgrund der Bildung von Niederschlägen im Interface. Dies wird bei Betrachtung der in Abbildung 2-34 dargestellten Fotografien deutlich. Hier ist die gebildete Salzkruste bei Verwendung einer stark gepufferten mobilen Phase auf dem FID-Interface deutlich zu erkennen. Diese Kruste

baute sich bei einer Pufferkonzentration von 100 mmol L^{-1} kontinuierlich bis zur totalen Verstopfung des Zerstäubers auf (Abbildung 2-34).

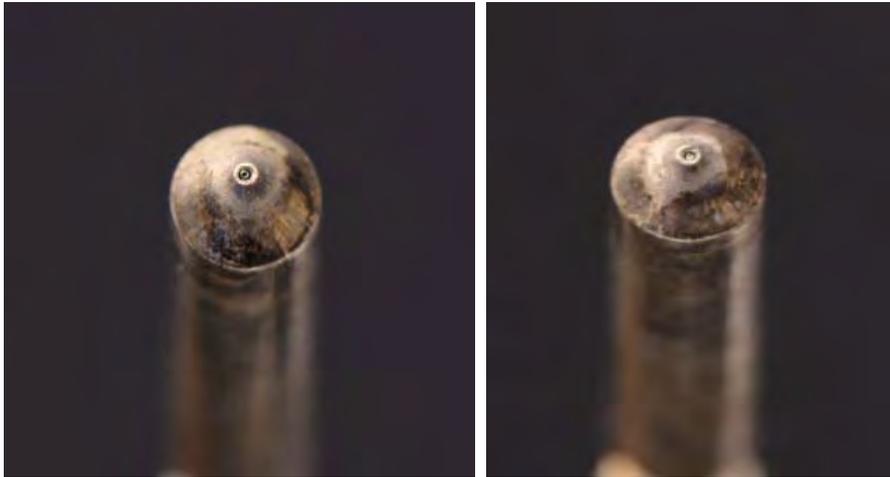


Abbildung 2-34: Zerstäuberdüse vor (links) und nach (rechts) Verwendung eines $0,1 \text{ molaren Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ Puffers. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}; 4 \mu\text{m}$); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit $0,1 \text{ M NaH}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{HSO}_4$; Flussrate: 1 mL min^{-1} mit $1/20$ Split auf $0,05 \text{ mL min}^{-1}$.

Bedingt durch die konzentrationsabhängige Auskristallisation der Puffersalze an der Zerstäuberdüse, kommt es zur Änderung des Gegendrucks im FID-Interface. Dadurch verschiebt sich das Split-Verhältnis der mobilen Phase nach der Trennsäule in Abhängigkeit der Niederschlagsbildung. Dies führt zu einer Verschiebung der Retentionszeiten der Analyten, was exemplarisch für die Trennung der Alkohole in Abbildung 2-35 dargestellt ist. Bedingt durch diesen Effekt ist die Analysenmethode nicht reproduzierbar. Dabei ist jedoch zu beachten, dass dies lediglich für die Anwendung hoher Pufferkonzentrationen von bis zu 100 mmol L^{-1} problematisch ist, denn im Fall der analysierten Alkohole konnte bei einer Pufferkonzentration von 10 mmol L^{-1} nach einer Versuchsdauer von 72 h kein signifikanter Einfluss auf das FID-Signal beobachtet werden.

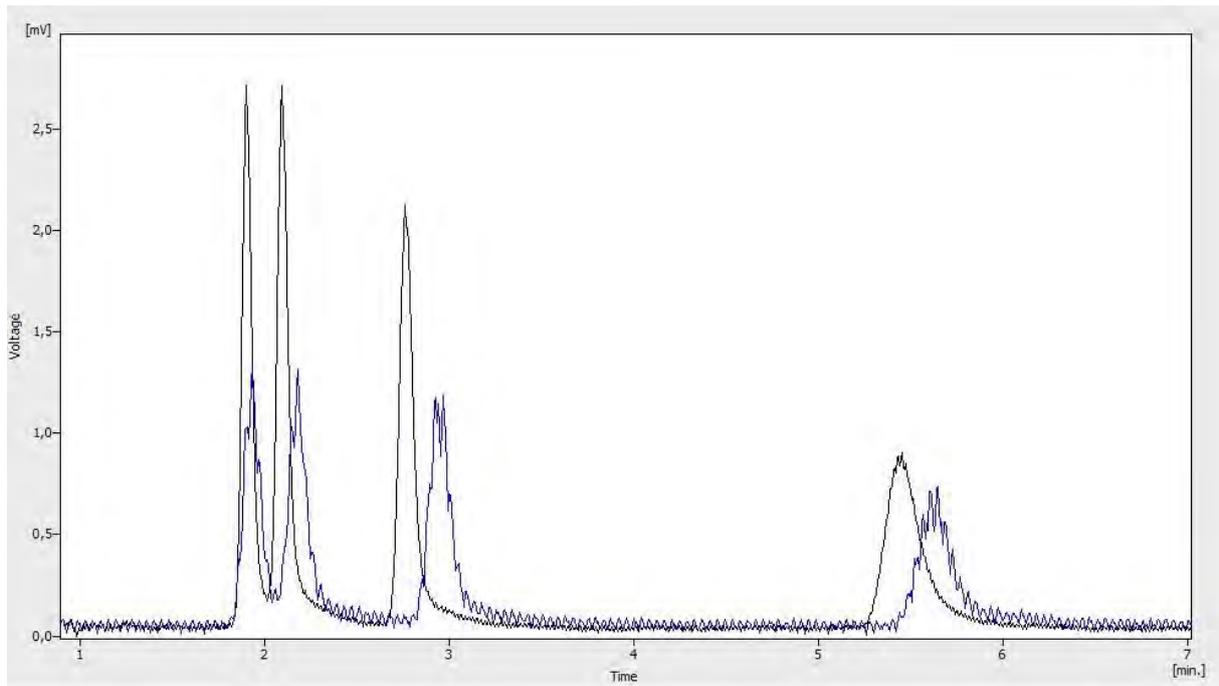


Abbildung 2-35: Auftrennung eines Alkoholgemisches unter Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase (schwarz) eines 0,01 molaren $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ Puffers (Blau). Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb (100 mm \times 2,1 mm; 4 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,01 M $\text{NaH}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{HSO}_4$; Flussrate: 1 mL min^{-1} mit 1/20 Split auf 0,1 mL min^{-1} ; Detektion: FID.

Da in der Flüssigkeitschromatografie in der Regel Puffer in Konzentrationen zwischen 2 mmol L^{-1} und 20 mmol L^{-1} eingesetzt werden, wurde bei einer moderaten Pufferkonzentration von 10 mmol L^{-1} der Einfluss von Puffern auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschiedener Alkohole evaluiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-12 zusammengefasst.

Tabelle 2-12: Einfluss von gepufferten Laufmitteln auf die Sensitivität des FID, gezeigt an der Peakhöhe, den Peakflächen und dem ermittelten S/N-Verhältnis. Chromatografische Bedingungen: Stationäre Phase: Thermo Hypercarb (100 mm \times 2,1 mm; 4 μm); mobile Phase: deionisiertes Wasser mit 0,01 M $\text{NaH}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{HSO}_4$; pH = 2,5; Flussrate: 1 mL min^{-1} mit 1/20 Split auf 0,05 mL min^{-1} ; Detektion: FID.

Analyt	Puffer	Peakhöhe in mV	Peakfläche in mVs	S/N	Faktor Reduzierung S/N
Propanol	Kein Puffer	2,7	10,6	90	4,3
	Sulfat	1,3	7,7	21	
Butanol	Kein Puffer	2,7	13,4	90	4,5
	Sulfat	1,2	10,3	20	
Pentanol	Kein Puffer	2,0	12,3	66	3,3
	Sulfat	1,2	10,5	20	
Heptanol	Kein Puffer	0,9	12,2	29	2,4
	Sulfat	0,7	8,4	12	

Anhand des Vergleichs der in Abbildung 2-35 dargestellten Chromatogramme wird ersichtlich, dass das FID-Signal um circa 30 % abnimmt, wenn eine gepufferte mobile Phase verwendet wird. Durch die Zunahme des Rauschens und die einhergehende Reduzierung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um einen Faktor zwischen 2,4 und 4,5 erhöht sich die Nachweisgrenze von $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ auf $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6.3.2 Puffer und Additive bei der Nano-HPLC-FID Kopplung

2.6.3.2.1 Anwendung anorganischer Additive in der mobilen Phase

Analog zu den in Abschnitt 2.6.3.1 beschriebenen Untersuchungen zum Einfluss von Additiven in der mobilen Phase auf das FID-Signal bei der Kapillar-HPLC-FID Kopplung, wurden ähnliche Versuche für den Nano-Flussbereich durchgeführt. Hier ist jedoch darauf verzichtet worden, anorganische Puffersalze zu verwenden, da bedingt durch die in Abschnitt 2.5 beschriebene Problematik der Verstopfung der Fused-Silica-Transferkapillaren bereits abgeleitet werden konnte, dass eine Verstopfung des Interface deutlich schneller erfolgen würde. Vor diesem Hintergrund wurde lediglich Salzsäure als anorganisches Additiv zur Einstellung des pH-Wertes verwendet, um die Verstopfung zu verhindern und das Tailing zu reduzieren. Allerdings blieben sowohl die Retentionszeit als auch die Peakform der Analyten (Alkohole $\text{C}_1\text{-C}_4$) unverändert. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass eine deutlich höhere Anzahl an Spikes die Auswertung der Analytpeaks erschweren, was beim Vergleich der in Abbildung 2-36 dargestellten Chromatogramme mit und ohne Salzsäure sehr gut erkennbar ist. Da auch in Reinstwässern geringe Konzentration von Alkali- und Erdalkalimetallionen vorhanden sind, kommt es beim Verdampfen der mobilen Phase im FID zur Bildung von nicht volatilen Salzen wie z. B. Natrium- und Kaliumchlorid. Werden Partikel dieser Salze durch die verdampfende mobile Phase in die FID-Flamme mitgerissen, erzeugen sie Störpeaks wie in Abbildung 2-36 b dargestellt. Eine Verbesserung der Peakform der Analyten konnte durch die Verwendung von HCl als Additiv nicht beobachtet werden. In beiden Fällen eluieren die Alkohole mit starkem Tailing.

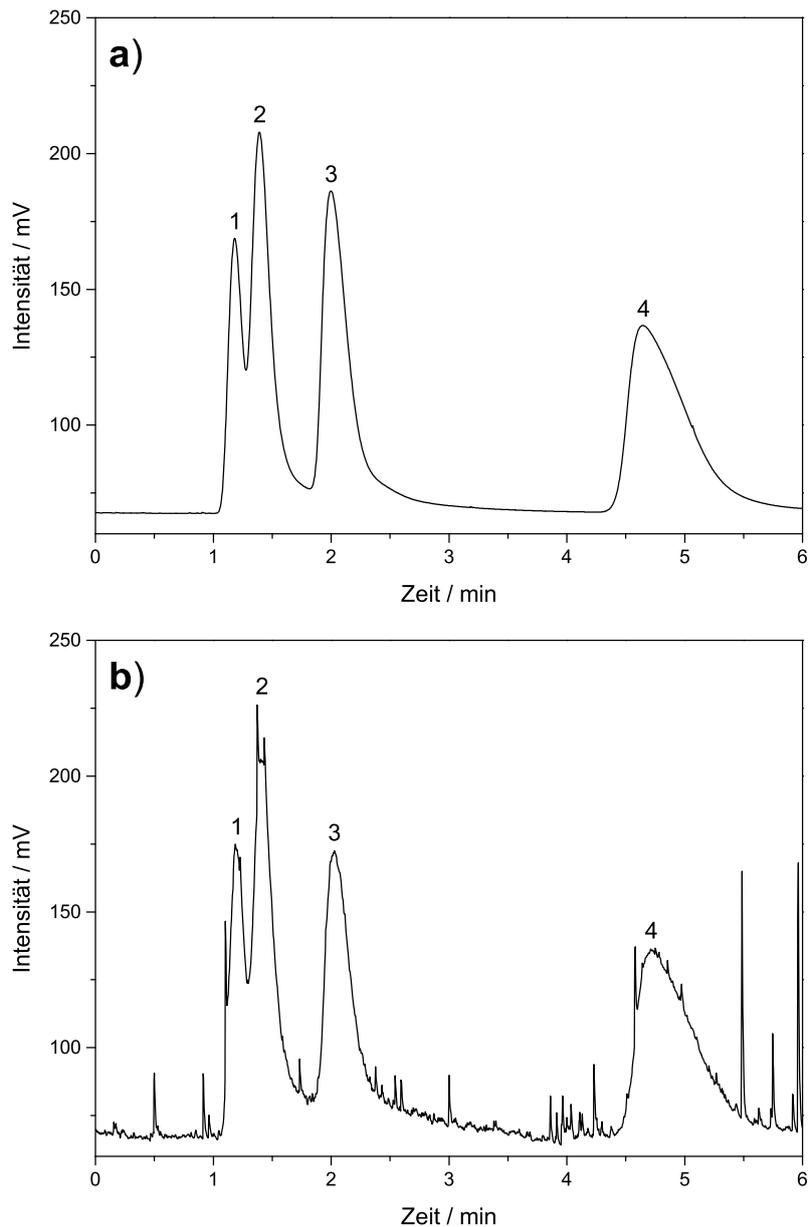


Abbildung 2-36: Vergleich der Chromatogramme der Alkoholtrennung von Methanol (1), Ethanol (2), Isopropanol (3) und iso-Butanol (4). Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: a) Wasser; b) Wasser mit $9,66 \text{ mmol L}^{-1}$ HCl; Flussrate: $10 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 100 nL ; Analytkonzentration: 1 Vol.-%ige Alkohollösung; Säule: Agilent Zorbax SB C-18 ($150 \times 0,3 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$); Temperatur: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min^{-1} H_2 , 450 mL min^{-1} Luft (kein Makeup-Gas); Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$.

Weiterhin zeigte sich, dass die Verstopfung der Kapillaren bei Verwendung von HCl nicht herausgezögert werden kann. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die Verstopfung nun schwarz und nicht weiß gefärbt war (vgl. Abschnitt 2.5.1, Abbildung 2-21).

2.6.3.2.2 Anwendung organischer Additive in der mobilen Phase

Die Mehrzahl aller konventionellen HPLC-Trennungen werden im sauren Milieu durchgeführt, um symmetrische Peaks und stabile Retentionszeiten zu erhalten. Vor diesem Hintergrund wurde Ameisensäure verwendet, da diese leicht flüchtig und verdampfbar ist. Darüber hinaus führt ein saurer pH-Wert zu einer deutlichen Verminderung der Löslichkeit von Quarz in der mobilen Phase. Die Vermutung, dass der Zusatz von kohlenstoffhaltigen Additiven zur mobilen Phase im FID zu einem erheblichen Anstieg der Basislinie bzw. des Grundrauschens führt, konnte in diesem Fall nicht bestätigt werden. Bei der Zugabe von 0,1 % Ameisensäure zur mobilen Phase stieg die Basislinie lediglich von $74,5 \text{ mV} \pm 1,2 \text{ mV}$ auf $81,3 \text{ mV} \pm 0,3 \text{ mV}$ an und führte zu keinem merklichen Rauschen. Des Weiteren wurde kein vermehrtes Auftreten von Spikes registriert. Für die Trennung der Alkohole konnte allerdings keine Verbesserung des Tailings der Peaks festgestellt werden. Ein Vergleichschromatogramm der Elution von Methanol mit und ohne 0,1 % Ameisensäure in der mobilen Phase ist in Abbildung 2-37 dargestellt.

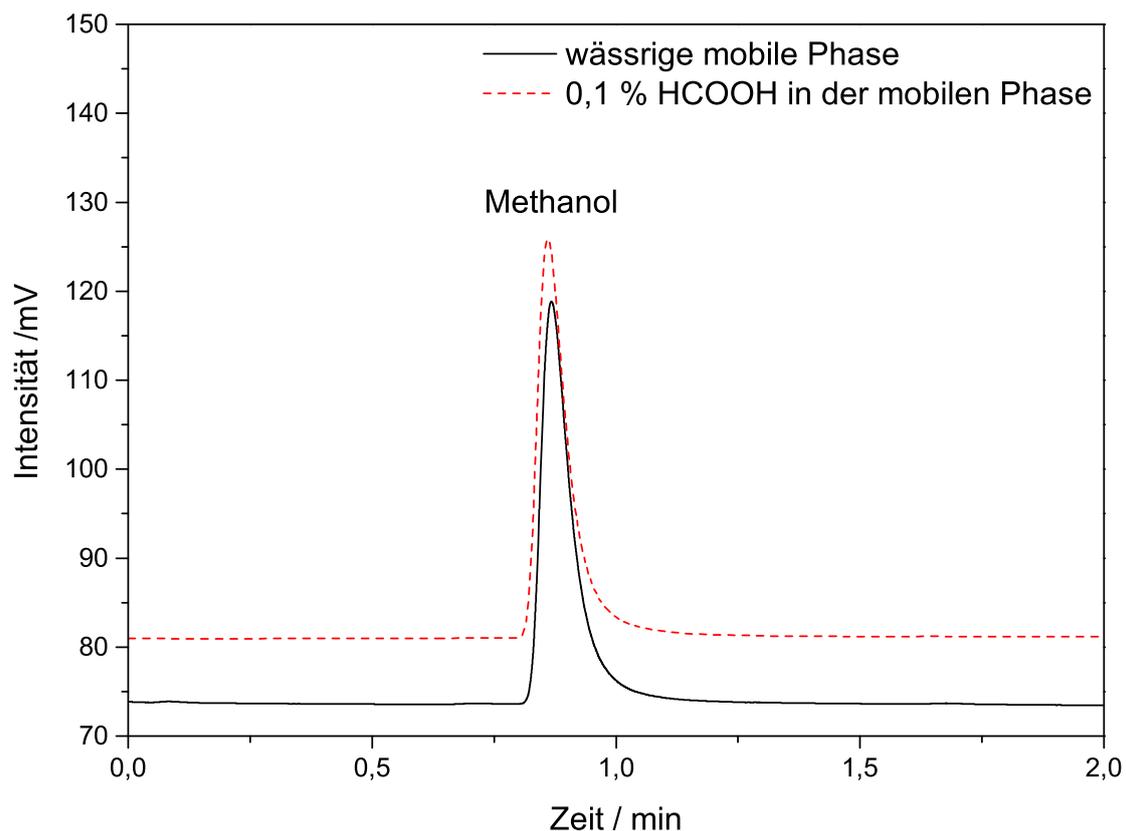


Abbildung 2-37: Vergleich der Chromatogramme von Methanol. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: Wasser (durchgezogene Linie), Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (gestrichelte Linie); Flussrate: $2 \mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 1 Vol.-%ige Methanollösung; Säule: VisionHT; Temperatur: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: $100 \text{ mL min}^{-1} \text{ H}_2$, $450 \text{ mL min}^{-1} \text{ Luft}$; Basistemperatur: $275 \text{ }^\circ\text{C}$.

Auf Grundlage der hier erzielten Resultate kann abgeleitet werden, dass durchaus höhere Konzentrationen organischer Additive in der mobilen Phase bei der Nano-HPLC-FID-Kopplung eingesetzt werden können. Wird die Annahme zugrunde gelegt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Kohlenstoffmenge in der mobilen Phase und dem korrespondierenden FID-Signal besteht, würde bei 1 % Ameisensäure in der mobilen Phase ein Anstieg der Basislinie des FID um circa 70 mV erwartet werden. Vor dem Hintergrund, dass die Detektorsättigung bei dem in diesem Projekt verwendeten DANI Master GC-FID erst bei 1000 mV erreicht wird, könnten noch höhere Konzentrationen von Ameisensäure in der mobilen Phase genutzt werden, obgleich dies mit der Reduzierung der Detektorsensitivität und damit der Nachweisempfindlichkeit verbunden ist.

2.6.4 Untersuchung des Response für ausgewählte Modellsubstanzen

2.6.4.1 Klassifizierung der Modellsubstanzen

Die in Abschnitt 2.4.1 erarbeiteten optimalen Einstellungen des Flammenionisationsdetektors wurden im weiteren Verlauf für die Analyse ausgewählter Modellsubstanzen verwendet. Um die im Rahmen des Projektes erzielten Ergebnisse mit der Literatur vergleichen zu können, wurden die analysierten Substanzen in die drei Kategorien volatil (Siedetemperatur: 50 °C - 260 °C), semi-volatil (Siedetemperatur: 260 - 400 °C) und nicht-volatil (Siedetemperatur \geq 400 °C) eingeteilt (siehe Tabelle 2-13). Die Berechnung von Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Detektionsgrenzen erfolgte nach DIN 32645.

Tabelle 2-13: Einteilung der analysierten Substanzen nach Siedetemperatur in die Klassen volatil, semi-volatil und nicht-volatil.

Klassifizierung	Temperaturbereich in °C	Substanzen	Siedetemperatur in °C
Volatil	50 - 260	Methanol	65
		Propanol	97
		Butanol	117
		Pentanol	138
		Hexanol	157
		Koffein	178
Semi-volatil	260 - 400	Cumarin	301
		Uracil	379
Nicht volatil	\geq 400	Theophyllin	474
		Sulfamethoxazol	490
		Thymin	566
		Hydrocortison	613

2.6.4.2 Untersuchung des Response volatiler Substanzen

Das als volatil eingestufte Koffein wurde mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,99 in einem Kohlenstoff-Konzentrationsbereich von $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ kalibriert. Die relative Standardabweichung der Peakfläche betrug 2,1 %. Die korrespondierende Kalibrationsgerade ist im Anhang in Abschnitt 5.7.1 dargestellt. Die gemäß DIN 32645 ermittelte Nachweisgrenze für Koffein liegt bei $0,22 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kohlenstoff absolut. Auf Grundlage des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von 3:1, wird eine Nachweisgrenze von $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kohlenstoff absolut berechnet.

Die in Tabelle 2-13 als volatil angegebenen Alkohole Propanol, Butanol, Pentanol und Hexanol wurden als Gemisch analysiert und kalibriert. Die Konzentrationen der Alkohole wurden für eine bessere Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten für volatile, semi-volatile und nicht-volatile Substanzen in dem gleichen Konzentrationsbereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$) wie zuvor Koffein gemessen. In Anlehnung an die Experimente von Guillaume et al. [20] wurde die Auftrennung mittels einer Thermo Hypercarb Säule durchgeführt. Das Chromatogramm der bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$ gesplitteten Fluss separierten Alkohole ist in Abbildung 2-38 gezeigt.

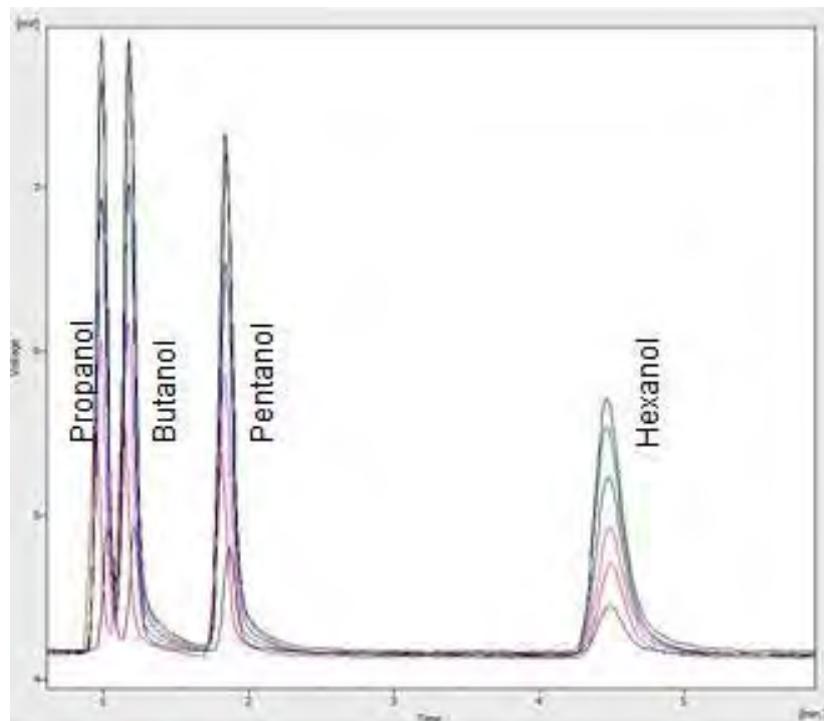


Abbildung 2-38: Auftrennung eines Alkoholgemisches mit Propanol, Butanol, Pentanol und Hexanol ($C_{\text{Abs}} = 0,1 \mu\text{g C mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g C mL}^{-1}$). LC-Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$; Mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

Um die hohe Reproduzierbarkeit der Kapillar-HPLC-Zerstäuber-FID-Kopplung zu zeigen, sind in Tabelle 2-14 verschiedene experimentelle Retentionsdaten für Wiederholungsmessun-

gen eines Alkoholstandards mit jeweils $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kohlenstoff je Alkohol zusammengefasst. Die Auswertung bezieht sich auf das zuletzt von der Trennsäule eluierende Hexanol. Jeder der in Tabelle 2-14 dargestellten Parameter hat eine relative Standardabweichung $\leq 6 \%$.

Tabelle 2-14 Wiederholungsmessungen für Hexanol $c(C_{\text{Abs}}) = 6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Angegeben sind die Peakfläche, Peakhöhe und Peakbreite mit Standardabweichung.

Parameter	Peakfläche in mV s	Peakhöhe in mV	Peakbreite in min
Messung 1	12,1	0,77	0,23
Messung 2	11,6	0,84	0,21
Messung 3	12,2	0,86	0,21
Mittelwert	12,0	0,82	0,22
Standardabweichung	0,32	0,05	0,01
RSD in %	2,7	5,7	5,3

Die auf Grundlage dieser Messungen ermittelten Nachweisgrenzen der vier Alkohole sind in Tabelle 2-15 zusammengefasst. Auch hier wurde eine Standardabweichung der Peakfläche von kleiner 6 % und einem Bestimmtheitsmaß von 0,99 ermittelt.

Tabelle 2-15: Statistische Parameter des aufgetrennten Alkohol-Mix. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$; mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{Luft}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$; Kalibrationsbereich: 0,1 bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Analyt	Bestimmtheitsmaß (R^2)	RSD in %	Nachweisgrenze in $\mu\text{g mL}^{-1}$
Propanol	0,99	3	0,39
Butanol	0,99	5	0,22
Pentanol	0,99	4	0,31
Hexanol	0,99	3	0,23

Der berechnete relative Response der Alkohole ist in Tabelle 2-16 dargestellt. Anhand dieser Daten ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem detektierten Signal und der Kohlenstoffkonzentration innerhalb der Probe festzustellen. Die Responsefaktoren variierten von $2,1 \text{ mV pro } \mu\text{g mL}^{-1}$ Kohlenstoff bis $2,4 \text{ mV pro Kohlenstoff}$. Im Durchschnitt erzeugten die mittels Hypercarb Säule getrennten Alkohole einen relativen Response von $2,24 \text{ mV pro } \mu\text{g mL}^{-1}$ Kohlenstoff mit einer Standardabweichung von circa 4,3 %.

Tabelle 2-16: Relativer Kohlenstoff-Response der vier analysierten Alkohole mit Mittelwert und relativer Standardabweichung. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split: 1:20 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275\text{ }^\circ\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50\text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{Luft}} = 450\text{ mL min}^{-1}$.

Analyt	Relativer Response in mV pro $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kohlenstoff	Mittelwert rel. Response in mV pro $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kohlenstoff	RSD in %
Propanol	2,19		
Butanol	2,36	2,24	4,3
Pentanol	2,27		
Hexanol	2,14		

Weiterhin sind in Tabelle 2-17 die entsprechenden Kalibrationsfunktionen der Alkohole dargestellt. Bei Betrachtung der y - Achsenabschnitte der in Tabelle 2-17 dargestellten Kalibrierfunktionen wird deutlich, dass die Geraden in Abwesenheit von Kohlenstoff annähernd durch den Nullpunkt des Koordinatensystems verlaufen.

Tabelle 2-17: Kalibrierfunktionen der analysierten Alkohole für den Konzentrationsbereich von $c(C_{\text{Abs}}) = 0,1\text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12\text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split: 1:20 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$; mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275\text{ }^\circ\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50\text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{air}} = 450\text{ mL min}^{-1}$.

Analyt	Steigung	Achsenabschnitt
Propanol	1,636	0,437
Butanol	2,016	0,618
Pentanol	1,866	0,683
Hexanol	1,981	0,126

Abschließend ist festzuhalten, dass im Fall der aliphatischen Alkohole der Response proportional zum Kohlenstoffgehalt der Probe ist.

2.6.4.3 Untersuchung des Response semi-volatiler Substanzen

Die Untersuchung bezüglich der Abhängigkeit des FID-Signals von der Kohlenstoffkonzentration in der Probe der semi-volatilen Substanzen Cumarin und Uracil mit Siedetemperaturen von 301 °C respektive 379 °C führen zu ähnlichen Ergebnissen wie die Untersuchungen der volatilen Substanzen. Die korrespondierenden Kalibrationsgeraden sind im Anhang in Abschnitt 5.7.2 dargestellt. Die Nachweisgrenzen der Analyten als auch das Bestimmtheitsmaß der Kalibration sind in Abschnitt 5.7.2 aufgeführt. Die Kalibration korreliert für Uracil sowie Cumarin mit einem Bestimmtheitsmaß $\geq 0,99$. Hier muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass deutlich höhere Standardabweichungen der Peakfläche von 8,5 bzw. 10,4 % erhalten werden. Auch die berechneten Nachweisgrenzen der Analyten sind deutlich höher.

Die RSD der Peakfläche von Uracil lag bei 10,4 %, Cumarin wies eine RSD von 8,5 % auf. In der nachfolgenden Tabelle 2-18 sind alle wesentlichen statistischen Resultate nochmals zusammengefasst. Die Nachweisgrenze von Uracil ist mit $c(C_{\text{Abs}}) = 27,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ aufgrund der höheren Minimalkonzentration von $c(C_{\text{Abs}}) = 14,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ höher ausgefallen als bei Cumarin $c(C_{\text{Abs}}) = 0,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. den zuvor diskutierten Alkoholen ($c(C_{\text{Abs}}) = 0,22 - 0,39 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabelle 2-18: Statistische Parameter der mittels Fließinjektionsanalyse untersuchten Substanzen Cumarin und Uracil. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split: 1:10 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$; mobile Phase: 100 % Wasser; $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$; $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$; $F_{\text{Luft}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

Analyt	Bestimmtheitsmaß (R^2)	RSD in %	Nachweisgrenze in $\mu\text{g mL}^{-1}$
Cumarin	0,99	8,5	0,47
Uracil	0,99	10,4	27,0

Der Response von Cumarin (60,9 mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$) und Uracil (0,63 mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$) lag für Cumarin deutlich über und für Uracil deutlich unter dem Response, der für die Alkohole berechnet wurde.

2.6.4.4 Untersuchung des Response nicht-volatiler Substanzen

Ein wichtiger Aspekt der Evaluierung des entwickelten LC-FID-Interface war die Anwendung bei der Analyse nicht-volatiler Substanzen. In früheren Arbeiten auf dem Gebiet der LC-FID Kopplung wurde ein nicht-linearer Response für verschiedene semi-volatile Substanzen wie z. B. 4-Hydroxybenzamid ($T_{\text{Sied}} = 345 \text{ °C}$) erhalten (vgl. Young [17,18]). Daher lag ein Schwerpunkt der Analyse bei den Substanzen Hydrocortison ($T_{\text{Sied}} = 613 \text{ °C}$), Sulfamethoxazol ($T_{\text{Sied}} = 490 \text{ °C}$), Theophyllin ($T_{\text{Sied}} = 474 \text{ °C}$) und Thymin ($T_{\text{Sied}} = 566 \text{ °C}$). Entgegen den Ergebnissen für die sogenannte Nebulizer/Spray Chamber von Young et al. konnte für alle nicht-volatilen Substanzen über den gesamten Kalibrierbereich von $c(C_{\text{Abs}}) = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ für Sulfamethoxazol und Hydrocortison und $c(C_{\text{Abs}}) = 15,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $238 \mu\text{g mL}^{-1}$ für Sulfamethoxazol und $c(C_{\text{Abs}}) = 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ für Theophyllin ein linearer Zusammenhang zwischen dem FID-Signal und der Kohlenstoff-Konzentration beobachtet werden (siehe Abschnitt 5.7.3).

In Bezug auf die Modellsubstanz Theophyllin zeigte sich, dass sich der lineare Bereich über vier Zehnerpotenzen erstreckt. Zwar sind die relativen Standardabweichungen für alle nicht-volatilen Substanzen höher als bei volatilen bzw. semi-volatilen Komponenten, jedoch konnte im Vergleich zu Young et al. [17,18] eine deutliche Steigerung des Arbeitsbereiches mit dem entwickelten LC-FID-Interface erreicht werden. Gemäß der relativen Standardabweichung weisen auch die Konfidenzintervalle auf eine geringfügig höhere Schwankung der Messwerte hin (siehe Abschnitt 5.7.3). Darüber hinaus ist auffällig, dass die relative Standardabweichung für den gemessenen Kalibrierbereich der Substanzen entsprechend den Siedetemperaturen zunimmt (Hydrocortison 13,6 % mit $T_{\text{Sied}} = 613 \text{ °C}$, Thymin 9,9 % mit $T_{\text{Sied}} = 566 \text{ °C}$, Sulfamethoxazol 9,1 % mit $T_{\text{Sied}} = 490 \text{ °C}$ und Theophyllin 6,8 % mit $T_{\text{Sied}} = 474 \text{ °C}$). Die Nachweisgrenzen der nicht-volatilen Substanzen sind zusammen mit den Kalibrierbereichen und weiteren statistischen Größen in Tabelle 2-19 zusammengefasst.

Tabelle 2-19: Statistische Parameter der mittels Fließinjektionsanalyse untersuchten Modellsubstanzen. LC-Bedingungen: 20 μL Probenschleife; Split 1:20 auf 50 $\mu\text{L min}^{-1}$; $T_{\text{FID}} = 275 \text{ °C}$; $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$; mobile Phase: 100 % Wasser; Konzentrationsbereich: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bis 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Analyt	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Relative Standardabweichung in %	Nachweisgrenze in $\mu\text{g mL}^{-1}$
Hydrocortison	0,96	13,6	0,75
Sulfamethoxazol	0,98	9,1	0,57
Theophyllin	0,99	6,8	44
Thymin	0,99	9,9	19

Der relative Response in mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$ schwankt für die analysierten Substanzen von 1,81 mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$ für Thymin bis 30,5 mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$ für Sulfamethoxazol.

2.6.4.5 Vergleich des Response für alle Substanzklassen

Der Vergleich der in Tabelle 2-20 zusammengefassten Werte für den relativen Response der Modellschubstanzen lässt keinen direkten Zusammenhang deutlich werden. Die Unterschiede von 0,63 mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$ für Uracil und 60,9 mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$ für Cumarin bedeuten eine Variation um den Faktor 100.

Tabelle 2-20: Relativer Response in mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$ für verschiedene Analyten.

Analyt	Relativer Response in mV pro $\mu\text{g C mL}^{-1}$
Cumarin	60,9
Koffein	58,6
Hydrocortison	26,1
Sulfamethoxazol	30,5
Uracil	0,63
Thymin	1,81
Propanol	2,20
Butanol	2,40
Pentanol	2,30
Hexanol	2,10

Die von Laumer beschriebene Abhängigkeit des Response von der Molekülstruktur konnte nur bedingt festgestellt werden, wie z. B. für Koffein und Cumarin. Wie von Laumer et al. [30] beschrieben, wies Koffein bei äquivalenter Kohlenstoffkonzentration zu Cumarin ein geringeres Detektorsignal auf, was eine Folge der erhöhten C-N Bindungszahl in Koffein ist.

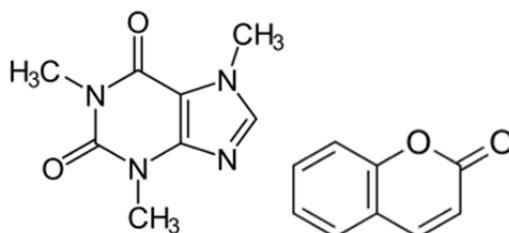


Abbildung 2-39: Strukturformeln für Koffein (links) und Cumarin (rechts).

Während der Pyrolyse muss mehr Energie für die Ionisierung aufgebracht werden, d. h. weniger angeregte Kohlenstoffatome erreichen den Detektor unter gleichen Bedingungen innerhalb der gleichen Zeit.

Die Analyse der Alkohole zeigt, wie in diversen Publikation [30,31] im Bereich der Gaschromatografie beschrieben, einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Kohlenstoffkonzentration innerhalb einer Probe und dem erhaltenen Response.

2.6.5 Bewertung der Nachweisempfindlichkeit der LC-FID-Kopplung

2.6.5.1 Nachweisempfindlichkeit der Kapillar-HPLC-FID Kopplung

Mithilfe des entwickelten LC-FID-Interfaces resultieren bei einer Säulentemperatur von 100 °C und einem Fluss von 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ um bis zu 3 Zehnerpotenzen geringere Detektionslimits als in früheren Studien von u. a. Young et al. Tabelle 2-21 fasst relevante Einstellungen für die LC-FID-Kopplung aus der Literatur zusammen.

2.6.5.2 Nachweisempfindlichkeit der Nano-HPLC-FID-Kopplung

In Abschnitt 2.4.2.1 wurde bereits ausgeführt, dass mit Hilfe der Original-FID-Düse eine Nachweisempfindlichkeit von 5 ng Koffein absolut mit der Nano-HPLC-FID Kopplung erreicht werden konnte. Im Folgenden wird die ermittelte Nachweisgrenze für Methanol auf einer monolithischen Trennsäule diskutiert. Diese Trennsäulentechnologie ist besonders gut für die Kopplung mit dem Flammen-Ionisationsdetektor geeignet, da die Säule selbst als Transferkapillare fungiert und so das Extrasäulenvolumen, im Vergleich zu konventionellen Nano-HPLC-Säulen, weiter reduziert werden kann. Bedingt dadurch eluieren die Analyten als schmale Peaks von der Trennsäule und es werden im Vergleich zu partikulären stationären Phasen niedrigere Nachweisgrenzen erzielt.

Um dies zu verdeutlichen ist in Abbildung 2-40 das Chromatogramm der Elution von Methanol auf der monolithischen Nano-HPLC-Trennsäule dargestellt.

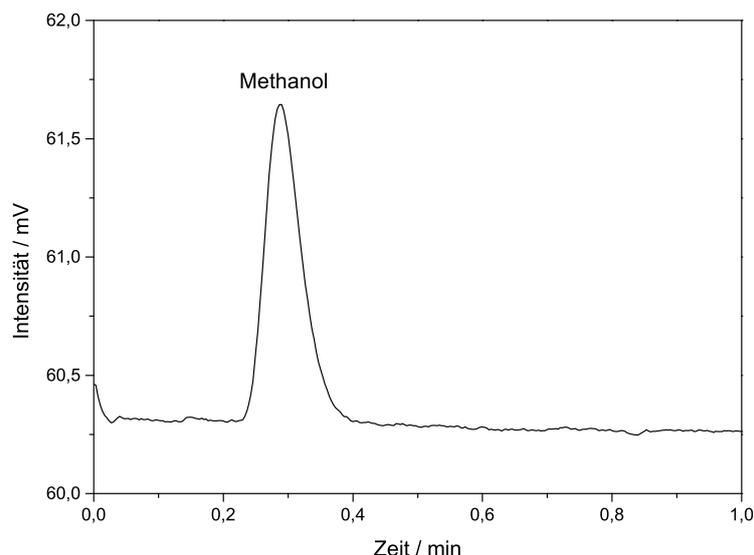


Abbildung 2-40: Chromatogramm der Elution von Methanol auf einer monolithischen Nano-HPLC-Trennsäule. Chromatografische Bedingungen: mobile Phase: deionisiertes Wasser; Flussrate: 5 $\mu\text{L min}^{-1}$; Injektionsvolumen: 50 nL; Analytkonzentration: 0,01 Vol.-% Methanol; Säule: Monolith; Temperatur: Raumtemperatur; FID-Bedingungen: Gaseinstellung: 100 mL min^{-1} H_2 ; 450 mL min^{-1} Luft; Basistemperatur: 275 °C.

Aufgrund der erheblich glatteren Basislinie wurde eine Nachweisgrenze von 0,23 ng Methanol absolut auf der Trennsäule erreicht. Im Vergleich dazu erreichten Young et al. eine Nachweisgrenze von 780 ng [17,18], Hooijschuur et al. für die homologe Reihe der Alkohole eine Nachweisgrenze von 3 bis 10 ng absolut auf der Trennsäule [26] und Ingelse et al. erzielten bei einem Injektionsvolumen von 50 μL eine Nachweisgrenze von 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, was einer absoluten NWG von 10 ng entspricht [21]. Vor diesem Hintergrund kann festgehalten werden, dass die in diesem Forschungsvorhaben realisierte Nano-HPLC-FID-Kopplung um den Faktor 10 besser als der in der Literatur beschriebene Stand der Technik ist.

In Tabelle 2-21 sind die in der Literatur beschriebenen HPLC-FID-Kopplung mit den verfügbaren experimentellen Randbedingungen zusammengefasst.

Tabelle 2-21: Vergleich der entwickelten LC-FID-Kopplung mit in der Literatur beschriebenen Ansätzen auf Basis aliphatischer Alkohole.

Forschungsgruppe	Analyten	Nachweisgrenze in ng	Temperatur in °C	Trennsäule	Flussrate in $\mu\text{L min}^{-1}$	Injektionsvolumen in nL	Mobile Phase
IUTA e. V.	Methanol	0,23	RT	PS-DVB Monolith	5	50	Deion. Wasser
		0,26	30	VisionHT	2	50	Deion. Wasser
Fu et al.	Methanol	8	120	Ohne Säule	35	k. A.	Deion. Wasser
	Ethanol	10	120	Ohne Säule	35	k. A.	Deion. Wasser
Hooijschuur et al.	C ₁ -C ₄ Alkohole	3 bis 10	k. A.	LiChrosorb RP-2	10	k. A.	Deion. Wasser mit 0,1 % HCOOH
Ingelse et al.	Methanol	10	k. A.	Ohne Säule	50	50.000	Deion. Wasser
Miller et al.	Butanol	1	k. A.	k. A.	20-50	100.000 bis 200.000	Deion. Wasser
		5	k. A.	k. A.	20-50	100.000 bis 200.000	Deion. Wasser
Nakajima et al.	C ₁ -C ₅ Alkohole	26 bis 57	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Guillarme et al.	Alkohole	Erwartet: 0,1 bis 1,0	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Young et al.	Methanol	780	120 bis 180	PS-DVB	k. A.	k. A.	k. A.
	Butanol	300	(7 °C min ⁻¹)				

3 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

3.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrages

Die Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrages bestanden in der Entwicklung und Evaluierung der Kopplung der Nano- und Kapillar-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit einem Flammen-Ionisationsdetektor. Weiterhin sollte im Rahmen des Projektes abgeschätzt werden, ob die LC-FID-Kopplung als umfassende und universelle Analysetechnik angewendet werden kann, um alle in einem pharmazeutischen Synthesegemisch enthaltenen kohlenstoffhaltigen Verbindungen mit einem maximalen Fehler von $\pm 20\%$ zu quantifizieren.

Im Folgenden wird auf die nach Abschluss des Projektes erreichten technischen Spezifikationen bzw. Fragestellungen eingegangen und mit dem aktuellen Stand der Technik verglichen.

3.1.1 Kopplung zwischen HPLC und FID

Im Rahmen des Forschungsvorhabens ist es erstmals gelungen, eine direkte Kopplung zwischen HPLC und FID auf Basis der Nano-HPLC zu realisieren. Durch die konsequente Miniaturisierung der Trenneinheit und der damit einhergehenden Reduzierung der Gesamtflussrate ist es möglich, prinzipiell jeden beliebigen Flammen-Ionisationsdetektor, wie er für die Gaschromatografie genutzt wird, einzusetzen. Aufgrund der niedrigen Gesamtflussrate von weniger als $5 \mu\text{L min}^{-1}$ liegt das bei der Volumenexpansion der mobilen Phase durch den Phasenübergang entstehende Gasvolumen in derselben Größenordnung wie im Bereich der Gaschromatografie. Insofern ist die Verwendung eines speziellen Interfaces für die Kopplung des FID mit der Nano-HPLC nicht notwendig. Die Technologie steht somit jedem Hersteller analytischer Systeme auf Basis der GC-FID-Kopplung direkt zur Verfügung, da keine Modifikationen am Detektor vorgenommen werden müssen. Des Weiteren ist durch die Verwendung der Original-FID-Düse die Handhabung der Kopplung erheblich einfacher.

Werden höhere Flussraten über $5 \mu\text{L min}^{-1}$ eingestellt, so ist ein spezielles Interface notwendig, um die mobile Phase vollständig und reproduzierbar zu versprühen. Obwohl die HPLC-Pumpentechnologie zur reproduzierbaren und splitfreien Förderung kleinster Volumenströme kommerziell verfügbar ist, werden diese Systeme insbesondere im Umfeld der pharmazeutischen Industrie noch nicht auf breiter Ebene eingesetzt. Um die hier erzielten Ergebnisse deshalb in die industrielle Praxis zu überführen, empfiehlt es sich, beide technologischen Ansätze parallel weiter zu verfolgen.

3.1.2 Stationäre Phasen und Säulenhardware

3.1.2.1 Stationäre Phasen

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Untersuchungen zum Säulenbluten belegen, dass bei der LC-FID-Kopplung lediglich Trennsäulen mit einer entsprechenden Temperaturstabilität genutzt werden sollten, wenn Temperaturen ≥ 80 °C erforderlich sind. Dies gilt sowohl für den Kapillar- als auch Nano-Flussbereich. Anderenfalls wird ein starkes Rauschen der Basislinie des Flammen-Ionisationsdetektors beobachtet. Dies ist bedingt durch den von der mobilen Phase ausgewaschenen Kohlenstoff. Aus den in Abschnitt 2.6.1 vorgestellten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass ähnliche Trennsäulen wie für die Kopplung mit der Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) auch im Rahmen der LC-FID-Kopplung genutzt werden können [32,33]. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die von Waters entwickelten Hybridmaterialien zu erwähnen, die über eine exzellente Stabilität auch bei Temperaturen ≥ 100 °C verfügen [32].

Da nur Wasser als mobile Phase verwendet werden kann, sollte die Polarität bzw. Hydrophobizität der stationären Phase an das Trennproblem angepasst sein. Wie den Ergebnissen aus Kapitel 2.2 zu entnehmen ist, resultieren für bestimmte Substanzen sehr lange Analysenzeiten von bis zu mehreren Stunden. Eine Elution unpolarer Verbindungen auf klassischen Umkehrphasen ist deshalb selbst bei Temperaturen über 100 °C nur eingeschränkt möglich. In diesem Zusammenhang könnten jedoch neue Materialien auf Basis von modifizierten Perlcellulosen bzw. Hydrogelen, deren Hydrophobizität über pH- und/oder Temperatureffekte eingestellt werden kann, eine Alternative darstellen. Ein aktuelles IGF-Forschungsvorhaben (IGF-FV-Nr. 18033 BG, Laufzeit 01.02.2014 bis 30.04.2016) widmet sich dieser Fragestellung, um auch unpolare Substanzen einer HPLC-Analyse zugänglich zu machen, wenn nur Wasser als mobile Phase verwendet werden kann.

3.1.2.2 Hardware

Ein anderes Problem stellt die derzeit verfügbare Hardware dar. Dies bezieht sich sowohl auf die Säulenhardware als auch auf die Kapillaren, um die Säule mit dem Detektor zu verbinden. Konventionelle HPLC-Säulen mit einem Innendurchmesser > 1 mm werden i. d. R. in einer Edelstahlhardware ausgeliefert. Die Verbindung zwischen HPLC-Säule und FID kann in diesem Fall ebenfalls über Edelstahlkapillaren realisiert werden, die mittlerweile bis zu einem Innendurchmesser von 50 μm kommerziell bezogen werden können [34]. Kritische Systemvolumina, die insbesondere den Bereich nach der Trennsäule betreffen, wirken sich i. d. R. bei konventionellen HPLC-Säulen nicht so stark auf die Trenneffizienz aus, wie dies für den Bereich der Nano-HPLC der Fall ist. Werden Trennsäulen mit einem Innendurch-

messer zwischen 75 µm und 100 µm verwendet, muss der Innendurchmesser der Transferkapillare unbedingt zwischen 25 µm und 50 µm liegen. Bislang sind für diesen Bereich nur alternative Materialien wie z. B. PEEK oder Fused Silica verfügbar. Neben der eingeschränkten Temperaturbeständigkeit dieser Materialien stellt insbesondere die Verstopfung durch Silikate ein zurzeit noch ungelöstes Problem dar (siehe die ausführlichen Erläuterungen in Abschnitt 2.4.2). Ähnliche Phänomene wurden im Labor der Forschungsstelle 1 bei der Kopplung zwischen Mikro-LC und massenspektrometrischer Detektion beobachtet. Die Ursache lässt sich vermutlich ebenfalls auf die Auskristallisation von Silikaten beim Verdampfungsprozess der mobilen Phase zurückführen. Um dieses Problem zu lösen ist es notwendig, dass auch für kleine Innendurchmesser von weniger als 50 µm Kapillaren auf Basis von Edelstahl verfügbar sind.

3.1.2.3 Monolithische Trennphasen

Eine weitere Alternative für die Kopplung zwischen Nano-HPLC und FID könnten monolithische Trennphasen sein. Wie den Ausführungen in Abschnitt 2.6.1.3.2 entnommen werden kann, ist eine direkte Kopplung monolithischer Trennsäulen ohne zusätzliche Verbindungsstücke oder Transferkapillaren möglich. Die in diesem Forschungsvorhaben verwendete monolithische Trennphase zeichnet sich darüber hinaus durch eine extreme Temperaturstabilität aus, so dass eine Verbindung der Säule mit der Basis des FID möglich ist. Auf diese Weise wird jegliches Totvolumen eliminiert und die Verdampfung der mobilen Phase erfolgt von einer größeren Oberfläche, was zusätzlich die Bildung von Spikes reduziert. Der Syntheseprozess für monolithische Säulen lässt es zu, den Innendurchmesser der Säule bis auf 25 µm zu reduzieren.

3.1.3 Mobile Phase

Aufgrund der Tatsache, dass die mobile Phase keinen Kohlenstoff enthalten sollte, da ansonsten ein hoher Signaluntergrund resultiert, kann nur Wasser als mobile Phase verwendet werden. Die Kontrolle bzw. Einstellung des pH-Wertes der mobilen Phase ist jedoch zwingend erforderlich, da ansonsten keine reproduzierbaren Retentionszeiten erhalten werden und viele Substanzen als breite Banden mit einem starken Tailing eluieren. Vor diesem Hintergrund wurden sowohl anorganische als auch organische Puffer untersucht. Es bleibt festzuhalten, dass anorganische Puffer i. d. R. zu Ablagerungen an der FID-Düse führen und einen stabilen Betrieb des Systems über mehrere Stunden nicht erlauben.

In Bezug auf die Nano-HPLC-FID-Kopplung zeigte sich, dass kohlenstoffhaltige Pufferzusätze, wie zum Beispiel Ameisensäure, in höheren Konzentrationen (1 % bis 10 %) genutzt werden können, ohne dass das Detektorsignal gesättigt wird. Hier gilt jedoch zu beachten,

dass die Anwendung von kohlenstoffhaltigen Puffern und Additiven zwangsläufig zu höheren Nachweisgrenzen führt.

3.1.4 Nachweisstärke

In Bezug auf die Nachweisstärke der Nano-HPLC-FID-Kopplung ist festzuhalten, dass der in der wissenschaftlichen Literatur beschriebene Stand der Technik in Bezug auf die Bestimmung von Methanol als Referenz- bzw. Modellsubstanz um den Faktor 10 übertroffen werden konnte. Für Methanol wurde auf einer konventionellen Nano-HPLC-Trennsäule eine Nachweisgrenze von 0,26 ng absolut erzielt. 0,23 ng Methanol absolut konnten auf einer monolithischen Nano-Trennsäule nachgewiesen werden.

Eine weitere Steigerung der Nachweisstärke ließe sich in Kombination mit Anreicherungsverfahren wie z. B. der Festphasenextraktion oder einer großvolumigen Direktinjektion auf die Trennsäule erzielen. Darüber hinaus sollte versucht werden, die Nachweisgrenze über die Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zu reduzieren. Dies gelingt, wenn eine optimale Anschlusstechnik ohne Totvolumina entwickelt wird, so dass Peakbreiten von wenigen Sekunden resultieren. Dieser Lösungsansatz ist deshalb eng mit den in Abschnitt 3.1.2 skizzierten Problemen verknüpft.

3.1.5 Universelle Detektion und Response

Anhand der in Abschnitt 2.6.4 aufgeführten Ergebnisse wird deutlich, dass ein wichtiges Teilziel des Projektes, nämlich die Quantifizierung prinzipiell unbekannter Verbindungen aus einem Synthesegemisch mit einem Fehler $\leq 20\%$ anhand des universellen Response nicht erreicht werden konnte. Während für die homologe Gruppe der Alkohole ein konstanter Response von $2,2 \text{ mV pro } \mu\text{g mL}^{-1}$ ermittelt wurde, ergaben sich in Bezug auf typische pharmazeutische Verbindungen mit einem hohen Anteil an Heteroatomen beträchtliche Abweichungen. Es zeigte sich, dass der Response für Uracil und Cumarin in einem Bereich von $0,63 \text{ mV pro } \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $60,9 \text{ mV pro } \mu\text{g mL}^{-1}$ schwankt. Eine Lösungsstrategie für dieses Problem könnte darin bestehen, den Response in Abhängigkeit der funktionellen Gruppen eines Moleküls für unterschiedliche Substanzklassen zu ermitteln.

3.2 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der Ergebnisse – Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten

Zur Zeit gibt es kein auf dem Markt befindliches System für die Kopplung von Nano- und Kapillar-HPLC mit dem Flammen-Ionisationsdetektor, das für die Anwendung von Flussraten in einem Bereich von 500 nL min^{-1} bis $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ ausgelegt ist. Insofern stellen die hier erzielten Ergebnisse ein sehr hohes innovatives wissenschaftlich-technisches Potenzial dar, das eine konsequente Weiterentwicklung miniaturisierter analytischer Systeme erlaubt.

Mit dem hier vorgestellten Systemaufbau ist es nun möglich, die Kopplung der Flüssigkeitschromatografie mit einem konventionellen Flammen-Ionisationsdetektor zu realisieren. Für die chromatografische Trennung können konventionelle HPLC- als auch Nano-HPLC-Trennsäulen, aber auch moderne monolithische Phasen genutzt werden. Letzt genannte Phasen bieten in Bezug auf eine einfache Handhabung und die Reduzierung des Extrasäulenvolumens deutliche Vorteile gegenüber konventionellen Trennsäulen.

Sowohl für analytisch ausgerichtete Unternehmen, die sich im Bereich der Mikrosystemtechnik etabliert haben, als auch für Dienstleister, die die neue Technologie nutzen wollen, erschließen sich hier große Potenziale. Anhand der aktuellen Entwicklung im Bereich der miniaturisierten flüssigkeitschromatografischen Systeme ist davon auszugehen, dass ähnliche Systeme innerhalb der nächsten Jahre verstärkt entwickelt bzw. weiterentwickelt werden, um diese in Routinelaboratorien zu etablieren.

Die Kopplung von Nano- bzw. Kapillar-HPLC mit dem FID ist dabei prinzipiell für alle Bereiche der Life Sciences geeignet, wenn der Anteil aller kohlenstoffhaltigen Verbindungen in verschiedenen Gemischen quantifiziert werden muss. Darüber hinaus bietet die Nano-HPLC-FID Kopplung entscheidende Vorteile, wenn die Probenmenge limitierend ist. Aufgrund der Miniaturisierung ist es möglich, kleinste Volumina von wenigen Nanolitern in das System zu überführen und anschließend zu quantifizieren.

Die hier vorgestellten Sachverhalte verdeutlichen demzufolge das extrem innovative Potenzial der im Rahmen des Projektes entwickelten Technologie und belegen die enormen Einsparpotenziale in Bezug auf die notwendigen Ressourcen.

3.2.1 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

Um eine schnelle Umsetzung der erzielten Ergebnisse in die industrielle Praxis zu erzielen, wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Transfermaßnahmen durchgeführt, die im Folgenden erläutert und in Tabelle 3-1 zusätzlich unter Berücksichtigung des konkreten Zeitrahmens aufgeführt werden.

3.2.1.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Mehrheit der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Mitglieder sind den kleinen und mittelständischen Unternehmen zuzurechnen. Die aufgeführten Unternehmen entstammen vorwiegend den Branchen der Mikrosystem-, Analysen- und Labortechnik. Dies gewährleistet, dass nach Ende des Projektes eine zeitnahe Umsetzung des in diesem Projekt entwickelten Demonstrators möglich ist. Während der Projektlaufzeit wurden drei Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt, um die Probleme immer zeitnah zu diskutieren und neue Lösungsansätze umzusetzen. Alle Sitzungen wurden in Duisburg durchgeführt. Weitere Angaben zur zeitlichen Abfolge der Ausschusssitzungen können der Tabelle 3-1 entnommen werden.

3.2.1.2 Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA

Sowohl während der Projektlaufzeit als auch nach Abschluss des Projektes wurden wichtige Fachtagungen und Messen in Deutschland dazu genutzt, weitere potenziell interessierte Unternehmen über die Projektinhalte und das Projektergebnis zu informieren. In diesem Zusammenhang ist die analytica hervorzuheben, die im Abstand von zwei Jahren in München stattfindet. Die am Projekt beteiligten Partner haben an dieser Messe sowohl in 2012 als auch 2014 teilgenommen und in Einzelgesprächen mit kmU über die Projektidee als auch die technische Umsetzung gesprochen.

3.2.1.3 Wissenschaftliche Publikationen wie Dissertationen und Beiträge in Fachzeitschriften

Die im Rahmen des Projektes erzielten Ergebnisse werden nach Ablauf der Projektlaufzeit in renommierten wissenschaftlichen Journalen mit Gutachtersystem (peer-Review), als auch deutschsprachigen Fachzeitschriften für die Analysetechnik veröffentlicht. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die interessierte Öffentlichkeit auf breiter Ebene über die Resultate

des Projektes informiert wird. Darüber hinaus werden Projektergebnisse im Rahmen von Dissertationen veröffentlicht.

3.2.1.4 Vorstellung der Ergebnisse durch Vorträge und Posterpräsentationen

Die Vorstellung der Ergebnisse während der Projektlaufzeit erfolgte hauptsächlich in Form von Vorträgen und Postern auf Fachtagungen, Messen, Seminaren sowie bei regionalen branchenspezifischen Veranstaltungen. Weiterhin soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass ein Posterbeitrag bei der ANAKON 2013 in Essen mit dem ersten Platz als bestes Poster ausgezeichnet wurde. Darüber hinaus wurde ein Poster auf der in Brügge abgehaltenen HTC-Konferenz, die sich schwerpunktmäßig wichtigen analytischen Kopplungstechniken widmet, mit dem dritten Platz ausgezeichnet. Weitere Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen auch über die Projektlaufzeit hinaus können der in Tabelle 3-1 aufgeführten Auflistung entnommen werden.

3.2.1.5 Übernahme der Ergebnisse in die akademische Lehre oder berufliche Weiterbildung

Teilergebnisse des Projektes fließen direkt in die entsprechenden Lehrveranstaltungen an der Universität Duisburg-Essen ein.

Darüber hinaus werden Teilergebnisse im Rahmen von Schulungen und Seminaren durch Mitarbeiter der Forschungsstelle 1 vermittelt. Aufgrund der Ausrichtung dieser Veranstaltungen werden nur Ergebnisse vermittelt, die auch einen Beitrag zur beruflichen Weiterbildung der Teilnehmer liefern. Diese Maßnahmen werden deshalb erst im Anschluss an das Projekt durchgeführt, wenn eine genaue Aussage über die verwertbaren Ergebnisse getroffen werden kann.

3.2.1.6 Bau eines Demonstrators bzw. Funktionsmusters

Der im Rahmen des Projektes entwickelte Demonstrator wird auch nach Ende des Projektes für Demonstrationszwecke bzw. weitere Studienarbeiten an den Forschungsstellen 1 und 2 genutzt. Die Verfügbarkeit eines auch nach Projektende einsatzbereiten Funktionsmusters gewährleistet, dass potenziell an einer Produktentwicklung interessierte Unternehmen einen Eindruck von der Leistungsfähigkeit der im Rahmen des Projektes entwickelten Technologie erhalten. Darüber hinaus werden im Anschluss an das Projekt Studienarbeiten durchgeführt, die es den Studierenden ermöglichen, aktuelle technologische Entwicklungen zu nutzen und weitere grundlegende Forschungsarbeiten durchzuführen.

3.2.1.7 Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Tabelle 3-1: Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.

Datum/Zeitraum	Bereits umgesetzte Maßnahmen	Erläuterung
21.11.-22.11.2011	Vortrag Novia HPLC-Tage 2011, Frankfurt am Main Titel des Vortrags: „Neue Entwicklungen bei der Hochtemperatur-HPLC“	Vorstellung des Projektes und der Projektidee während der Novia-HPLC-Tage 2011. Die von der Novia GmbH durchgeführten Seminare richten sich im Wesentlichen an Anwender der HPLC aus der pharmazeutischen Industrie. Es werden aktuelle Trends aus Wissenschaft und Forschung sowie neue Richtlinien aus dem pharmazeutischen Umfeld vorgestellt und diskutiert.
17.04.-20.04.2012	Vortrag Analytica Conference 2012, München Titel des Vortrags: "High-temperature liquid chromatography – Advances, challenges and limitations"	Vorstellung des Projektes und 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.
05.11.-06.11.2012	Vortrag Novia HPLC-Tage 2012, Frankfurt am Main Titel des Vortrags: „Potenziale und Anwendungen der 2D-Chromatografie“.	Vorstellung der Projektidee im Rahmen der Novia HPLC-Tage 2012. Die Novia HPLC-Tage sind eine Austauschplattform zwischen Anwendern und Industrie aus dem Bereich der analytischen Trennverfahren. Es wird ein großer Schwerpunkt auf die Vermittlung von anwendungsorientiertem Wissen gelegt. Die Veranstaltung wird von einer Geräteausstellung begleitet.
05.12.2012	Erster Projektbegleitender Ausschuss in Duisburg	Vorstellung des Projektes und Diskussion der ersten Ergebnisse.
04.03.-07.03.2013	Posterbeitrag Anakon 2013, Essen Titel des Posters: „Development of a LC-FID coupling for the universal detection of semi- and non-volatile compounds“	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.
04.07.2013	Zweiter Projektbegleitender Ausschuss in Duisburg	Vorstellung der erzielten Ergebnisse und Diskussion der geplanten Arbeiten.
05.01.-07.01.2014	Vortrag 24. Doktorandenseminar Hohenroda Titel des Vortrags: "Analysis of alcohols and selected compounds by a novel LC-FID-interface"	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.
29.01.-31.01.2014	Posterbeitrag HTC-Tagung Brügge	Vorstellung der erzielten Ergebnisse im Rahmen der Tagung. Die HTC-Tagung befasst sich mit Kopplungstechniken in der Chromatographie.
27.02.2014	Dritter Projektbegleitender Ausschuss in Duisburg	Vorstellung aller erzielten Ergebnisse und Abschlussdiskussion.
Datum/Zeitraum	Maßnahmen nach Projektende	Erläuterung
01.04.-04.04.2014	Poster Analytica Conference 2014 München Titel der Posters: „Evaluation of a concept coupling flame ionization detection with nano-liquid chromatography“	Vorstellung aller erzielten Ergebnisse im Rahmen der Analytica. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle, Mess- und Prüftechnik sowie Biotechnologie, Life Sciences und Diagnostika.

11.05. -15.05.2014	Posterbeitrag, HPLC 2014, New Orleans USA Titel der Beitrags: „Development of LC/FID Coupling: Analysis of Selected Compounds by High Temperature-LC/FID“	Vorstellung von Projektergebnissen im Rahmen der HPLC 2014. Das International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques ist eine der renommiertesten Tagungen auf dem Gebiet der Flüssigkeitschromatografie. Die begleitende Industrieausstellung, in der auch zahlreiche deutsche Unternehmen vertreten sind, dient zum gegenseitigen Austausch neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse und innovativer Produkte.
Kontinuierlich	Beratung von kmU	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend über die gesamte Projektlaufzeit und auch darüber hinaus durchgeführt.
Ab 2014	Akademische Ausbildung	Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projektes erzielten Forschungsergebnisse in die Lehrveranstaltungen zur Analytischen Chemie an der Universität Duisburg-Essen.
Ab 2014	Veröffentlichung in Fachzeitschriften	GIT; LABO; Journal of Chromatography, Analytical Chemistry

4 Literatur

- [1] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6898.
- [2] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, Anal. Chem. 83 (2011) 2227.
- [3] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, J. Chromatogr. A 1222 (2012) 71.
- [4] C.A. Lipinski, Drug Discovery Today 1 (2004) 337.
- [5] I. Molnar, J. Chromatogr. A 965 (2002) 175.
- [6] E.F. Hewitt, P. Lukulay, S. Galushko, J. Chromatogr. A 1107 (2006) 79.
- [7] S. Heinisch, E. Lesellier, C. Podevin, J.L. Rocca, A. Tchaplá, Chromatographia 44 (1997) 529.
- [8] T. Teutenberg, High-temperature liquid chromatography : a user's guide for method development, RSC Pub., Cambridge, 2010.
- [9] T. Teutenberg, K. Hollebekkers, S. Wiese, A. Boergers, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1262.
- [10] I. Molnar, C. Horvath, J. Chromatogr. 142 (1977) 623.
- [11] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, Introduction to modern liquid chromatography, Wiley, Hoboken, NJ, 2010.
- [12] G. Rheinwald, Personal Communication, München, 02.04.2014
- [13] L.R. Snyder, J.W. Dolan, High-performance gradient elution the practical application of the linear-solvent-strength model, Wiley, Hoboken, NJ, 2007.
- [14] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 178.
- [15] C.F. Poole, The essence of chromatography, Elsevier, Amsterdam ; Boston, 2003.
- [16] Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, [http://www.ufz.de/index.php?en=31698&contentonly=1&lsrd_data\[mvc\]=Public/start](http://www.ufz.de/index.php?en=31698&contentonly=1&lsrd_data[mvc]=Public/start), Zugriff: 05.05.2014
- [17] E. Young, R.M. Smith, B.L. Sharp, J.R. Bone, J. Chromatogr. A 1236 (2012) 16.
- [18] E. Young, R.M. Smith, B.L. Sharp, J.R. Bone, J. Chromatogr. A 1236 (2012) 21.
- [19] C. Becker, Universität Duisburg-Essen, Duisburg.
- [20] D. Guillarme, S. Heinisch, J.Y. Gauthier, P. Lanteri, J.L. Rocca, J. Chromatogr. A 1078 (2005) 22.
- [21] B.A. Ingelse, H.-G. Janssen, C.A. Cramers, HRC-J. High Res. Chrom. 21 (1998) 613.
- [22] T.L. Chester, J. Chromatogr. 299 (1984) 424.
- [23] M.G. Rawdon, Anal. Chem. 56 (1984) 831.
- [24] H. Veening, P.P.H. Tock, J.C. Kraak, H. Poppe, J. Chromatogr. A 352 (1986) 345.
- [25] D.J. Miller, S.B. Hawthorne, Anal. Chem. 69 (1997) 623.
- [26] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.T. Brinkman, HRC-J. High Res. Chrom. 23 (2000) 309.
- [27] N.J. Wu, Q.L. Tang, J.A. Lippert, M.L. Lee, J. Microcolumn Sep. 13 (2001) 41.
- [28] T. Yarita, R. Nakajima, S. Otsuka, T. Ihara, A. Takatsu, M. Shibukawa, J. Chromatogr. A 976 (2002) 387.
- [29] T.J. Causon, R.A. Shellie, E.F. Hilder, The Analyst 134 (2009) 440.
- [30] J.Y. de Saint Laumer, E. Cicchetti, P. Merle, J. Egger, A. Chaintreau, Anal. Chem. 82 (2010) 6457.
- [31] A.D. Jorgensen, K.C. Picel, V.C. Stamoudis, Anal. Chem. 62 (1990) 683.
- [32] L. Zhang, D.M. Kujawinski, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, Rapid Commun. Mass Spectrom. 25 (2011) 2971.
- [33] T. Teutenberg, K. Hollebekkers, S. Wiese, A. Boergers, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1262.
- [34] New Objective, Inc., <http://www.newobjective.com/products/emitters/mt-1.shtml>, Zugriff: 05.05.2014
- [35] J. Park, D. Lee, Int. J. Adv. Manuf. Technol. 40 (2009) 742.
- [36] V. Lenher, H.B. Merrill, Journal of the American Chemical Society 39 (1917) 2630.

5 Anhang

5.1 Hydrophobizitätsindices der ZirChrom-PS Trennsäule

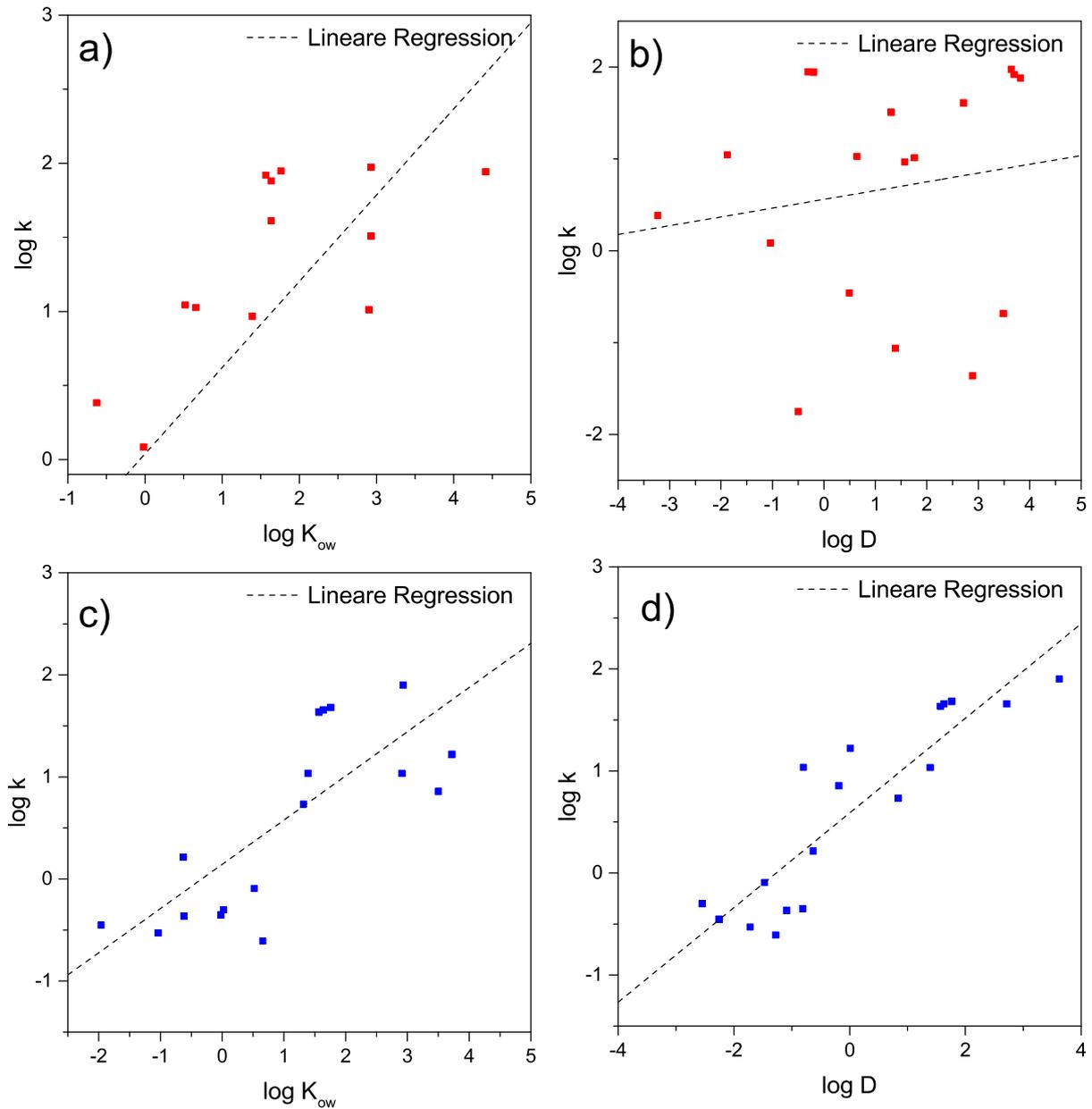


Abbildung 5-1: Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom PS (100 x 2,1 mm, 3,0 μm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min^{-1} ; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$.

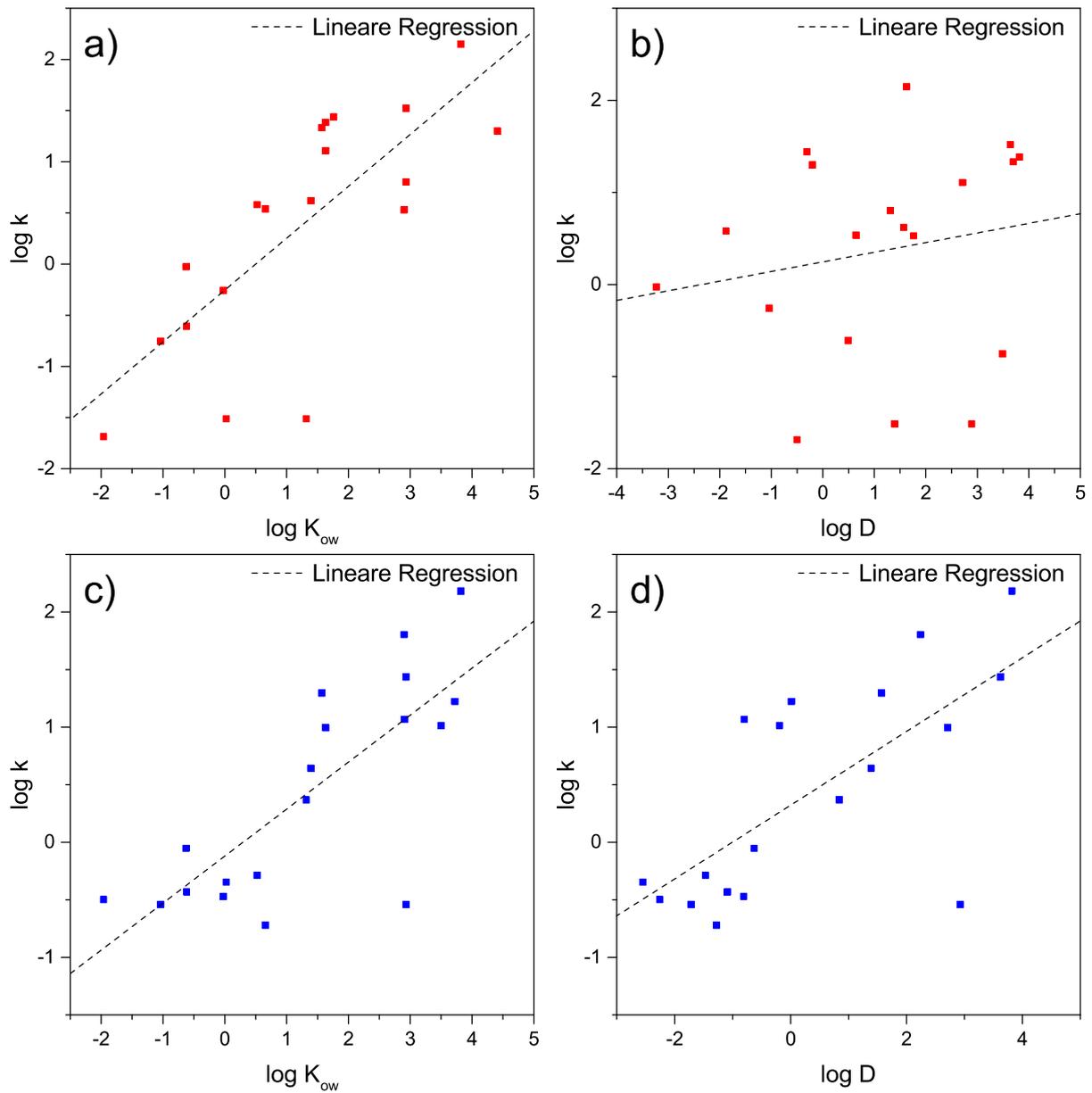


Abbildung 5-2: Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom PS (100 × 2,1 mm, 3,0 µm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: 60 °C.

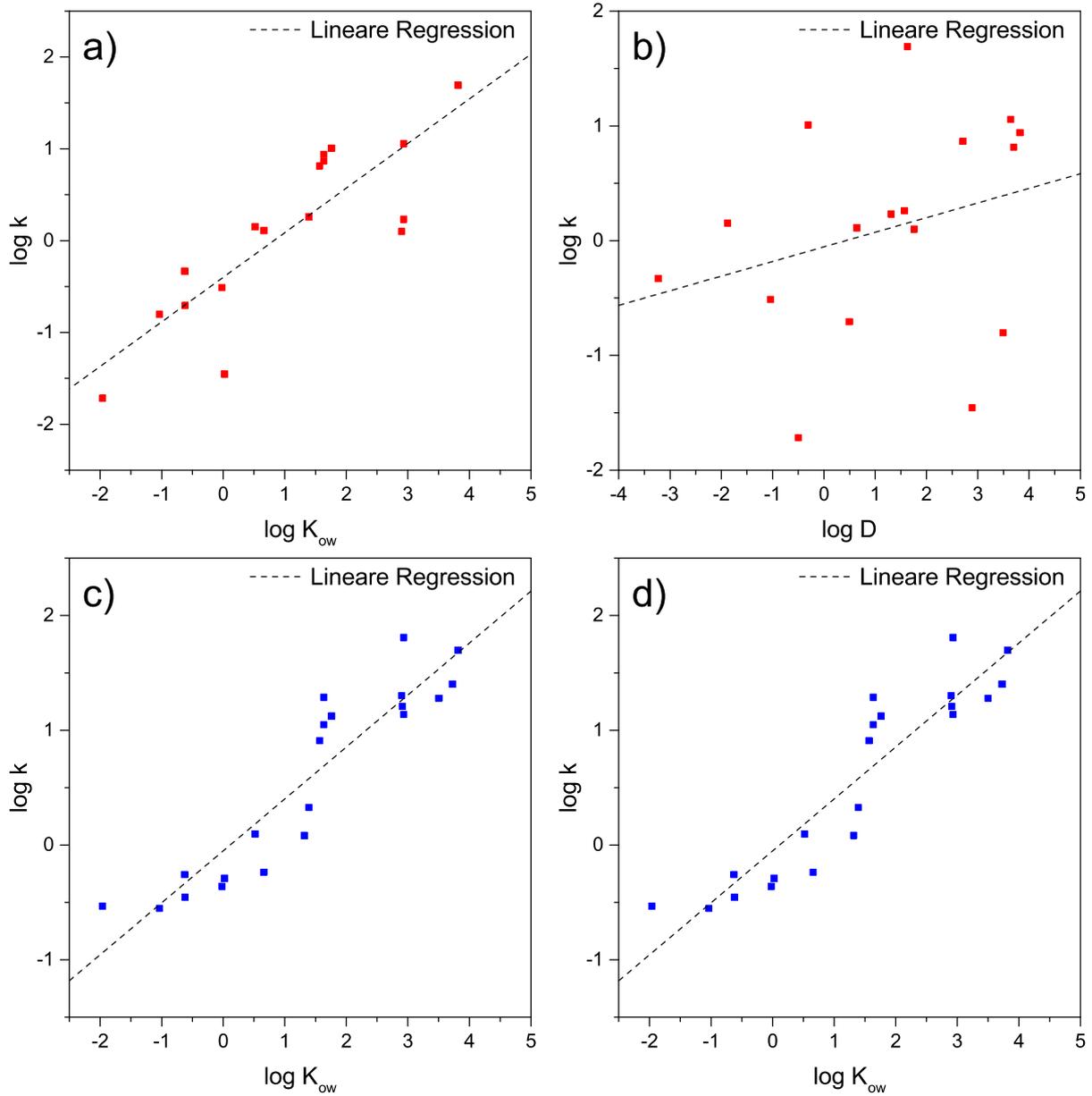


Abbildung 5-3: Vergleich der Hydrophobizitätsindices basierend auf dem a, c) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem b, d) D-Wert für ausgewählte Modellanalyten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom PS (100 × 2,1 mm, 3,0 µm); Detektion: UV bei 254 nm; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; mobile Phase: a, b) deionisiertes Wasser, pH 2,7; c, d) deionisiertes Wasser, pH 9,0; Temperatur: 90 °C.

5.2 Chromatografische Rohdaten für den Hydrophobizitätsindex

Tabelle 5-1: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C8 (50 x 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 100 °C.

Nr.	Substanz	t _R bei 20 % Me-OH in min	t _R bei 15 % Me-OH in min	t _R bei 10 % Me-OH in min	t _R bei 5 % MeOH in min	t _R bei 0 % MeOH in min
1	Koffein	0,52	0,63	0,85	1,38	2,62
2	Theophyllin	0,44	0,49	0,58	0,78	1,23
3	Ibuprofen	30,26	55,52	116,18	251,17	
4	Fenoprofen	15,75	29,30	62,19	137,78	333,65
5	Hydrocortison	4,66	9,06	21,33	57,86	180,48
6	Ketoprofen	8,39	15,90	35,70	86,05	237,05
7	Cytosin	-	-	-	-	-
8	Sulfamethoxazol	0,60	0,76	1,10	1,78	3,49
9	Sulfamethizol	0,50	0,59	0,81	1,30	2,57
10	Procainamid	-	-	-	-	-
11	Cumarin	0,99	1,30	1,92	2,96	5,28
12	Flavon	9,99	18,42	39,97	88,52	247,81
13	Propranolol	0,82	1,33	2,50	5,06	13,01
14	Amitriptylin	2,55	4,58	10,56	22,74	63,08
15	Adenin	-	-	-	-	-
16	Thymin	-	-	-	-	-
17	Uracil	-	-	-	-	-
18	Prednison	3,81	7,55	18,88	52,84	201,63
19	Prednisolon	4,59	8,86	21,03	54,36	172,31
20	Papaverin	0,69	1,23	2,80	8,64	37,03
21	Diethylphthalat	61,75	128,05	259,63	-	-
22	Bisphenol A	120,80	-	-	-	-
23	Benz[a]anthracen	71,76	139,93	297,08	-	-
24	Benzo[a]pyren	5,050	8,86	15,92	32,09	73,68
25	Chrysen	6,61	11,90	24,77	55,97	158,16

Tabelle 5-2: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Methanol mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 90 °C.

Nr.	Substanz	t_R bei 30 % MeOH in min	t_R bei 25 % MeOH in min	t_R bei 20 % MeOH in min	t_R bei 15 % MeOH in min	t_R bei 10 % MeOH in min	t_R bei 5 % MeOH in min	t_R bei 0 % MeOH in min
1	Koffein	0,42	0,49	0,57	0,71	0,99	1,70	3,48
2	Theophyllin	0,40	0,42	0,45	0,49	0,58	0,77	1,18
3	Ibuprofen	2,53	3,66	5,86	10,06	16,97	31,03	60,30
4	Fenopropfen	1,57	2,29	3,65	6,34	11,43	23,59	48,33
5	Hydrocortison	1,97	3,24	6,07	12,98	29,73	86,72	273,44
6	Ketopropfen	1,06	1,51	2,40	4,28	8,19	18,71	43,44
7	Cytosin	-	-	-	-	-	-	-
8	Sulfamethoxazol	0,37	0,38	0,39	0,41	0,46	0,58	0,84
9	Sulfamethizol	0,36	0,36	0,38	0,41	0,47	0,65	1,06
10	Procainamid	0,47	0,53	0,64	0,88	1,35	2,64	6,33
11	Cumarin	0,72	0,88	1,14	1,59	2,28	3,74	6,43
12	Flavon	4,46	7,72	14,32	29,10	59,72	145,40	372,12
13	Propranolol	2,49	4,22	7,75	15,96	33,32	81,89	231,56
14	Amitriptylin	14,89	29,31	61,24	141,07	312,99	772,07	-
15	Adenin	-	-	-	-	-	-	-
16	Thymin	-	-	-	-	-	-	-
17	Uracil	-	-	-	-	-	-	-
18	Prednison	1,58	2,67	5,242	11,235	27,75	79,32	299,53
19	Prednisolon	1,91	3,23	6,216	12,887	29,87	81,38	-
20	Papaverin	3,34	6,56	14,834	36,433	102,21	-	-

Tabelle 5-3: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 60 °C.

Nr.	Substanz	t_R für 10 min Gradienten- dauer in min	t_R für 30 min Gradienten- dauer in min	t_R für 60 min Gradienten- dauer in min	t_R für 90 min Gradienten- dauer in min	t_R für 270 min Gradienten- dauer in min
1	Koffein	2,16	3,04	3,60	4,04	4,84
2	Theophyllin	1,60	1,91	2,02	2,12	2,23
3	Ibuprofen	7,66	18,60	33,18	37,780	88,94
4	Fenoprofen	6,27	14,30	24,41	33,39	76,43
5	Hydrocortison	5,00	10,64	17,40	23,26	50,43
6	Ketoprofen	5,61	12,40	20,76	28,06	62,25
7	Cytosin	0,34	0,34	-	-	-
8	Sulfamethoxazol	2,56	3,84	4,82	5,40	6,81
9	Sulfamethizol	2,19	3,13	3,80	4,20	5,06
10	Procainamid	0,85	0,79	-	-	-
11	Cumarin	3,15	4,87	6,18	7,024	9,04
12	Flavon	5,81	12,86	21,54	29,04	64,24
13	Propranolol	3,75	6,93	9,80	12,73	22,31
14	Amitriptylin	4,91	10,41	16,41	22,40	47,25
15	Adenin	0,37	0,37	-	-	-
16	Thymin	0,61	0,63	-	-	-
17	Uracil	0,42	0,42	-	-	-
18	Prednison	4,78	10,13	16,63	22,26	48,66
19	Prednisolon	5,01	10,68	17,53	23,44	50,78
20	Papaverin	3,36	6,52	9,91	13,27	26,76
21	Diethylphthalat	5,36	11,52	18,56	24,64	51,59
22	Bisphenol A	5,36	11,53	18,76	24,82	51,08
23	Benz[a]anthracen	7,37	17,73	31,59	43,91	108,83
24	Benzo[a]pyren	7,63	18,56	33,31	46,63	118,03
25	Chrysen	7,32	17,55	31,18	43,31	106,98

Tabelle 5-4: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 90 °C.

Nr. Substanz	t_R für 10 min Gradienten- dauer in min	t_R für 30 min Gradienten- dauer in min	t_R für 60 min Gradienten- dauer in min	t_R für 90 min Gradienten- dauer in min	t_R für 270 min Gradienten- dauer in min
1 Koffein	1,69	2,03	2,21	2,31	2,438
2 Theophyllin	1,15	1,19	1,19	1,19	1,20
3 Ibuprofen	6,95	16,23	28,28	39,07	92,86
4 Fenopfen	5,48	11,76	19,25	25,58	53,54
5 Hydrocortison	4,32	8,63	13,54	17,55	34,93
6 Ketoprofen	4,87	10,09	16,13	21,09	43,07
7 Cytosin	0,32	0,32	-	-	-
8 Sulfamethoxazol	1,94	2,51	2,82	2,99	3,26
9 Sulfamethizol	1,66	1,99	2,18	2,26	2,40
10 Procainamid	0,53	0,53	-	-	-
11 Cumarin	2,49	3,42	4,00	4,32	4,91
12 Flavon	5,06	10,54	16,88	22,20	44,86
13 Propranolol	2,84	4,66	6,29	7,40	10,51
14 Amitriptylin	3,93	7,66	11,75	15,01	27,95
15 Adenin	0,34	0,34	-	-	-
16 Thymin	0,51	0,50	-	-	-
17 Uracil	0,39	0,39	-	-	-
18 Prednison	4,11	8,17	12,84	16,70	33,53
19 Prednisolon	4,30	8,58	13,52	17,49	34,79
20 Papaverin	2,77	4,91	7,18	8,97	15,35
21 Diethylphthalat	4,72	9,45	14,76	18,94	36,64
22 Bisphenol A	4,51	8,83	13,54	17,09	30,83
23 Benz[a]anthracen	6,63	15,20	26,25	36,06	83,96
24 Benzo[a]pyren	6,88	16,02	28,01	38,79	93,35
25 Chrysen	6,56	15,01	25,81	35,38	81,87

Tabelle 5-5: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Methanol mit 0,1 % Ameisensäure. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 120 °C.

Nr.	Substanz	t_R für 10 min Gradienten- dauer in min	t_R für 30 min Gradienten- dauer in min	t_R für 60 min Gradienten- dauer in min	t_R für 90 min Gradienten- dauer in min	t_R für 270 min Gradienten- dauer in min
1	Koffein	1,23	1,28	1,30	1,28	1,31
2	Theophyllin	0,74	0,73	0,73	0,72	0,74
3	Ibuprofen	6,13	13,69	17,22	22,47	43,70
4	Fenopfen	4,62	9,16	14,13	18,03	32,68
5	Hydrocortison	3,58	6,62	9,81	12,17	20,70
6	Ketoprofen	4,07	7,74	11,67	14,68	25,49
7	Cytosin	0,30	0,30	-	-	-
8	Sulfamethoxazol	1,39	1,52	1,57	1,52	1,60
9	Sulfamethizol	1,15	1,21	1,22	1,06	1,23
10	Procainamid	0,39	0,39	-	-	-
11	Cumarin	1,87	2,24	2,42	2,48	2,56
12	Flavon	4,28	8,21	12,41	15,66	27,39
13	Propranolol	2,06	2,84	3,31	3,50	3,860
14	Amitriptylin	3,04	5,30	7,394	8,82	12,92
15	Adenin	0,32	0,32	-	-	-
16	Thymin	0,42	0,43	-	-	-
17	Uracil	0,37	0,36	-	-	-
18	Prednison	3,41	6,24	9,21	11,49	19,46
19	Prednisolon	3,55	6,54	9,62	12,02	20,20
20	Papaverin	2,21	3,44	4,47	5,12	6,71
21	Diethylphthalat	4,01	7,45	10,98	13,66	22,56
22	Bisphenol A	3,59	6,30	8,80	10,53	15,33
23	Benz[a]anthracen	5,77	12,60	20,80	27,82	58,82
24	Benzo[a]pyren	6,03	13,42	22,61	30,43	67,54
25	Chrysen	5,72	12,40	20,41	27,13	58,28

Tabelle 5-6: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetat pH 9, B) Methanol mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetat, pH 9. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 60 °C.

Nr.	Substanz	t_R für 10 min Gradienten- dauer in min	t_R für 30 min Gradienten- dauer in min	t_R für 60 min Gradienten- dauer in min	t_R für 90 min Gradienten- dauer in min	t_R für 270 min Gradienten- dauer in min
1	Koffein	2,20	3,11	3,73	4,10	4,91
2	Theophyllin	1,41	1,49	1,49	1,49	1,50
3	Ibuprofen	5,50	11,36	17,76	22,58	42,28
4	Fenoprofen	5,02	10,09	15,52	19,85	36,56
5	Hydrocortison	5,04	10,72	17,48	23,28	50,50
6	Ketoprofen	4,47	8,73	13,31	17,01	31,19
7	Cytosin	0,37	0,37	-	-	-
8	Sulfamethoxazol	1,15	1,16	1,06	1,05	1,02
9	Sulfamethizol	1,46	1,61	1,62	1,64	1,64
10	Procainamid	2,59	4,04	5,29	6,23	8,57
11	Cumarin	3,17	4,89	6,23	7,11	9,05
12	Flavon	5,89	13,02	21,87	29,73	65,49
13	Propranolol	5,32	11,46	18,81	25,13	54,13
14	Amitriptylin	6,99	16,48	28,95	40,48	98,51
15	Adenin	0,57	0,57	-	-	-
16	Thymin	0,58	0,57	-	-	-
17	Uracil	0,39	0,39	-	-	-
18	Prednison	4,82	10,18	16,72	22,52	48,99
19	Prednisolon	5,05	10,73	17,60	23,48	50,91
20	Papaverin	5,40	12,04	20,56	28,30	65,96

Tabelle 5-7: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 μm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetat pH 9, B) Methanol mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetat, pH 9,0. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 90 °C.

Nr.	Substanz	t_R für 10 min Gradienten- dauer in min	t_R für 30 min Gradienten- dauer in min	t_R für 60 min Gradienten- dauer in min	t_R für 90 min Gradienten- dauer in min	t_R für 270 min Gradienten- dauer in min
1	Koffein	1,68	2,01	2,20	2,29	2,37
2	Theophyllin	0,95	0,94	0,92	0,91	0,91
3	Ibuprofen	4,60	8,71	12,90	15,97	26,45
4	Fenopfen	4,08	7,44	10,78	13,31	20,70
5	Hydrocortison	4,35	8,66	13,61	17,87	35,02
6	Ketoprofen	3,64	6,49	9,32	11,45	17,74
7	Cytosin	0,36	0,36	-	-	-
8	Sulfamethoxazol	0,72	0,71	0,70	0,65	0,63
9	Sulfamethizol	0,89	0,86	0,85	0,81	0,76
10	Procainamid	2,04	2,73	3,22	3,64	4,00
11	Cumarin	2,53	3,44	4,02	4,41	4,84
12	Flavon	5,15	10,71	17,19	22,71	45,70
13	Propranolol	4,59	9,21	14,56	19,23	37,36
14	Amitriptylin	6,13	13,77	23,65	32,53	73,41
15	Adenin	0,43	0,42	-	-	-
16	Thymin	0,46	0,46	-	-	-
17	Uracil	0,37	0,37	-	-	-
18	Prednison	4,14	8,25	13,09	17,12	33,77
19	Prednisolon	4,33	8,64	13,70	17,85	34,79
20	Papaverin	4,80	10,22	16,98	22,72	49,75

Tabelle 5-8: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C₈ (50 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetat pH 9,0, B) Methanol mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetat, pH 9. Lösungsmittelgradient von 2 % auf 100 % B; Temperatur: 120 °C.

Nr.	Substanz	t_R für 10 min Gradienten- dauer in min	t_R für 30 min Gradienten- dauer in min	t_R für 60 min Gradienten- dauer in min	t_R für 90 min Gradienten- dauer in min	t_R für 270 min Gradienten- dauer in min
1	Koffein	1,28	1,36	1,35	1,32	1,34
2	Theophyllin	0,70	0,69	0,68	0,65	0,65
3	Ibuprofen	3,83	6,67	8,96	10,32	14,78
4	Fenoprofen	3,28	5,40	7,01	7,943	10,65
5	Hydrocortison	3,69	6,88	10,02	12,49	21,77
6	Ketoprofen	2,93	4,61	6,00	6,77	8,97
7	Cytosin	0,36	0,36	-	-	-
8	Sulfamethoxazol	0,56	0,56	0,55	0,52	0,52
9	Sulfamethizol	0,58	0,56	0,56	0,50	0,50
10	Procainamid	1,44	1,58	1,63	1,64	1,67
11	Cumarin	1,95	2,32	2,50	2,59	2,69
12	Flavon	4,43	8,50	12,89	16,52	29,62
13	Propranolol	3,80	6,90	10,12	12,69	21,26
14	Amitriptylin	5,23	10,88	17,57	23,37	48,57
15	Adenin	0,42	0,42	-	-	-
16	Thymin	0,42	0,42	-	-	-
17	Uracil	0,37	0,36	-	-	-
18	Prednison	3,53	6,42	9,50	12,03	20,99
19	Prednisolon	3,65	6,70	9,89	12,44	21,55
20	Papaverin	4,26	8,51	13,44	17,76	35,83

Tabelle 5-9: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 30 °C.

Substanz	t_R 70 % ACN in min	t_R 65 % ACN in min	t_R 60 % ACN in min	t_R 55 % ACN in min	t_R 50 % ACN in min	t_R 45 % ACN in min	t_R 40 % ACN in min	t_R 35 % ACN in min	t_R 30 % ACN in min	t_R 25 % ACN in min	t_R 20 % ACN in min	t_R 15 % ACN in min	t_R 10 % ACN in min	t_R 5 % ACN in min	t_R 0 % ACN in min
Koffein	-	-	-	-	0,82	-	0,81	-	0,83	0,84	0,87	0,93	1,03	1,32	2,37
Theophyllin	-	-	-	-	0,82	-	0,80	-	0,81	0,82	0,84	0,87	0,94	1,09	1,54
Ibuprofen	1,85	2,07	-	2,94	5,29	5,60	10,52	13,38	30,44	61,25	120,19	-	-	-	-
Fenoprofen	2,10	2,40	-	3,50	6,19	6,51	12,89	16,63	37,56	75,68	156,05	-	-	-	-
Hydrocortison	-	-	-	-	0,95	---	1,03	-	1,25	1,51	2,03	3,29	6,86	17,93	62,23
Ketoprofen	0,86	0,88	-	4,62	7,37	7,74	13,83	17,27	35,17	65,36	122,90	-	-	-	-
Cytosin	-	-	-	-	0,74	-	0,73	-	0,72	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
Sulfamethoxazol	-	-	-	-	0,86	-	0,89	-	0,98	1,04	1,17	1,42	1,96	3,21	8,07
Sulfamethizol	-	-	-	-	0,86	-	0,89	-	0,95	1,01	1,12	1,35	1,85	3,14	8,36
Procaimid	-	-	-	-	0,72	-	0,71	-	0,70	0,69	0,69	0,69	0,70	0,72	0,75
Cumarin	-	-	-	-	0,90	-	0,95	-	1,07	1,15	1,31	1,57	2,06	3,08	7,10
Flavon	-	-	-	-	1,09	-	1,41	-	2,45	3,87	6,91	15,07	37,08	103,12	---
Propranolol	-	-	-	-	0,73	-	0,75	-	0,82	0,85	0,98	1,27	1,95	3,70	7,83
Amitriptylin	-	-	-	-	0,75	-	0,81	-	0,96	1,18	1,73	3,24	7,34	18,28	61,42
Adenin	-	-	-	-	0,74	-	0,73	-	0,72	0,71	0,71	0,71	0,71	0,72	0,72
Thymin	-	-	-	-	0,84	-	0,83	-	0,83	0,83	0,83	0,84	0,85	0,89	0,93
Uracil	-	-	-	-	0,83	-	0,82	-	0,82	0,81	0,81	0,82	0,82	0,83	0,84
Prednison	-	-	-	-	0,91	-	0,98	-	1,18	1,40	1,87	3,05	6,24	16,55	58,34
Prednisolon	-	-	-	-	0,95	-	1,02	-	1,23	1,47	1,99	3,23	6,58	16,58	53,39
Papaverin	-	-	-	-	0,73	-	0,73	-	0,77	0,78	0,87	1,10	1,90	5,26	22,96
Diethylphthalat	-	-	-	-	0,95	-	1,09	-	1,44	1,79	2,42	3,64	6,28	12,52	29,09
Bisphenol A	-	-	-	-	0,93	-	1,04	-	1,51	2,14	3,40	6,27	13,02	27,49	65,93
Benz[a]anthracen	1,60	1,97	-	3,62	6,04	9,62	19,70	40,95	106,81	-	-	-	-	-	-
Benzo[a]pyren	1,61	1,97	-	3,62	6,05	9,61	19,67	40,79	105,87	-	-	-	-	-	-
Chrysen	1,20	1,40	-	2,22	3,42	5,03	9,69	18,41	44,91	122,25	-	-	-	-	-

Tabelle 5-10: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 60 °C.

Substanz	t_R 70 % ACN in min	t_R 65 % ACN in min	t_R 60 % ACN in min	t_R 55 % ACN in min	t_R 50 % ACN in min	t_R 45 % ACN in min	t_R 40 % ACN in min	t_R 35 % ACN in min	t_R 30 % ACN in min	t_R 25 % ACN in min	t_R 20 % ACN in min	t_R 15 % ACN in min	t_R 10 % ACN in min	t_R 5 % ACN in min	t_R 0 % ACN in min
Koffein	0,79	0,79	0,79	0,79	0,78	0,78	0,79	0,79	0,80	0,81	0,82	0,85	0,90	1,00	1,35
Theophyllin	0,80	0,80	0,79	0,78	0,79	0,78	0,78	0,79	0,79	0,79	0,81	0,82	0,85	0,91	1,08
Ibuprofen	2,24	2,38	2,69	3,12	3,89	5,16	7,08	10,23	16,42	27,68	47,22	82,41	-	-	-
Fenoprofen	2,53	2,75	3,03	3,54	4,43	5,81	8,17	11,80	18,89	32,51	56,37	102,68	-	-	-
Hydrocortison	0,90	0,90	0,89	0,90	0,91	0,93	0,97	1,03	1,13	1,30	1,58	2,10	3,35	7,07	19,77
Ketoprofen	3,57	3,70	4,00	4,54	5,53	6,89	9,07	12,44	18,63	29,94	48,90	82,79	-	-	-
Cytosin	1,10	0,95	0,86	0,81	0,78	0,75	0,74	0,72	0,72	0,72	0,71	0,71	0,71	0,70	0,71
Sulfamethoxazol	0,77	0,77	0,77	0,78	0,79	0,80	0,81	0,83	0,86	0,90	0,95	1,04	1,22	1,60	3,08
Sulfamethizol	0,80	0,80	0,80	0,80	0,81	0,81	0,82	0,84	0,87	0,91	0,97	1,06	1,27	1,70	3,33
Procainid	0,68	0,68	0,67	0,67	0,67	0,66	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,68	0,68	0,69	0,71
Cumarin	0,79	0,80	0,80	0,81	0,82	0,84	0,86	0,89	0,93	0,98	1,06	1,17	1,37	1,79	3,59
Flavon	0,82	0,84	0,86	0,89	0,94	1,01	1,12	1,32	1,64	2,29	3,50	5,92	12,39	-	98,17
Propranolol	0,69	0,68	0,68	0,68	0,68	0,69	0,69	0,70	0,72	0,75	0,80	0,90	1,12	1,63	3,03
Amitriptylin	0,69	0,68	0,69	0,68	0,69	0,70	0,71	0,74	0,78	0,89	1,08	1,45	2,50	-	14,60
Adenin	0,84	0,80	0,78	0,76	0,74	0,73	0,73	0,72	0,72	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
Thymin	0,86	0,85	0,83	0,82	0,82	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,82	0,82	0,83	0,84	0,86
Uracil	0,86	0,85	0,83	0,82	0,81	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,81	0,82
Prednison	0,84	0,84	0,84	0,84	0,85	0,87	0,90	0,95	1,02	1,15	1,38	1,78	2,81	5,60	15,64
Prednisolon	0,90	0,89	0,88	0,89	0,90	0,92	0,96	1,01	1,11	1,26	1,53	2,02	3,24	6,64	17,51
Papaverin	0,68	0,68	0,68	0,67	0,68	0,68	0,68	0,69	0,70	0,72	0,76	0,83	1,07	1,82	5,10
Diethylphthalat	0,78	0,79	0,80	0,81	0,84	0,87	0,92	1,00	1,11	1,30	1,57	2,01	2,94	5,06	9,57
Bisphenol A	0,77	0,78	0,79	0,81	0,83	0,86	0,91	0,99	1,12	1,40	1,87	2,75	4,80	9,73	23,60
Benz[a]anthracen	1,04	1,16	1,35	1,66	2,23	3,25	5,17	9,33	18,75	41,93	101,09	-	-	-	-
Benzo[a]pyren	1,27	1,50	1,85	2,46	3,57	5,59	9,56	18,53	39,92	95,62	248,79	-	-	-	-
Chrysen	1,04	1,17	1,35	1,67	2,23	3,22	5,10	9,08	17,99	41,41	102,84	-	-	-	-

Tabelle 5-11: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B) Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 90 °C.

Substanz	t_R 70 % ACN in min	t_R 65 % ACN in min	t_R 60 % ACN in min	t_R 55 % ACN in min	t_R 50 % ACN in min	t_R 45 % ACN in min	t_R 40 % ACN in min	t_R 35 % ACN in min	t_R 30 % ACN in min	t_R 25 % ACN in min	t_R 20 % ACN in min	t_R 15 % ACN in min	t_R 10 % ACN in min	t_R 5 % ACN in min	t_R 0 % ACN in min
Koffein	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,77	0,77	0,78	0,79	0,81	0,83	0,90	1,02
Theophyllin	0,77	0,77	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,77	0,77	0,77	0,78	0,79	0,81	0,84	0,91
Ibuprofen	1,38	1,47	1,63	1,85	2,23	2,76	3,59	4,89	7,20	10,75	17,10	33,35	59,96	106,76	-
Fenoprofen	1,46	1,58	1,75	2,00	2,42	3,01	3,93	5,33	7,85	11,87	18,91	38,72	73,28	136,32	-
Hydrocortison	0,85	0,84	0,83	0,84	0,84	0,85	0,87	0,91	0,96	1,05	1,20	1,45	1,97	3,11	7,76
Ketoprofen	1,89	2,03	2,23	2,50	2,95	3,57	4,50	5,86	8,24	11,72	17,71	33,80	61,35	112,34	-
Cytosin	0,87	0,82	0,78	0,76	0,74	0,73	0,71	0,71	0,70	0,70	0,70	0,71	0,72	0,71	0,71
Sulfamethoxazol	0,74	0,74	0,74	0,75	0,75	0,76	0,77	0,78	0,80	0,82	0,86	0,90	0,98	1,12	1,59
Sulfamethizol	0,76	0,76	0,75	0,76	0,77	0,77	0,78	0,79	0,81	0,84	0,86	0,93	1,01	1,18	1,68
Procainid	0,66	0,66	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,66	0,66	0,66	0,67	0,67	0,68	0,69
Cumarin	0,76	0,76	0,77	0,77	0,78	0,80	0,81	0,83	0,85	0,88	0,93	1,00	1,10	1,29	1,96
Flavon	0,78	0,79	0,80	0,83	0,85	0,90	0,96	1,07	1,24	1,55	2,12	3,25	5,72	11,94	34,76
Propranolol	0,66	0,65	0,65	0,66	0,66	0,66	0,66	0,67	0,69	0,71	0,73	0,76	0,85	1,02	1,57
Amitriptylin	0,66	0,66	0,65	0,66	0,66	0,66	0,67	0,69	0,71	0,75	0,82	0,98	1,29	2,08	-
Adenin	0,80	0,78	0,76	0,75	0,74	0,72	0,72	0,72	0,71	0,71	0,71	0,72	0,72	0,72	0,72
Thymin	0,87	0,85	0,82	0,82	0,81	0,80	0,80	0,80	0,79	0,80	0,80	0,80	0,81	0,81	0,83
Uracil	0,87	0,85	0,83	0,82	0,81	0,80	0,79	0,79	0,79	0,78	0,79	0,79	0,79	0,80	0,80
Prednison	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,81	0,82	0,86	0,90	0,96	1,08	1,27	1,68	2,47	5,22
Prednisolon	0,84	0,84	0,83	0,83	0,84	0,85	0,87	0,90	0,96	1,03	1,17	1,41	1,91	2,92	6,74
Papaverin	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,66	0,66	0,67	0,69	0,71	0,75	0,83	1,02	1,88
Diethylphthalat	0,75	0,75	0,76	0,77	0,79	0,80	0,83	0,88	0,93	1,03	1,17	1,41	1,88	2,72	5,79
Bisphenol A	0,75	0,75	0,75	0,76	0,77	0,79	0,82	0,87	0,94	1,06	1,26	1,66	2,43	3,95	8,60
Benz[a]anthracen	0,91	0,98	1,09	1,25	1,54	2,02	2,88	4,55	8,02	15,81	35,37	87,64	-	-	-
Benzo[a]pyren	1,04	1,17	1,37	1,66	2,20	3,13	4,86	8,29	15,62	33,57	80,11	-	-	-	-
Chrysen	0,91	0,98	1,09	1,25	1,54	2,02	2,85	4,47	7,72	15,45	37,30	91,27	-	-	-

Tabelle 5-12: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Acetonitril mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 30 °C.

Substanz	t_R 70 % ACN in min	t_R 65 % ACN in min	t_R 60 % ACN in min	t_R 55 % ACN in min	t_R 50 % ACN in min	t_R 45 % ACN in min	t_R 40 % ACN in min	t_R 35 % ACN in min	t_R 30 % ACN in min	t_R 25 % ACN in min	t_R 20 % ACN in min	t_R 15 % ACN in min	t_R 10 % ACN in min	t_R 5 % ACN in min	t_R 0 % ACN in min
Koffein	0,98	0,99	0,81	0,81	0,81	0,81	0,84	0,79	0,82	0,84	0,85	0,89	0,97	1,18	1,83
Theophyllin	1,02	1,03	0,81	0,81	0,83	0,83	0,81	0,76	0,82	0,77	0,78	0,78	0,80	0,85	1,00
Ibuprofen	2,48	2,03	1,00	0,99	1,03	1,03	1,10	1,12	1,76	1,75	2,12	2,61	3,45	4,46	5,68
Fenoprofen	2,63	2,03	1,00	1,02	1,05	1,13	1,13	1,15	2,03	1,94	2,52	3,26	4,89	7,57	12,26
Hydrocortison	1,06	1,07	0,85	0,87	0,90	0,96	0,99	1,06	1,47	1,59	2,13	3,33	6,36	13,93	33,83
Ketoprofen	3,15	2,29	0,99	0,98	0,99	1,05	1,09	1,05	1,61	1,53	1,83	2,43	3,54	5,61	8,20
Cytosin	2,74	2,23	1,12	1,05	1,03	1,00	0,96	0,93	0,98	0,93	0,93	0,92	0,93	0,93	0,94
Sulfamethoxazol	0,95	0,95	0,74	0,72	0,71	0,71	0,70	0,71	0,83	0,73	0,74	0,75	0,76	0,79	0,86
Sulfamethizol	1,05	1,00	0,73	0,73	0,73	0,76	0,71	0,71	0,89	0,75	0,76	0,78	0,83	0,95	1,25
Procaimid	1,27	1,25	1,01	1,00	0,99	1,03	1,01	1,04	0,94	1,08	1,17	1,30	1,55	2,14	4,45
Cumarin	0,94	0,94	0,78	0,84	0,85	0,88	0,87	0,91	0,97	1,06	1,21	1,46	1,94	3,12	8,19
Flavon	0,95	0,98	0,89	0,90	0,98	1,02	1,21	1,50	2,08	3,23	6,19	14,22	39,53	136,94	-
Propranolol	1,36	1,36	1,26	1,35	1,48	1,72	1,95	2,40	2,77	4,58	8,05	14,00	30,25	82,65	-
Amitriptylin	1,17	1,20	1,16	1,27	1,47	1,83	2,39	3,53	5,33	10,76	26,31	74,98	-	-	-
Adenin	1,18	1,14	0,84	0,84	0,84	0,82	0,81	0,81	0,86	0,83	0,85	0,86	0,88	0,94	1,04
Thymin	1,14	1,14	0,87	0,88	0,89	0,87	0,85	0,85	1,34	0,90	0,90	0,91	0,93	0,96	0,99
Uracil	1,22	1,21	0,89	0,87	0,87	0,89	0,86	0,86	0,92	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Prednison	0,98	0,99	0,81	0,82	0,85	0,89	0,91	0,80	1,19	1,41	1,84	2,76	5,29	11,90	30,43
Prednisolon	1,07	1,05	0,84	0,87	0,90	0,99	0,96	1,05	1,33	1,58	2,10	3,11	5,90	13,01	32,13
Papaverin	0,95	0,96	0,80	0,83	0,84	0,88	0,96	1,08	1,34	1,89	3,41	8,30	30,45	-	-
Diethylphthalat	0,91	0,92	0,80	0,83	0,84	0,85	0,92	1,01	1,18	1,43	1,93	2,87	5,08	9,66	32,13
Bisphenol A	0,92	0,95	0,80	0,83	0,90	0,94	0,98	1,13	1,65	2,11	3,55	6,90	15,27	31,44	55,92
Benz[a]anthracen	1,09	1,15	1,54	2,01	2,86	4,73	8,52	17,26	41,07	102,33	-	-	-	-	-
Benzo[a]pyren	1,30	1,45	2,45	3,35	5,34	9,26	8,83	39,04	96,09	-	-	-	-	-	-
Chrysen	1,11	1,18	1,60	2,06	2,88	4,65	8,54	17,29	39,94	-	-	-	-	-	-

Tabelle 5-13: Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Acetonitril mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 60 °C.

Substanz	t_R 70 % ACN in min	t_R 65 % ACN in min	t_R 60% ACN in min	t_R 55 % ACN in min	t_R 50 % ACN in min	t_R 45 % ACN in min	t_R 40 % ACN in min	t_R 35 % ACN in min	t_R 30 % ACN in min	t_R 25 % ACN in min	t_R 20 % ACN in min	t_R 15 % ACN in min	t_R 10 % ACN in min	t_R 5 % ACN in min	t_R 0 % ACN in min
Koffein	0,79	0,78	0,78	0,78	0,79	0,79	0,79	0,80	0,80	0,81	0,82	0,85	0,89	1,00	1,31
Theophyllin	0,81	0,80	0,79	0,80	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,80	0,80	0,82	0,86	0,93
Ibuprofen	2,09	1,76	1,52	1,38	1,33	1,33	1,33	1,47	1,66	1,86	2,40	2,98	3,93	5,07	7,85
Fenoprofen	2,09	1,73	1,49	1,36	1,32	1,30	1,29	1,46	1,65	1,87	2,45	3,16	4,45	6,68	12,27
Hydrocortison	0,85	0,84	0,84	0,85	0,87	0,88	0,92	0,99	1,09	1,24	1,56	2,18	3,68	7,21	-
Ketoprofen	2,27	1,79	1,50	1,34	1,27	1,23	1,20	1,30	1,42	1,55	1,92	2,55	3,43	4,74	8,81
Cytosin	1,31	1,18	1,09	1,04	1,00	0,97	0,95	0,93	0,92	0,91	0,90	0,90	0,90	0,90	0,91
Sulfamethoxazol	0,77	0,76	0,75	0,74	0,74	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,74	0,75	0,75	0,79	0,82
Sulfamethizol	0,81	0,78	0,75	0,73	0,73	0,72	0,72	0,73	0,73	0,73	0,75	0,76	0,79	0,89	1,05
Procainid	0,92	0,93	0,94	0,95	0,96	0,97	0,98	0,99	1,00	1,03	1,07	1,13	1,26	1,50	2,31
Cumarin	0,78	0,78	0,79	0,80	0,82	0,83	0,85	0,88	0,91	0,96	1,05	1,17	1,42	1,92	3,74
Flavon	0,81	0,82	0,84	0,87	0,92	0,98	1,08	1,26	1,56	2,18	3,52	6,55	15,20	34,61	106,53
Propranolol	0,98	1,02	1,05	1,11	1,19	1,30	1,44	1,65	2,01	2,64	3,93	5,80	11,22	21,19	44,85
Amitriptylin	0,93	0,97	1,02	1,10	1,23	1,41	1,70	2,18	3,08	4,99	9,61	21,12	49,42	-	-
Adenin	0,91	0,88	0,86	0,85	0,84	0,83	0,83	0,83	0,84	0,84	0,86	0,87	0,89	0,94	1,01
Thymin	0,88	0,86	0,85	0,84	0,84	0,84	0,84	0,85	0,85	0,86	0,87	0,88	0,90	0,92	0,95
Uracil	0,91	0,89	0,81	0,86	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,87	0,88	0,88	0,89	0,89
Prednison	0,81	0,81	0,81	0,82	0,83	0,85	0,88	0,93	1,00	1,14	1,39	1,86	3,01	5,85	14,39
Prednisolon	0,85	0,84	0,84	0,85	0,86	0,88	0,93	0,99	1,08	1,24	1,55	2,11	3,48	6,83	-
Papaverin	0,78	0,78	0,79	0,81	0,84	0,87	0,92	1,00	1,16	1,48	2,22	4,26	11,32	34,82	0,89
Diethylphthalat	0,76	0,77	0,78	0,80	0,82	0,85	0,89	0,94	1,03	1,19	1,47	1,96	2,97	4,73	7,54
Bisphenol A	0,77	0,78	0,79	0,81	0,83	0,86	0,91	1,00	1,15	1,45	2,03	3,28	6,16	11,70	19,55
Benz[a]anthracen	1,00	1,11	1,27	1,53	2,03	3,01	4,82	8,72	17,25	38,10	105,08	-	-	-	-
Benzo[a]pyren	1,25	1,45	1,75	2,31	3,26	5,35	9,01	17,57	37,21	89,16	-	-	-	-	-
Chrysen	1,02	1,13	1,28	1,55	2,06	3,02	4,81	8,59	17,39	39,69	112,218	-	-	-	-

Tabelle 5-14 Übersicht experimenteller Retentionszeiten (t_R). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: ZirChrom-PS (100 × 2,1 mm, 2,5 µm); mobile Phase: A) Wasser mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, B) Acetonitril mit 20 mmol L⁻¹ Ammoniumacetatpuffer pH 9,0, Zusammensetzung: siehe Tabelle; Temperatur: 90 °C

Substanz	t_R 70 % ACN in min	t_R 65 % ACN in min	t_R 60 % ACN in min	t_R 55 % ACN in min	t_R 50 % ACN in min	t_R 45 % ACN in min	t_R 40 % ACN in min	t_R 35 % ACN in min	t_R 30 % ACN in min	t_R 25 % ACN in min	t_R 20 % ACN in min	t_R 15 % ACN in min	t_R 10 % ACN in min	t_R 5 % ACN in min	t_R 0 % ACN in min
Koffein	0,77	0,76	0,76	0,76	0,77	0,77	0,78	0,79	0,79	0,80	0,81	0,83	0,86	0,92	1,08
Theophyllin	0,79	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,79	0,79	0,79	0,79	0,80	0,81	0,83	0,87	1,00
Ibuprofen	2,92	2,79	2,48	2,28	2,13	2,05	2,03	2,18	2,39	2,75	3,24	3,68	4,88	6,49	13,84
Fenoprofen	2,94	2,71	2,37	2,15	1,99	1,91	1,85	2,01	2,20	2,45	3,02	3,51	4,82	7,15	18,21
Hydrocortison	0,86	0,85	0,84	0,84	0,86	0,87	0,90	0,94	1,00	1,08	1,21	1,51	2,21	4,12	9,94
Ketoprofen	3,39	2,94	2,44	2,13	1,92	1,78	1,69	1,78	1,88	2,01	2,36	2,82	3,77	5,16	11,88
Cytosin	1,32	1,18	1,08	1,02	0,98	0,95	0,93	0,92	0,91	0,89	0,89	0,88	0,89	0,89	0,90
Sulfamethoxazol	0,78	0,77	0,76	0,76	0,76	0,75	0,76	0,75	0,75	0,75	0,76	0,77	0,78	0,88	1,09
Sulfamethizol	0,87	0,84	0,81	0,78	0,77	0,76	0,76	0,76	0,76	0,77	0,78	0,79	0,83	0,99	1,56
Procainid	0,85	0,84	0,83	0,84	0,85	0,86	0,88	0,89	0,91	0,93	0,96	1,00	1,08	1,22	1,53
Cumarin	0,76	0,77	0,76	0,78	0,79	0,80	0,82	0,84	0,86	0,89	0,95	1,03	1,17	1,45	2,17
Flavon	0,78	0,79	0,80	0,82	0,85	0,89	0,97	1,08	1,25	1,56	2,19	3,58	7,28	15,01	35,25
Propranolol	0,88	0,87	0,89	0,91	0,95	1,01	1,08	1,19	1,36	1,64	2,16	2,93	4,79	8,42	14,58
Amitriptylin	0,84	0,85	0,87	0,91	0,96	1,05	1,20	1,42	1,82	2,57	4,28	8,14	15,47	34,71	-
Adenin	0,95	0,93	0,90	0,89	0,88	0,87	0,87	0,87	0,88	0,89	0,90	0,92	0,95	0,99	1,05
Thymin	0,90	0,88	0,87	0,86	0,85	0,85	0,85	0,86	0,86	0,86	0,87	0,88	0,90	0,91	0,94
Uracil	0,93	0,91	0,89	0,88	0,87	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,87	0,88	0,88	0,89
Prednison	0,82	0,81	0,81	0,81	0,82	0,84	0,86	0,90	0,95	1,03	1,14	1,35	1,83	3,00	6,32
Prednisolon	0,86	0,84	0,84	0,84	0,85	0,87	0,90	0,93	1,00	1,06	1,18	1,46	2,08	3,69	8,43
Papaverin	0,76	0,76	0,77	0,78	0,79	0,82	0,86	0,92	1,02	1,21	1,61	2,57	5,44	13,39	45,28
Diethylphthalat	0,75	0,75	0,76	0,77	0,79	0,80	0,84	0,88	0,94	1,03	1,20	1,48	2,00	2,86	14,12
Bisphenol A	0,76	0,76	0,77	0,78	0,80	0,82	0,87	0,93	1,02	1,20	1,52	2,14	3,50	6,11	10,22
Benz[a]anthracen	0,89	0,96	1,06	1,20	1,47	1,92	2,70	4,31	7,58	14,94	37,83	97,56	-	-	-
Benzo[a]pyren	1,01	1,16	1,33	1,61	2,10	2,99	4,56	8,03	15,03	31,91	84,13	-	-	-	-
Chrysen	0,91	0,97	1,06	1,22	1,47	1,91	2,69	4,29	7,63	15,99	38,24	102,24	-	-	-

5.3 Herstellung von edelstahlbasierten Zerstäubernadeln

In Abbildung 5-4 ist der Aufbau der zur Polierung verwendeten Apparatur schematisch gezeigt.

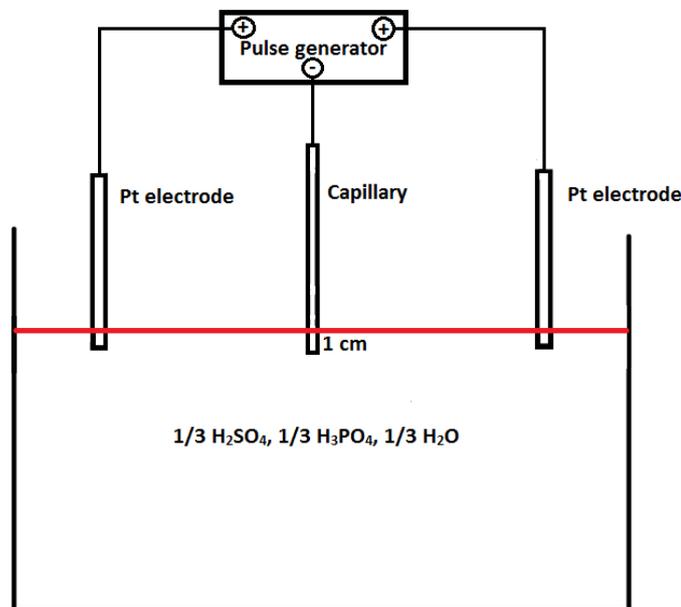


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung der Polierapparatur.

Die Kapillare wurde in 12,5 cm lange Stücke geschnitten. Die Schnittkanten wurden mit einem Nassschleifpapier mit 2000-er Körnung bearbeitet. Im Anschluss daran wurde ein Ende der Kapillare 1 cm tief in eine nach Parker et al. [35] angesetzte Lösung aus 1:1:1 Teilen $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$ getaucht und elektrochemisch bearbeitet. Die Kapillare wurde bei einer Spannung von 7 V bei einer Pulsperiode von 10 ms und einer Pulsweite von 5 ms elektrochemisch modifiziert, hierfür wurde ein TGP110 10 MHz Pulsgenerator (TTi, Deutschland) verwendet. Die Kapillare wurde als Anode verwendet und zwei 2 x 2 cm Platinelektroden wurden als Kathoden verwendet.

Die Bearbeitung gliederte sich in zwei Schritte, die Verjüngung der Kapillare und das konische Ätzen der Kapillarspitze. Im ersten Schritt wurde die Kapillare 8 min lang PECP behandelt und diese von 0,32 mm auf 0,28 mm verjüngt (vgl. Abbildung 2-13 a und b). Im zweiten Schritt wurde die Kapillarspitze so in Kontakt mit dem Elektrolyten gebracht, dass ein konkaver Meniskus um die Kapillarspitze entstand. Die Kapillarspitze wurde mit den oben erwähnten Einstellungen bearbeitet, bis der Meniskus nicht mehr sichtbar war. Zum Abschluss wurde die Kapillarspitze nochmals mittels 2000-er Körnung Nassschleifpapier nachbearbeitet. Die Qualitätsprüfung erfolgte mikroskopisch.

5.4 Weiterführende Informationen zur Optimierung der FID-Parameter für den Nano-Flussbereich

In Tabelle 5-15 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Stabilität der FID-Flamme in Abhängigkeit des Innendurchmessers der Transferkapillare, der Flussrate der mobilen Phase als Temperatur der Basis des FID zusammengefasst.

Tabelle 5-15: Zusammenhang zwischen Ausgehen und „Ploppen“ der FID-Flamme bei unterschiedlichen Betriebsparametern.

ID in μm	Fluss in $\mu\text{L min}^{-1}$	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Flamme An	Flamme Aus	Beides	Kein „Ploppen“	„Ploppen“	Beides
75	1	275	X			X		
75	5	275			X			X
75	10	275		X			X	
75	20	275			X			X
25	5	200			X		X	
25	10	200		X		X		
25	15	200		X		X		
25	20	200			X			X
25	20	220	X				X	
25	20	250			X	X		

Hier wird deutlich, dass daraus kein Zusammenhang zwischen den experimentellen Parametern und der Stabilität der FID-Flamme angeleitet werden kann. „Beides“ bedeutet hier, dass das Problem nicht reproduzierbar aufgetreten ist.

5.5 Untersuchung verschiedener Wasserarten

Zuerst wurde der Eluent (LC-MS-Wasser) frisch angesetzt, da dessen Vorrat aufgrund der geringen Flussraten deutlich länger hält. Auch nach gründlichem Spülen des Systems verstopfte die Kapillare. Dasselbe geschieht mit dem von der Hochschule Niederrhein bereit gestellten Subboiled-Wasser. Das Verdampfen des Wassers durch IR-Licht unterhalb der Siedetemperatur führt dazu, dass sich keine Tröpfchen bilden, die Partikel mitreißen können. Auf diese Weise sollte das Wasser vollständig und rückstandsfrei verdampft sein und sich dadurch keine Rückstände bilden können. Dass sich auch mit diesem Wasser Verstopfungen in der Kapillare bilden, bestätigt die Vermutung, dass sich die Bestandteile der Verstopfung nicht im Wasser befinden, sondern aus dem System stammen.

Hierbei ist es naheliegend, dass Bestandteile aus den Kapillaren herausgelöst werden. Der Hersteller der Kapillaren versicherte nach Rückfrage, dass die Kapillaren nicht deaktiviert bzw. beschichtet sind. Die Kapillaren bestehen demzufolge nur aus reinem Quarz. Lenher et al. [36] untersuchten in ihrer Arbeit, wie gut sich Quarz in Wasser löst. Dabei stellte sich heraus, dass sich Quarz in pH-neutralem Wasser relativ gut löst [36]. Die Untersuchung der pH-Werte für die hier durchgeführten Versuche der verwendeten Wässer ist in Tabelle 5-16 aufgeführt.

Es ist also durchaus denkbar, dass sich Siliziumdioxid aus den Kapillarwänden löst und an der Stelle, an der das Wasser verdampft, wieder auskristallisiert. Dies würde auch erklären, warum die Verstopfung in die Kapillarwand eingedrungen ist.

Tabelle 5-16: pH-Werte der unterschiedlichen Reinstwässer.

Wasserart	pH-Wert
LC-MS-Wasser	7,52
Subboiled-Wasser	6,48
Osiose-Wasser	7,58

5.6 Weiterführende Informationen zur Optimierung der Nano-LC-FID Kopplung

Unabhängig davon, ob das Interface oder die Original-Düse verwendet wurde, stellte die Stabilität der FID-Flamme ein großes Problem dar. Zum einen ging die Flamme bei speziellen Betriebsparametern scheinbar willkürlich aus, zum anderen kam es bei unterschiedlichen Einstellungen zum „Ploppen“. Hierbei handelt es sich um das schnelle, konsekutive Aus- und Wiederangehen der FID-Flamme. Dabei wird diese durch die verdampfende mobile Phase vermutlich entweder sehr stark abgekühlt, wodurch die Flamme nahezu ausgeht, oder der sich ausdehnende Wasserdampf verdrängt kurzzeitig das Brenngas der Flamme. Hierbei könnte es sich auch um eine Art Siedeverzug in der Kapillaren handeln. Die These ist nun, dass entweder weniger mobile Phase verdampft, wenn die Flamme aus ist, diese sich dadurch wieder entzündet, was wiederum mehr mobile Phase verdampfen lässt, wodurch die Flamme wiederum nahezu erlischt. Ein anderer Erklärungsansatz geht davon aus, dass Wassertröpfchen, die durch den Siedeverzug in die Flamme katapultiert werden, schlagartig verdampfen, was das An- und Ausgehen der Flamme zur Folge hat. Dieser Prozess wiederholt sich sehr schnell hintereinander und ist als „Ploppen“ wahrzunehmen. Wie Tabelle 5-17 zeigt, besteht kein erkennbarer direkter Zusammenhang zwischen beiden Problemen.

Tabelle 5-17: Zusammenhang zwischen Ausgehen und „Ploppen“ der FID-Flamme bei unterschiedlichen Betriebsparametern.

ID in μm	Fluss in $\mu\text{L min}^{-1}$	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Flamme An	Flamme Aus	Beides	Kein „Ploppen“	„Ploppen“	Beides
75	1	275	X			X		
75	5	275			X			X
75	10	275		X			X	
75	20	275			X			X
25	5	200			X		X	
25	10	200		X		X		
25	15	200		X		X		
25	20	200			X			X
25	20	220	X				X	
25	20	250			X	X		

Der Tabelle ist zudem zu entnehmen, dass das Auftreten beider Probleme keinem klaren Muster bezüglich der Versuchsparameter folgt. „Beides“ bedeutet hier, dass das Problem nicht reproduzierbar aufgetreten ist.

Wie sich bei der Beschreibung des Ploppens schon angedeutet hat, ist eine These zur Erklärung die Art des Eintrags der mobilen Phase in die Flamme. Ein Lösungsansatz bestand darin, die Kapillare, statt wie angedacht planar mit der FID-Interface-Düse abschließen zu las-

sen, ca. 0,5 – 1 mm nach oben in die Flamme zu versetzen. Die Öffnung der Kapillare tiefer in die Flamme zu schieben sollte den Eintrag der mobilen Phase samt Analyt in die Flamme erleichtern, da sich die Kapillaröffnung nun in der Flamme und nicht mehr direkt darunter befindet. Jedoch konnte die Flamme auf diese Weise nicht stabilisiert werden.

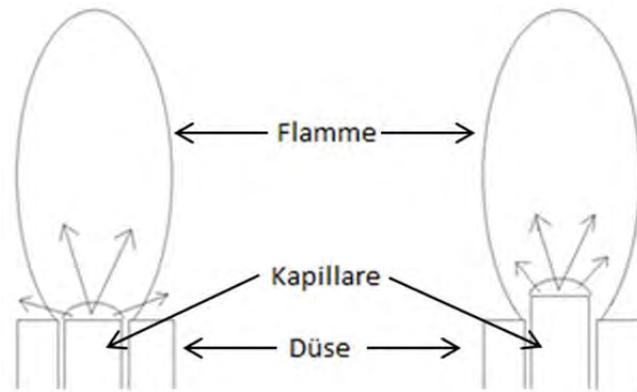


Abbildung 5-5: Planarer (links) und versetzter (rechts) Einbau der Kapillare in die FID-Interface-Düse.

Ein weiterer Lösungsansatz wird in der Literatur beschrieben. Dabei wird die Kapillare wenige Zentimeter tiefer in die Düse gezogen, um so die Gasströme beim Austritt aus der Düsenöffnung nicht zu behindern. Miller et al. beschreiben das Problem, die Flamme angezündet zu halten [25]. Sie liefern zwar keine Erklärung, aber bei ihren Versuchen hilft das Herabsenken der Einbautiefe, die Flamme brennen zu lassen.

Eine Versuchsreihe, bei der die Kapillare kontinuierlich um jeweils 1 mm von der Düsenöffnung heruntergezogen wurde ergab, dass die Flamme ab einer Einbautiefe von 7 mm an bleibt und das Grundsignal bis zu einer Einbautiefe von 10 mm unverändert bleibt. Miller et al. fanden ein optimales Verhältnis von Signal und Rauschen bei einer Einbautiefe von 30 mm. Ab 20 mm trat jedoch so starkes Rauschen auf, dass eine Messung nicht mehr möglich war. Miller et al. arbeiteten allerdings mit einer viel höheren Basistemperatur von 400 °C als in diesem Forschungsprojekt (275° C) und einer Fließgeschwindigkeit von 20 bis 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ [25] statt 2 bis 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Tabelle 5-18 stellt die Einbautiefen anderer Arbeitsgruppen gegenüber und gibt eine Übersicht über die jeweils verwendeten Versuchsparameter.

Tabelle 5-18: Vergleich der Einbautiefen der Kapillaren in der FID-Düse diverser Arbeitsgruppen.

Arbeitsgruppe	Einbautiefe in mm	LC-Fluss in $\mu\text{L min}^{-1}$	FID-Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Referenz
IUTA e. V.	10	2 - 10	275	
Guillarme et al.	30 - 50	20 - 200	300 - 400	[20]
Hooijschuur et al.	30	20 - 50	k. A.	[26]
Ingelse et al.	20 - 30	50	400	[21]
Miller et al.	(10) 30	20 - 200	400	[25]
Wu et al.	30 - 35	10	> 390	[27]
Yarita et al.	30	10	k. A.	[28]

k. A.: keine Angabe

5.7 Untersuchung des Response für ausgewählte Modellsubstanzen

5.7.1 Untersuchung des Response volatiler Modellsubstanzen

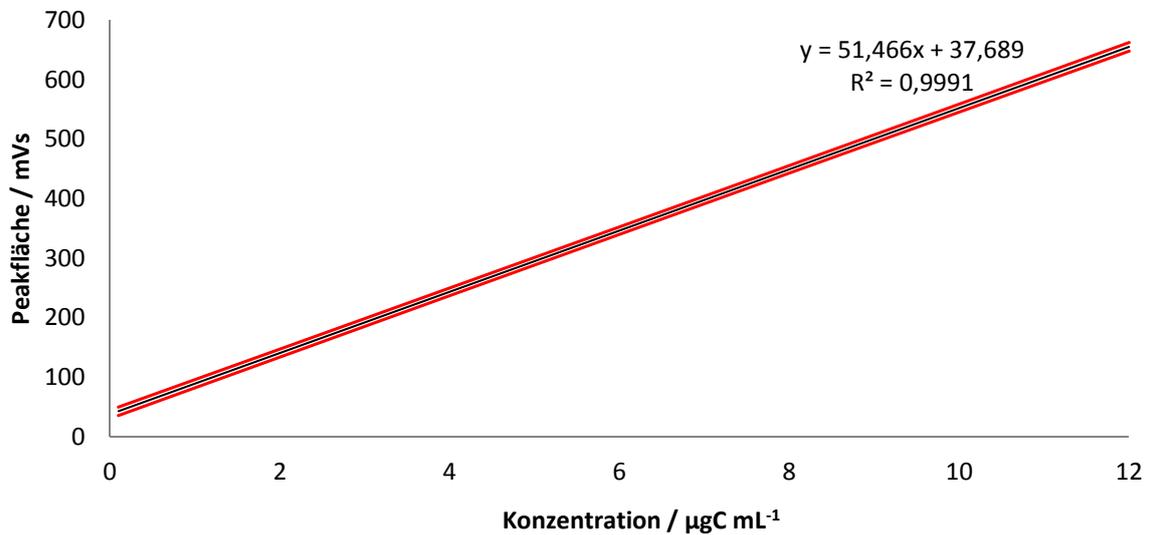


Abbildung 5-6: Fließinjektionsanalyse von Koffein mit 20 µL Probenvolumen und $F_{\text{Wasser}} = 0,05 \text{ µL min}^{-1}$, $T_{\text{FID}} = 275^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{Air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$. Die Kalibrierung ist für einen Konzentrationsbereich von $c(C_{\text{Abs}}) = 0,1 - 12 \text{ µg L}^{-1}$ gemessen worden. Bestimmtheitsmaß (R^2), die Vertrauensbanden sind in rot dargestellt.

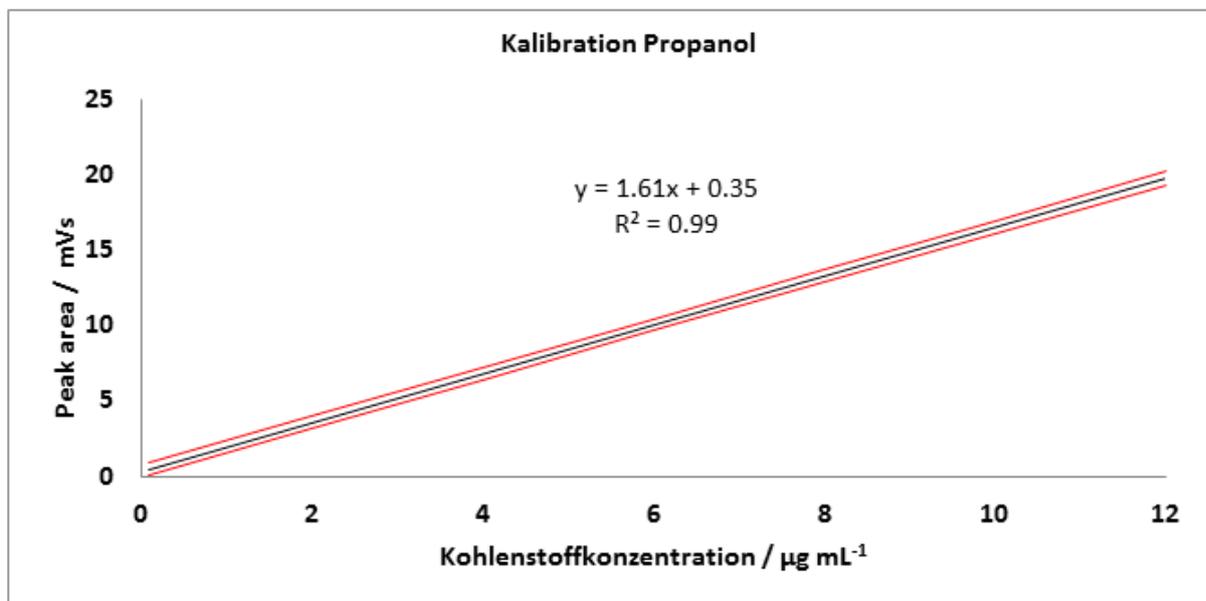


Abbildung 5-7: Kalibrierung Propanol von $c(C_{\text{Abs}}) = 0,1 \text{ µg mL}^{-1}$ to 12 µg mL^{-1} , LC-Bedingungen: 20 µL Probenschleife, Split: 1:20 auf 50 µL min^{-1} , mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

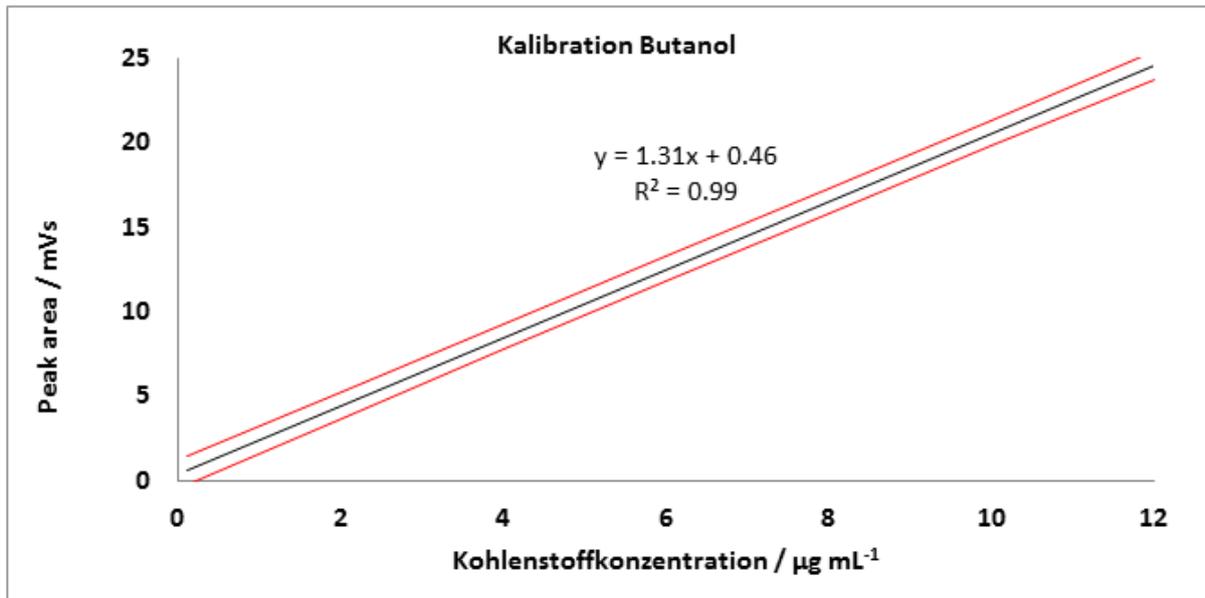


Abbildung 5-8: Kalibration Butanol von $c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, LC-Bedingungen: 20 µL Proben-schleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

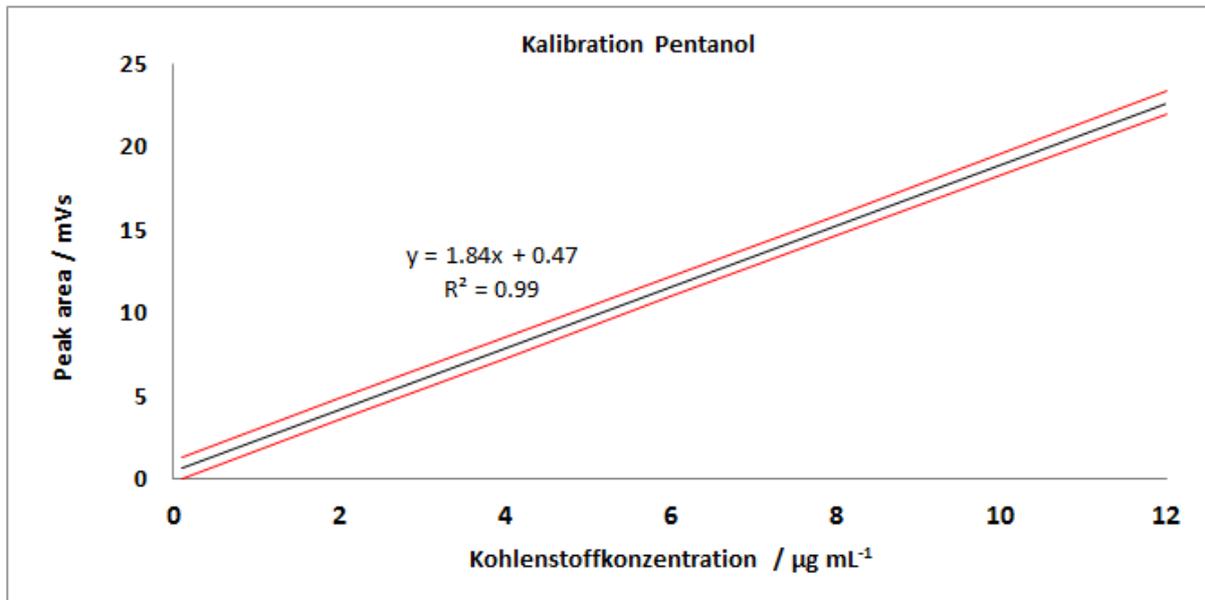


Abbildung 5-9: Kalibration Pentanol von $c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, LC-Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Proben-schleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

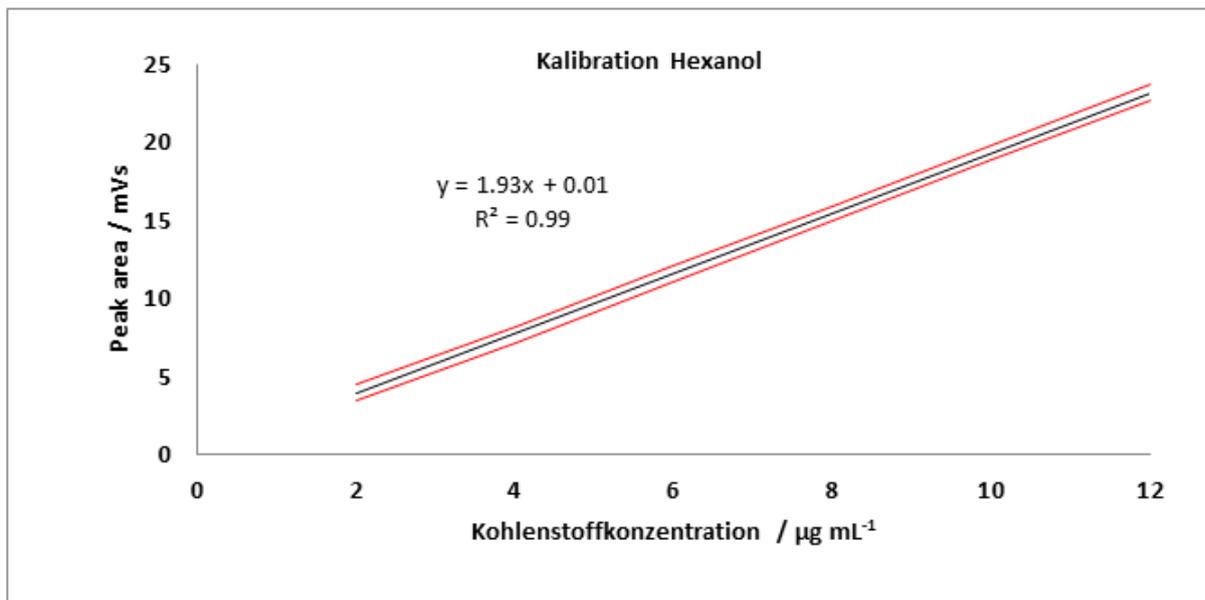


Abbildung 5-10: Kalibration Hexanol von $c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, LC-Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Proben-schleife, Split: 1:20 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

5.7.2 Untersuchung des Response semi-volatiler Modellsubstanzen

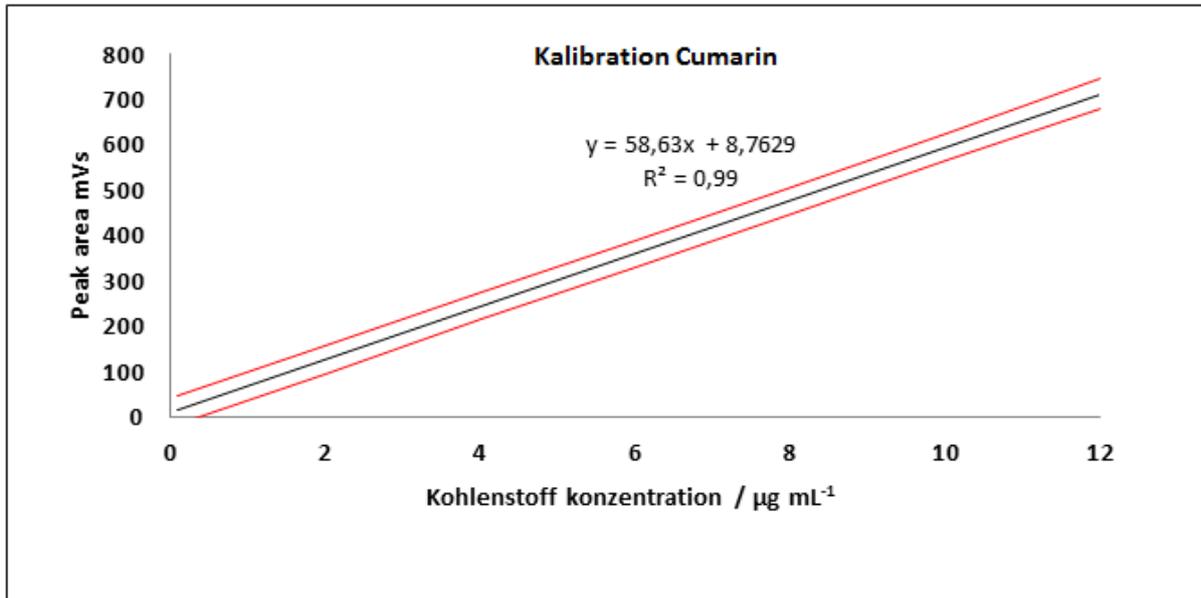


Abbildung 5-11: Fließinjektionsanalyse des Duftstoffes Cumarin im Bereich $c(C_{\text{Abs}}) = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ LC Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

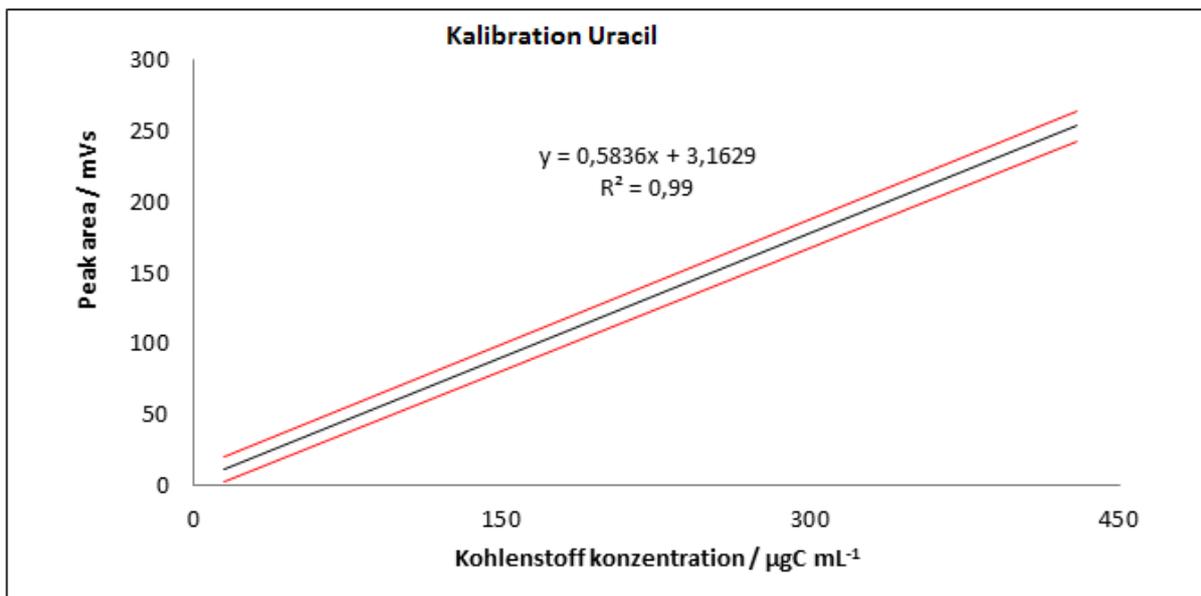


Abbildung 5-12: Fließinjektionsanalyse von Cumarin im Bereich $c(C_{\text{Abs}}) = 14,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $429 \mu\text{g mL}^{-1}$ LC Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

5.7.3 Untersuchung des Response nicht-volatiler Modellsubstanzen

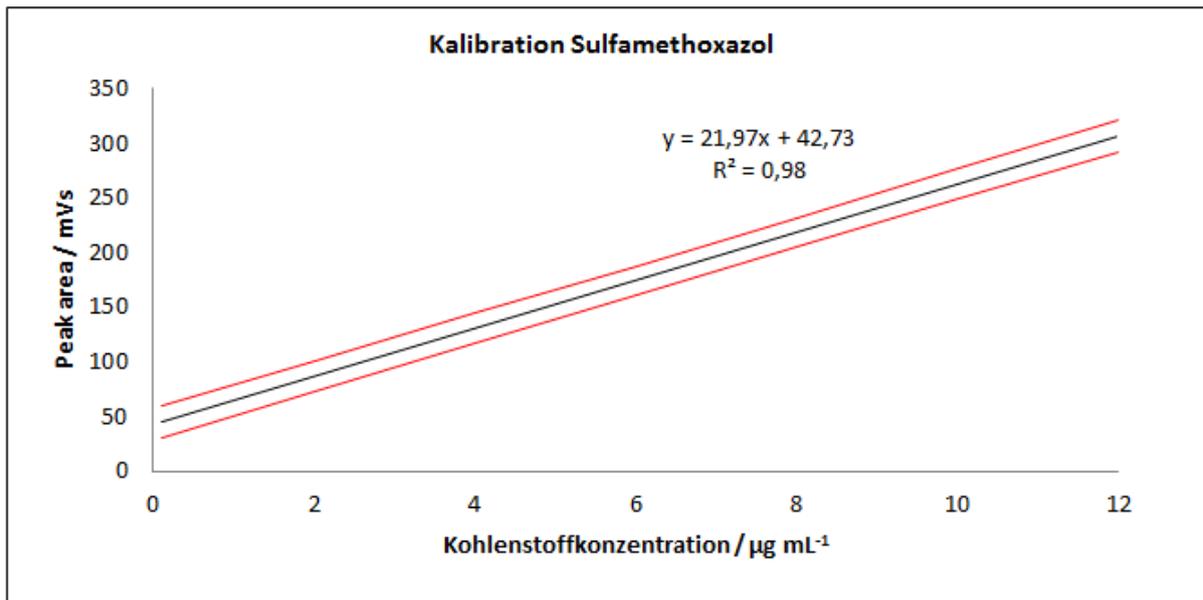


Abbildung 5-13: Fließinjektionsanalyse von Sulfamethoxazol im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

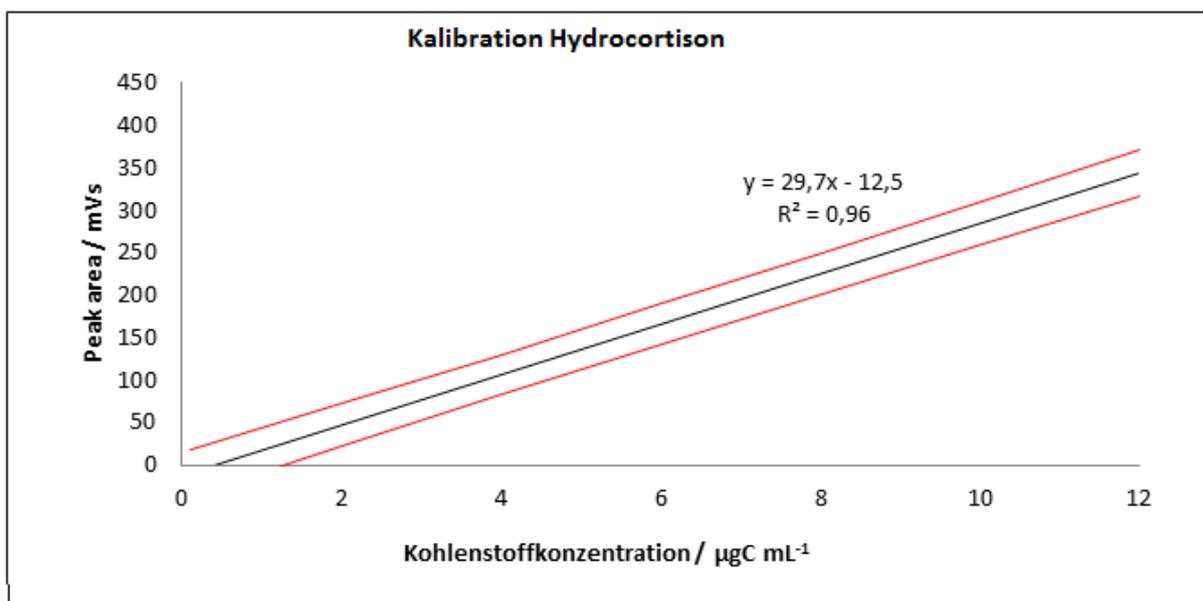


Abbildung 5-14: Fließinjektionsanalyse von Hydrocortison im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $12 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

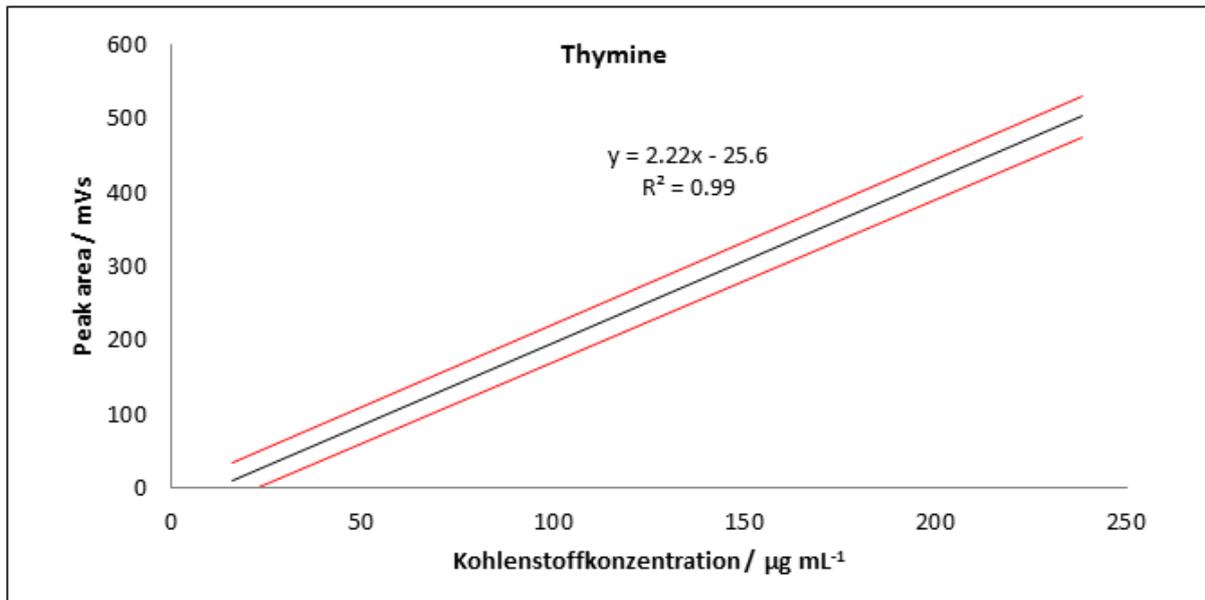


Abbildung 5-15: Fließinjektionsanalyse von Thymin im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 15,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $238 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC-Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.

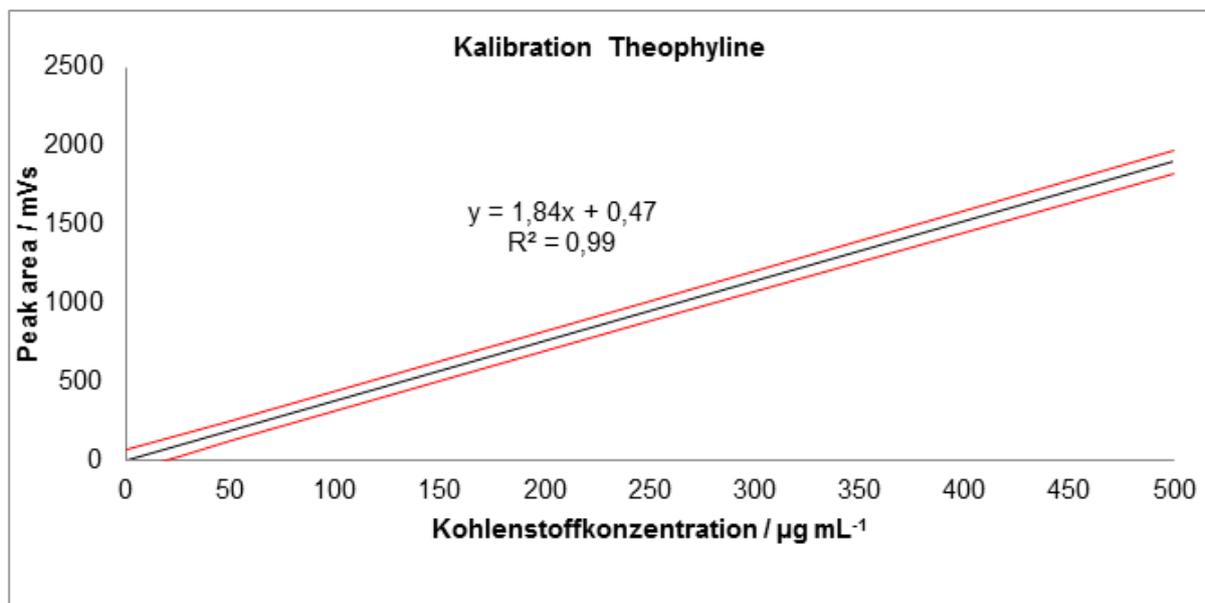


Abbildung 5-16: Fließinjektionsanalyse von Thymin im Bereich ($c(C_{\text{Abs}}) = 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $500 \mu\text{g mL}^{-1}$). LC-Bedingungen: $20 \mu\text{L}$ Probenschleife, Split: 1:10 auf $50 \mu\text{L min}^{-1}$, mobile Phase: 100 % Wasser, $T_{\text{FID}} = 275 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{H}_2} = 50 \text{ mL min}^{-1}$, $F_{\text{air}} = 450 \text{ mL min}^{-1}$.