



forschen.  
vernetzen.  
anwenden.

# Innovationsreport 2018

Industrielle Gemeinschaftsforschung

IGF-Forschungsvorhaben 18861 N

## **Evaluation der Leistungsfähigkeit multidimensionaler Trenn- und Detektionstechniken auf Basis der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatografie, Ionenmobilitätsspektrometrie und Massenspektrometrie (TRENN-DEKT4)**

**Laufzeit:**

01.10.2015 – 31.03.2018

**Beteiligte Forschungsstelle(n):**

Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V.  
Bereich Forschungsanalytik & Miniaturisierung

Universität Duisburg-Essen,  
Fakultät für Chemie,  
Applied Analytical Chemistry

# Schlussbericht

---

zu IGF-Vorhaben Nr. 18861 N

## Thema

Evaluation der Leistungsfähigkeit multidimensionaler Trenn- und Detektionstechniken auf Basis der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatografie, Ionenmobilitätsspektrometrie und Massenspektrometrie

## Berichtszeitraum

01.10.2015-31.03.2018

## Forschungsvereinigung

Umwelttechnik

## Forschungseinrichtung(en)

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.

Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie, Applied Analytical Chemistry

Essen, 11.07.2018

Prof. Dr. Oliver Schmitz

Duisburg, 12.07.2018

Dr. Thorsten Teutenberg

---

Ort, Datum

Name und Unterschrift aller Projektleiterinnen und Projektleiter der  
Forschungseinrichtung(en)

Gefördert durch:

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Griechische Formelzeichen .....   | 12 |
| 1 Einleitung.....   | 16 |
| 1.1 Ziel des Projektes .....  | 16 |
| 1.2 Definition kritischer Peakpaare im Kontext der HPLC-MS-Kopplung.....  | 17 |
| 1.2.1 Einleitung.....   | 17 |
| 1.2.2 Pharmazeutische Analytik.....   | 17 |
| 1.2.3 Umweltanalytik .....  | 19 |
| 1.2.4 Fazit.....  | 20 |
| 2 Wissenschaftlich technische Ergebnisse .....  | 21 |
| 2.1 Auswahl der Testgemische und der Realproben.....  | 21 |
| 2.1.1 Auswahl der kritischen Substanzpaare .....  | 21 |
| 2.1.3 Auswahl komplexer Realproben .....  | 23 |
| 2.2 Bestimmung der Peakkapazität und Peakkapazitätsproduktionsrate für die<br>eindimensionale Flüssigkeitschromatografie..... | 24 |
| 2.2.1 Einleitung und Theorie.....   | 24 |
| 2.2.2 Experimentelle Durchführung.....  | 25 |
| 2.2.3 Berechnung der Kenngrößen und Diskussion der Ergebnisse .....   | 30 |
| 2.3 Bestimmung der chromatografischen Auflösung mittels HPLC-MS-Kopplung.....   | 33 |
| 2.3.1 Experimentelle Durchführung.....  | 33 |
| 2.3.2 Diskussion der Ergebnisse .....   | 34 |
| 2.4 Isobarentrennung mit verschiedenen IMS-Methoden.....  | 37 |
| 2.4.1 Taxonomie der IMS .....   | 37 |
| 2.4.2 Systemkonfigurationen .....   | 38 |
| 2.4.3 Bestimmung des Stoßquerschnitts (Collison Cross Section).....   | 40 |
| 2.4.4 Experimentelle Durchführung.....  | 50 |
| 2.4.5 Ergebnisse und Diskussion.....  | 53 |
| 2.5 Untersuchung des Testgemisches mittels 2D-LC-MS-Kopplung .....  | 60 |
| 2.5.1 Einleitung und Theorie.....   | 60 |
| 2.5.2 Experimentelle Durchführung.....  | 66 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 2.5.3 | Ergebnisse und Diskussion.....  | 72  |
| 2.5.4 | Isobarentrennung mittels miniaturisierter LC x LC.....  | 75  |
| 2.5.5 | Limitierungen von LC x LC-Verfahren.....  | 79  |
| 2.6   | Untersuchung der Realproben.....  | 83  |
| 2.6.1 | Bestimmung der Retentionszeitstabilität.....  | 83  |
| 2.6.2 | Abschätzung der Wiederfindung.....  | 85  |
| 2.6.3 | Durchführung einer Feature Analyse.....   | 88  |
| 2.7   | Vergleich der Leistungsfähigkeit zwischen 1D-LC- und 2D-LC-IM-MS.....   | 95  |
| 2.7.1 | Bestimmung der Ionensuppression.....  | 95  |
| 2.7.2 | Identifizierung von Inhaltsstoffen über die CCS-Datenbank.....  | 100 |
| 2.8   | Vergleich der Anschaffungskosten der verschiedenen Systeme.....   | 106 |
| 3     | Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit<br>Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.....   | 109 |
| 3.1   | Technische Realisierung des vierdimensionalen Trenn- und<br>Detektionssystems.....  | 109 |
| 3.2   | Nutzung der Ionenmobilitätsspektrometrie zur Trennung von Isomeren und<br>Isobaren.....   | 109 |
| 3.3   | Nutzung der Ionenmobilitätsspektrometrie für die Probenvorbereitung.....  | 110 |
| 3.4   | Ultimative Limitierung zweidimensionaler umfassender HPLC-Verfahren<br>(LC x LC).....   | 110 |
| 3.5   | Aufbau einer CCS-Demonstrations-Datenbank.....  | 110 |
| 3.6   | Software.....   | 111 |
| 4     | Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens<br>der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen<br>Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten..... | 112 |
| 5     | Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft.....  | 113 |
| 5.1   | Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses.....  | 113 |
| 5.2   | Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des<br>PA.....  | 113 |
| 5.3   | Vorstellung der Ergebnisse durch Vorträge und Posterpräsentationen.....   | 113 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 5.4   | Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen ..... | 113 |
| 5.5   | Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts .....         | 115 |
| 6     | Verwendung der Zuwendung .....  | 117 |
| 6.1   | Forschungsstelle 1 (IUTA e. V.) .....   | 117 |
| 6.1.1 | Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) .....                   | 117 |
| 6.1.2 | Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans).....   | 117 |
| 6.1.3 | Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) .....  | 117 |
| 6.2   | Forschungsstelle 2 (AAC) .....  | 117 |
| 6.2.1 | Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) .....                   | 117 |
| 6.2.2 | Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans).....   | 117 |
| 6.2.3 | Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) .....  | 117 |
| 7     | Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....  | 118 |
| 8     | Anhang .....  | 119 |
| 8.1   | Weitere Substanzinformationen .....   | 119 |
| 8.1.1 | Strukturformeln der verwendeten Isobaren bzw. Isomeren .....  | 119 |
| 8.1.2 | Substanzspezifische Angaben .....   | 121 |
| 8.2   | Probenvorbereitung der Realproben .....   | 122 |
| 8.2.1 | Probenvorbereitung Abwasserproben .....   | 122 |
| 8.2.2 | Probenvorbereitung Pflanzenextrakt .....  | 122 |
| 8.2.3 | Probenvorbereitung HTC-Kohle mittels ASE.....   | 123 |
| 8.3   | Auswahl der Massenübergänge für Isobare mittels Triple-Quadrupol-MS.....                                | 124 |
| 8.4   | Weitere Parameter der IMS-MS-Methoden .....   | 125 |
| 8.4.1 | TWIMS-MS .....  | 125 |
| 8.4.2 | DMS-MS .....  | 125 |
| 8.5   | Untersuchung der Realproben mittels 1D-LC-MS-Kopplung .....   | 127 |
| 8.5.1 | Bestimmung der Retentionszeitstabilität .....   | 127 |
| 8.5.2 | Abschätzung der Wiederfindungsrate .....  | 132 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 8.6   | Methodenparameter für LC x LC-MS-Kopplung .....              | 136 |
| 8.6.1 | Methodenparameter für miniaturisierte LC x LC-Trennung ..... | 136 |
| 9     | Literatur .....  | 137 |

## Abbildungsverzeichnis

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1:  | Strukturformeln von a) Cyclophosphamid (CP) und b) Ifosfamid (IF). Die gestrichelten Linien markieren die unterschiedlichen Fragmentierungen.....   | 17 |
| Abbildung 2:  | Strukturformeln von a) Doxorubicin und b) Epirubicin.....   | 18 |
| Abbildung 3:  | Strukturformeln von a) Estron und b) Trenbolon.....   | 20 |
| Abbildung 4:  | Extraktionslösungen verschiedener Umweltmatrices im Vergleich zu einem Reinststandard: Mitte: Extrakt des Kläranlagenzulaufs; rechts: HTC-Extrakt. ....   | 23 |
| Abbildung 5:  | Exemplarische Darstellung der Peakkapazität anhand der mit konstanter Auflösung von $R = 1$ getrennten Signale, die innerhalb des Elutionszeitfensters von $t_0$ (Durchflusszeit) bis $t_e$ (Ende des Gradienten) erfasst werden. Die blaue gestrichelte Linie repräsentiert den Lösungsmittelgradienten. ....  | 24 |
| Abbildung 6:  | Beispielchromatogramm des fünf Komponenten Mix zur Bestimmung der Peakkapazität. Die Messung erfolgte mit dem in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Verfahren. Substanzen v. l. n. r. 5-Fluorouracil, Atenolol, Topotecan, Etoposid, Fenofibrat.....   | 26 |
| Abbildung 7:  | HPLC-MS-Kopplung im Labor der Forschungseinrichtung 1. Rechte Bildseite: LC 20 AD der Firma Shimadzu; linke Bildseite: QTrap 3200 der Firma Sciex.....  | 27 |
| Abbildung 8:  | Emittertips im Vergleich. A) Klassischer Emittertip aus rostfreiem Stahl, einem ID von 100 $\mu\text{m}$ und einem 1/16" Fitting. B) Mikro Emittertip aus PEEKSil Kapillare und Metallspitze, einem ID von 50 $\mu\text{m}$ und 1/32" Fitting. ....   | 28 |
| Abbildung 9:  | Abhängigkeit zwischen Trennsäuleninnendurchmesser und der linearen Fließgeschwindigkeit (linke y-Achse) und der absoluten Flussrate (rechte y.Achse).....   | 29 |
| Abbildung 10: | Darstellung der Peakkapazität in Abhängigkeit der Gradientenzeit. Die mit $\mu\text{LC}$ gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit dem Mikro-LC-System erzielten Ergebnisse. Die mit LC gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit einem konventionellen HPLC-System erzielten Ergebnisse. Für die Gradientenzeiten von 2 h und 8 h wurde die serielle Säulenkopplung verwendet.....                 | 30 |
| Abbildung 11: | Darstellung der Peakkapazitätsproduktionsrate in Abhängigkeit der Gradientenzeit. Die mit $\mu\text{LC}$ gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit dem Mikro-LC-System erzielten Ergebnisse. Die mit LC gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit einem konventionellen HPLC-System erzielten Ergebnisse. Für die Gradientenzeiten von 2 h und 8 h wurde die serielle Säulenkopplung verwendet..... | 32 |
| Abbildung 12: | Taxonomie der IMS mit Einteilung der verwendeten IMS Systeme.....   | 37 |

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Abbildung 13: | Schematischer Aufbau des Traveling Wave Ion Mobility Spectrometer (TWIMS).....  | 38 |
| Abbildung 14: | Schematischer Aufbau des Differential Mobility Analyzer (DMA).....  | 39 |
| Abbildung 15: | Schematischer Aufbau des Differential Mobility Spectrometer (DMS).....  | 39 |
| Abbildung 16: | Plot von $t_{ges}$ gegen $1/\Delta V$ für ein Ion mit $m/z$ 22,0107; $t_0$ ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden. ....  | 42 |
| Abbildung 17: | Strukturformel von Colchicin.....   | 43 |
| Abbildung 18: | CCS-Werte für das $[M+H]^+$ -Addukt von Colchicin aus zehn unabhängigen Messungen. ....   | 44 |
| Abbildung 19: | Kalibrationsgerade für CCS-Messungen nach der Single-Field Methode. $\beta$ wird aus der Steigung und $t_{Fix}$ aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden bestimmt.....   | 47 |
| Abbildung 20: | Vergleich der CCS-Werte für ausgewählte Standards nach der Stepped-Field Methode (Mittelwert aus acht CCS-Werten mit Fehlerbalken) und der Single-Field Methode (Einfachbestimmung).....  | 48 |
| Abbildung 21: | Ansicht der CCS-Demonstrations-Datenbanksoftware mit importierter Feature Liste („feature identification list“; links) und Ergebnissen der Datenbanksuche („identified features“; rechts) bei einer Toleranz von $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %. .... | 50 |
| Abbildung 22: | Trennung von Estron und Trenbolon, aufgezeichnet auf dem DMA-Gerät bei $15.000 U \text{ min}^{-1}$ und einer Scanzeit pro Masse von 300 ms. ....  | 56 |
| Abbildung 23: | Mobilitätsspektren von Tramadol und Desvenafloxin unter Verwendung des DMS-Systems mit 2-Propanol (grau) und ohne Dopantgas (weiß). Die Peaks entsprechen Desvenafloxin (1), Tramadol, (2) und beiden Verbindungen (1/2). ....  | 57 |
| Abbildung 24  | Unterschied im Intensitätsverhältnis der Multimere von Tramadol und Desvenafloxin unter Verwendung des DMA-Systems. Für weitere Erläuterungen: siehe Text. ....   | 58 |
| Abbildung 25: | Prinzip der Single-Heart-Cut 2D-LC (LC – LC). Für weitere Details: siehe Text.....  | 60 |
| Abbildung 26: | Prinzip der umfassenden (comprehensive) 2D-LC. Für weitere Details: siehe Text.....   | 62 |
| Abbildung 27: | Darstellung der Abhängigkeit der Wechselwirkungsmechanismen für den Fall einer a) geringen Orthogonalität und b) hohen Orthogonalität in der ersten und zweiten Trenndimension. Für weitere Details: siehe Text. ....   | 63 |
| Abbildung 28: | Schema der Trennung in vier Dimensionen bei der LC + LC-IM-HRMS-Kopplung. ....  | 65 |
| Abbildung 29: | Schematische Darstellung der einzelnen Elemente des miniaturisierten 2D-LC-Systems.....   | 66 |
| Abbildung 30: | Kopplung des miniaturisierten 2D-LC-Systems (Expert NanoLC 425) mit QTrap 3200 im Labor der Forschungseinrichtung 1.....  | 67 |

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| Abbildung 31:  | Gradientenverläufe der ersten und zweiten Dimension. ....  | 68 |
| Abbildung 32:  | Kopplung des 2D-LC-Systems mit dem hochauflösenden Massenspektrometer im Labor der Forschungseinrichtung 2. ....   | 70 |
| Abbildung 33:  | Aufbau des LC + LC-Systems. Das Eluat der ersten Dimension ( $100 \mu\text{L min}^{-1}$ ) wird kontinuierlich mit Wasser ( $300 \mu\text{L min}^{-1}$ ) verdünnt. Hinter der Mischkammer wird mit einem Fluss von $380 \mu\text{L min}^{-1}$ über ein T-Stück abgesaugt, sodass die Probenschleifen mit verdünntem Eluat ( $20 \mu\text{L min}^{-1}$ ) gefüllt werden. ....  | 71 |
| Abbildung 34:  | EIC von Etoposid in fünf aufeinanderfolgenden Fraktionen der zweiten Dimension. ....   | 73 |
| Abbildung 35:  | Vergleich der Peakkapazitäten und Peakkapazitätsproduktionsraten für 1D-LC-Verfahren und LC x LC-Verfahren. ....   | 74 |
| Abbildung 36:  | Extrahierte Ionenchromatogramme der Mixe 1-3 von Paar 5 ( $m/z$ 115,0) für jeweils fünf aufeinanderfolgende Fraktionen aus der ersten Dimension. (Mix 1: Estron und Trenbolon; Mix 2: Estron; Mix 3: Trenbolon). ....  | 75 |
| Abbildung 37:  | Resultierende zweidimensionale Trennung der rekonstruierten Peakformen der ersten Dimension für a) die Epimere Doxorubicin und Epirubicin und b) die Isomere Ifosfamid und Cyclophosphamid. Die vertikal gestrichelten roten Linien stellen die verschiedenen Fraktionen dar, die auf die zweite Trenndimension übertragen werden. Die resultierenden 2D-LC-Trennungen sind in c) und d) für die einzelnen kritischen Peakpaare dargestellt. Die entsprechende Trennung auf der zweiten Dimension für eine Fraktion ist in e) und f) dargestellt. .... | 77 |
| Abbildung 38:  | Visualisierung des M-S-F-Kriteriums das vorgibt, dass ein Signal bzw. Peak aus der ersten Trenndimension drei Mal geschnitten wird. ....   | 80 |
| Abbildung 39 : | HPLC-HRMS-Kopplung im Labor der Forschungseinrichtung 1. Linke Bildseite: LC 1260 der Firma Agilent; rechte Bildseite: 6545 QTOF der Firma Agilent. ....   | 89 |
| Abbildung 40:  | Darstellung der Totalionenstrom-Chromatogramme für die mit den Targetanalyten dotierten Realproben. Die Messungen erfolgten mit dem in Abschnitt 2.6.3.1 beschriebenen Verfahren. ....   | 90 |
| Abbildung 41:  | Feature-Analyse der Abwasserprobe. Dargestellt sind die aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm extrahierten Massenspuren, die eindeutig als chromatografische Peaks zugeordnet werden konnten. Für weitere Erläuterungen: siehe Text. ....  | 91 |
| Abbildung 42:  | Feature-Analyse des Pflanzenextrakts. Dargestellt sind die aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm extrahierten Massenspuren, die eindeutig als chromatografische Peaks zugeordnet werden konnten. Für weitere Erläuterungen: siehe Text. ....   | 92 |
| Abbildung 43:  | Feature-Analyse des Extrakts der HTC-Kohle. Dargestellt sind die aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm extrahierten Massenspuren,  |    |

|               |   |     |
|---------------|---|-----|
|               | die eindeutig als chromatografische Peaks zugeordnet werden konnten. Für weitere Erläuterungen: siehe Text. ....  | 93  |
| Abbildung 44: | Beispiel einer Huminsäure.....  | 94  |
| Abbildung 45: | Contourplot der LC + LC Analyse des Extrakts einer chinesischen Heilpflanze (oben), eines Abwassers (Mitte) und einer Biokohle (unten), jeweils mit Cyclophosphamid und Ifosfamid dotiert. ....   | 96  |
| Abbildung 46: | Teil des LC + LC-Contourplots (links), der Heatmap (Mitte) und des erweiterten Teils (rotes Rechteck) der Heatmap (rechts) der Biokohleanalyse mit LC + LC-ESI-IM-HRMS.....   | 97  |
| Abbildung 47: | Fünf Massenspektren von insgesamt mehr als 12 Signalen in der erweiterten Heatmap des HTC-Extrakts mit LC + LC-ESI-IM-HRMS. ....  | 98  |
| Abbildung 48: | Heatmap der LC-IM-HRMS Analyse (ESI pos.) von Abwasser.....   | 100 |
| Abbildung 49: | a) Heatmap der LC + LC-IM-HRMS Analyse (ESI pos.) von Abwasser; b) Ausschnitt der Heatmap mit Trennung einer Fraktion (gesammelt zwischen 16 und 20 Minuten) in der zweiten Dimension (Elution von der zweiten Säule zwischen 20 und 24 Minuten)..... | 102 |
| Abbildung 50: | Vergleich der Anschaffungskosten der unterschiedlichen Verfahrensvarianten. * Mittelwert aus zwei Angeboten. ** Mittelwert aus fünf Angeboten. *** Mittelwert aus drei Angeboten. ....  | 108 |

## Tabellenverzeichnis

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1:  | Ausgewählte Isobarenpaare und ihre Zuordnung zu den jeweiligen Gemischen (Mix). .....   | 22 |
| Tabelle 2:  | Komponenten zur Bestimmung der Peakkapazität. ....  | 26 |
| Tabelle 3:  | Angabe der chromatografischen Auflösung R in Abhängigkeit der Gradientendauer. Grüne Felder bedeuten, dass eine Auflösung > 1,5 erzielt wird (Basislinientrennung); rot-orangene Felder bedeuten, dass eine Auflösung < 1,5 erzielt wird. n. d.: nicht detektierbar. ....   | 35 |
| Tabelle 4:  | Vergleich der CCS-Werte ( $\Omega$ ) von Colchicin berechnet nach der Stepped-Field Methode über verschiedene Kombinationen an Driftspannungen und Vergleich mit der Literatur. ....  | 45 |
| Tabelle 5:  | Ermittelte CCS-Werte für ausgewählte Substanzen und Vergleich mit Literaturwerten. ....   | 46 |
| Tabelle 6:  | Methodenparameter der TWIMS-Messung. ....   | 51 |
| Tabelle 7:  | Parameter des ADC Algorithmus. ....   | 51 |
| Tabelle 8:  | Methodenparameter der DMA-Messung. ....   | 51 |
| Tabelle 9:  | Methodenparameter der DMS-Messung. ....   | 52 |
| Tabelle 10: | Methodenparameter des Drift Tube IMS. ....  | 53 |
| Tabelle 11: | Überblick über die IMS-Auflösungen. DMS-Daten für die Messungen mit 2-Propanol. DMA-Daten gesammelt mit 15.000 U min <sup>-1</sup> und ohne den Zusatz von Dopantgasen. Grüne Felder bedeuten, dass eine Auflösung > 1,5 erzielt wird (Basislinientrennung); rot-orangene Felder bedeuten, dass eine Auflösung < 1,5 erzielt wird. n. d.: nicht detektierbar. ....                  | 54 |
| Tabelle 12: | Auflistung der Säulenkenndaten für die miniaturisierte LC x LC. ....  | 67 |
| Tabelle 13: | Substanzen zur Bestimmung der Peakkapazität mittels FLD mit Vorsäule. ....  | 69 |
| Tabelle 14: | Substanzen zur Bestimmung der Peakkapazität mittels FLD ohne Vorsäule. ....   | 69 |
| Tabelle 15: | Isobarentrennung auf der zweiten Dimension der 2D-LC mit und ohne Vorsäule auf der ersten Dimension. n. d.: nicht detektiert. ....  | 78 |
| Tabelle 16: | Vergleich der resultierenden Datenpunkte über einen chromatografischen Peak in Abhängigkeit von Peakbreite und Zykluszeit. Annahme: Verweilzeit für Scanexperiment beträgt 250 ms bei einer Peakbreite von 10 s und 20 ms bei einer Peakbreite von 1 s. Verweilzeit für MS/MS-Experimente beträgt 100 ms bei einer Peakbreite von 10 s und 20 ms bei einer Peakbreite von 1 s. .... | 81 |
| Tabelle 17: | Retentionszeiten der Dreifachbestimmung der Abwasser-Stichprobe für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. Die Messungen erfolgten mit dem in  |    |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
|             | Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Verfahren (eindimensionale HPLC-MS-Kopplung mit einer Gradientenzeit von 30 Minuten).....   | 84  |
| Tabelle 18: | Abgeschätzte Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Umweltproben über den Vergleich der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse von Probe und Standard. ....  | 86  |
| Tabelle 20: | Auflistung der Substanzen die im Standard detektiert, in den Realproben jedoch nicht wiedergefunden werden konnten.....   | 87  |
| Tabelle 19: | Parameter der MS-Methode für das Agilent Q-TOF 6545.....  | 88  |
| Tabelle 21: | Retentionszeit und Fläche mit RSD der beiden dotierten Standards in drei verschiedenen komplexen Proben nach Analyse mit LC + LC-IM-HRMS. ....  | 99  |
| Tabelle 22: | Vergleich der Ionensuppressionen unter Anwendung der 1D-LC versus LC + LC. ....   | 99  |
| Tabelle 23: | Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-HRMS Analyse von Abwasser mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und $\Omega$ entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben, zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt. ....     | 101 |
| Tabelle 24: | Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC + LC-IM-HRMS Analyse von Abwasser mit $\Delta m/z = \pm 5$ ppm und $\Delta \Omega = \pm 1$ %; die angegebene exakte Masse und $\Omega$ entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben, zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt..... | 103 |
| Tabelle 25: | Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen. ....   | 113 |
| Tabelle 26: | Strukturformeln der verwendeten Isobaren bzw. Isomeren.....   | 119 |
| Tabelle 27: | Substanzspezifische Angaben.....  | 121 |
| Tabelle 28: | Massenübergänge des Isobarenmix im MRM-Modus der QTrap 3200. .  | 124 |
| Tabelle 29: | Weitere Parameter des TWIMS Systems. ....   | 125 |
| Tabelle 30: | Q1-Scan der QTrap 6500 nach Auftrennung in der DMS-Zelle.....   | 125 |
| Tabelle 31: | Weitere Parameter der MS-Methode (QTrap 6500).....  | 125 |
| Tabelle 32: | Retentionszeiten der Dreifachbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. (Methode: LC 20 – QTrap 3200; 30 Minuten Gradient). ....   | 127 |
| Tabelle 33: | Retentionszeiten der Doppelbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. (Methode: LC 20 – QTrap 3200; 120 Minuten Gradient). ....  | 129 |
| Tabelle 34: | Retentionszeiten der Doppelbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit   |     |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
|             | des Standards. (Methode: LC 1260 / 1290 Infinity – QToF 6545; 120 Minuten Gradient).....  | 130 |
| Tabelle 35: | Retentionszeiten der Dreifachbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. auf der zweiten Dimension mittels miniaturisierter 2D-LC mit Vorsäule und ohne Vorsäule auf der ersten Dimension.(a: Abwasser Stichprobe; b: Abwasser Mischprobe; c: Pflanzenextrakt; d: HTC-Kohle). ..... | 131 |
| Tabelle 36: | Auflistung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den Realproben für das System LC 20–QTrap 3200 mittels 2 h Gradient. ....   | 132 |
| Tabelle 37: | Bestimmung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Realproben für das System LC 1260 / 1290 Infinity – QToF 6545; 30 Minuten Gradient. ....  | 133 |
| Tabelle 38: | Bestimmung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Realproben für die 2D-LC mit Vorsäule auf der ersten Dimension. ....  | 134 |
| Tabelle 39: | Bestimmung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Realproben für die 2D-LC ohne Vorsäule auf der ersten Dimension. ....   | 135 |
| Tabelle 40: | LC-Parameter der ersten und zweiten Dimension. Säulenparameter siehe Tabelle 12.....  | 136 |

## Griechische Formelzeichen

|                |   |
|----------------|---|
| $\mu$          | Reduzierte Masse                          |
| $f_{coverage}$ | Orthogonalitätsfaktor                     |
| $\beta$        | Korrekturfaktor „Undersampling“           |
| $\gamma$       | Koeffizient für reduzierte Masse          |
| $\xi$          | Peakkapazitätsproduktionsrate             |
| $\sigma$       | Standardabweichung                        |
| $\Omega$       | Collision Cross Section (Stoßquerschnitt) |

## Lateinische Formelzeichen

|       |                                |
|-------|--------------------------------|
| $e$   | Elektrische Ladung             |
| $E$   | Feldstärke                     |
| $h$   | Stunde                         |
| $K_0$ | Reduzierte Mobilität           |
| $k_b$ | Boltzmann Konstante            |
| $L$   | Länge                          |
| $m_A$ | Masse Analytion                |
| $m_B$ | Masse Driftgasmolekül          |
| $N$   | Bodenzahl                      |
| $N_0$ | Dichte Driftgas                |
| $n_c$ | Peakkapazität                  |
| $R_s$ | Auflösung                      |
| $T$   | Temperatur                     |
| $t_0$ | Durchflusszeit                 |
| $t_1$ | Retentionszeit erst eluierend  |
| $t_d$ | Driftzeit                      |
| $t_g$ | Gradientenlaufzeit             |
| $t_n$ | Retentionszeit letzt eluierend |
| $t_r$ | Retentionszeit                 |
| $t_s$ | Samplingtime                   |
| $u_0$ | Lineare Fließgeschwindigkeit   |
| $w_b$ | Basispeakbreite                |
| $w_h$ | Halbwertspeakbreite            |
| $z$   | Ladungszustand                 |

## Abkürzungsverzeichnis

|            |  |
|------------|--|
| °C         | Grad Celsius   |
| µL         | Mikroliter   |
| µm         | Mikrometer   |
| 2D         | Zweidimensional  |
| ASE        | Accelerated Solvent Extraction (Beschleunigte Lösungsmittlextraktion)            |
| CCS        | Collision Cross Section (Stoßquerschnitt)  |
| cm         | Zentimeter   |
| CP         | Cyclophosphamid  |
| CV         | Compensation Voltage (Kompensationsspannung)                                     |
| Da         | Dalton   |
| DMA        | Differential Mobility Analyser   |
| DMS        | Differential Mobility Spectrometer   |
| DTIMS      | Drift Time IMS (Driftzeit IMS)   |
| DV         | Dispersion Voltage (Dispersionsspannung)   |
| ESI        | Elektrospray Ionisation  |
| F          | Flussrate  |
| FAIMS      | Field Asymmetric Waveform IMS (Asymmetrische IMS)                                |
| FLD        | Fluoreszenzdetektor  |
| FWHM       | Full width at half maximum (Peakbreite auf halber Höhe)                          |
| HPLC       | High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) |
| HRMS       | High-Resolution Mass Spectrometry (Hochauflösende Massenspektrometrie)           |
| HTC        | Hydrothermal Carbonization (Hydrothermale Karbonisierung)                        |
| ID, i.d.   | Innendurchmesser   |
| IF         | Ifosfamid  |
| IMS        | Ionenmobilitätsspektrometer; Ionenmobilitätsspektrometrie                        |
| LC         | Liquid chromatography (Flüssigkeitschromatografie)                               |
| LC x LC    | Umfassende 2D-LC   |
| min        | Minute   |
| Mix        | Substanzmixturen   |
| mL         | Milliliter   |
| MRM        | Multiple Reaction Monitoring   |
| MS         | Massenspektrometer; Massenspektrometrie  |
| MS/MS      | Tandem MS  |
| <i>m/z</i> | Masse-zu-Ladungsverhältnis   |
| ng         | Nanogramm  |
| PAK        | Polyaromatische Kohlenwasserstoffe   |
| PEEK       | Polyetheretherketon  |
| PGC        | Porous Grafitic Carbon (Poröser grafitisierter Kohlenstoff)                      |
| Q          | Quadrupol  |
| RIP        | Reaktantionenpeak  |
| RP         | Reverse Phase (Umkehrphase)  |
| RSD        | Relative Standard Deviation (Relativen Standardabweichung)                       |
| s          | Sekunde  |
| sMRM       | Scheduled MRM  |
| TIC        | Total Ion Current (Totalionenstrom)  |

TOF  
TWIMS

Time of Flight (Flugzeit)  
Traveling Wave IMS

# 1 Einleitung

## 1.1 Ziel des Projektes

Innerhalb des beantragten Projektes sollte der zentralen Frage nachgegangen werden, inwieweit der zunehmende Grad an Komplexität hinsichtlich der Kopplungstechnik für den Bereich der instrumentellen Analytik zu einem echten Mehrwert bei der Lösung komplexer analytischer Probleme führt. Dafür wurde im Schwerpunkt die Trennung kleiner isomerer Moleküle betrachtet. Als „klein“ werden im Kontext dieses Forschungsvorhabens Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 800 Da bezeichnet. Die schwerwiegenden Konsequenzen, die sich durch die unzureichende Trennung von Isomeren ergeben können, sind mit dem tragischen Fall von Contergan hinreichend bekannt [1].

Die hier betrachteten instrumentell-analytischen Techniken beziehen sich auf die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography), die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) sowie die Massenspektrometrie (MS). Um eine effektive Bearbeitung des Projektes zu gewährleisten, erfolgte eine Fokussierung auf zentrale Fragestellungen aus den Bereichen der Umweltanalytik und Arzneistoffforschung. Dabei sollte zunächst anhand einer „Referenzanalytik“ die Leistungsfähigkeit eindimensionaler flüssigkeitschromatografischer Trennverfahren in Kombination mit der Ionenmobilitätsspektrometrie und Massenspektrometrie aufgezeigt werden. Im weiteren Projektverlauf erfolgte die Kopplung zweidimensionaler flüssigkeitschromatografischer Systeme mit der Ionenmobilitätsspektrometrie und Massenspektrometrie. Es sollte die Frage beantwortet werden, welcher konkrete Mehrwert durch die Kopplung aller potenziell zur Verfügung stehenden Trenn- und Detektionstechniken generiert wird. Obwohl seitens der Gerätehersteller die Kombination der Ionenmobilitätsspektrometrie mit der Massenspektrometrie als ideal beworben wird, um Verbindungen zu trennen, die aufgrund des identischen Masse-zu-Ladungsverhältnisses nicht mit einem Massenspektrometer aufgetrennt bzw. unterschieden werden können, muss diese Arbeitshypothese auf Grundlage einer zu geringen Datenbasis kritisch hinterfragt werden [2], [3].

Nach erfolgreicher Bearbeitung des Projektes liegen jetzt Erkenntnisse vor, auf deren Basis eine eindeutige Bewertung des tatsächlichen Nutzens in Bezug auf die Kombination der verfügbaren Trenn- und Detektionstechniken möglich ist. Dies wiederum gewährleistet, dass das hohe Investitionsrisiko gesenkt werden kann, sodass diejenigen Unternehmen, die eine bestimmte Technologie bzw. Kombination unterschiedlicher Trenn- und Detektionssysteme einsetzen wollen, eine sichere Kalkulationsbasis in Bezug auf die Wirtschaftlichkeit und Rentabilität eines neu zu beschaffenden Trenn- und Detektionssystems haben.

## 1.2 Definition kritischer Peakpaare im Kontext der HPLC-MS-Kopplung

### 1.2.1 Einleitung

Es ist festzustellen, dass die Anforderungen an die analytischen Verfahren in allen Bereichen der Life Sciences stark gestiegen sind. Dies ist im Wesentlichen darauf zurück zu führen, dass vermehrt Massenspektrometer anstelle von UV-Detektoren eingesetzt werden, die eine Erfassung von organischen Spurenstoffen in sehr geringen Konzentrationen ermöglichen [4]–[6]. In vielen Quantifizierungs- und Screeningmethoden werden heutzutage deutlich mehr als 100 Komponenten in einer Methode erfasst [7]. Dass eine vollständige Basislinientrennung von ca. 50 Verbindungen in einem chromatografischen Lauf bereits eine große Herausforderung darstellt, verdeutlicht die folgende Beispielrechnung, die auf Überlegungen von Calvin C. Giddings aus dem Jahre 1983 zurückgeht [8]. Giddings stellte sich die Frage, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, ein Gemisch aus m-Komponenten auf einer HPLC-Säule mit gegebener Peakkapazität vollständig aufzutrennen. Wenn die Probe 50 Substanzen enthält und die Trennung auf einer Säule mit einer Peakkapazität von 100 durchgeführt wird, so würden 32 von 50 Verbindungen koeluiieren. Nur 18 Peaks bestünden tatsächlich aus einer Komponente. Da die Trennung von Substanzen unterschiedlicher Masse und Struktur auch im Massenspektrometer möglich ist, sollte bei der Entwicklung einer chromatografischen Methode dementsprechend in erster Linie das Ziel verfolgt werden, die nicht mittels Massenspektrometrie unterscheidbaren Substanzen zu trennen.

### 1.2.2 Pharmazeutische Analytik

Bei den in Abbildung 1 dargestellten Verbindungen handelt es sich um Struktur- bzw. Konstitutionsisomere mit identischer akkurater Masse.

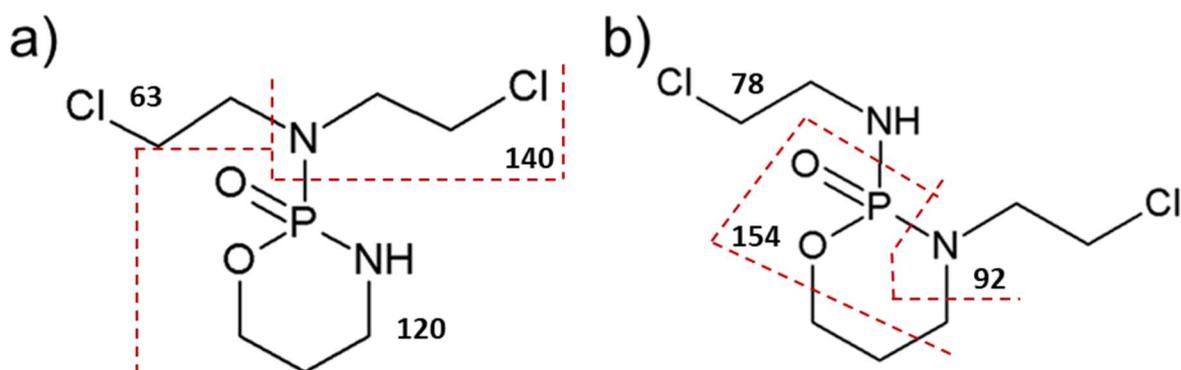


Abbildung 1: Strukturformeln von a) Cyclophosphamid (CP) und b) Ifosfamid (IF). Die gestrichelten Linien markieren die unterschiedlichen Fragmentierungen.

Für den Fall, dass ein hochauflösendes Massenspektrometer eingesetzt wird, das nicht über die Möglichkeit der Erzeugung von Produktionenspektren (MS/MS- bzw. MS<sup>2</sup>-Spektren) verfügt, ist bei einer Koelution dieser Substanzen keine massenspektrometrische Unterscheidung möglich. Anders verhält es sich, wenn ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer genutzt wird. Anhand unterschiedlicher Massenübergänge kann verifiziert werden, ob eine Koelution oder nur eine der beiden Verbindungen vorliegt. Die mit Strichen und Zahlen gekennzeichneten Bereiche in den Strukturformeln in Abbildung 1 markieren die charakteristischen „Bruchstellen“ des Moleküls. Wie zu erkennen ist, ergeben sich trotz identischer akkurater Masse viele unterschiedliche Massenübergänge. Idealerweise sollten die für die Identifizierung und Quantifizierung selektierten Massenübergänge unterschiedlich sein. Wenn dies nicht der Fall ist, weil ein oder beide Massenübergänge, die für die Quantifizierung und Verifizierung ausgewählt wurden, für beide Verbindungen identisch sind, müssen diese unbedingt chromatografisch getrennt werden. Ohne diese Vortrennung lässt sich eine Substanz nicht eindeutig identifizieren und quantifizieren, sodass lediglich die Summe der beiden Komponenten ermittelt wird.

Die in Abbildung 2 aufgeführten Substanzen sind Epimere bzw. Diastereomere, die sich nur anhand der Stellung einer OH-Gruppe voneinander unterscheiden. Bei einer Koelution dieser Verbindungen ist weder über die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS, High-Resolution Mass Spectrometry) noch bei Nutzung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers eine eindeutige Unterscheidung möglich. Eine chromatografische Trennung in Verbindung mit der Injektion der jeweiligen Referenzstandards zur Bestimmung der Retentionszeit für jede Komponente ist demzufolge zwingend erforderlich. Dies liegt daran, dass die Massenspektren in Bezug auf Fragmentationenpeaks, dem Basispeak, den Isotopenpeaks sowie dem Molekülionenpeak identisch sind.

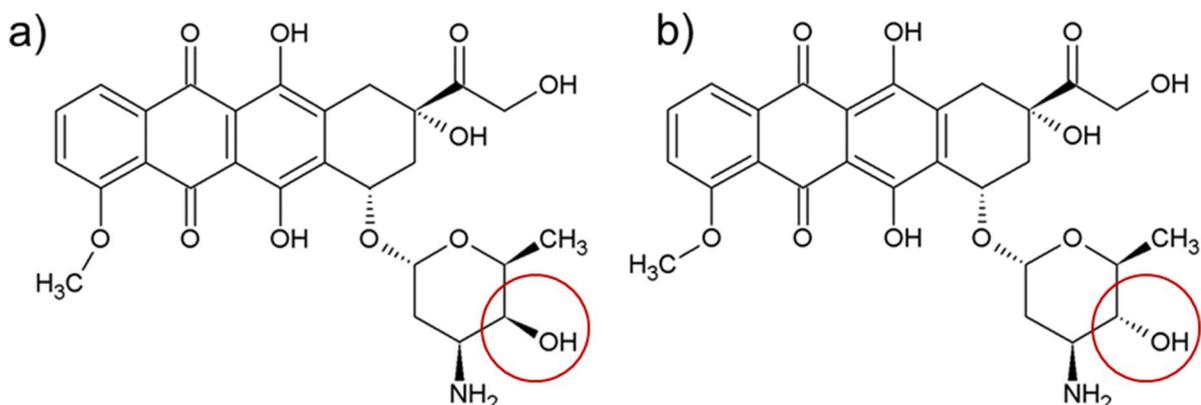


Abbildung 2: Strukturformeln von a) Doxorubicin und b) Epirubicin.

Gerade in der Pharmazie ist eine eindeutige Identifizierung der Wirkstoffe zwingend notwendig, weil isomere Verbindungen trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit signifikante Unterschiede in ihren Nebenwirkungen aufweisen können. Bei den in Abbildung 1 und Abbildung 2 dargestellten Substanzpaaren handelt es sich um Chemotherapeutika bzw. Zytostatika, die zur Krebstherapie eingesetzt werden. Sie wirken, indem sie das Wachstum der Zelle beeinträchtigen bzw. die Teilung verhindern. Da dieser Mechanismus nicht nur Krebszellen betrifft, kann es zu Nebenwirkungen wie Erbrechen, Haarausfall, Verminderung der Blutzellen und Beeinträchtigungen des Zentralnervensystems kommen [9], [10]. Cyclophosphamid und Ifosfamid werden vor allem für die Behandlung von Weichteilkarzinomen eingesetzt [11]. Bei Doxorubicin und Epirubicin handelt es sich um die am häufigsten eingesetzten Zytostatika für die Behandlung von Mammakarzinomen [12]. Doxorubicin und Epirubicin sind synthetisch hergestellte Zytostatika, die sich lediglich in der räumlichen Anordnung einer Hydroxogruppe an dem Tetrahydropyranring unterscheiden. Trotz dieser Ähnlichkeit weisen sie Unterschiede in ihrer Wirkung auf. Bei gleicher Dosierung treten unterschiedliche Wirkungs- bzw. Nebenverhältnisse auf, welche als äquimolare Dosisverhältnisse bezeichnet werden. Bei Doxorubicin : Epirubicin beträgt dieses Verhältnis für Nebenwirkungen wie Myelosuppression und Kardiotoxizität 1:1,2 bzw. 1:1,7-2,0 [13]. Dies bedeutet, dass, im Gegensatz zu Doxorubicin, vor Eintreten der Kardiotoxizität in der Regel die doppelte Menge an Epirubicin eingesetzt werden kann. Da die Zubereitungen für die Chemotherapie auf jeden Patienten individuell eingestellt werden, kann eine Verwechslung der Substanzen oder fehlerhafte Zusammensetzung der Zubereitung zu unerwünschten Nebenwirkungen für den Patienten führen.

### 1.2.3 Umweltanalytik

Endokrin aktive Verbindungen beeinflussen den Hormonhaushalt von Organismen schon in geringsten Mengen. Im Tierreich führt dies unter anderem zu Missbildungen und Fehlverhalten aquatischer Lebewesen [14], [15]. Auch beim Menschen kann eine zusätzliche Aufnahme dieser Substanzen zu einer Reihe gravierender Nebenwirkungen führen, zu denen unter anderem Brustkrebs, gestörte sexuelle Reifung und depressive Verstimmungen gehören [16], [17]. Vor allem das natürliche Hormon Estron ist von besonderem Interesse, da dieses bereits in größeren Mengen in Oberflächengewässern nachgewiesen wurde. Estron gelangt sowohl aus häuslichen Abwässern über Kläranlagen in Oberflächengewässer als auch über diffuse Einträge durch die Nutzung von Gülle zur Düngung in Flüsse und Seen [18].

Vor diesem Hintergrund wird die Aufnahme von Estron auf die Liste der prioritären Stoffe nach EU Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) derzeit diskutiert [19]–[22]. Estron wurde 2015 auf die Beobachtungsliste (Watch List) der EU WRRL mit einer notwendigen Nachweisgrenze von  $0,4 \text{ ng L}^{-1}$  für Monitoringuntersuchungen aufgenommen [23]. Mit Trenbolon existiert ein

nicht reglementiertes Isomer von Estron. Die Strukturformeln beider Verbindungen sind in Abbildung 3 wiedergegeben. Die Kombination aus fehlerhafter Probenvorbereitung sowie unzureichender Isomerentrennung kann dazu führen, dass Trenbolon und Estron als Summenparameter bestimmt werden. Durch den sehr geringen Grenzwert für Estron kann dieser Fehler für eine Vielzahl von Umweltproben schnell zu einer Überschreitung des Grenzwertes führen.

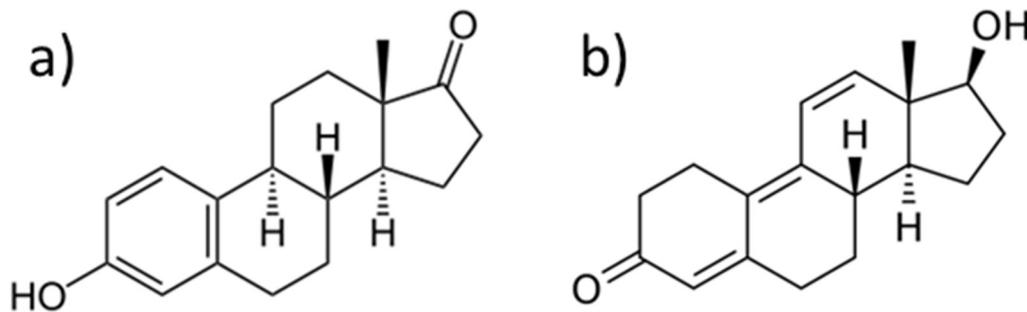


Abbildung 3: Strukturformeln von a) Estron und b) Trenbolon.

#### 1.2.4 Fazit

Für viele analytische Fragestellungen ist es deshalb unabdingbar, eine generische Methode zur Trennung isomerer Verbindungen zu etablieren. Für Hochdurchsatz-Anwendungen ist demgegenüber eine Verfahrenskombination aus einem Ionenmobilitätsspektrometer (IMS) und einem Massenspektrometer interessant [24]. Während die Zykluszeit für eine chromatografische Trennung i. d. R. mindestens mehrere Minuten beträgt, erfolgt die Trennung über ein IMS im Millisekundenbereich. Vor diesem Hintergrund zielen neue analytische Ansätze darauf ab, die chromatografische Trennung durch eine IMS-MS-Kopplung zu ersetzen [25]. Die Datenlage in der wissenschaftlichen Literatur ist allerdings gering und es muss kritisch hinterfragt werden, ob ein solcher Ansatz tatsächlich als generische Methode verwendet werden kann, oder ob für jedes kritische Peakpaar eine Anpassung der Parameter erfolgen muss, um die Selektivität der IMS-Trennung zu optimieren.

## **2 Wissenschaftlich technische Ergebnisse**

### **2.1 Auswahl der Testgemische und der Realproben**

#### **2.1.1 Auswahl der kritischen Substanzpaare**

Für die Untersuchungen wurden 27 Verbindungen ausgewählt, die sich in 12 Paare und ein Triplet unterteilen und jeweils aus isomeren bzw. isobaren Verbindungen bestehen. Nach einfacher Definition wird bereits bei gleicher nominaler Masse von Isomeren gesprochen. Bei den in diesem Forschungsvorhaben ausgewählten Substanzen handelt es sich um Verbindungen mit identischer monoisotopischer Masse.

Es wurden vier Substanzgemische hergestellt, die im Folgenden als Mix bzw. Gemisch bezeichnet werden. Mix 1 enthielt alle 27 Verbindungen. Um die einzelnen Substanzen im Chromatogramm eindeutig zuordnen zu können, wurden zudem Gemische mit jeweils einem der beiden bzw. einem der drei konstitutionsisomeren Komponenten angesetzt. Die Zusammensetzung der Gemische sowie die Summenformel und monoisotopische Masse der Analyten sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die zugehörigen Strukturformeln sind im Anhang wiedergegeben (Kapitel 8.1.1). Zusätzliche substanzspezifische Angaben sind in Tabelle 27 (Kapitel 8.1.2) aufgeführt.

Tabelle 1: Ausgewählte Isobarenpaare und ihre Zuordnung zu den jeweiligen Gemischen (Mix).

| Paar Nr. | Substanz                 | Summenformel   | Monoisotopische Masse / Da | Mix 1 | Mix 2 | Mix 3 | Mix 4 |
|----------|--------------------------|--|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol | C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub>                                   | 133,0639                   | X     | X     |       |       |
|          | 4-Methyl-1H-Benzotriazol |  |                            | X     |       | X     |       |
| 2        | Cyclophosphamid          | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P | 260,0248                   | X     | X     |       |       |
|          | Ifosfamid                |  |                            | X     |       | X     |       |
| 3        | Tramadol                 | C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>                                | 263,1885                   | X     | X     |       |       |
|          | Desvenlafaxin            |  |                            | X     |       | X     |       |
| 4        | Diethylstilbestrol       | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>                                 | 268,1463                   | X     | X     |       |       |
|          | Equilin                  |  |                            | X     |       | X     |       |
| 5        | Estron                   | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>                                 | 270,1620                   | X     | X     |       |       |
|          | Trenbolon                |  |                            | X     |       | X     |       |
| 6        | Dehydroepiandrosteron    | C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>                                 | 288,2089                   | X     | X     |       |       |
|          | Testosteron              |  |                            | X     |       | X     |       |
| 7        | Dihydrotestosteron       | C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                                 | 290,2246                   | X     | X     |       |       |
|          | Etiocholanon             |  |                            | X     |       | X     |       |
|          | Androsteron              |  |                            | X     |       |       | X     |
| 8        | Laktose                  | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>                                | 342,1162                   | X     | X     |       |       |
|          | Saccharose               |  |                            | X     |       | X     |       |
| 9        | Ofloxacin                | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                 | 361,1438                   | X     | X     |       |       |
|          | Levofloxacin             |  |                            | X     |       | X     |       |
| 10       | Doxorubicin              | C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>11</sub>                               | 543,1741                   | X     | X     |       |       |
|          | Epirubicin               |  |                            | X     |       | X     |       |
| 11       | Iomeprol                 | C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>   | 766,8541                   | X     | X     |       |       |
|          | Iopamidol                |  |                            | X     |       | X     |       |
| 12       | Corticosteron            | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                                 | 346,2144                   | X     | X     |       |       |
|          | Cortexolon               |  |                            | X     |       | X     |       |
| 13       | Cortison                 | C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>                                 | 360,1937                   | X     | X     |       |       |
|          | Prednisolon              |  |                            | X     |       | X     |       |

### 2.1.3 Auswahl komplexer Realproben

Es wurden drei verschiedene Realproben ausgewählt. Hierbei handelte es sich um eine Abwasserprobe, ein Pflanzenextrakt sowie ein Extrakt einer Biokohle. Als Abwasserprobe diente ein Krankenhaus-Kläranlagen-Zulauf. Es wurden eine Zulauf-Stichprobe und eine 24-h Zulauf-Mischprobe genommen. Beim Zulauf handelt es sich um den Punkt der Kläranlage, an dem das Kanalnetz anschließt und das Abwasser in die Anlage fließt. Die Probenvorbereitung ist im Anhang in Kapitel 8.2.1 beschrieben. Als weitere Realprobe wurde ein Pflanzenextrakt analysiert, welcher aus einer Mischung der chinesischen Kräuter *Scutellaria barbata herba* und *Hedyotis diffusa herba* gewonnen wurde. Diese als Heilkräuter vertriebenen Extrakte finden in der alternativen Heilkunde immer häufiger Anwendung, sind aber unzureichend charakterisiert, sodass mit unvorhersehbaren Nebenwirkungen gerechnet werden muss [26]. Die Arbeitsanweisung zur Gewinnung des Extrakts befindet sich im Anhang in Kapitel 8.2.2. Bei der dritten Matrix handelte es sich um eine durch Hydrothermale Karbonisierung (HTC) hergestellte Biokohle. Zur deren Gewinnung wird Biomasse unter erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur in Biokohle überführt, welche anschließend als Dünger verwendet werden kann [27], [28]. Auch Klärschlamm kann mit dieser Methode, unter einer hohen Kohlenstoff-Effizienz, zu Brennstoff verarbeitet werden. Aufgrund der Komplexität des Prozesses ist es allerdings schwer vorauszusagen, welche Spurenstoffe bei dem Prozess zersetzt, umgewandelt oder erzeugt werden. Zur Probenvorbereitung wurde die gefriergetrocknete HTC-Kohle mittels „Accelerated Solvent Extraction“ (ASE) extrahiert. Die Parameter des ASE-Programms befinden sich im Anhang in Kapitel 8.2.3.

Die aufbereiteten Realproben wurden mit den Targetkomponenten (Mix 1 aus Tabelle 1) dotiert, sodass eine Konzentration von  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  für jeden der 27 Analyten resultiert. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte über die gesamte Projektlaufzeit bei  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Abbildung 4 zeigt repräsentative Extraktionslösungen von zwei verschiedenen Umweltmatrixen im Vergleich zu einem Reinststandard.



Abbildung 4: Extraktionslösungen verschiedener Umweltmatrixen im Vergleich zu einem Reinststandard: Mitte: Extrakt des Kläranlagenzulaufs; rechts: HTC-Extrakt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der HTC-Extrakt aufgrund der tiefschwarzen Färbung die komplexeste Matrix der in diesem Forschungsvorhaben untersuchten Realproben darstellt.

## 2.2 Bestimmung der Peakkapazität und Peakkapazitätsproduktionsrate für die eindimensionale Flüssigkeitschromatografie

### 2.2.1 Einleitung und Theorie

Um die Leistungsfähigkeit bzw. Trenneffizienz eindimensionaler flüssigkeitschromatografischer Trennverfahren zu ermitteln, wurden Referenzverfahren etabliert. Insgesamt wurden drei Verfahrensvarianten untersucht. Hierbei wurde die Gradientenzeit in einem sehr weiten Bereich zwischen 30 Sekunden und acht Stunden variiert. Für die Bestimmung der Trenneffizienz wurden die Peakkapazität und die Peakkapazitätsproduktionsrate berechnet. Die Peakkapazität ist eine dimensionslose Zahl und gibt an, wie viele Peaks mit einer konstanten chromatografischen Auflösung  $R$  in ein Elutionszeitfenster passen. In Abbildung 5 ist dieser Sachverhalt für eindimensionale Trennverfahren exemplarisch dargestellt.

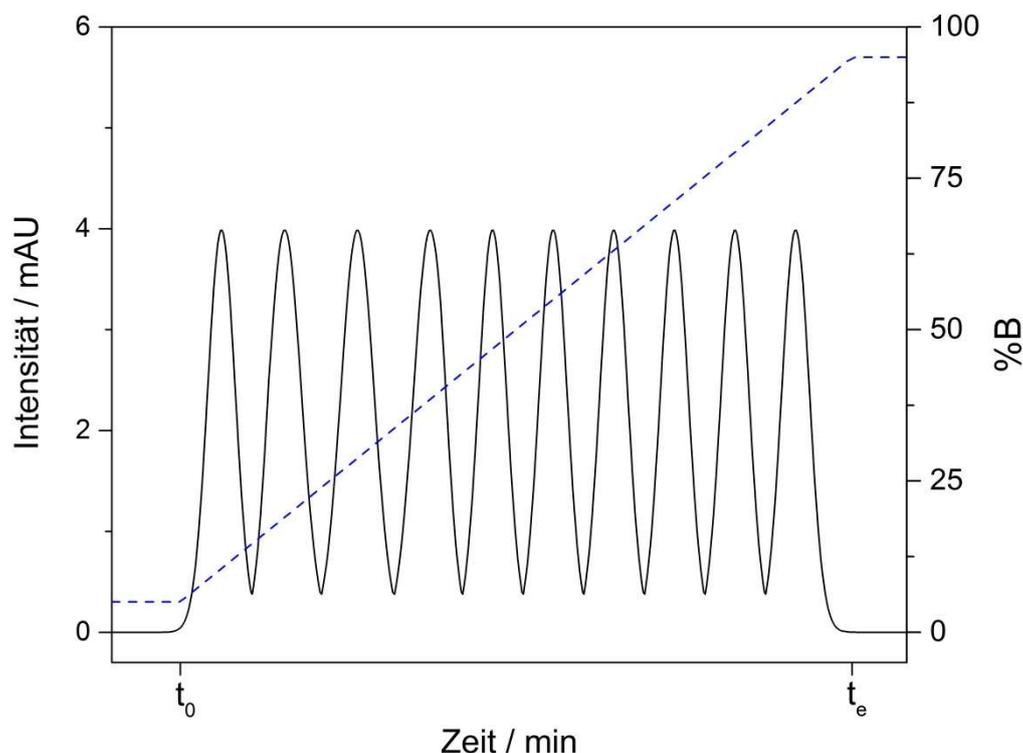


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Peakkapazität anhand der mit konstanter Auflösung von  $R = 1$  getrennten Signale, die innerhalb des Elutionszeitfensters von  $t_0$  (Durchflusszeit) bis  $t_e$  (Ende des Gradienten) erfasst werden. Die blaue gestrichelte Linie repräsentiert den Lösungsmittelgradienten.

Das Konzept der Peakkapazität geht auf eine frühe Arbeit von Grushka zurück [29]. In dieser Publikation definierte er zur Berechnung der Peakkapazität eine Auflösung von 1. Nahezu alle Werte, die in der Literatur veröffentlicht sind, beziehen sich auf diese Vorgabe. Das Elutionszeitfenster erstreckt sich dabei von der Zeit, die eine Komponente ohne Wechselwirkung mit der stationären Phase durch das System benötigt (sog. Durchflusszeit  $t_0$ ) bis zu

dem Zeitpunkt, an dem die letzte Komponente von der Säule eluiert. Alternativ kann zur Berechnung der theoretischen Peakkapazität auch der Endpunkt des Gradienten gewählt werden. Die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens ermittelten Werte beziehen sich immer auf die Gradientenlaufzeit. Für die Gradientenelution wird häufig die Annahme getroffen, dass die mittlere Peakweite aller Komponenten innerhalb des Gradientenfensters konstant ist. Der Grund hierfür ist, dass durch die Bandenkompression keine Zunahme der Peakbreite mit steigender Analysenzeit erfolgt [30]. Im Gegensatz dazu wird für isokratische Trennungen beobachtet, dass die Peakbreite mit zunehmender Analysenzeit zunimmt. Die Peakkapazität  $n_c$  für den Gradientenmodus kann somit anhand folgender Gleichung abgeschätzt werden:

$$n_c \approx 1 + \frac{t_g}{w_b} \approx 1 + \frac{t_g}{4 \cdot \sigma} \approx 1 + \frac{t_g}{4 \cdot \frac{w_h}{2,354}} \quad \text{Gl. 1}$$

Hierbei bezeichnet  $t_g$  die Dauer des linearen Gradienten und  $w_b$  steht für die Basispeakbreite,  $\sigma$  bezeichnet die Standardabweichung des Signals. Zur Berechnung der Peakkapazität wurde ein Mittelwert aus den Peakbreiten aller während der Gradientenlaufzeit eluierenden Peaks gebildet.

Die Peakkapazitätsproduktionsrate ( $\xi$ ) ist eine Leistungskennzahl, die die Anzahl an getrennten Peaks mit definierter Auflösung pro Zeiteinheit angibt. Diese wurde nach folgender Gleichung (Gl. 2) berechnet.

$$\xi = 1 + \frac{n_c}{t_g} \quad \text{Gl. 2}$$

Anhand dieser Kennzahl lassen sich unterschiedliche chromatografische Ansätze miteinander vergleichen.

## 2.2.2 Experimentelle Durchführung

### 2.2.2.1 Auswahl der Substanzen

Zur Bestimmung der Peakkapazität wurde ein Substanzgemisch aus verschiedenen Stammlösungen mit einer Konzentration von je  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet. Die Analyten und die resultierenden Konzentrationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Komponenten zur Bestimmung der Peakkapazität.

| Substanz       | Endkonzentration        | Organikanteil (ACN) |
|----------------|-------------------------|---------------------|
| 5-Fluorouracil | 500 ng mL <sup>-1</sup> | 0,025 %             |
| Atenolol       | 500 ng mL <sup>-1</sup> | 0,025 %             |
| Topotecan      | 500 ng mL <sup>-1</sup> | 0,025 %             |
| Etoposid       | 500 ng mL <sup>-1</sup> | 0,025 %             |
| Fenofibrat     | 500 ng mL <sup>-1</sup> | 0,05 %              |

Die Substanzen wurden dabei so ausgewählt, dass sie sich unter Verwendung einer Umkehrphase über den gesamten Bereich des Gradientenzeitfensters verteilen. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 6 dargestellt. Die sehr polare Verbindung 5-Fluorouracil zeigt in diesem Fall keine Wechselwirkung mit der stationären Phase und konnte daher als Totzeitmarker zur Berechnung der Durchflusszeit verwendet werden.

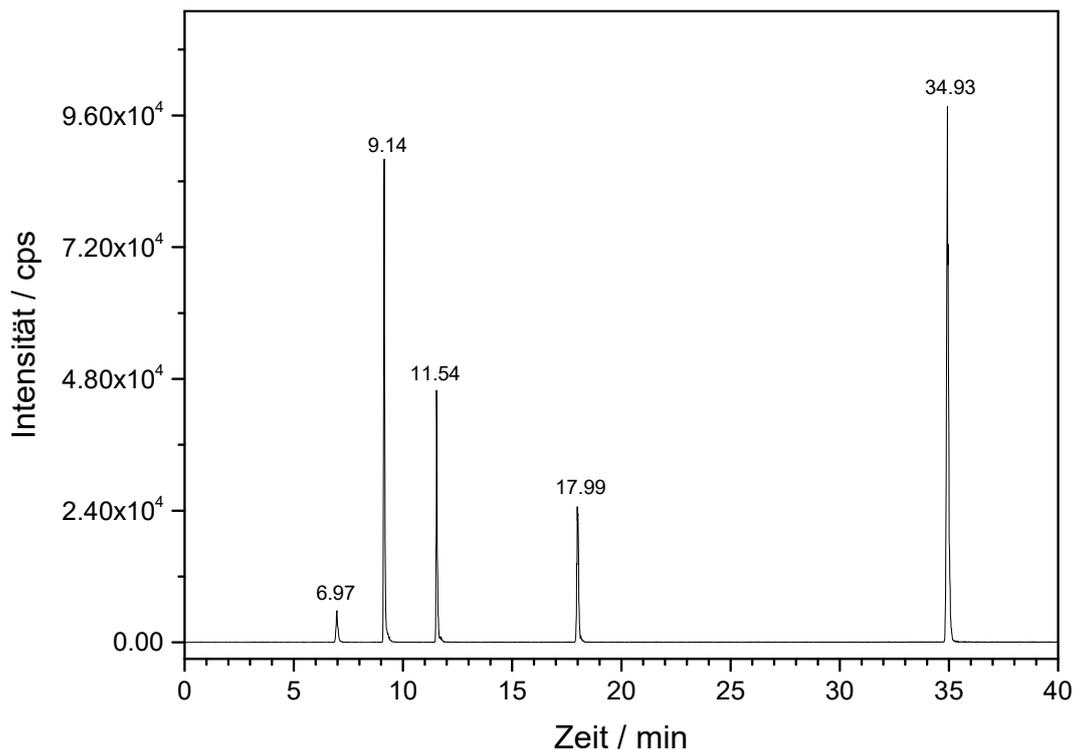


Abbildung 6: Beispielchromatogramm des fünf Komponenten Mix zur Bestimmung der Peakkapazität. Die Messung erfolgte mit dem in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Verfahren. Substanzen v. l. n. r. 5-Fluorouracil, Atenolol, Topotecan, Etoposid, Fenofibrat.

### 2.2.2.2 Referenzverfahren eindimensionale HPLC (5,0 $\mu\text{m}$ , konventionelle HPLC)

Als Referenzsäule für die konventionelle eindimensionale Trennung mit einer Gradientenzeit von 30 Minuten wurde eine Umkehrphase in den Dimensionen 250 mm x 4,6 mm verwendet (Zorbax-SB-C-18, 5,0  $\mu\text{m}$ ). Die Messungen erfolgten auf einem HPLC-System der Firma Shimadzu (LC 20 AD). Das Injektionsvolumen betrug 5  $\mu\text{L}$  und es wurde eine Gradientenzeit von 30 min bei einer Flussrate von 500  $\mu\text{L min}^{-1}$  gewählt. Es wurde ein linearer Lösungsmittelgradient von 5 % A (Wasser + 0,1 % Ameisensäure) auf 95 % B (Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure) eingestellt. Als Detektor wurde ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer der Firma Sciex verwendet (QTrap 3200). Abbildung 7 zeigt die Kopplung im Labor der Forschungseinrichtung 1.



Abbildung 7: HPLC-MS-Kopplung im Labor der Forschungseinrichtung 1. Rechte Bildseite: LC 20 AD der Firma Shimadzu; linke Bildseite: QTrap 3200 der Firma Sciex.

### 2.2.2.3 Referenzverfahren eindimensionale HPLC – serielle Säulenkopplung (5,0 $\mu\text{m}$ )

Für den zweiten Ansatz, der an die Arbeiten von Lestremau et al. angelehnt ist, wurden vier Zorbax SB-C18 Säulen seriell gekoppelt [31]. Dieses Verfahren eignet sich für die Analyse komplexer Proben und ist ohne weitere technische Modifikationen mit jedem HPLC-System zu realisieren. Es wurden Messungen mit einer Gradientenzeit von 2 h und 8 h und einer Flussrate von 500  $\mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Es wurde ein linearer Lösungsmittelgradient von 5 % A (Wasser + 0,1 % Ameisensäure) auf 95 % B (Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure) eingestellt. Das Injektionsvolumen betrug 5  $\mu\text{L}$ . Die Messungen erfolgten auf dem in Abbildung 7 dargestellten System.

#### 2.2.2.4 Referenzverfahren eindimensionale HPLC (sub 2 $\mu\text{m}$ , Mikro-LC)

Bei der dritten Verfahrensvariante wurden Messungen auf einem Eksigent ExpressLC Ultra-System (Sciex, Dublin, CA, USA) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Mikro-LC-System, das im Vergleich zu konventionellen HPLC-Systemen ein deutlich reduziertes Gradientenverweilvolumen von ca. einem Mikroliter besitzt. Auf diese Weise lassen sich extrem schnelle Gradienten ( $< 1$  min) bei einer im Vergleich zu klassischen HPLC-Systemen geringen absoluten Flussrate durchführen. Um konventionelle Ionisationsquellen nutzen zu können, ist es bei der Mikro-LC-MS-Kopplung notwendig, einen Emittertip mit einem Innendurchmesser (ID) von  $50 \mu\text{m}$  zu verwenden. In Abbildung 8 ist der Emittertip mit einem ID von  $100 \mu\text{m}$  für die konventionelle HPLC-MS-Kopplung dem Emittertip mit einem ID von  $50 \mu\text{m}$  gegenüber gestellt.

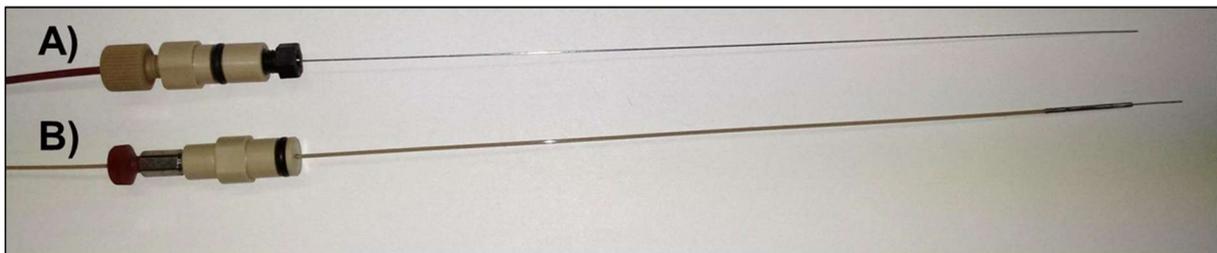


Abbildung 8: Emittertips im Vergleich. A) Klassischer Emittertip aus rostfreiem Stahl, einem ID von  $100 \mu\text{m}$  und einem  $1/16''$  Fitting. B) Mikro Emittertip aus PEEKSil Kapillare und Metallspitze, einem ID von  $50 \mu\text{m}$  und  $1/32''$  Fitting.

Trotz der relativ niedrigen absoluten Flussraten im Bereich von  $40 \mu\text{L min}^{-1}$  für Mikro-LC-Säulen mit einem ID von  $300 \mu\text{m}$  können sehr hohe lineare Fließgeschwindigkeiten erzielt werden, wie anhand der Darstellung in Abbildung 9 deutlich wird. Aufgetragen ist der Innendurchmesser der Trennsäule gegen die lineare Fließgeschwindigkeit (linke y-Achse) bei konstanter Flussrate von  $40 \mu\text{L min}^{-1}$  bzw. gegen die absolute Flussrate (rechte y-Achse) bei konstanter linearer Fließgeschwindigkeit von  $13,6 \text{ mm s}^{-1}$ .

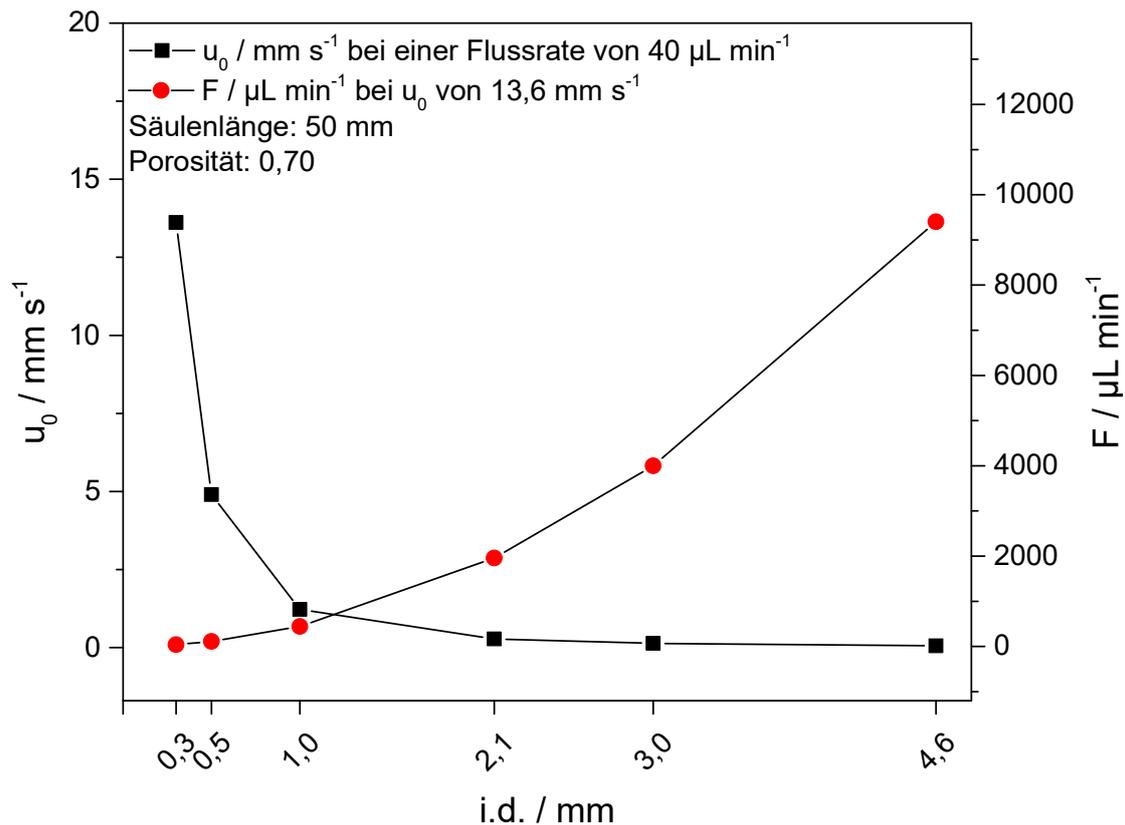


Abbildung 9: Abhängigkeit zwischen Trennsäulennendurchmesser und der linearen Fließgeschwindigkeit (linke y-Achse) und der absoluten Flussrate (rechte y-Achse).

Anhand der aufgetragenen Daten kann abgelesen werden, dass die lineare Fließgeschwindigkeit bei einer konstanten absoluten Flussrate von  $40 \mu\text{L min}^{-1}$  von  $0,058 \text{ mm s}^{-1}$  auf  $13,6 \text{ mm s}^{-1}$  steigt, wenn der Innendurchmesser von  $4,6 \text{ mm}$  auf  $300 \mu\text{m}$  reduziert wird. Ausgehend von einer konstanten linearen Fließgeschwindigkeit von  $13,6 \text{ mm s}^{-1}$  erhöht sich die absolute Flussrate von  $40 \mu\text{L min}^{-1}$  bis auf  $9,4 \text{ mL min}^{-1}$ , wenn der Innendurchmesser von  $300 \mu\text{m}$  auf  $4,6 \text{ mm}$  aufgeweitet wird. Um also unter Verwendung klassischer Säulenformate dieselbe Analysenzeit im Vergleich zu Mikro-LC-Anwendungen zu erreichen, muss die absolute Flussrate drastisch erhöht werden. Dies schlägt sich in einem sehr hohen Verbrauch an teuren und toxischen Lösungsmitteln nieder. Des Weiteren ist eine Kopplung mit der Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nur möglich, wenn ein Flussplitter verwendet wird.

Die hier dargestellte Verfahrensvariante wurde darüber hinaus ausgewählt, weil die in Kapitel 2.5 aufgeführten Ergebnisse mit einem miniaturisierten 2D-LC-System erzielt wurden, das in der zweiten Trenndimension ebenfalls aus einem Mikro-LC-System bestand. Da das Zorbax Material für eine Mikro-LC-Trennsäule mit einem Innendurchmesser von  $300 \mu\text{m}$  nicht verfügbar war, wurde die Triart C-18 HPLC-Säule von YMC ( $300 \mu\text{m} \times 5 \text{ cm}$ ,  $1,9 \mu\text{m}$ ) verwendet. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Umkehrphase. Da vor dem Hintergrund der Kinetik-Plot-Theorie stationäre Phasen mit sub  $2 \mu\text{m}$  Partikeln tendenziell für schnellere

Gradienten prädestiniert sind, wurde eine maximale Laufzeit von 30 min für den linearen Lösungsmittelgradienten definiert [32]. Die minimale Gradientenzeit betrug in diesem Fall 30 Sekunden bei einer Flussrate von  $25 \mu\text{L min}^{-1}$ . Es wurde ein linearer Lösungsmittelgradient von 5 % A (Wasser + 0,1 % Ameisensäure) auf 95 % B (Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure) eingestellt. Das Injektionsvolumen betrug 442 nL.

### 2.2.2.5 Definition der Detektionsparameter

Die Detektion erfolgte für alle in den vorhergehenden Abschnitten genannten Verfahrensvarianten mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer der Firma Sciex (QTrap 3200). Hierbei wurden für jede Substanz zwei Massenübergänge ausgewählt. Die Verweilzeit auf den einzelnen Massenübergängen wurde so festgelegt, dass mindestens zehn Datenpunkte pro Peak erhalten wurden. Die Ionisation erfolgte mittels Elektrosprayionisation (ESI) im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus.

## 2.2.3 Berechnung der Kenngrößen und Diskussion der Ergebnisse

### 2.2.3.1 Peakkapazität

In Abbildung 10 sind die berechneten Peakkapazitäten für alle Verfahrensvarianten zusammengefasst.

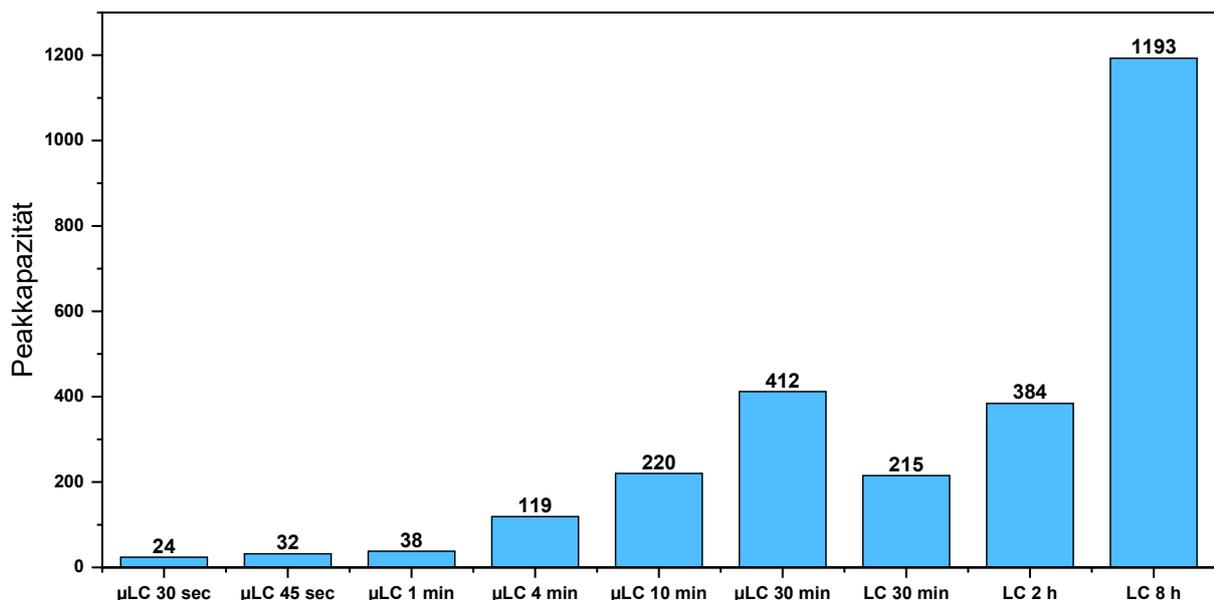


Abbildung 10: Darstellung der Peakkapazität in Abhängigkeit der Gradientenzeit. Die mit  $\mu\text{LC}$  gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit dem Mikro-LC-System erzielten Ergebnisse. Die mit LC gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit einem konventionellen HPLC-System erzielten Ergebnisse. Für die Gradientenzeiten von 2 h und 8 h wurde die serielle Säulenkopplung verwendet.

Beträgt die Gradientenzeit 30 Sekunden, so können innerhalb des Gradientenfensters 24 Peaks mit einer Auflösung von 1 getrennt werden. Eine Gradientenzeit von 30 Sekunden repräsentiert den Bereich ultra-schneller Trennungen und ist für Hochdurchsatz-Anwendungen interessant. Bei 2D-LC-Verfahren, die im umfassenden oder „comprehensive“ Modus durchgeführt werden, beträgt die Modulationszeit und somit Zykluszeit i. d. R. 30 Sekunden bis 60 Sekunden. Vor diesem Hintergrund wurden Gradientenzeiten mit einer Laufzeit von 45 Sekunden und 60 Sekunden gewählt, da diese den Bereich für 2D-LC-Verfahren im „comprehensive“-Modus vollständig abdecken. Anhand der in Abbildung 10 zusammengefassten Daten ist ersichtlich, dass die Peakkapazität von 32 auf 38 ansteigt, wenn die Gradientenzeit von 45 Sekunden auf 60 Sekunden erhöht wird.

Eine Gradientenzeit von vier Minuten wurde gewählt, weil diese Zeit den Bereich schneller Trennungen repräsentiert. Des Weiteren entspricht diese Zeit der Modulationszeit für das von Schmitz et al. im Rahmen dieses Forschungsvorhabens entwickelte LC + LC-Konzept, auf das in Abschnitt 2.5.1.3 im Detail eingegangen wird. Bei einer Erhöhung der Gradientenzeit auf vier Minuten erfolgt ein deutlicher Anstieg der Peakkapazität auf 119.

Die Gradientenzeiten von 10 Minuten und 30 Minuten wurden ausgewählt, weil diese den Bereich von typischen Screening-Anwendungen für komplexe Proben abdecken. Die Peakkapazität steigt von 220 bei einer Gradientenzeit von 10 Minuten auf 412 bei einer Gradientenzeit von 30 Minuten. Diese Werte wurden für die mit vollporösen 1,9 µm Partikeln gepackte Mikro-LC-Säule erhalten. Wird demgegenüber eine Säule mit vollporösen 5,0 µm Partikeln bei einer Gradientenzeit von 30 Minuten verwendet, so resultiert eine Peakkapazität von lediglich 215. Die serielle Kopplung von vier identischen Säulen und Ausdehnung des Gradientenfensters auf zwei bzw. acht Stunden führt dann erneut zu einem Anstieg der Peakkapazität auf 384 bzw. 1193.

### **2.2.3.2 Peakkapazitätsproduktionsrate**

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse aus Abbildung 10 auf die Gradientenzeit normiert. Aufgetragen ist die Peakkapazitätsproduktionsrate in Abhängigkeit der Gradientenzeit.

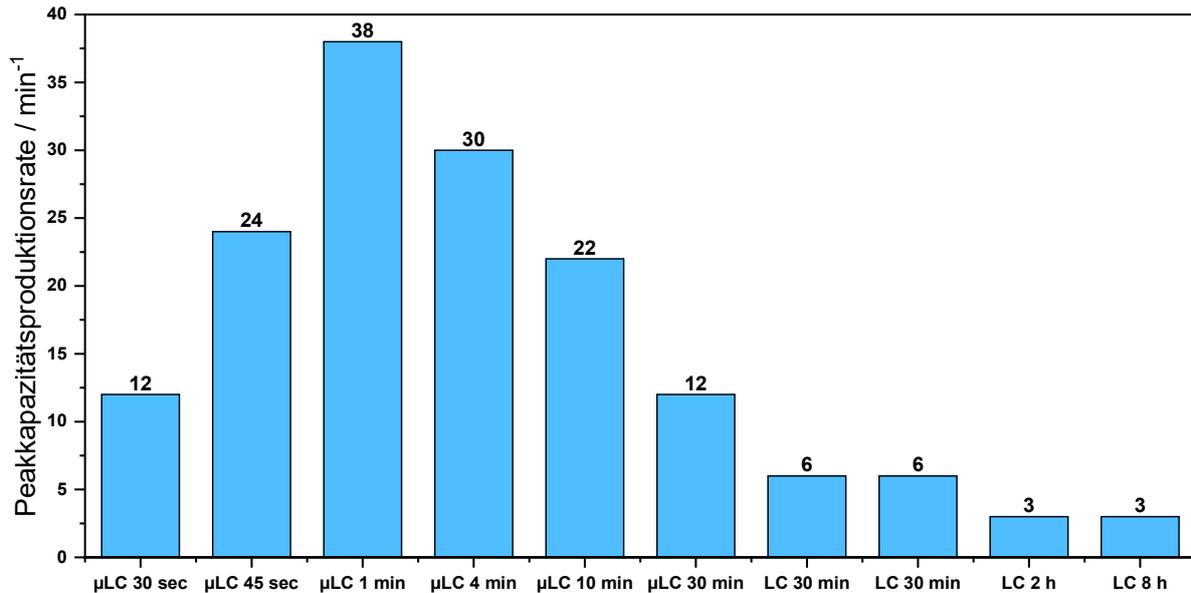


Abbildung 11: Darstellung der Peakkapazitätsproduktionsrate in Abhängigkeit der Gradientenzeit. Die mit  $\mu$ LC gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit dem Mikro-LC-System erzielten Ergebnisse. Die mit LC gekennzeichneten Balken beziehen sich auf die mit einem konventionellen HPLC-System erzielten Ergebnisse. Für die Gradientenzeiten von 2 h und 8 h wurde die serielle Säulenkopplung verwendet.

Für ultra-schnelle Trennungen von 30 Sekunden wird dieselbe Peakkapazitätsproduktionsrate von 12 erhalten, als wenn die Gradientenlaufzeit 30 Minuten beträgt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei einer Gradientenlaufzeit von 30 Minuten eine wesentlich höhere absolute Peakkapazität erzielt wird (siehe Abbildung 10). Die höchste Peakkapazitätsproduktionsrate wird bei einer Gradientenlaufzeit von einer Minute erreicht. Damit einher geht die Minimierung der Peakbreite. Müssen für eine Quantifizierungsmethode sehr niedrige Nachweisgrenzen erzielt werden, so ist aus chromatografischer Sicht eine Gradientenlaufzeit von einer Minute anzustreben. Dies bedeutet jedoch nicht, dass bei Verwendung eines massenspektrometrischen Detektors tatsächlich das höchste Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultiert, da koeluiierende Komponenten der Matrix zu einer deutlichen Signalreduktion führen können. In diesem Fall ist anhand von sog. Matrixeffekt-Chromatogrammen zu ermitteln, wie stark die Signalreduktion in Abhängigkeit der Gradientenlaufzeit ist. Für weniger komplexe Matrices ist jedoch immer eine Gradientenlaufzeit ideal, bei der die höchste Peakkapazitätsproduktionsrate erhalten wird. Eine weitergehende Diskussion der in Abbildung 10 und Abbildung 11 erhaltenen Daten erfolgt in Kapitel 2.4.5 im Zusammenhang mit zweidimensionalen chromatografischen Verfahren.

## 2.3 Bestimmung der chromatografischen Auflösung mittels HPLC-MS-Kopplung

### 2.3.1 Experimentelle Durchführung

Zur Bestimmung der chromatografischen Auflösung wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Mixe 1 bis 4 mit den in den Abschnitten 2.2.2.2 bis 2.2.2.4 beschriebenen Methoden und Gerätekonfigurationen gemessen. Es sollte ermittelt werden, inwieweit sich eine verlängerte Gradientenzeit bzw. eine längere Säule auf die chromatografische Auflösung zwischen den kritischen Peakpaaren auswirkt. Die Auflösung  $R_s$  zwischen den Isomeren wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$R_s = 1,177 \cdot \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{W_{h,1} + W_{h,2}} \quad \text{Gl. 3}$$

Hierzu wurden die Retentionszeiten und die Peakbreiten auf halber Höhe ausgewertet. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im MRM-Modus. Um möglichst viele Zyklen bei ausreichender Verweilzeit auf den einzelnen Massenspuren zu erreichen, wurde ein „Scheduled MRM“ (sMRM) durchgeführt, bei dem die erwarteten Retentionszeiten der Analyten angegeben und die jeweiligen  $m/z$ -Werte in einem Bereich von zwei Minuten um die erwartete Retentionszeit aufgezeichnet wurden. Die Massenübergänge der verschiedenen Isobarenpaare sind im Anhang in Kapitel 8.3 in Tabelle 28. aufgelistet. Hierbei wurden jeweils zwei Übergänge detektiert, mit Ausnahme von Paar 3 und Paar 4, bei denen nur ein Massenübergang im Ionisationsmodus ESI-positiv gefunden wurde. Für Paar 4 wurde die Messung im negativen Ionisationsmodus wiederholt, da Diethylstilbestrol nur im negativen Modus detektiert werden konnte.

Da die Peakbreiten bei längeren Gradienten zunehmen, wurde bei einer Gradientenlaufzeit von 2 h bzw. 8 h kein sMRM durchgeführt. Durch die Zunahme der Peakbreiten kann die Datenakquisition über den konventionellen MRM-Modus vorgenommen werden, um eine ausreichende Anzahl an Datenpunkten pro Signal zu erhalten. Da die Intensität des Signals von Diethylstilbestrol bei den längeren Gradienten nicht mehr groß genug war, um detektiert zu werden, wurden die Messungen im negativen Ionisationsmodus nur für eine Gradientenzeit von 30 min durchgeführt und in den darauffolgenden Methoden nicht mehr berücksichtigt.

### **2.3.2 Diskussion der Ergebnisse**

Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 3 gegenübergestellt. In der Tabelle repräsentiert der angegebene Zahlenwert immer die chromatografische Auflösung zwischen den jeweiligen kritischen Peakpaaren.

Tabelle 3: Angabe der chromatografischen Auflösung R in Abhängigkeit der Gradientendauer. Grüne Felder bedeuten, dass eine Auflösung > 1,5 erzielt wird (Basislinientrennung); rot-orangene Felder bedeuten, dass eine Auflösung < 1,5 erzielt wird. n. d.: nicht detektierbar.

| Paar Nr. | Gradientenzeit ▶<br>Substanz ▼ Partikelgröße ▶       | 30 s<br>1,9 µm    | 45 s<br>1,9 µm           | 1 min<br>1,9 µm          | 4 min<br>1,9 µm   | 10 min<br>1,9 µm  | 30 min<br>1,9 µm  | 30 min<br>5,0 µm  | 2 h<br>5,0 µm       | 8 h<br>5,0 µm       |
|----------|--|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol<br>4-Methyl-1H-Benzotriazol | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | 1,2               | 1,5                 | 3,8                 |
| 2        | Cyclophosphamid<br>Ifosfamid                         | 0,4               | 0,5                      | 0,5                      | 1,5               | 2,4               | 2,5               | 1,9               | 2,7                 | 10,9                |
| 3        | Tramadol<br>Desvenlafaxin                            | 0,8               | 1,2                      | 1,6                      | 3,3               | 4,4               | 10,5              | 7,4               | 8,6                 | 26                  |
| 4        | Diethylstilbestrol<br>Equilin                        | n. d.             | n. d.                    | n. d.                    | n. d.             | n. d.             | n. d.             | 3,3               | Equilin n. d.       | Equilin n. d.       |
| 5        | Estron<br>Trenbolon                                  | 1,4               | 1,6                      | 2,0                      | 6,7               | 10,6              | 15,1              | 8,6               | Estron n. d.        | Estron n. d.        |
| 6        | Dehydroepiandrosteron<br>Testosteron                 | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung        | 3,8               | 5,6               | 7,8               | Keine<br>Trennung | n. d.               | n. d.               |
| 7        | Dihydrotestosteron<br>Etiocholanon<br>Androsteron    | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung<br>1,8 | Keine<br>Trennung<br>2,6 | 2,8<br>4,2        | 3,0<br>6,0        | 3,2<br>7,6        | 2,8<br>3,5        | 4,6<br>4,5          | 9,8<br>9,8          |
| 8        | Laktose<br>Saccharose                                | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | 1,3               | 1,4               | Saccharose<br>n. d. | Saccharose<br>n. d. |
| 9        | Ofloxacin<br>Levofloxacin                            | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung   | Keine<br>Trennung   |
| 10       | Doxorubicin<br>Epirubicin                            | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung        | 1,7               | 2,6               | 5,5               | 2,8               | 2,8                 | 10,4                |
| 11       | lomeprol<br>Iopamidol                                | 0,7               | 1,1                      | 1,6                      | 2,0               | 2,6               | 2,3               | 6,6               | 5,7                 | 28,2                |
| 12       | Corticosteron<br>Cortexolon                          | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung        | 1,2               | 2,2               | 3,5               | 3,0               | 3,6                 | 9,9                 |
| 13       | Cortison<br>Prednisolon                              | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        | Keine<br>Trennung        | 1,4               | 1,8               | 1,8               | 2,1               | 2,6                 | 5,4                 |

Bei einer Gradientendauer von 30 s wird für keines der kritischen Peakpaare eine Basislini-entrennung erreicht. Lediglich das Peakpaar 5 (Estron, Trenbolon) wird mit einer Auflösung von 1,4 getrennt, die Peakpaare 2, 3 und 11 werden mit einer Auflösung  $< 1,0$  angetrennt. Dies bedeutet, dass für kurze Modulationszeiten von 30 s, wie sie für die umfassende 2D-LC typisch sind, keine hinreichende Trenneffizienz für kritische Peakpaare im Kontext der Definition aus Abschnitt 2.1.1 erreicht wird. Wird die Gradientenzeit auf 45 s bzw. 60 s erhöht, so lassen sich bereits zwei bzw. vier Peakpaare mit einer Auflösung  $> 1,5$  trennen. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3 erläutert, ist eine Gradientenzeit von 60 s die obere Grenze für den LC x LC-Modus.

Durch die Erhöhung der Gradientenzeit auf vier Minuten lassen sich bereits sieben Peakpaare mit einer Mindestauflösung von  $R > 1,5$  trennen, zwei weitere Peakpaare sind mit einer Auflösung  $R > 1,2$  getrennt. Bei einer Gradientenzeit von 30 Minuten sind bereits neun Peakpaare mit einer Auflösung von  $R > 1,5$  getrennt, für die beiden Zucker Laktose und Sachharose beträgt die Auflösung 1,3.

Aufgrund der in Abbildung 10 aufgeführten Ergebnisse wäre zu erwarten gewesen, dass unter Verwendung des sub 2  $\mu\text{m}$ -Materials im Vergleich zum 5,0  $\mu\text{m}$  Material bei einer identischen Gradientenzeit von 30 Minuten immer eine höhere Auflösung für alle betrachteten Peakpaare resultiert, da die Peakkapazität für das sub 2  $\mu\text{m}$  Material etwa doppelt so groß ist wie für das 5,0  $\mu\text{m}$  Material (412 versus 215). Die für die Peakpaare 1 (5-Methyl-1H-Benzotriazol, 4-Methyl-1H-Benzotriazol), 11 (lomeprol, lopamidol) sowie 13 (Cortison, Prednisolon) ermittelten Werte für die Auflösung weisen darauf hin, dass neben der Trenneffizienz auch die Selektivität der stationären Phase einen signifikanten Einfluss auf die Auflösung hat.

Für die überwiegende Anzahl der Peakpaare wird bei einer Gradientenzeit von 30 min eine Auflösung erzielt, die deutlich über 1,5 liegt. Dies bedeutet, dass die Umkehrphasenchromatografie unabhängig von der Selektivität der stationären Phase eine generische Methode für die Trennung von Isobaren und Isomeren ist. Allerdings wird hierzu eine Mindestpeakkapazität benötigt, die wiederum eine entsprechend lange Gradientenzeit zur Folge hat. Wird die Gradientenzeit auf 2 h bzw. 8 h erhöht, werden für die Peakpaare 3 und 11) extrem hohe Werte für die Auflösung erhalten ( $R > 20$ ). Der Ansatz der seriellen Säulenkopplung in Verbindung mit langen Gradientenzeiten ist somit ideal geeignet, die Auflösung kritischer Peakpaare in komplexen Proben zu maximieren. Dies bedeutet gleichzeitig, dass auch die in der Matrix enthaltenen Verbindungen, die zu starken Suppressionseffekten in der Massenspektrometrie führen können, minimiert werden. Auf der anderen Seite ist zu beobachten, dass durch die zunehmende Verdünnung durch Anwendung langer Gradientenzeiten und damit einhergehend der Verbreiterung der Peaks für die Peakpaare 4, 5, 6 und 8 keine Werte be-

rechnet werden können, weil für einzelne Verbindungen (Equilin, Estron, Dehydroepiandrosteron und Sachharose) keine Detektion möglich ist.

## 2.4 Isobarentrennung mit verschiedenen IMS-Methoden

### 2.4.1 Taxonomie der IMS

Bei der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) werden die Ionen aufgrund unterschiedlicher Driftgeschwindigkeiten im elektrischen Feld voneinander getrennt. Die Ionenmobilität und somit die unterschiedlichen Driftgeschwindigkeiten hängen von Größe, Ladung und Form bzw. Struktur der Ionen ab. Es gibt verschiedene Arten der Ionenmobilitätsspektrometrie. Diese lassen sich wie in Abbildung 12 dargestellt in die zwei großen Bereiche der Hochfeld- und Niedrigfeldtechnologien unterteilen.

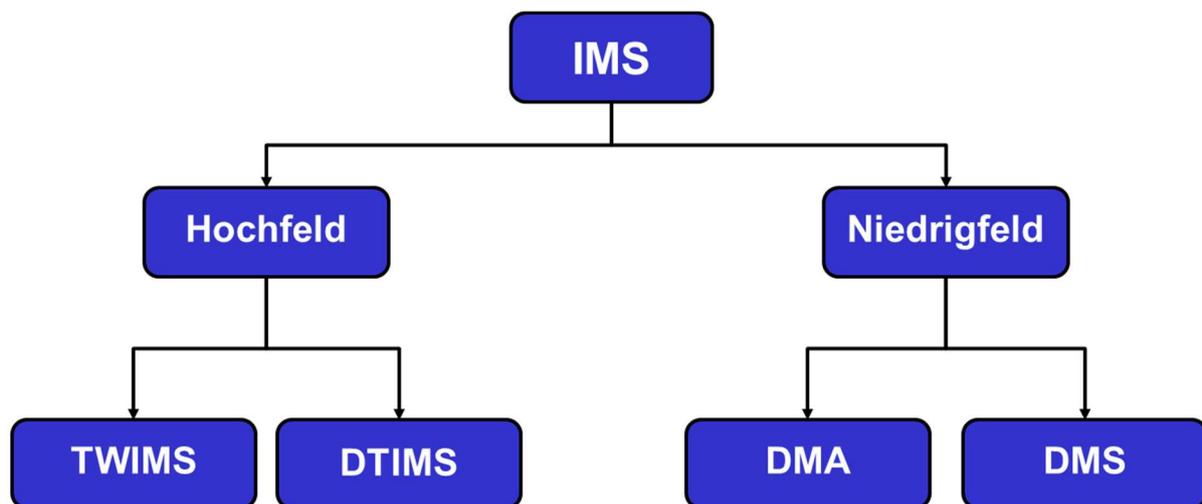


Abbildung 12: Taxonomie der IMS mit Einteilung der verwendeten IMS Systeme.

Die IMS wurde auf ihre Eignung zur Trennung der ausgewählten isobaren Substanzen untersucht. Hierbei wurden verschiedene technologische Ansätze berücksichtigt. Bei dem Differential Mobility Spectrometer (DMS) und dem Differential Mobility Analyzer (DMA) handelt es sich um Filtermethoden. Das Traveling-Wave IMS (TWIMS) und das Driftzeit Ionenmobilitätsspektrometer (DTIMS) entsprechen im Gegensatz dazu einer Trennmethode im eigentlichen Sinn, da alle Verbindungen, die in die TWIMS-Zelle bzw. Driftrohre geleitet werden, auch dem massenspektrometrischen Detektor zugeführt werden.

## 2.4.2 Systemkonfigurationen

### 2.4.2.1 Traveling Wave IMS (TWIMS)

Das SYNAPT G2-Si High (Waters, Milford, USA) war das TWIMS System. Dieses bestand aus der ZSpray™-Ionenquelle, dem StepWave-Gerät zur Eliminierung neutraler Moleküle, einem Quadrupol, der TriWave-Ionenmobilitäts-Trenneinheit und dem Flugzeit-Massenspektrometer QuantTOF. Der schematische Aufbau des TWIMS ist in Abbildung 13 dargestellt.

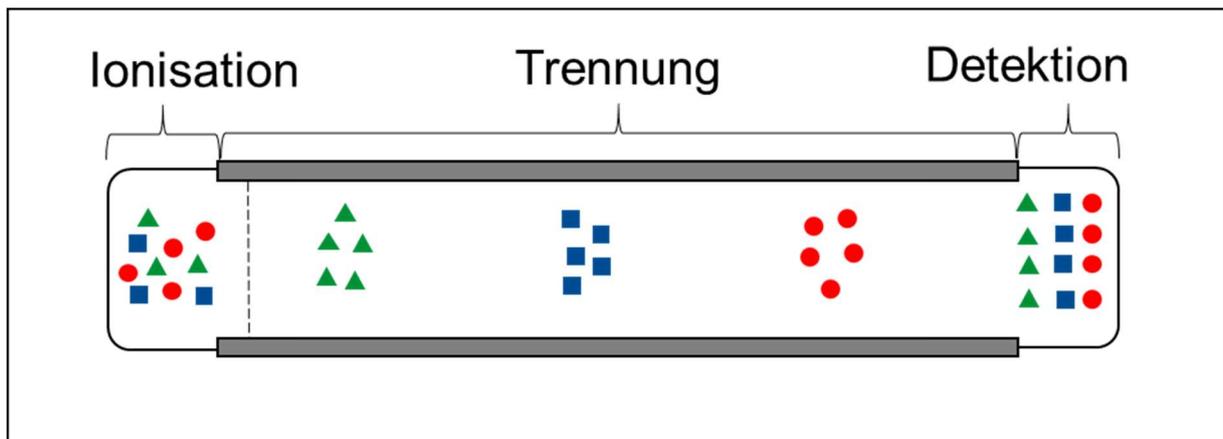


Abbildung 13: Schematischer Aufbau des Traveling Wave Ion Mobility Spectrometer (TWIMS).

Die Driftregion des TWIMS bestand aus einer Ionenführung mit aufeinanderfolgenden Ringelektroden, auf denen die Wellenspannung angelegt wurde. Durch Aufprall der wellenförmigen Spannungen werden die Ionen anschließend durch den gasgefüllten und bei leichtem Unterdruck gehaltenen Trennbereich beschleunigt. Diese Spannungen werden durch Pulsen an zwei benachbarten Ringelektroden erzeugt. Nach einer vordefinierten Verweilzeit wird das nächste Elektrodenpaar gepulst. Durch Beeinflussung der Geschwindigkeit und der Amplitude der TW kann eine Trennung durch Mobilität erreicht werden.

### 2.4.2.2 Differential Mobility Analyzer (DMA)

Der DMA wurde zur Identifizierung der Ionen mit einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer der Firma Sciex (Quad 3500) gekoppelt. Wenn möglich, wurde ein MRM für die jeweilige Substanz durchgeführt. Die Ionisierung wurde bei Umgebungstemperatur über eine ESI-Quelle erzielt. Der schematische Aufbau der DMA-Einheit ist in Abbildung 14 dargestellt.

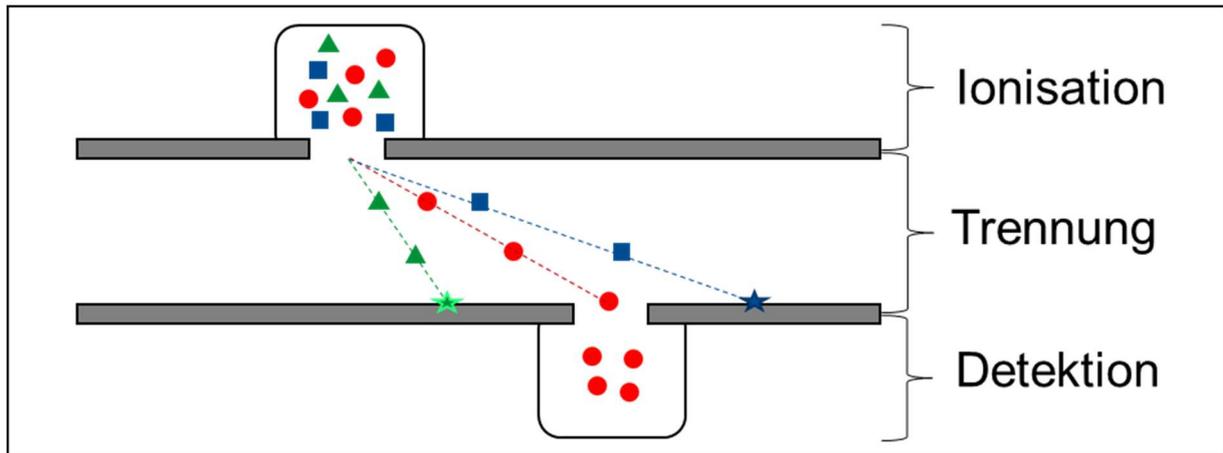


Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Differential Mobility Analyzer (DMA).

Beim DMA-System wird der Ionenstrahl orthogonal in ein Strömungsfeld gebracht und dispergiert. Das elektrische Feld zur Isolierung der Mobilitäten wird zwischen zwei parallel liegenden Elektroden angelegt. Der konstante Gasstrom wird durch ein Gebläse gewährleistet, welches hauptsächlich mit Luft, CO<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub> betrieben werden kann. Durch eine Erweiterung kann über das Gebläse ein Dopantgas eingespeist werden. Das DMA-System kann an ein Massenspektrometer gekoppelt werden und wird mit einer Atmosphärendruckquelle betrieben.

### 2.4.2.3 Differential Mobility Spectrometer (DMS)

Zusätzlich wurde das differentielle Ionenmobilitätsspektrometer (DMS) SelexION (Sciex, Dublin, USA) verwendet. Das DMS wurde zur Identifizierung der Ionen mit einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer der Firma Sciex (QTrap 6500) gekoppelt. Der Aufbau des DMS Systems ist in Abbildung 15 dargestellt.

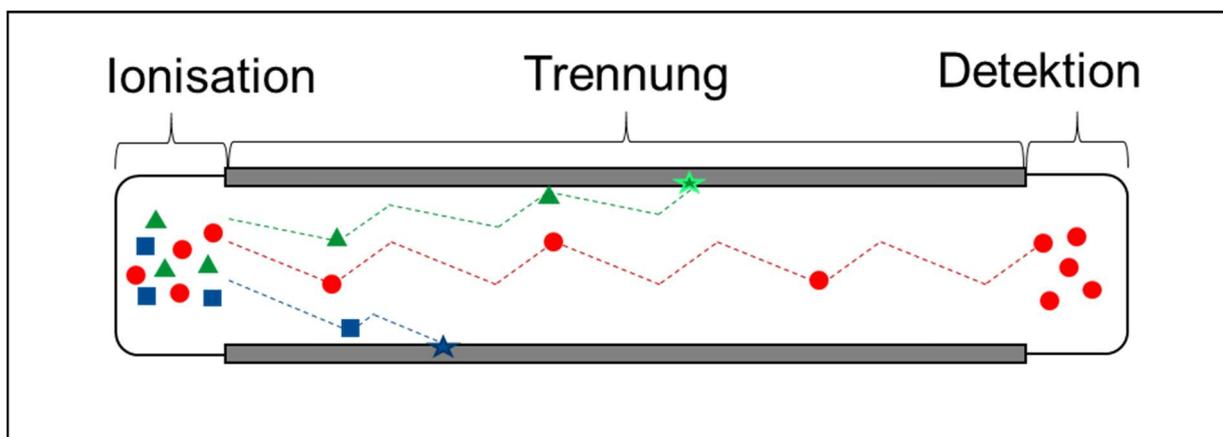


Abbildung 15: Schematischer Aufbau des Differential Mobility Spectrometer (DMS).

Das verwendete DMS arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie die asymmetrischen Ionenmobilitätsspektrometrie-Systeme (FAIMS). Die Trennfläche besteht aus zwei flachen parallelen Elektroden. Über diesen Elektroden werden hohe elektrische Wechselfelder, die als Dispersionsspannung (DV) bekannt sind, angelegt. Um stabile Trajektorien für diejenigen Ionen zu erreichen, die zum Massenanalysator geleitet werden sollen, muss eine Kompensationsspannung (CV, compensation voltage, auch COV) angelegt werden. Andernfalls würden die Ionen an den Elektroden entladen. Um große Feldstärken bei moderaten Spannungen zu erreichen, sind kleine Abstände zwischen den Elektroden erforderlich. Dies ermöglicht höhere Auflösungen, ohne einen elektrischen Funken zwischen beiden Elektroden zu verursachen. Die Ionen wandern mit dem Gasfluss senkrecht zu den elektrischen Feldern. Im Gegensatz zum TWIMS funktioniert das DMS wie auch das DMA als Ionenfilter. Durch seriell abtasten der CVs passieren nur Ionen mit übereinstimmender differentieller Mobilität die Driftfläche.

#### **2.4.2.4 Drift Tube Ion Mobility Spectrometer (DTIMS)**

Beim Agilent 6560 Q-TOF gelangen die Analyten nach der Ionisierung in einen *Front Funnel*, in dem sie fokussiert werden, und anschließend in einen *Trap Funnel*, an dessen Ende sich die *Trap*, bestehend aus Gittern am Eingang und am Ausgang, befindet. Von dort werden die Ionen in Paketen in die eigentliche Driftröhre mit einer Länge von 78 cm entlassen, in der ein konstantes elektrisches Feld und ein N<sub>2</sub>-Druck von 4 Torr eingestellt sind. Nach der Trennung in der IMS findet im *Rear Funnel* eine erneute Fokussierung des Ionenstrahls statt, der von da aus in einen Quadrupol Massenfilter und weiter in eine Kollisionszelle gelangt, so dass auch MS/MS Experimente durchgeführt werden können. Hinter der Kollisionszelle werden die Ionen von einem *Pusher* in die feldfreie Driftstrecke des TOF-Flugrohrs beschleunigt und gelangen nach weiterer Umlenkung durch einen Reflektor zum Detektor. Werden die Gitterspannungen der *Trap* niedrig gehalten und somit keine Ionen gesammelt, kann das Gerät im einfachen Q-TOF-Betrieb genutzt werden.

### **2.4.3 Bestimmung des Stoßquerschnitts (Collision Cross Section)**

#### **2.4.3.1 Einleitung**

Für die Interpretation der in Abschnitt 2.7.2 diskutierten Ergebnisse wurden die CCS-Werte von ca. 800 Verbindungen mittels Drift-Tube IMS experimentell ermittelt. Diese Messungen erfolgten mit dem in Abschnitt 2.4.2.4 beschriebenen System. Hierzu muss lediglich die Driftzeit bestimmt werden, wie anhand der in Gleichung 4 angegebenen Mason-Schamp-Beziehung deutlich wird.

$$\Omega = \frac{3ze}{16N_0} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{k_b T}} \cdot \sqrt{\frac{1}{m_B} + \frac{1}{m_A}} \cdot \frac{t_d E}{L} \cdot \frac{760 \text{ torr}}{p} \cdot \frac{T}{273,2 \text{ K}} \quad \text{Gl. 4}$$

In Gl. 4 ist  $z$  der Ladungszustand des Ions,  $e$  die elektrische Elementarladung,  $N_0$  die Dichte des Driftgases bei Standardbedingungen,  $k_b$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die Temperatur,  $\mu$  die reduzierte Masse und  $K_0$  die reduzierte Mobilität nach Gl. 5. Die reduzierte Masse berechnet sich aus der Masse des Driftgasmoleküls  $m_B$  und der Masse des Analytens  $m_A$  zu:

$$\mu = \frac{m_B \cdot m_A}{m_B + m_A} \quad \text{Gl. 5}$$

Da die gemessene Zeit jedoch der Zeit entspricht, die die Ionen vom Eingang der Driftröhre bis zum Auftreffen am Detektor benötigen und nicht der tatsächlichen Zeit zum Passieren der Driftröhre, muss eine zusätzliche Korrektur durchgeführt werden. Dies kann mittels der Gerätesoftware nach zwei Verfahren erfolgen: Entweder durch die Bestimmung und anschließende Subtraktion der Zeit, in der ein Ion die Ionenoptik hinter der Driftröhre passiert (Stepped-Field Methode) oder durch eine Kalibration des Systems mit bekannten Standards, die auf der Beziehung nach Mason-Schamp beruht (Single-Field Methode). Hierbei ist es nicht notwendig, dass die Standards eine ähnliche Struktur wie die der Target-Analyten aufweisen.

#### 2.4.3.2 Bestimmung des Stoßquerschnitts nach der Stepped-Field Methode

Die Bestimmung von CCS-Daten für den Aufbau einer Datenbank erfolgte aus Einzelstandards oder Standardgemischen nach der sogenannten Stepped-Field Methode. Dabei wird ein Analyt mehrfach (hier wenn nicht anders angegeben achtmal) in das HRMS-System injiziert und die Spannung am Eingang der Driftröhre  $V_1$  variiert, sodass sich unterschiedliche elektrische Feldstärken  $E$  ergeben.

$$E = \frac{\Delta V}{L} = \frac{V_1 - V_2}{L} \quad \text{Gl. 6}$$

Dabei ist  $\Delta V$  die Differenz der Spannungen am Eingang ( $V_1$ ) und am Ausgang ( $V_2$ ) der Driftröhre und  $L$  die Länge der Driftröhre. Für jede Messung wird zunächst für ein Ion mit bestimmtem  $m/z$ -Verhältnis die Gesamtdriftzeit  $t_{ges}$  ermittelt. Diese setzt sich zusammen aus der tatsächlichen Driftzeit  $t_d$ , die das Ion benötigt, um die Driftröhre zu passieren, und der Zeit  $t_0$ , in der das Ion durch die weitere Optik des Instruments bis zum Detektor gelangt:

$$t_{ges} = t_d + t_0$$

Gl. 7

Aus Messungen bei mindestens zwei verschiedenen elektrischen Feldstärken kann  $t_0$  bestimmt werden, indem  $t_{ges}$  gegen  $1/\Delta V$  aufgetragen wird [33]. Bei unendlich großer Driftspannung geht  $1/\Delta V$  gegen Null und  $t_d$  wird unendlich klein, sodass der y-Achsenabschnitt der Geraden  $t_0$  entspricht (s. Beispiel in Abbildung 16). Nach Umstellen von Gl. 3 wird für jede Messung die tatsächliche Driftzeit  $t_d$  als Differenz zwischen  $t_{ges}$  und  $t_0$  berechnet. Durch Einsetzen von  $t_d$  und  $E$  sowie der anderen, während der Messung konstanten Parameter wie Druck und Temperatur in die Mason-Schamp Gleichung wird anschließend der CCS-Wert aus der Einzelinjektion berechnet. Dabei muss zusätzlich ein täglich über eine bekannte Referenzsubstanz ermittelter Faktor für die Druckkorrektur (*pressure calibration factor*) einbezogen werden.

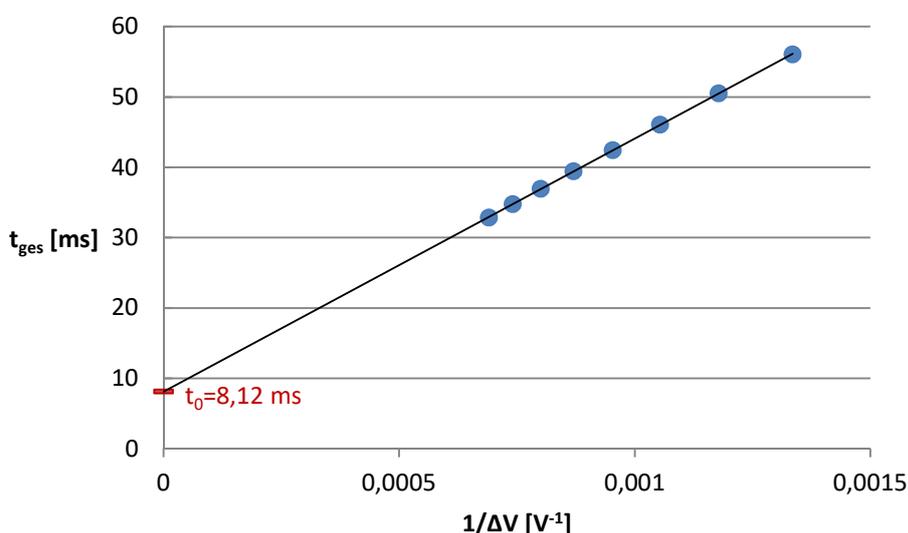


Abbildung 16: Plot von  $t_{ges}$  gegen  $1/\Delta V$  für ein Ion mit  $m/z$  22,0107;  $t_0$  ergibt sich aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden.

Der CCS-Wert ( $\Omega$ ) wird als Mittelwert mit Standardabweichung aus diesen Mehrfachbestimmungen angegeben. Da ausschließlich Stickstoff als Driftgas verwendet wurde, beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, alle mit  $\Omega$  abgekürzten CCS-Werte auf die Verwendung von Stickstoff ( $\Omega_{N_2}$ ).

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurde als Standardsubstanz Colchicin (Strukturformel s. Abbildung 17) ausgewählt, dessen Collision Cross Section bereits bekannt ist [34].

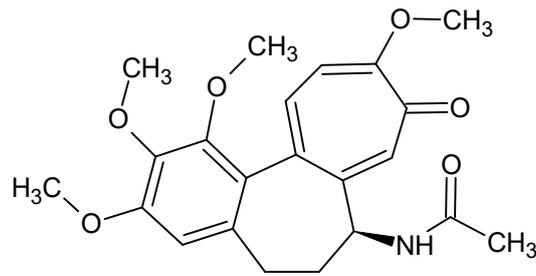


Abbildung 17: Strukturformel von Colchicin.

Für die Messung bei acht verschiedenen Feldstärken wurde in Abständen von einer Minute je 1  $\mu\text{L}$  von einer Standardlösung mittels des Autosamplers der HPLC (jedoch ohne Chromatographiesäule) injiziert. Die Spannung am Eingang der Driftrohre (im Weiteren kurz als „Driftspannung“ bezeichnet) wurde dabei innerhalb von 8 Minuten zwischen 1000 V und 1700 V in Stufen von 100 V (je eine Minute lange Zeitsegmente) variiert. Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde der CCS-Wert sowohl für das  $[\text{M}+\text{H}]^+$ - als auch für das  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Addukt von Colchicin insgesamt zehnmal an verschiedenen Tagen gemessen. Als Mittelwert aus den zehn Messungen ergab sich  $\Omega = 196,8 \text{ \AA}^2$  für das  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Addukt mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von 0,14 % und für das Natriumaddukt  $\Omega = 202,4 \text{ \AA}^2$  mit einer RSD von 0,14 %. Die geringen relativen Standardabweichungen belegen die gute Reproduzierbarkeit der CCS-Wert-Bestimmung von Tag zu Tag. Die Verteilung der gemessenen Werte für das  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Addukt von Colchicin ist in Abbildung 18 dargestellt. Eingezeichnet sind zudem der Mittelwert in blau und die Grenzen von  $\pm 0,5 \%$  und  $\pm 1,0 \%$  um den Mittelwert als gelbe bzw. rote Linien. Der Hersteller gibt dazu an, dass CCS-Werte mit einer Genauigkeit von etwa 1 % bestimmt werden können [35]. Es ist zu erkennen, dass alle Werte innerhalb des Bereiches von  $\pm 0,5 \%$  liegen. Das Verfahren weist somit eine gute Präzision auf und ist vergleichbar mit den Ergebnissen in [36], die mit dem gleichen System erzielt wurden. Auf Grundlage dieser Daten wurde eine Kontrollkarte erstellt.

Colchicin wurde an jedem weiteren Messtag als Referenzstandard zur Überprüfung des Systems mit bestimmt und in diese Kontrollkarte eingetragen. Bei der späteren Anwendung der Demonstrations-Datenbank zur Identifizierung unbekannter Substanzen kann eine Abweichung von maximal  $\Delta\Omega = \pm 1 \%$  angenommen werden.

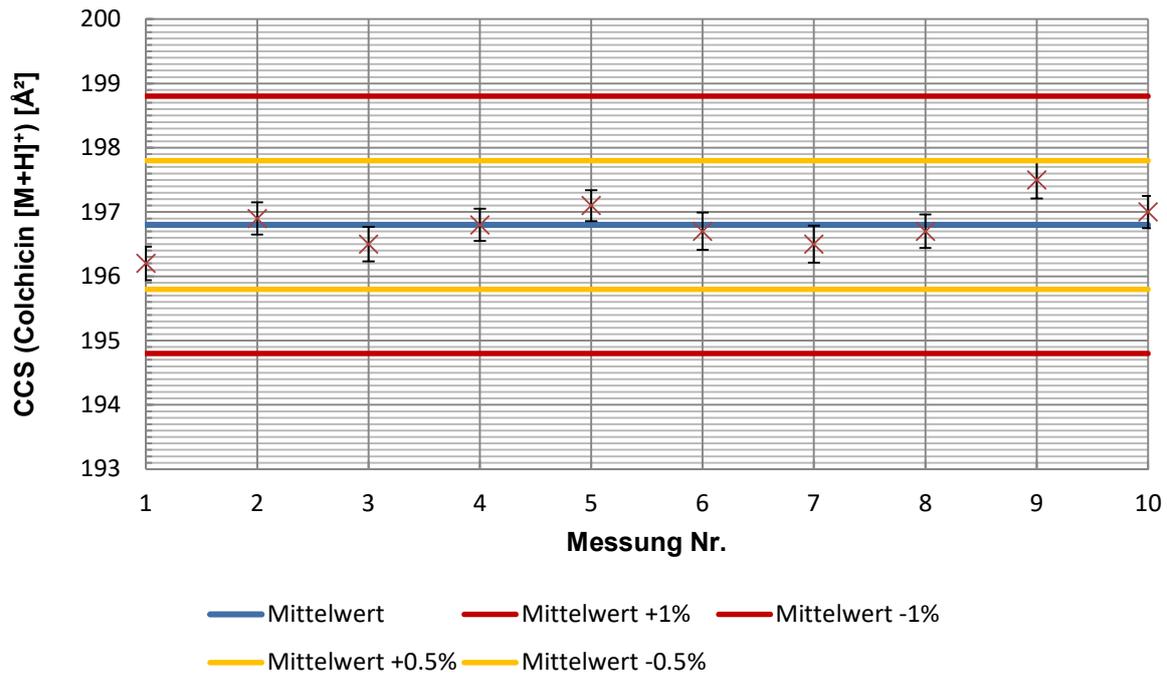


Abbildung 18: CCS-Werte für das [M+H]<sup>+</sup>-Addukt von Colchicin aus zehn unabhängigen Messungen.

Da wie oben erwähnt für die Ermittlung der CCS-Werte nach der Stepped-Field Methode theoretisch Messungen bei zwei verschiedenen elektrischen Feldstärken ausreichen würden, wird im Folgenden die Anwendung von unterschiedlichen Kombinationen an Driftspannungen diskutiert, um die Akquisitionszeit zu verkürzen. Dafür wurde wieder Colchicin als Standardsubstanz verwendet und zunächst bei acht verschiedenen Driftspannungen gemessen. Variiert wurde dabei die Spannung am Eingang der Driftröhre zwischen 1000 V und 1700 V in 100 V Schritten. Zur Auswertung wurden anschließend Kombinationen aus zwei oder drei Driftspannungen herangezogen. Die so berechneten CCS-Werte werden in Tabelle 4 mit dem bereits bestimmten Mittelwert aus 10 gesonderten CCS-Wert-Bestimmungen von Colchicin, die jeweils über acht Driftspannungen durchgeführt wurden ( $\Omega = 196,8 \text{ \AA}^2$ ), und einem Literaturwert ( $\Omega = 196,2 \text{ \AA}^2$ ) verglichen.

Tabelle 4: Vergleich der CCS-Werte ( $\Omega$ ) von Colchicin berechnet nach der Stepped-Field Methode über verschiedene Kombinationen an Driftspannungen und Vergleich mit der Literatur.

| Kombi-<br>nation | Drift-<br>spannung (V) | $\Omega$<br>( $\text{\AA}^2$ ) | SD<br>( $\text{\AA}^2$ ) | $\Delta$ ( $\Omega$ aus 8 Drift-<br>spannungen)<br>(%) | $\Delta$ ( $\Omega$ Lit.)<br>(%) |
|------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|--|----------------------------------|
| 1                | 1000,1100,1200         | 194,2                          | 0,06                     | 1,3  | 1,0                              |
| 2                | 1300,1400,1500         | 197,8                          | 0,07                     | -0,5   | -0,8                             |
| 3                | 1500,1600,1700         | 199,8                          | 0,03                     | -1,5   | -1,8                             |
| 4                | 1000,1400,1700         | 196,3                          | 0,39                     | 0,3  | -0,1                             |
| 5                | 1000,1300,1700         | 196,4                          | 0,37                     | 0,2  | -0,1                             |
| 6                | 1100,1400,1700         | 197,4                          | 0,27                     | -0,3   | -0,6                             |
| 7                | 1000,1100              | 193,5                          |                          | 1,7  | 1,4                              |
| 8                | 1200,1300              | 197,2                          |                          | -0,2   | -0,5                             |
| 9                | 1400,1500              | 199,4                          |                          | -1,3   | -1,6                             |
| 10               | 1600,1700              | 199,1                          |                          | -1,2   | -1,5                             |
| 11               | 1000,1700              | 196,5                          |                          | 0,2  | -0,2                             |
| 12               | 1000,1200              | 194,3                          |                          | 1,3  | 1,0                              |
| 13               | 1500,1700              | 199,8                          |                          | -1,5   | -1,8                             |
| 14               | 1300,1400              | 196,6                          |                          | 0,1  | -0,2                             |

Aus den in Tabelle 4 aufgeführten Daten geht hervor, dass die Abweichungen größer sind, wenn die Driftspannungen relativ nah beieinander und eher am Rand des gesamten Bereiches liegen. So betragen die Abweichungen vom CCS-Wert der achtfachen Bestimmung immer mehr als -1 %, wenn Kombinationen aus zwei oder drei Driftspannungen ausschließlich im hohen (1500 V bis 1700 V) Bereich verwendet werden oder mehr als +1 % bei Kombinationen im niedrigen Bereich (1000 V bis 1200 V). Liegen die Spannungen dagegen im mittleren Bereich (1200 V bis 1400 V), werden Abweichungen unter 1 % erreicht.

Die Gründe für diese Abweichungen liegen in der Störung der Driftspannung durch die elektrischen Felder des *Trap Funnel*s und des *Rear Funnel*s am Anfang bzw. am Ende der Driftröhre. Deshalb wurden in einer späteren Firmwareversion diese Einflüsse korrigiert, wodurch die Genauigkeit der CCS-Wert-Bestimmung nochmals verbessert werden konnte. Die Ergebnisse mit den insgesamt geringsten Abweichungen werden erhalten, wenn Driftspannungen aus dem hohen und dem niedrigen Bereich kombiniert werden, sodass ein möglichst großer Bereich aufgespannt wird. Aufgrund dieser Beobachtungen und um für die in der CCS-Demonstrations-Datenbank abgelegten Werte eine höhere Genauigkeit zu erzielen, wurden für alle weiteren Messungen mit der Stepped-Field Methode trotz der etwas längeren Akquisitionszeit immer acht Driftspannungen zwischen 1000 V und 1700 V verwendet. Die CCS-Wert-Bestimmung von bisher mehr als 800 Substanzen erfolgte aus Einzelstan-

dards oder Gemischen analog zu dem oben für Colchicin beschriebenen Verfahren, wobei jeweils im positiven und im negativen ESI Modus alle beobachteten Addukte ausgewertet wurden. Einen Überblick über die Vergleichbarkeit der mit diesem System ermittelten CCS-Werte mit anderen bereits in der Literatur veröffentlichten Daten gibt Tabelle 5. Alle Abweichungen sind geringer als 1 %.

Tabelle 5: Ermittelte CCS-Werte für ausgewählte Substanzen und Vergleich mit Literaturwerten.

| Substanz      | Addukt          | $\Omega$ (Å <sup>2</sup> ) | s (Å <sup>2</sup> ) | $\Omega$ (Literatur)<br>(Å <sup>2</sup> ) | Abweichung<br>(%) |
|---------------|-----------------|----------------------------|---------------------|---|-------------------|
| Fructose      | Na <sup>+</sup> | 142,3                      | 0,18                | 143,4                                     | - 0,8             |
| Sorbitol      | Na <sup>+</sup> | 143,0                      | 0,16                | 142,7                                     | + 0,2             |
| Phenylalanin  | H <sup>+</sup>  | 142,2                      | 0,15                | 140,9                                     | + 0,9             |
| Colchicin     | H <sup>+</sup>  | 196,3                      | 0,27                | 196,2                                     | + 0,1             |
| Verapamil     | H <sup>+</sup>  | 209,1                      | 0,23                | 210,0                                     | + 0,4             |
| Omethoat      | H <sup>+</sup>  | 136,6                      | 0,17                | 136,8                                     | - 0,1             |
| Acephat       | Na <sup>+</sup> | 141,3                      | 0,18                | 140,4                                     | + 0,6             |
| Palmitinsäure | H <sup>+</sup>  | 171,3                      | 0,17                | 170                                       | + 0,8             |
| Stearinsäure  | H <sup>+</sup>  | 179,2                      | 0,34                | 178                                       | + 0,7             |

#### 2.4.3.3 Bestimmung des Stoßquerschnitts nach der Single-Field Methode

Da die Messung und Auswertung nach der Stepped-Field Methode durch die Einstellung mehrerer Feldstärken relativ aufwendig ist und bei der Analyse von Realproben vor allem bei einer längeren chromatografischen Trennung sehr viel Zeit in Anspruch nehmen würde, sollte die Eignung der Single-Field Methode zur Berechnung der CCS-Werte direkt aus der Driftzeit bei einer einzigen elektrischen Feldstärke implementiert werden. Bei dieser Methode erfolgt vor der eigentlichen Messung eine Kalibration mit einem bekannten Tunemix. Dieser Mix muss unter den exakt gleichen Bedingungen (elektrische Feldstärke, Druck, Ionenquellenparameter) wie die anschließend zu messende Probe injiziert werden. Aus den so erhaltenen Driftzeiten und den bekannten CCS-Werten und Massen der im Tunemix enthaltenen Substanzen ergibt sich eine Gerade, die gemäß Kurulugama et. al. direkt aus der Mason-Schamp Gleichung hergeleitet werden kann [37]:

$$t_{ges} = \gamma\beta\Omega + t_{Fix} \quad \text{Gl. 8}$$

Dabei ist  $t_{ges}$  die gemessene Driftzeit und  $\beta$  ist ein geräteunabhängiger Proportionalitätskoeffizient, der vom Druck, dem elektrischen Feld und Einstellungen der Ionenoptik abhängt.  $\gamma$  ist ein modifizierter Koeffizient für die reduzierte Masse und  $t_{Fix}$  ist ein mobilitätsunabhängiger Beitrag zur Flugzeit außerhalb der Driftröhre [34], der sich nur aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden, wie in Abbildung 19 gezeigt, als ein Wert nahe Null ergibt.

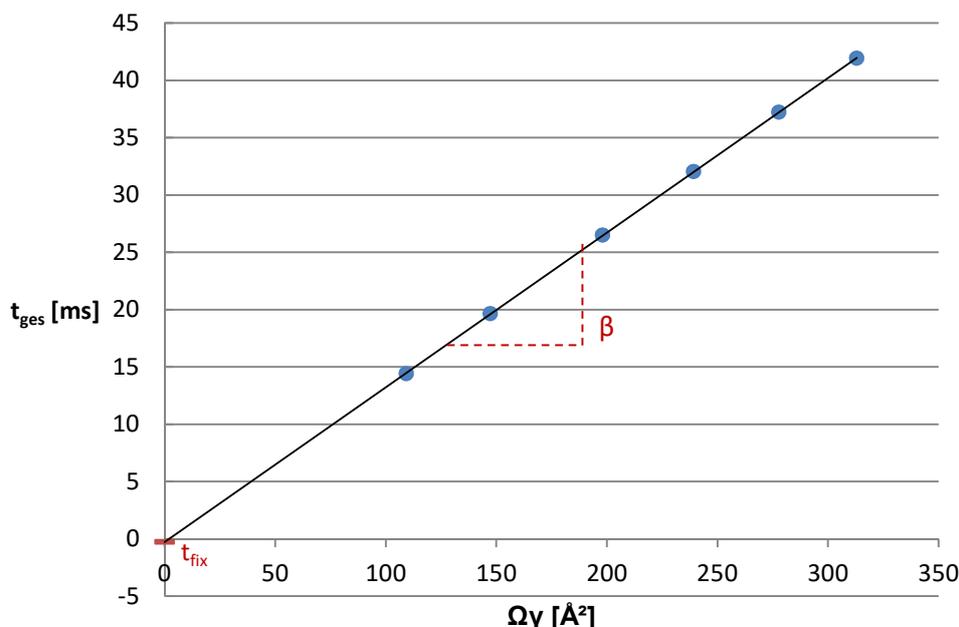


Abbildung 19: Kalibrationsgerade für CCS-Messungen nach der Single-Field Methode.  $\beta$  wird aus der Steigung und  $t_{Fix}$  aus dem y-Achsenabschnitt der Geraden bestimmt.

Der Koeffizient  $\gamma$  kann für jedes Ion berechnet werden als:

$$\gamma = \frac{1}{z} \sqrt{\frac{m_A}{m_A + m_B}} \quad \text{Gl. 9}$$

Die Parameter  $\beta$  und  $t_{Fix}$  werden anhand der Kalibration, wie in Abbildung 19 zu erkennen, aus der Steigung bzw. dem y-Achsenabschnitt bestimmt. Nach der Messung einer Probe unter gleichen Bedingungen kann durch Einsetzen von  $\gamma$  und der Driftzeit  $t_{ges}$  eines Analytens in Gl. 8 und Auflösen nach  $\Omega$  dessen CCS-Wert berechnet werden. Da die Geradengleichung in direktem Zusammenhang zur Mason-Schamp-Gleichung steht, handelt es sich bei dieser Art der Kalibration, anders als bei Messungen mit TWIMS, um eine substanzunabhängige Kalibration.

### 2.4.3.4 Vergleichbarkeit von Stepped-Field und Single-Field Methode

Zum Vergleich der beiden Methoden sind in Abbildung 20 für eine Auswahl an Standards die ermittelten CCS-Werte nach der Stepped-Field und der Single-Field Methode gegenübergestellt. Die Werte für die Stepped-Field Methode wurden für acht verschiedene Driftspannungen zwischen 1000 V und 1700 V ermittelt. Die Single-Field Methode wurde für eine Messung bei einer Driftspannung von 1700 V, bei der laut Gerätehersteller die beste Auflösung erzielt wird, nach entsprechender Kalibration, durchgeführt. Die in Abbildung 20 aufgeführten Daten belegen, dass die nach beiden Methoden erzielten Werte sehr gut vergleichbar sind. Die berechneten Abweichungen lagen bei maximal 0,4 % und liegen damit im Rahmen der erreichbaren Präzision.

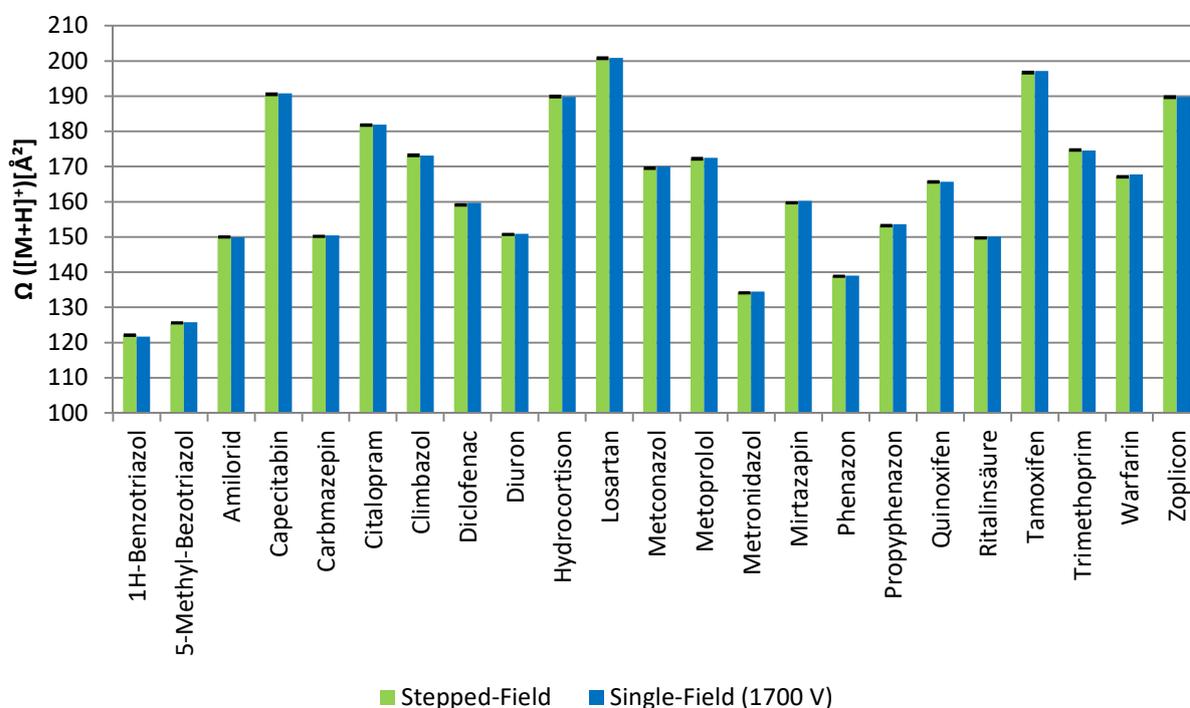


Abbildung 20: Vergleich der CCS-Werte für ausgewählte Standards nach der Stepped-Field Methode (Mittelwert aus acht CCS-Werten mit Fehlerbalken) und der Single-Field Methode (Einfachbestimmung).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für weitere Messungen von Standards zum Aufbau der CCS-Demonstrations-Datenbank zur Erzielung einer höheren Präzision die Stepped-Field Methode mit acht verschiedenen elektrischen Feldstärken eingesetzt, die bei Einzelstandards oder einfachen Standardgemischen ohne chromatografische Trennung in nur acht Minuten je Probe durchgeführt werden kann. Für die Analyse von Realproben mittels chromatografischer Trennung und mit längerer Laufzeit wurde dagegen, da eine Vergleichbarkeit wie oben gezeigt gegeben ist, die Single-Field Methode mit 1700 V als Driftspannung angewendet.

Die Vergleichbarkeit von CCS-Werten für kleine Moleküle, bestimmt durch TWIMS-MS und DTIMS-MS, wurde untersucht, um die Möglichkeit einer geräteunabhängigen CCS-Datenbank zu evaluieren. Eine gute Korrelation wurde zwischen den beiden Gerätetypen für  $[M+H]^+$ -Ionen und  $[M+Na]^+$ -Ionen gefunden. Die mittleren absoluten Prozentfehler betragen 1,0 % für  $[M+H]^+$ - und 1,1 % für  $[M+Na]^+$ -Ionen. Abweichungen von bis zu 6,2 % der gemessenen CCS-Werte zeigten jedoch, dass eine Vergleichbarkeit der mit beiden Geräten bestimmten CCS-Werte nicht in allen Fällen besteht. Dennoch können die CCS-Werte wechselseitig verwendet werden, um eindeutig falsche Zuordnungen während der Identifikation von Unbekannten auszuschließen. Beim Erstellen einer Datenbank sollte daher immer angegeben werden, welcher Gerätetyp für die CCS-Wert-Bestimmung verwendet wurde. Dies sollte auch bei der Verwendung einer CCS-Datenbank berücksichtigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Intensitätsverteilungen von Protomeren in den Driftspektren abhängig sind von dem verwendeten Lösungsmittel, wenn Elektrosprayionisation angewendet wird. Drastisch unterschiedliche flüssigkeitschromatografische Bedingungen können unterschiedliche Protonierungsstellen bevorzugen. Daher müssen die experimentellen Einstellungen sowie mehrere detektierte Ionenmobilitätssignale für eine Verbindung beim Erstellen von CCS-Datenbanken angegeben werden.

#### **2.4.3.5 Aufbau der CCS-Demonstrations-Datenbank**

Während der Laufzeit des Projektes wurden die CCS-Werte von über 800 Substanzen unterschiedlicher Klassen bestimmt. Diese wurden in einer Demonstrations-Datenbank zusammengefasst, die die Identifizierung von Komponenten in Realproben über deren exakte Masse und den CCS-Wert erlaubt. Die Datenbank enthält für jede analysierte Substanz Informationen zu IUPAC-Namen, Trivialnamen, Summenformel, CAS-Nummer, exakter Masse sowie die CCS-Werte aller möglichen Addukte inklusive Standardabweichung, die im positiven und im negativen ESI Modus bestimmt werden konnten. Dabei werden folgende Addukte in Betracht gezogen:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  und  $[M+2H]^{2+}$  im ESI-positiv Modus sowie  $[M]^{++}$ ,  $[M-H]^-$ ,  $[M+Cl]^-$  und  $[M+HCOO]^-$  im ESI-negativ Modus. Das entsprechende  $m/z$ -Verhältnis der einzelnen Adduktionen wird aus der exakten Masse direkt in der Software berechnet und ebenfalls hinterlegt. Nach einzelnen Einträgen kann in der Datenbank über das  $m/z$ -Verhältnis, die CAS-Nummer oder den Substanznamen gesucht werden. Für die Suche nach einzelnen, unbekanntem Substanzen kann die Datenbank nach dem  $m/z$ -Verhältnis und dem CCS-Wert eines beobachteten Ions durchsucht werden. Als Ergebnis werden nur diejenigen Datenbankinträge ausgegeben, bei denen sowohl das Masse-zu-Ladungsverhältnis als auch der CCS-Wert in einem wählbaren Toleranzbereich ( $\pm \Delta m/z$  (ppm) und  $\pm \Delta \Omega$  (%)) mit den gesuchten Werten übereinstimmen. Um die Datenbank nach mehreren Komponenten gleichzeitig zu durchsuchen kann eine Liste im \*.csv-Format, die unter ande-

rem Werte für  $m/z$  und CCS enthält, in die Software importiert werden. Diese Liste kann zum Beispiel bei der Non-Target Analyse komplexer Proben durch Extrahieren sogenannter Features erstellt werden. Die Datenbank wird für alle Einträge der Liste nach der Kombination aus  $m/z$  und CCS in einem definierten Toleranzbereich durchsucht. Die Ergebnisse dieser Suche werden in einer Tabelle, wie in Abbildung 21 exemplarisch gezeigt, als „Identified Features“ mit der jeweiligen Abweichung zum Datenbankeintrag angezeigt. Diese Tabelle kann zur weiteren Bearbeitung wieder als \*.csv-Datei exportiert werden.

The screenshot shows the 'CCS - Database by AAC' software interface. The 'Feature identification' section on the left shows search parameters: delta m/z (ppm) set to 5, delta cca (%) set to 1, and Search Mode set to 'pos'. The 'Imported features' count is 100. The 'Identified features' section on the right shows 58 results. Below are two tables representing the data shown in the interface.

| feature nr | RT    | DT    | m/z      | Abund   | Omega (A°) |
|------------|-------|-------|----------|---------|------------|
| 1          | 7.333 | 19.99 | 375.261  | 3915717 | 154.6      |
| 2          | 7.327 | 20.61 | 264.1947 | 2979844 | 161.6      |
| 3          | 7.338 | 21.97 | 278.2105 | 2931009 | 171.7      |
| 4          | 7.345 | 19.44 | 231.1488 | 2794204 | 153.6      |
| 5          | 7.384 | 23.44 | 325.1699 | 2256862 | 181.9      |
| 6          | 7.339 | 24.35 | 326.2319 | 1835782 | 188.8      |
| 7          | 7.322 | 24.35 | 377.2063 | 1763801 | 187.8      |
| 8          | 7.332 | 19.99 | 375.7625 | 1751919 | 154.6      |

| Feature Nr | m/z      | $\Delta m/z$ (ppm) | Adduct | CCS (A°) | $\Delta$ CCS (%) | Formula    | Exact Mass (Da) | Name                       | Trivialname    |
|------------|----------|--------------------|--------|----------|------------------|------------|-----------------|----------------------------|----------------|
| 2          | 264.1958 | 4.1635...          | H+     | 161.1    | -0.30...         | C16H25NO2  | 263.1885        | (1R,2R)-2-(dimethylam...   | Tramadol       |
| 3          | 278.2115 | 3.5944...          | H+     | 171.4    | -0.17...         | C17H27NO2  | 277.2042        | 1-[2-(dimethylamino)-1-... | Verifastine    |
| 4          | 231.1492 | 1.7304...          | H+     | 153.2    | -0.26...         | C14H18N2O  | 230.1419        | 4-Isopropyl-1,5-dimeth...  | Propyphenazone |
| 5          | 325.1711 | 3.6903...          | H+     | 181.8    | -0.05...         | C20H21FN2O | 324.1638        | 1-[3-(dimethylamino)pr...  | Citalopram     |
| 6          | 326.2326 | 2.1457...          | H+     | 187.8    | -0.52...         | C18H31NO4  | 325.2253        | 1-[4-(2-Isopropoxyeth...   | Bisoprolol     |
| 7          | 377.2073 | 2.6510...          | H+     | 187.6    | -0.10...         | C20H28N2O5 | 376.2000        | (2S)-1-[(2S)-2-[(2S)-1-... | Enalapril      |
| 9          | 372.2322 | 4.0297...          | H+     | 196.7    | -0.20...         | C26H29NO   | 371.2249        | 2-[4-(Z)-1,2-diphenylb...  | Tamoxifen      |
| 10         | 268.1907 | 3.3558...          | H+     | 172.2    | -0.17...         | C15H25NO3  | 267.1834        | 1-(Isopropylamino)-3-14... | Metoprolol     |

Abbildung 21: Ansicht der CCS-Demonstrations-Datenbanksoftware mit importierter Feature Liste („feature identification list“; links) und Ergebnissen der Datenbanksuche („identified features“; rechts) bei einer Toleranz von  $\Delta m/z = \pm 5$  ppm und  $\Delta \Omega = \pm 1$  %.

## 2.4.4 Experimentelle Durchführung

Für alle IMS-Systeme wurde zur Untersuchung der Trennung der Isobarenpaare das Probengemisch 1 (siehe Tabelle 1) direkt eingebracht, ohne eine vorherige chromatografische Trennung durchzuführen. Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten wurden Mix 1, 2 und 3 gemessen.

### 2.4.4.1 Traveling Wave IMS (TWIMS)

Die Hauptparameter für die Messungen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Weitere Parameter befinden sich im Anhang in Kapitel 8.4.1.

Tabelle 6: Methodenparameter der TWIMS-Messung.

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| Ionisation           | ESI positiv     |
| Quellen Temperatur   | 120°C           |
| Modifier             | kein Modifier   |
| Angelegte Spannung   | 3200 V          |
| Start Rampenspannung | 800 m/s         |
| Ende Rampenspannung  | 200 m/s         |
| Driftgas             | CO <sub>2</sub> |

Für die Prozessierung der Daten wurde der interne ADC Mode Algorithmus verwendet. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Parameter des ADC Algorithmus.

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| ADC Trigger Threshold (V)    | 1 V      |
| ADC Input Offset (V)         | - 1,38 V |
| Average Single Ion Intensity | 42       |
| ADC Amplitude Threshold      | 3        |
| ADC Centroid Threshold       | - 1      |
| ADC Ion Area Threshold       | 3        |
| ADC Ion Area Offset          | 10       |
| ADC Pushes Per IMS Increment | 1        |
| EDC Delay Coefficient        | 1,33     |
| EDC Delay Offset             | 0,4      |

#### 2.4.4.2 DMA

In Tabelle 8 sind die Methodenparameter für die DMA-Messungen aufgeführt.

Tabelle 8: Methodenparameter der DMA-Messung.

|                    |                               |
|--------------------|-------------------------------|
| Ionisation         | ESI positiv                   |
| DMS Temperatur     | Umgebungstemperatur           |
| Modifier           | Acetonitril / kein Modifier   |
| Angelegte Spannung | 3200 V                        |
| Ablenkspannung     | 0 bis 6000 V (10 V Schritten) |
| Gebläseinstellung  | 15000 Umdrehungen / min       |

Die Starteinstellung der Ablenkspannung betrug 0 V und wurde in 10 V Schritten auf 6000 V erhöht. Der N<sub>2</sub>-Gasstrom wurde über die Gebläseeinheit gesteuert, dazu wurde das Rotorblatt auf 15000 Umdrehungen pro Minute eingestellt. Durch einen Einlass an dieser Einheit konnte ein Dopantgas eingespeist werden. Aufgrund der Erfahrung des Herstellers wurde Acetonitril verwendet. Die Endkonzentration im Volumengasstrom wurde auf 2 % eingestellt. Für die Signalidentifizierung wurden anschließend die Mixe 2 – 4 aus Tabelle 1 gemessen. Nach dem Passieren der DMA-Zelle wurden die Ionen im Triple Quad 3500 anhand der entsprechenden MRM-Übergänge aufgezeichnet.

#### 2.4.4.3 DMS

In Tabelle 9 sind die Methodenparameter der DMS-Messungen aufgeführt.

Tabelle 9: Methodenparameter der DMS-Messung.

|                            |                                  |
|----------------------------|----------------------------------|
| Ionisation                 | ESI positiv                      |
| DMS Temperatur             | Medium (225 °C)                  |
| Modifier                   | Isopropanol / kein Modifier      |
| Separation Voltage         | 3500 V                           |
| Compensation Voltage       | -100 bis +100 V (0,1 V Schritte) |
| DMS Resolution Enhancement | Off                              |

Die Starteinstellung der Compensation Voltage betrug 0 V. Für die Korrektur der Flugbahnen der einzelnen Ionen wurde die Compensation Voltage in einem Bereich von -100 V bis +100 V abgescannt. Über die Einstellung Resolution Enhancement kann ein Drosselgas in die Zelle eingeführt werden, um eine längere Verweilzeit der Ionen in der Zelle zu erzeugen. Zur Untersuchung der möglichen Trennung von Isobaren wurde Mix 1 (siehe Tabelle 1) in das DMS-QTrap System ohne vorherige HPLC-Trennung injiziert. Um anschließend identifizieren zu können, welches Signal zu welcher Komponente gehört, wurden die Mixe 2 – 4 (siehe Tabelle 1) gemessen. Nach dem Passieren der DMS Zelle wurden die Ionen im Triple-Quadrupol Massenspektrometer detektiert. Es wurde ein Q1-Scan mit einer Scan-Rate von 1000 Da/sec durchgeführt. Der erste Quadrupol dient in diesem Fall als Filter für die einzelnen Massen, die anderen beiden Quadrupole haben keine Funktion.

Weitere Parameter der MS-Methode befinden sich im Anhang in Kapitel 8.4.2. Um den Einfluss eines Modifiers zu überprüfen, wurden die Messungen unter Zugabe von Isopropanol wiederholt.

#### 2.4.4.4 Agilent

Tabelle 10 fasst die Methodenparameter für das Drift-Tube-IMS zusammen. Es wurde ausschließlich Stickstoff als Driftgas eingesetzt, da die bisherige Ventilausstattung des Gerätes keine zuverlässige Analyse mit anderen Driftgasen zulässt.

Tabelle 10: Methodenparameter des Drift Tube IMS.

|                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| ESI Modus           | Positiv                |
| Gastemperatur       | 200 °C                 |
| Gasfluss            | 5 L min <sup>-1</sup>  |
| Nebulizer           | 20 psig                |
| Sheathgastemperatur | 325 °C                 |
| Sheathgasfluss      | 12 L min <sup>-1</sup> |
| Nozzle Voltage      | 500 V                  |
| VCap                | 5000 V                 |
| Trap fill time      | 30000 µs               |
| Trap release time   | 150 µs                 |
| Driftspannung       | 1700 V                 |
| Driftgas            | Stickstoff (3,95 torr) |
| Max. Driftzeit      | 50 ms                  |
| Massenbereich       | 50 – 1700 Da           |

#### 2.4.5 Ergebnisse und Diskussion

Aus der im Driftspektrum enthaltenen Driftzeit  $t_d$  und der Peakbreite auf halber Höhe  $w_h$  wurde für jedes Isobarenpaar die Auflösung R zwischen zwei Peaks analog zur Chromatografie berechnet. Hierzu werden die Retentionszeiten in Gl. 3 durch die Driftzeiten substituiert. Tabelle 11 fasst die Daten für die Bestimmung der Auflösungen für alle vier IMS-Systeme zusammen.

Tabelle 11: Überblick über die IMS-Auflösungen. DMS-Daten für die Messungen mit 2-Propanol. DMA-Daten gesammelt mit 15.000 U min<sup>-1</sup> und ohne den Zusatz von Dopantgasen. Grüne Felder bedeuten, dass eine Auflösung > 1,5 erzielt wird (Basislinientrennung); rot-orangene Felder bedeuten, dass eine Auflösung < 1,5 erzielt wird. n. d.: nicht detektierbar.

| Paar Nr. | Substanz   | TWIMS             | DMS               | DMA               | DTIMS                    |
|----------|--|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol<br>4-Methyl-1H-Benzotriazol | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        |
| 2        | Cyclophosphamid<br>Ifosfamid                         | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        |
| 3        | Tramadol<br>Desvenlafaxin                            | 0,5               | 1,4               | 0,9               | 1,0                      |
| 4        | Diethylstilbestrol<br>Equilin                        | 0,2               | Keine<br>Trennung | n. d.             | 0,6                      |
| 5        | Estron<br>Trenbolon                                  | Keine<br>Trennung | n. d.             | Keine<br>Trennung | 0,2                      |
| 6        | Dehydroepiandrosteron<br>Testosteron                 | n. d.             | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | 0,4                      |
| 7        | Dihydrotestosteron<br>Etiocholanon<br>Androsteron    | n. d.             | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | 1,2<br>Keine<br>Trennung |
| 8        | Laktose<br>Saccharose                                | 0,3               | 2,3               | Keine<br>Trennung | n. d.                    |
| 9        | Ofloxacin<br>Levofloxacin                            | n. d.             | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        |
| 10       | Doxorubicin<br>Epirubicin                            | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung        |
| 11       | Iomeprol<br>Iopamidol                                | 0,7               | Keine<br>Trennung | n. d.             | 0,4                      |
| 12       | Corticosteron<br>Cortexolon                          | Keine<br>Trennung | Keine<br>Trennung | 3,1               | Keine<br>Trennung        |
| 13       | Cortison<br>Prednisolon                              | 2,6               | Keine<br>Trennung | 2,1               | 0,4                      |

Mit allen IMS-Geräten zusammen können die Komponenten von neun Gruppen angetrennt werden. Eine Basislinientrennung mit einer Auflösung von mehr als 1,5 wurde jedoch nur für drei Gruppen erhalten. Mit dem DMA-System wurden zwei Peakpaare mit einer Auflösung  $> 1,5$  getrennt (Paare 12 und 13). Mittels DTIMS konnten insgesamt sieben Peakpaare angetrennt werden, allerdings wird für keines der betrachteten Paare eine Basislinientrennung erhalten. Mit dem DMS-System wurde eine Auflösung von 2,3 für Laktose und Sachharose erhalten. Des Weiteren wird für das Paar drei eine Auflösung von 1,4 erzielt. Die höchste Auflösung mit 3,1 wurde unter Verwendung des DMA-Systems für Corticosteron und Cortexolon erzielt. Das TWIMS und DTIMS waren in der Lage, Iomeprol und Iopamidol zu trennen. Das DTIMS ermöglichte mit einer Auflösung von 1,2 die Antrennung von Dihydrotestosteron und Etiocholanon.

Eine höhere Auflösung wurde normalerweise erhalten, wenn die Verbindungen getrennt eingeführt wurden. Diese virtuelle Auflösung, die aus zwei einzelnen Messungen berechnet werden konnte, war demnach höher als die tatsächliche Auflösung. Dies macht sich besonders bei den DMA- und DMS-Systemen bemerkbar. Bei Verwendung des TWIMS-Systems war die Auflösung i. d. R. nicht davon abhängig, ob die Substanzen als einzelne Verbindung oder als Paar eingeführt wurden. Für das DTIMS wurden diese Versuche nicht durchgeführt. Für Cortison und Prednisolon wurde bei Verwendung des TWIMS eine höhere Auflösung beobachtet, wenn beide Verbindungen gleichzeitig eingeführt wurden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Wechselwirkung zwischen den Coulomb-Kräften und den Wellenspannungen. Wenn Cortison und Prednisolon gleichzeitig in die Driftröhre eingeführt werden, entsteht eine erhöhte Ionendichte. Daher werden stärkere abstoßende Coulomb-Kräfte beobachtet, was zu einer Peakverbreiterung führt. Als Folge dieser Abstoßung werden die Analytionen beider Komponenten teilweise gemischt. Der Fokussierungseffekt der Sequenz von symmetrischen Potentialwellen, die sich kontinuierlich durch die Trennröhre ausbreiten und auf die Ionen treffen, könnte der Hauptgrund für die Beobachtung einer höheren Auflösung bei Verwendung des TWIMS sein. Durch den Aufprall der Wellen erfahren die Ionen eine Art unelastische Kollision, die zu einem fokussierenden Effekt führt. Dieser Effekt wirkt dann den abstoßenden Coulomb-Kräften entgegen. Die fokussierte Ionenwolke der einzelnen Spezies kann nun als eine einzige Ladung betrachtet werden. Diese beiden Ladungen stoßen sich gegenseitig ab und somit wird die Auflösung erhöht. Zusätzlich ist durch den niedrigeren Gasdruck im TWIMS die mittlere freie Weglänge höher.

Für das DMA-System war die Auflösung niedriger, wenn die Verbindungen gleichzeitig in die Driftregion eingeführt wurden. Die Wirkung der gegenseitigen Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen Estron und Trenbolon innerhalb des Systems ist anhand der Trennung der beiden Substanzen in Abbildung 22 gezeigt.

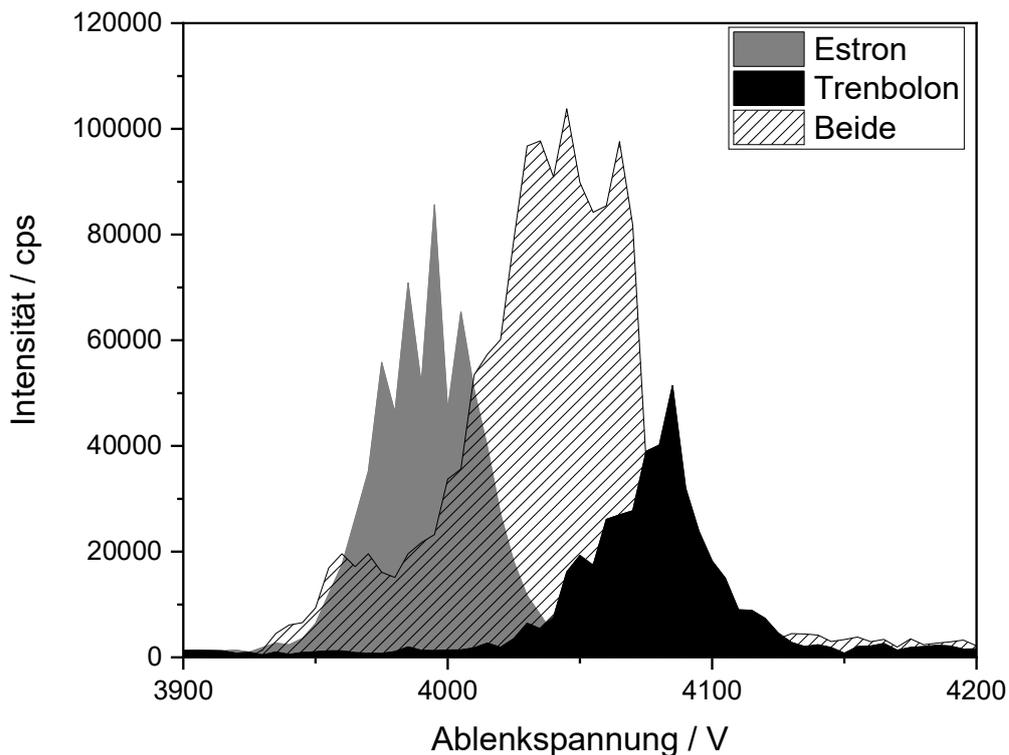


Abbildung 22: Trennung von Estron und Trenbolon, aufgezeichnet auf dem DMA-Gerät bei  $15.000 \text{ U min}^{-1}$  und einer Scanzeit pro Masse von 300 ms.

Die schwarz und grau eingefärbten Peaks repräsentieren die virtuelle Trennung. Hier wurde eine Auflösung von 1,2 erreicht. Wenn beide Komponenten gleichzeitig in die Ionisationskammer eingeführt wurden, wurde nur ein einziger Peak beobachtet, dessen Peakfläche der Summe der Peakflächen der einzelnen Peaks entspricht. Durch Erhöhung der Ionendichte bei gleichzeitigem Einlass beider Ionen nähert sich der Stoßquerschnitt (CCS) beider Ionen einander an. Die Clusterbildung ändert sich und ergibt ein einzelnes Signal.

Unter Verwendung des DMS konnte die Trennung von Laktose und Saccharose aufgrund der Bildung eines Natriumaddukts erreicht werden. Eine Trennung der protonierten Spezies war nicht möglich. Zusätzlich wurde der Einfluss von Dopantgasen bzw. Modifiern im DMS getestet. Unter Verwendung von 2-Propanol wurde die Trennung von Tramadol und Desvenlafaxin erreicht, wie in Abbildung 23 gezeigt. Ohne Dopantgas konnte keine Trennung erhalten werden. Durch Injizieren von 2-Propanol ändern sich die nichtlinearen Wechselwirkungen der Gasphase. Dieser Effekt führt zur Verschiebung des Signales in Richtung der negativen Kompensationsspannung.

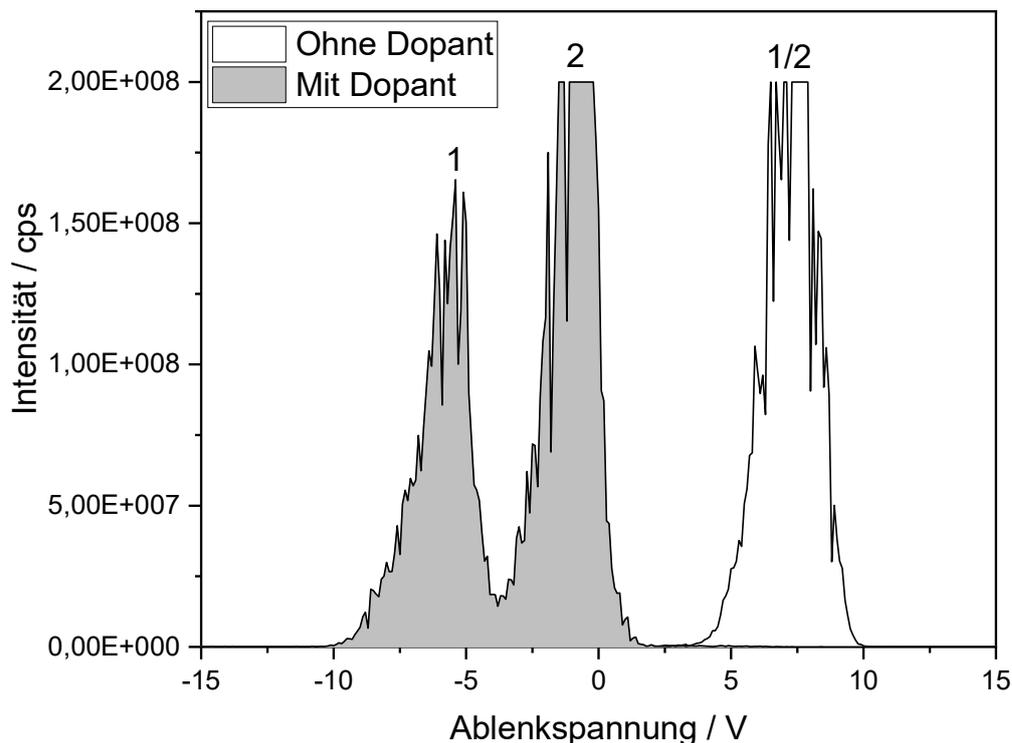


Abbildung 23: Mobilitätsspektren von Tramadol und Desvenlafaxin unter Verwendung des DMS-Systems mit 2-Propanol (grau) und ohne Dopantgas (weiß). Die Peaks entsprechen Desvenlafaxin (1), Tramadol, (2) und beiden Verbindungen (1/2).

Für die Paare 12 (Corticosteron und Cortisol) und 13 (Cortison und Prednisolon) wurde eine Auflösung von 3,1 und 2,1 bei Verwendung des DMA-Systems erhalten, selbst wenn beide Substanzen der jeweiligen Gruppen vorhanden waren. Die Auflösung für Cortison und Prednisolon lässt sich durch die Unterschiede in ihrer dreidimensionalen Struktur und damit einem ausreichenden Unterschied in ihren CCS-Werten erklären. Dieser beläuft sich auf  $5,7 \text{ \AA}^2$  respektive 2 %. Die Auflösung für Corticosteron und Cortisol lässt sich jedoch nicht anhand der CCS-Werte erklären, da dieser lediglich  $0,5 \text{ \AA}^2$  beträgt. Zusätzlich müssen hier die Effekte der Ladungsaufnahme eine Rolle spielen. Alle vier Analyten der beiden Paare sind Steroide, deren Grundelement Gonan ist, das aus drei sechsgliedrigen (A, B, C) und einem fünfgliedrigen Ring (D) besteht. Für Corticosteron befindet sich eine OH-Gruppe an Position 11 und somit am C-Ring des Sterins. Im Fall von Cortisol befindet sich der OH-Substituent in Position 17, was ebenfalls die Orientierung des alpha-Hydroxyketons beeinflusst. Prednisolon unterscheidet sich von Cortison dadurch, dass eine OH-Gruppe an Position 11 und eine zusätzliche Doppelbindung im A-Ring vorliegt.

Beim Eintritt in das Vakuum der MS sind die Ionencluster nicht mehr stabil. Daher spielt es in Bezug auf die Auflösung nur eine untergeordnete Rolle, ob ein Triple-Quadrupol- oder Flugzeitmassenspektrometer verwendet wird. Eine Substanz im IMS erzeugt nicht notwendiger-

weise ein einzelnes Signal. Da die Bildung von Multimeren oder Clustern möglich ist, können mehrere Peaks beobachtet werden. Das charakteristische Intensitätsverhältnis zwischen den Multimeren unterstützt oder ermöglicht sogar die Identifizierung der Verbindungen. Tramadol und Desvenlafaxin dienen als Beispiel. Aus der Darstellung in Abbildung 24 ist das Verhältnis zwischen dem Monomerpeak und dem Dimerpeak abzulesen. Dieses beträgt etwa 1:1 für Tramadol, während es für Desvenlafaxin 3: 1 ist.

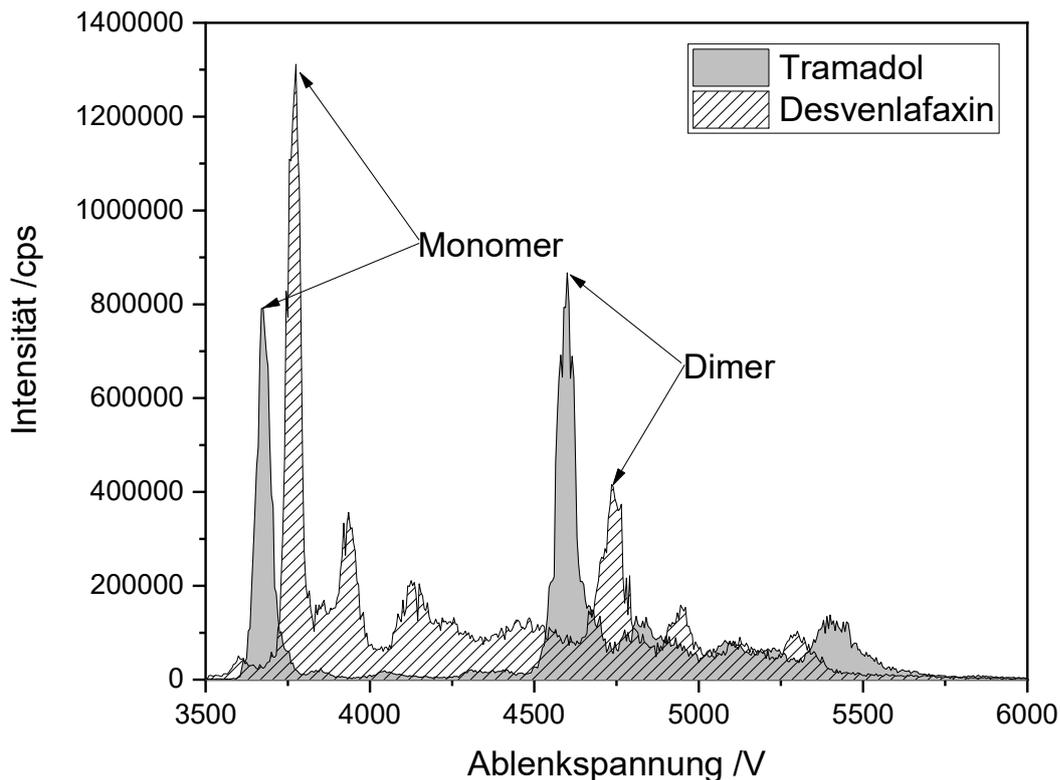


Abbildung 24 Unterschied im Intensitätsverhältnis der Multimere von Tramadol und Desvenlafaxin unter Verwendung des DMA-Systems. Für weitere Erläuterungen: siehe Text.

Die Abhängigkeit der Peakhöhe von der Konzentration und Anzahl der Verbindungen ist ein Nachteil für die Substanzidentifikation. Hier wirken die gleichen Mechanismen wie sie für den Reaktantionenpeak (RIP) beobachtet wurden. Wenn die Analytkonzentration zunimmt, nimmt die Intensität des RIP ab [38]. Außerdem kann die Änderung der Ionendichte zur Bevorzugung bestimmter Cluster führen. Dies kann zu einer Änderung der Intensität führen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die IMS unabhängig von der konkreten Technik keine generische Methode zur Trennung kleiner isobarer und isomerer Verbindungen < 800 Da darstellt, auch wenn dies in wissenschaftlichen Veröffentlichungen oder Produktbroschüren der Gerätehersteller postuliert wird [2], [3]. Allerdings ist es möglich, einzelne Peakpaare mit einer hohen Auflösung (> 2,0) im Millisekundenbereich zu trennen. Für Hochdurchsatzanwendungen besitzt dieser Ansatz demzufolge ein hohes Potenzial, da prinzipiell

auf eine chromatografische (Vor-)Trennung verzichtet werden kann. Zu bedenken ist, dass die Ionensuppression eine quantitative Auswertung erschwert bzw. quantitative Ergebnisse verfälscht, da die gesamte Probe gleichzeitig ionisiert wird.

Für eine weitergehende selektive Optimierung der Trennung einzelner Peakpaare ließen sich prinzipiell folgende Ansätze verfolgen: Durch die spezifische Auswahl von Dopantgasen könnten weitere Paare aufgetrennt werden. Der Einsatz von chiralen Dopants ermöglicht es zudem mit der IMS chirale Isomere zu trennen [39]. Auch der Einsatz von Metallionen durch spezielle Ionisationsmethoden kann zu einer Verbesserung der Auflösung führen. Entwicklungen auf Seiten der Hardware würden die Möglichkeit eröffnen, höhere Spannungen für die Trennung einzusetzen, wodurch eine bessere Auflösung erzielt werden könnte. Durch das Anlegen größerer Spannungen ließe sich zwar die Auflösung verbessern, allerdings könnten Gasphasenreaktionen die Bildung von Fragmentationen begünstigen, sodass die Auswertung erschwert wird.

## 2.5 Untersuchung des Testgemisches mittels 2D-LC-MS-Kopplung

Kernaspekt war die Beantwortung der Frage, inwieweit die zweidimensionale Flüssigkeitschromatografie in Verbindung mit der Massenspektrometrie zu einer höheren Auflösung und Sensitivität als die eindimensionale Flüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Ionenmobilitätsspektrometrie und Massenspektrometrie führt.

### 2.5.1 Einleitung und Theorie

#### 2.5.1.1 Single-Heart-Cut-2D-LC (LC – LC)

Bei der Single-Heart-Cut 2D-LC, abgekürzt LC – LC, wird in der Regel eine Fraktion aus dem Chromatogramm der Trennsäule in der ersten Dimension „ausgeschnitten“ und auf eine zweite Trennsäule transferiert. Dieser Vorgang ist schematisch an dem Chromatogrammausschnitt in Abbildung 25 dargestellt.

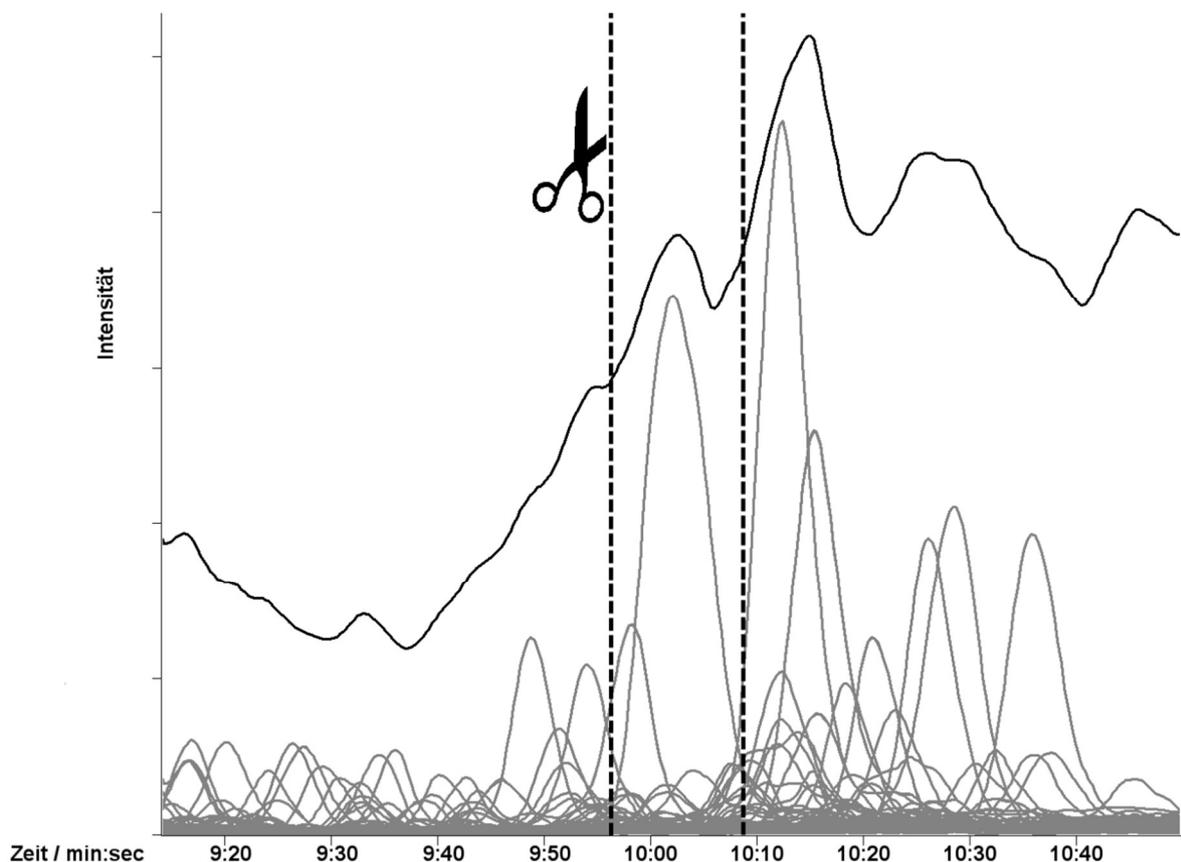


Abbildung 25: Prinzip der Single-Heart-Cut 2D-LC (LC – LC). Für weitere Details: siehe Text.

Die Single-Heart-Cut-Technologie erlaubt es, die ausgeschnittene Fraktion auf einer Trennsäule mit unterschiedlicher Selektivität zu analysieren. Im Optimalfall ist dann eine Auf-

trennung aller koeluerierenden Verbindungen in dieser Fraktion möglich. Bei der Single-Heart-Cut-Technik wird neben einer entsprechenden Ventilschaltung ein zweiter Detektor benötigt, wenn das Eluat von der ersten Trenndimension erfasst werden soll.

Die Peakkapazitäten beider Trenndimensionen verhalten sich bei Anwendung der LC - LC-Technik additiv. Weisen beide Trennsäulen eine Einzelpeakkapazität von z. B. 100 auf, ergibt sich eine Gesamtpeakkapazität von 200. Anwendungsbereiche der Single-Heart-Cut 2D-LC sind immer dann gegeben, wenn es um die Absicherung der Peakreinheit eines pharmazeutischen Wirkstoffs in Verbindung mit der UV-Detektion geht. Solche Trennprobleme weisen eine geringe Gesamtkomplexität auf, die Überprüfung der Peakreinheit ist jedoch vor dem Kontext der Arzneimittelforschung und der damit verbundenen Zulassung der Wirkstoffe durch die autorisierten Behörden von großer Wichtigkeit. In [40] findet sich eine ausführliche Beschreibung eines allgemeinen Workflows für die Bestimmung der Peakreinheit einer chiralen pharmazeutischen Verbindung.

#### **2.5.1.2 Umfassende 2D-LC (Comprehensive LC, LC x LC)**

Im Gegensatz zur Single-Heart-Cut 2D-LC wird bei der umfassenden oder comprehensive 2D-LC in der Regel das komplette Chromatogramm der ersten Trenndimension fraktioniert auf eine zweite Trennsäule übertragen. Dieser Vorgang wird durch das Adjektiv „umfassend“ bzw. „comprehensive“ charakterisiert. In diesem Fall ist das Zeichen für die Multiplikation „x“ zu verwenden. Der Chromatogramm-Ausschnitt in Abbildung 26 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

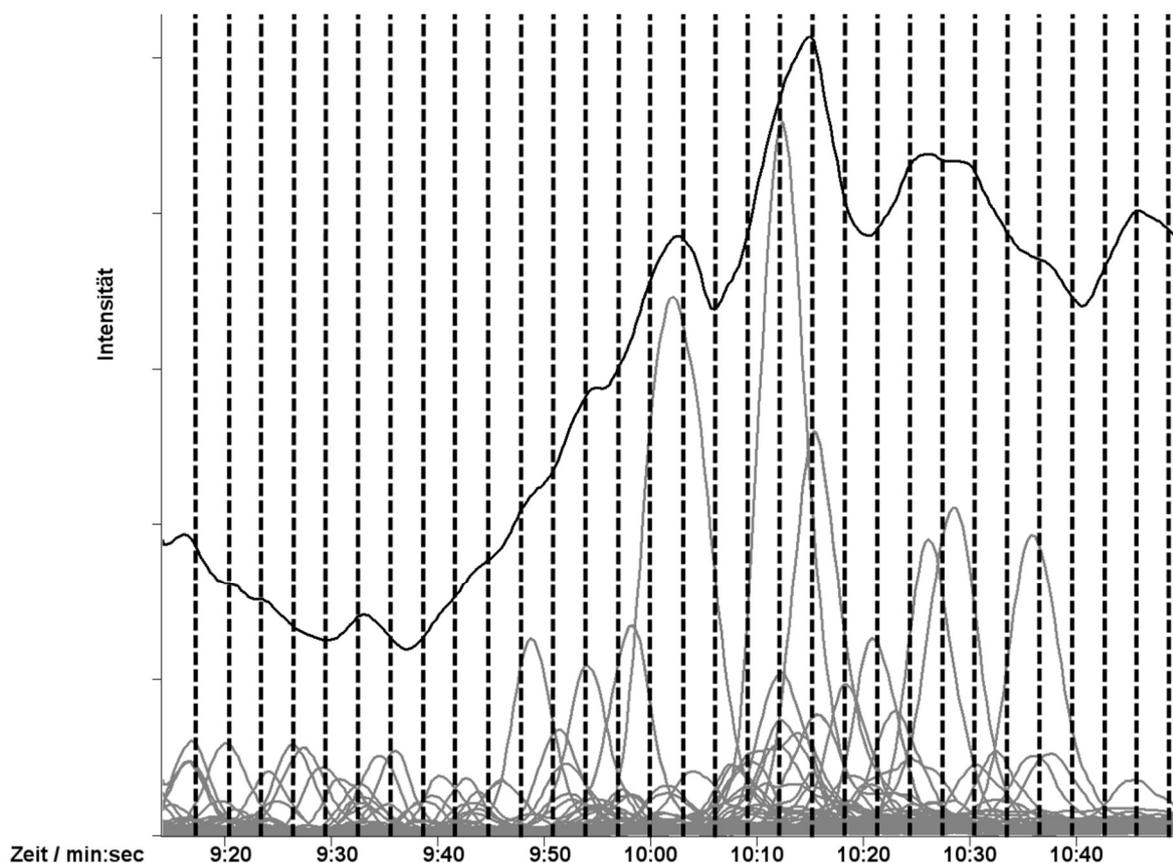


Abbildung 26: Prinzip der umfassenden (comprehensive) 2D-LC. Für weitere Details: siehe Text.

Von entscheidender Bedeutung ist, dass ein Peak, der von der ersten Trennsäule eluiert, drei bis viermal geschnitten werden sollte (Sampling). Diese Forderung geht auf eine zwar ältere, aber bis heute gültige und immer noch zitierte Publikation der Autoren Murphy, Schure und Foley zurück und wird als „M-S-F-Kriterium“ bezeichnet [41]. Wird das M-S-F-Kriterium nicht erfüllt, kann das Chromatogramm der ersten Trenndimension nicht mehr aus den Retentionsdaten der zweiten Trenndimension rekonstruiert werden. Darüber hinaus wird eine geringere Gesamtpeakkapazität erhalten, als es theoretisch möglich ist. Vereinfacht gesprochen verhalten sich die Peakkapazitäten beider Trenndimensionen multiplikativ, wenn beide Trennsysteme orthogonal sind und der Verlust an Peakkapazität durch das Sampling vernachlässigt werden kann. Weist die erste Säule eine Peakkapazität von 100 und die zweite Säule eine Peakkapazität von 10 auf, so ergibt sich theoretisch eine Gesamtpeakkapazität von 1000. An dieser simplen Rechnung wird das enorme Potenzial zweidimensionaler chromatografischer Verfahren deutlich.

Orthogonalität ist immer dann gegeben, wenn die Retentionsmechanismen beider Dimensionen statistisch unabhängig sind [42]. Als Beispiel kann hier z. B. die Trennung nach Größe über die Größenausschlusschromatografie in Kombination mit der Trennung nach Hydrophobizität über die Umkehrphasenchromatografie genannt werden. Auch die Kopplung einer Normalphase mit einer Umkehrphase führt häufig zu orthogonalen Trennungen.

Im Optimalfall verteilen sich die in der Probe befindlichen Analyten gleichmäßig über die zweidimensionale chromatografische Fläche. Dieser Fall entspricht dem in Abbildung 27 b dargestellten Szenario. Die Punkte repräsentieren die Peakmaxima der getrennten Substanzen in der ersten und zweiten Dimension. Es ist zu erkennen, dass sich die Trennmechanismen beider Dimensionen deutlich voneinander unterscheiden.

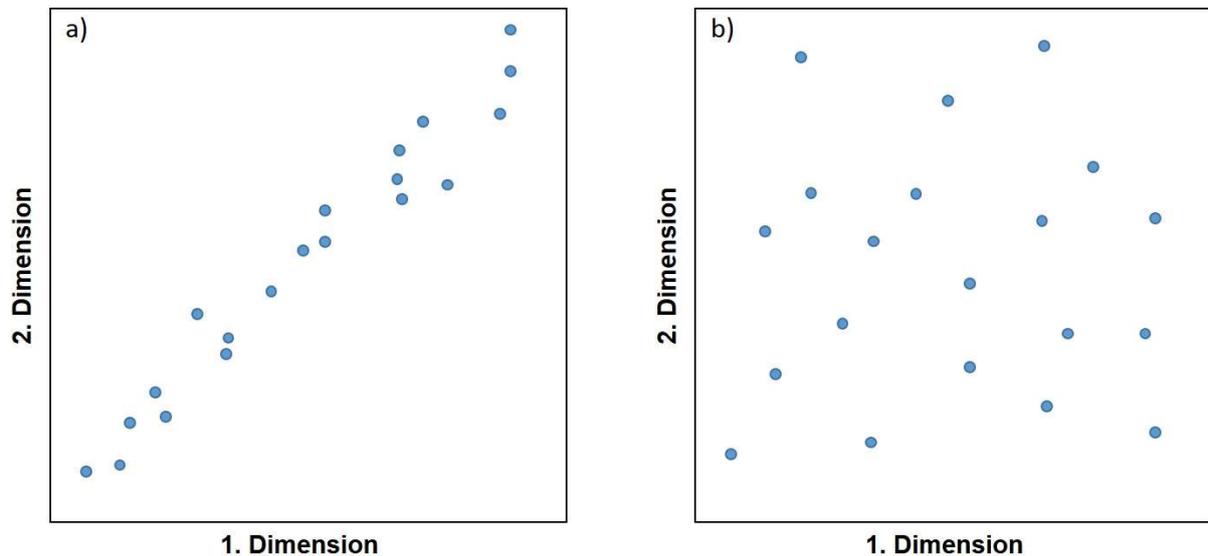


Abbildung 27: Darstellung der Abhängigkeit der Wechselwirkungsmechanismen für den Fall einer a) geringen Orthogonalität und b) hohen Orthogonalität in der ersten und zweiten Trenndimension. Für weitere Details: siehe Text.

In der Praxis ist die Entkopplung der Retentionsmechanismen für die LC x LC nur in Spezialfällen gegeben, da die Wechselwirkungen des Analyten mit der mobilen und stationären Phase häufig nicht auf einen Mechanismus reduziert werden können. Dies wird insbesondere an dem in Abbildung 27 a wiedergegebenen fiktiven Trennsystem deutlich. Zwischen der ersten und zweiten Dimension besteht in diesem Fall eine geringe Orthogonalität, weil sich die Peaks nicht über die zur Verfügung stehende Fläche verteilen, sondern entlang der Winkelhalbierenden angeordnet sind, so dass insgesamt eine geringe Gesamtpeakkapazität resultiert. Vor diesem Hintergrund werden zur Berechnung der effektiven Peakkapazität Korrekturfaktoren einbezogen, mit deren Hilfe eine Abschätzung der Peakkapazität für die umfassende zweidimensionale HPLC vorgenommen werden kann [43].

Davis, Stoll und Carr haben sich mit der Ableitung eines Faktors beschäftigt, der das sogenannte „Undersampling“ der ersten Dimension berücksichtigt, weil das M-S-F-Kriterium nicht immer erfüllt ist. Gl. 10 zeigt die Berechnung des Korrekturfaktors  $\beta$ .

$$\beta = \sqrt{1 + 3,35 * \left( \frac{t_s}{1w_b} \right)^2} \quad \text{Gl. 10}$$

$t_s$  steht dabei für die „Sampling Time“. Diese entspricht der Modulationszeit bzw. der Zykluszeit der zweiten Dimension. Für  ${}^1w_b$  wird ein Mittelwert der Peakbreiten der Signale der ersten Dimension eingesetzt. Unter Einbezug des Korrekturfaktors  $\beta$  kann die korrigierte Peakkapazität  $n_{c,2D}^*$  eines zweidimensionalen Systems nach Gl. 11 berechnet werden.

$$n_{c,2D}^* = \frac{{}^1n_c * {}^2n_c}{\beta} = \frac{{}^1n_c * {}^2n_c}{\sqrt{1 + 3,35 * \left(\frac{t_s * {}^1n_c}{{}^1t_g}\right)^2}} \quad \text{Gl. 11}$$

Neben dem Korrekturfaktor  $\beta$  muss weiterhin berücksichtigt werden, dass ein multiplikatives Verhältnis der Peakkapazitäten nur bei vollkommen orthogonalen Selektivitäten der beiden Trenndimensionen gegeben ist. Da die beiden Trennmechanismen in der Realität jedoch nicht vollständig unabhängig voneinander sind, muss ein Orthogonalitätsfaktor  $f_{\text{coverage}}$  berücksichtigt werden. Je nachdem wie die Orthogonalität bestimmt wird, wird auch der Faktor unterschiedlich berechnet. Li *et al.* beschreiben die Berechnung des Orthogonalitätsfaktors unter Verwendung der Bin-Counting Methode von Gilar *et al.* nach Gl. 12:

$$f_{\text{coverage}} = \frac{\sum \text{bins}}{n_{c,2D}} \quad \text{Gl. 12}$$

Unter Berücksichtigung der beiden Korrekturfaktoren für „Undersampling“ und Orthogonalität kann schließlich die effektive Peakkapazität  $n'_{c,2D}$  nach Gl. 13 berechnet werden.

$$n'_{c,2D} = {}^1n_c * {}^2n_c * \frac{1}{\beta} * f_{\text{coverage}} \quad \text{Gl. 13}$$

### 2.5.1.3 Multiple-Heart-Cut 2D-LC (LC + LC)

Bei Anwendung der Single-Heart-Cut 2D-LC (LC – LC) wird nur eine ausgewählte Fraktion der ersten Trenndimension auf die zweite Dimension übertragen, wobei in der Regel ein vollständiger Peak ausgeschnitten wird. Bei Anwendung der LC x LC wird dagegen das Eluat der ersten Dimension vollständig auf die zweite Dimension übertragen. Dabei wird jeder Peak der ersten Dimension in mindestens drei bis vier Fraktionen zerteilt, die nacheinander auf die zweite Dimension gelangen. Jede Komponente erscheint somit in mehreren Chromatogrammen der zweiten Dimension, was zu einer höheren Komplexität der Daten führt. Eine Kopplung von LC x LC an ein IM-HRMS ist apparativ und technisch möglich, jedoch gibt es bisher keine geeignete Softwarelösung, um die daraus erhaltenen Daten in vier Dimensionen

visuell darzustellen. Auch eine Feature-Suche, wie für die 1D-LC-IM-HRMS gezeigt, wäre hierbei problematisch, weil dabei mit kommerziell erhältlicher Software bisher keine Berücksichtigung von Retentionszeiten in zwei verschiedenen chromatografischen Dimensionen möglich ist. Es wurde daher eine Methode entwickelt, bei der alle Analyten einer Probe zwar in zwei verschiedenen (möglichst orthogonalen) flüssigkeitschromatografischen Dimensionen getrennt werden, aber anders als bei der LC x LC nicht fraktioniert werden und daher nach der zweiten Dimension nur als ein Peak eluieren und zum Detektor gelangen. Der Ansatz für eine solche Methode geht zurück auf die 1978 durchgeführten Arbeiten von ERNI und FREI [44]. Darin war die Modulationszeit so lang (7 Fraktionen in 10 Stunden), dass Substanzpeaks, die von der ersten Dimension eluierten, vollständig in einer Fraktion gesammelt und auf die zweite Dimension injiziert wurden. In Anlehnung an dieses Konzept wurde eine Modulationszeit von vier Minuten gewählt, die im Vergleich zu LC x LC-Methoden (meist 0,5 bis 1 Minute) relativ lang ist. Die Trenneffizienz der ersten Dimension wird dadurch reduziert, sodass nicht mehr alle Kriterien nach [45] erfüllt sind und die Methode nicht als umfassende 2D-LC bezeichnet werden kann. Da nun, ähnlich wie bei der Single-Heart-Cut 2D-LC, ganze Peaks auf die zweite Dimension gelangen und dies mit der kompletten Probe geschieht, kann das Verfahren auch als kontinuierliche Multi-Heart-Cut 2D-LC Methode beschrieben werden, das zwischen Single-Heart-Cut 2D-LC und umfassender 2D-LC einzuordnen ist. Als Abgrenzung zu LC - LC und LC x LC wurde die Abkürzung LC + LC eingeführt [46]. Die Aufeinanderfolge der vier Trenndimensionen bei der Kopplung von LC + LC mit IM-HRMS zeigt das Schema in Abbildung 28.

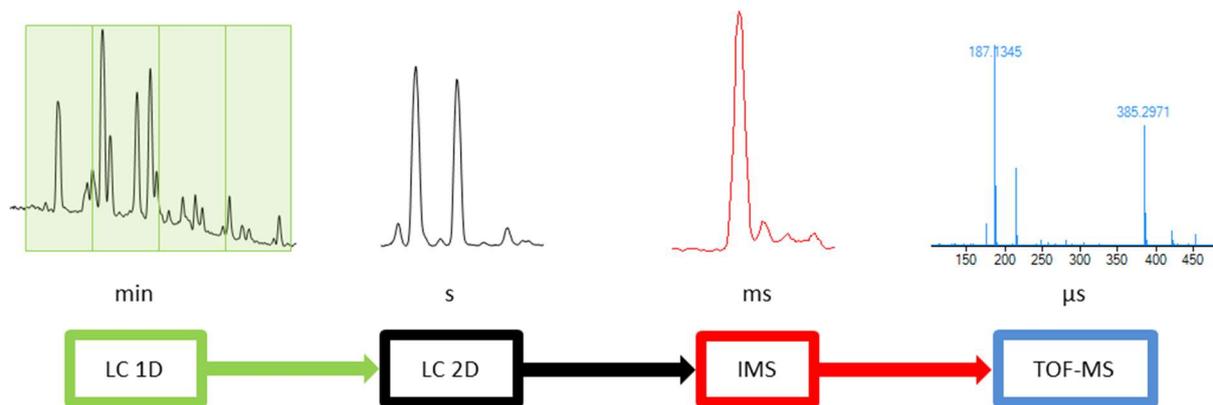


Abbildung 28: Schema der Trennung in vier Dimensionen bei der LC + LC-IM-HRMS-Kopplung.

Die Komponenten einer Probe werden dabei zunächst in der ersten Dimension chromatografisch getrennt und das Eluat in Fraktionen von je vier Minuten gesammelt. Dabei bleiben die Peaks – bis auf wenige Ausnahmen, die genau zwischen zwei Modulationen eluieren – vollständig in einer Fraktion. Die Fraktionen werden anschließend nacheinander auf der zweiten

Dimension chromatografisch getrennt, wobei hierfür entsprechend der Modulationszeit vier Minuten zur Verfügung stehen. Das Eluat der zweiten Dimension mit Peaks von einigen Sekunden Breite gelangt nach Ionisation in die Driftröhre des IMS als dritte Dimension, in der die Analyten nach ihrem Größe-zu-Ladungsverhältnis mit Driftzeiten im Millisekundenbereich getrennt werden. Hinter der Driftröhre gelangen die Ionen in das TOF-Flugrohr, in dem die Trennung nach Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen im Zeitrahmen von Mikrosekunden stattfindet.

## 2.5.2 Experimentelle Durchführung

### 2.5.2.1 Miniaturisierte umfassende 2D-LC (LC x LC)

Für die miniaturisierte 2D-LC wurde das Ekspert NanoLC 425-System von Sciex eingesetzt. Für die erste Dimension wurde eine Nano-LC verwendet, während es sich bei der zweiten Dimension um eine Mikro-LC handelte. Die Bestimmung der Peakkapazität der ersten Dimension des 2D-LC-Systems erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion (FLD), die der zweiten Dimension mittels Massenspektrometrie. Eine schematische Darstellung der Gerätekopplung ist in Abbildung 29 dargestellt. Als Massenspektrometer wurde die QTrap 3200 von Sciex verwendet.

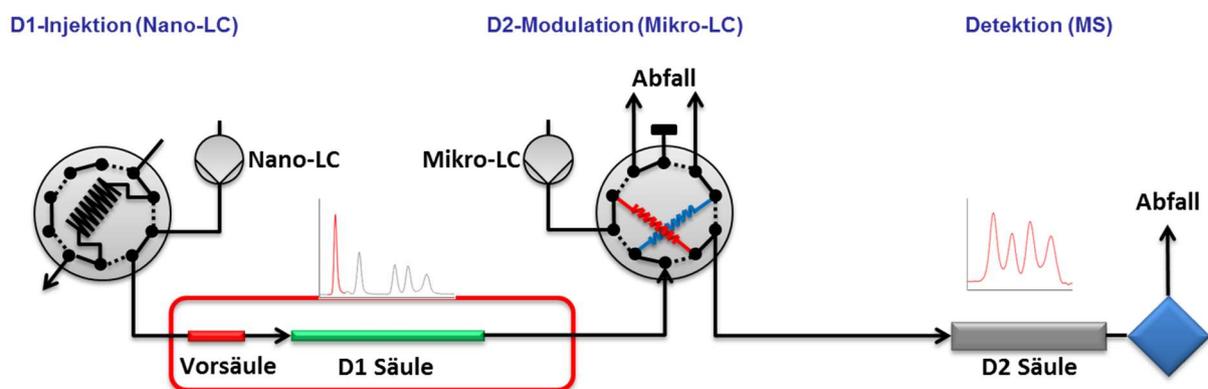


Abbildung 29: Schematische Darstellung der einzelnen Elemente des miniaturisierten 2D-LC-Systems.

Abbildung 30 zeigt die Kopplung des miniaturisierten 2D-LC-Systems mit dem massenspektrometrischen Detektor im Labor der Forschungseinrichtung 1. Um die Länge der Transferkappen so kurz wie möglich zu halten, wurde das System direkt über dem Massenspektrometer aufgestellt. Besonders kritisch ist die Verbindung zwischen dem Auslass der Trennsäule in der zweiten Dimension und dem Einlass in die Ionenquelle des Massenspektrometers.



Abbildung 30: Kopplung des miniaturisierten 2D-LC-Systems (Expert NanoLC 425) mit QTrap 3200 im Labor der Forschungseinrichtung 1.

In der ersten Trenndimension wurde eine Kombination aus zwei Säulen verwendet, um die Selektivität zu erhöhen. Die Wahl fiel hier auf ein Material der Firma ThermoFisher, das unter dem Namen Hypercarb bekannt ist und aus porösem, grafitisiertem Kohlenstoff (PGC, Porous Graphitic Carbon) besteht. Im Vergleich zu Silika-basierten Umkehrphasen zeichnet sich PGC generell durch eine stärkere Hydrophobizität aus. Vor diesem Hintergrund sollte über eine großvolumige Probenaufgabe (LVI, Large-Volume-Injection) ein entsprechend hoher Anreicherungsfaktor erzielt werden, da das effektive Säulenvolumen einer Nano-LC-Säule im Vergleich zu analytischen HPLC-Säulen mit einem Innendurchmesser zwischen 2,1 mm und 4,6 mm drastisch reduziert ist. In der zweiten Trenndimension wurde ein Core-Shell Material mit einem Partikeldurchmesser von 2,6  $\mu\text{m}$  verwendet, um möglichst hohe lineare Fließgeschwindigkeiten zu erzielen, da teilporöse Materialien gegenüber vollporösen sub 2  $\mu\text{m}$  Partikeln ein besseres Druck-zu-Flussrate Verhältnis aufweisen. Die Wahl fiel hier auf ein Material der Firma ChromaNik Technologies, das unter dem Namen SunShell vertrieben wird. Laut Herstellerinformation ist die Beladbarkeit gegenüber vergleichbaren Core-Shell Materialien höher. Die Kenndaten der verwendeten Säulen sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Auflistung der Säulenkenndaten für die miniaturisierte LC x LC.

| Bezeichnung        | Länge / mm | ID / $\mu\text{m}$ | Partikelgröße / $\mu\text{m}$ | Trägermaterial                              | Oberflächenmodifikation | Hersteller                                    |
|--------------------|------------|--------------------|-------------------------------|---|-------------------------|---|
| Hypercarb Vorsäule | 10         | 130                | 5,0                           | Grafitisierter Kohlenstoff (PGC); vollporös | keine                   | Thermo Fisher Scientific; umgepackt von Grace |
| BioBasic CN        | 100        | 75                 | 5,0                           | Silikagel; vollporös                        | Cyanopropyl (C-4)       | Thermo Fisher Scientific                      |
| SunShell RP-Aqua   | 50         | 300                | 2,6                           | Silikagel; CoreShell                        | C-28                    | ChromaNik Technologies; umgepackt von Grace   |

Die Zykluszeit der zweiten Dimension betrug 30 Sekunden. Dies entspricht gleichzeitig der Modulationszeit, in der das Volumen in der Schleife zwischen erster und zweiter Dimension gesammelt wird. Da das komplette Volumen der Schleife auf die zweite Trennsäule übertragen wird, wurde bei einer Flussrate von  $450 \text{ nL min}^{-1}$  auf der ersten Dimension ein Volumen von 225 nL auf die zweite Dimension überführt. Die Temperatur des zweiten Säulenofens wurde auf  $50^\circ\text{C}$  eingestellt, um die Viskosität der mobilen Phase zu reduzieren [47]. Die Gradientenzeiten waren 12 min auf der ersten und 17 Sekunden auf der zweiten Trenndimension. Die Gesamtanalysenzeit der ersten Dimension betrug 34 min. Auf diese Weise wurden bei jeder Messung 68 Fraktionen von der ersten auf die zweite Trennsäule übertragen. Die Gradientenverläufe der beiden Dimensionen sind in Abbildung 31 grafisch dargestellt.

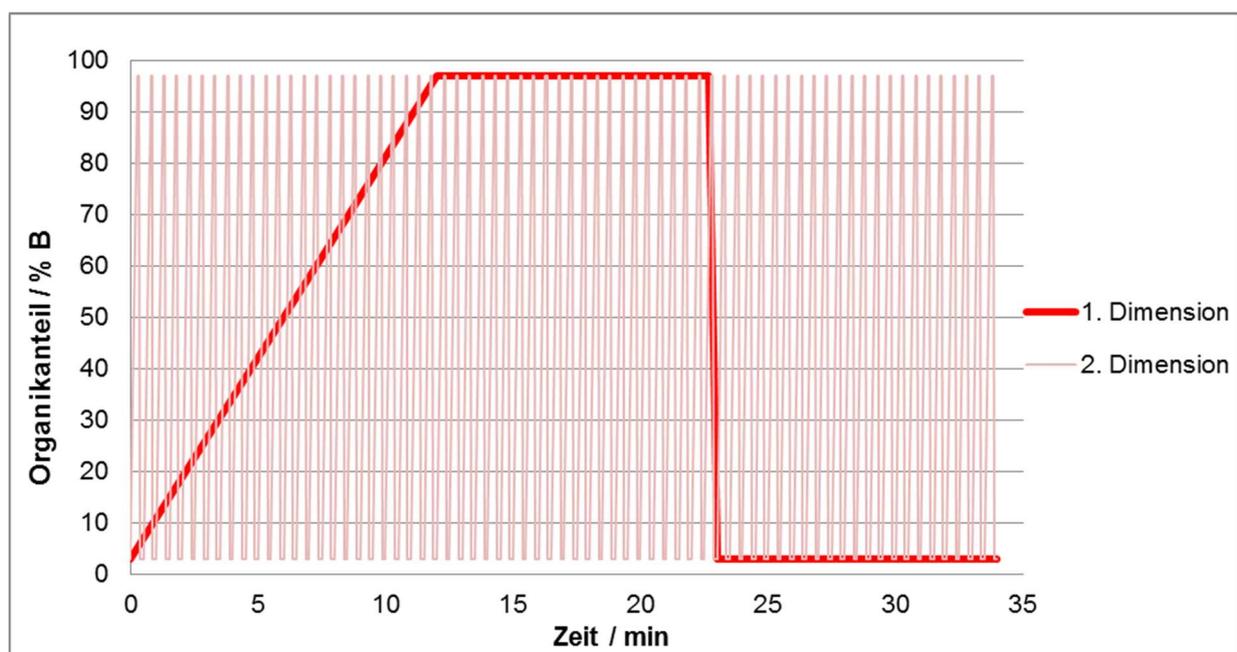


Abbildung 31: Gradientenverläufe der ersten und zweiten Dimension.

Um eine weitere Optimierung der Selektivität zu erzielen, wurde Methanol als protisches in der ersten und Acetonitril als aprotisches Lösemittel in der zweiten Dimension als Kosolvenz verwendet. Der Grund für die in diesem Beispiel angegebene Festlegung der Lösemittelsysteme besteht in der unterschiedlich hohen Viskosität der Lösemittelgemische. Während des Lösemittelgradienten wird ein Druck- bzw. Viskositätsmaximum durchlaufen, das für Mischungen aus Wasser-Methanol deutlich ausgeprägter ist als für Mischungen aus Wasser-Acetonitril. Die druckkritische Trennung ist eindeutig in der zweiten Dimension, so dass Methanol in der ersten Dimension eingesetzt wurde. Alle Methodenparameter für die miniaturisierte 2D-LC finden sich im Anhang in Kapitel 8.6.1 in Tabelle 40.

Für die Bestimmung der Peakkapazitäten der ersten Dimension mit und ohne Vorsäule wurden die in Tabelle 13 bzw. Tabelle 14 aufgeführten Komponenten verwendet. Die Peakkapazität der zweiten Dimension wurde mit dem Substanzmix aus Tabelle 2 bestimmt.

Tabelle 13: Substanzen zur Bestimmung der Peakkapazität mittels FLD mit Vorsäule.

| Substanz                      | Konzentration | Anregungswellenlänge | Emissionswellenlänge |
|-------------------------------|---------------|----------------------|----------------------|
|                               |               | $\lambda_{\max}$     | $\lambda_{\max}$     |
| Estradiol                     | 50 µg/mL      | 284 nm               | 312 nm               |
| Etoposid                      | 100 µg/mL     | 230 nm               | 328 nm               |
| 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol | 100 µg/mL     | 279 nm               | 312 nm               |
| Naproxen                      | 10 µg/mL      | 235 nm               | 405 nm               |

Tabelle 14: Substanzen zur Bestimmung der Peakkapazität mittels FLD ohne Vorsäule.

| Substanz     | Konzentration | Anregungswellenlänge | Emissionswellenlänge |
|--------------|---------------|----------------------|----------------------|
|              |               | $\lambda_{\max}$     | $\lambda_{\max}$     |
| Estradiol    | 50 µg/mL      | 284 nm               | 312 nm               |
| Etoposid     | 100 µg/mL     | 230 nm               | 328 nm               |
| PAK-Standard | 100 µg/mL     | 224-304 nm           | 310-508 nm           |
| Naproxen     | 1 µg/mL       | 235 nm               | 405 nm               |

### 2.5.2.2 Multiple Heart-Cut 2D-LC (LC + LC)

In Abbildung 32 ist die Kopplung des Multiple-Heart-Cut 2D-LC-Systems mit dem hochauflösenden Massenspektrometer im Labor der Forschungseinrichtung 2 gezeigt.



Abbildung 32: Kopplung des 2D-LC-Systems mit dem hochauflösenden Massenspektrometer im Labor der Forschungseinrichtung 2.

Es ist ersichtlich, dass für die Realisierung der Gerätekopplung ein großer Platzbedarf notwendig ist. Verglichen mit dem in Abbildung 30 gezeigten Systemaufbau der miniaturisierten 2D-LC-MS-Kopplung muss demzufolge im Labor eine entsprechende Fläche verfügbar sein, um eine lineare Anordnung zwischen HPLC und MS zu ermöglichen.

Um die LC + LC-Methode zu realisieren, wurde zunächst ein 2D-LC-System mit zwei Pumpen für die erste und die zweite Dimension und einem 2-Position-4-Port-Ventil mit zwei Probenschleifen verwendet. Die Modulationszeit wurde auf vier Minuten festgelegt. Da in dieser langen Sammelzeit die Volumina der Fraktionen sehr groß werden, sollte zumindest der Innendurchmesser der Säule in der ersten Dimension eher klein und die Flussrate ebenfalls gering sein. Die Trennung der ersten Dimension geht aus oben genannten Gründen teilweise verloren, weshalb durch eine lange Säule zumindest eine möglichst hohe Trennleistung erzielt werden soll. Für die erste Dimension wurde deshalb eine Säule mit 150 mm Länge und einem Innendurchmesser von 2,0 mm (Luna CN 3,0  $\mu\text{m}$ ) sowie eine geringe Flussrate ( $100 \mu\text{L min}^{-1}$ ) gewählt. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte aufgrund der langen Modulationszeit in großen Probenschleifen mit einem Volumen von  $100 \mu\text{L}$ . In der zweiten Dimension stehen entsprechend der Modulation nur vier Minuten für die Trennung zur Verfügung, was die Verwendung kürzerer Säulen erfordert. Da das gesamte Fraktionsvolumen von  $100 \mu\text{L}$  auf einmal in die zweite Säule injiziert wird, empfiehlt sich ein größerer Innendurchmesser, bei dem sich das Injektionsvolumen auf eine größere Fläche verteilt und somit am Anfang

eine schmalere Substanzbande vorliegt [48]. Hier wurde eine Säule mit 50 mm Länge und 3,0 mm Innendurchmesser eingesetzt (Kinetex C18 2,6  $\mu\text{m}$ ). Die Flussrate in der zweiten Dimension wurde auf  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  eingestellt, was dem optimalen Fluss für die verwendete ESI-Ionenquelle entspricht. Dieser Fluss ist geringer als bei LC x LC-Methoden üblich (2 bis  $4 \text{ mL min}^{-1}$  [49]), sodass der Fluss vor Eintritt in die Ionenquelle nicht gesplittet werden musste.

Das Injektionsvolumen auf die zweite Säule ist wie bereits erwähnt mit  $100 \mu\text{L}$  sehr hoch. Dies kann bei Verwendung einer Umkehrphase zu einer starken Peakverbreiterung in der zweiten Dimension führen, vor allem wenn der Anteil an organischem Lösungsmittel im Eluenten der ersten Dimension hoch und damit die Elutionskraft sehr stark ist [50]. Um diesem Problem zu begegnen, wurde das Eluat nach der ersten Dimension zunächst mit Wasser verdünnt, um eine Fokussierung der Analyten am Säulenkopf zu erzielen [51]. Dadurch können die Gradienten der ersten und der zweiten Dimension unabhängig voneinander optimiert werden.

In Abbildung 33 ist das Fließschema des LC + LC-Systems dargestellt.

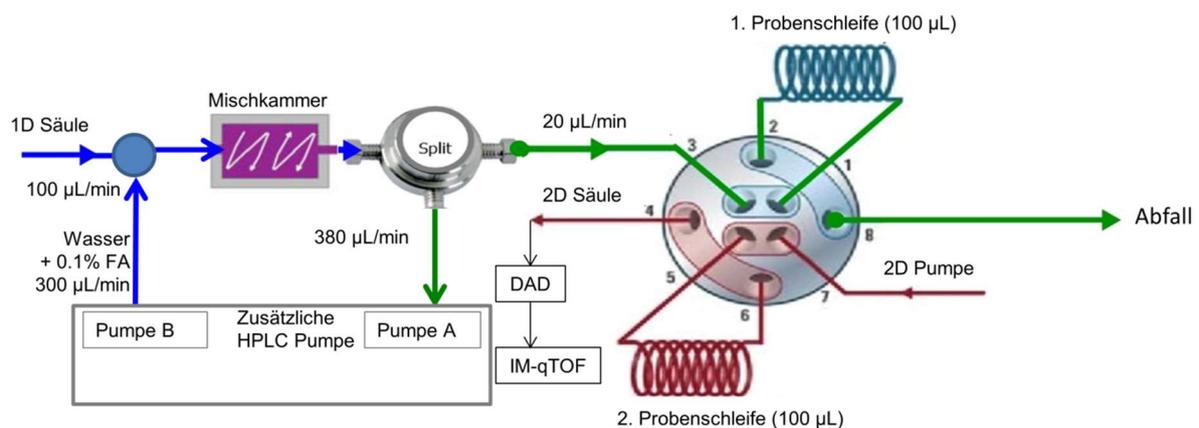


Abbildung 33: Aufbau des LC + LC-Systems. Das Eluat der ersten Dimension ( $100 \mu\text{L min}^{-1}$ ) wird kontinuierlich mit Wasser ( $300 \mu\text{L min}^{-1}$ ) verdünnt. Hinter der Mischkammer wird mit einem Fluss von  $380 \mu\text{L min}^{-1}$  über ein T-Stück abgesaugt, sodass die Probenschleifen mit verdünntem Eluat ( $20 \mu\text{L min}^{-1}$ ) gefüllt werden.

Die Verdünnung wurde durch kontinuierliches Zumischen von Wasser mit 0,1 % Ameisensäure über eine zusätzliche HPLC-Pumpe (Pumpenkopf B) realisiert. In der Mischkammer dieser Pumpe wurden Eluat und Wasser vollständig durchmischt, bevor der gesamte Fluss durch Saugen des Pumpenkopfs A über ein T-Stück zusätzlich geteilt wurde (*engl. dilute-and-split*). Daraus resultierte eine Flussrate von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$ , sodass die Probenschleifen innerhalb von vier Minuten zu 80 % gefüllt wurden. Ein Verlust einzelner Komponenten durch Überfüllen konnte somit ausgeschlossen werden. In der zweiten Dimension wurde ein Shift-

Gradient verwendet. Dabei wurde während der ersten Modulation ein linearer Gradient von 10 bis 60 % Methanol gefahren. In den nachfolgenden Modulationen startete der Gradient immer mit einem etwas höheren Anteil an organischem Lösungsmittel, so dass während der letzten Modulation ein Gradient von 50 bis 90 % Methanol resultierte. Damit erfahren Substanzen, die spät von der ersten Säule eluieren, in der zweiten Dimension direkt eine stärkere Elutionskraft. Diese Technik wird vor allem bei der Kombination von zwei Umkehrphasen im LC x LC-Modus eingesetzt, um eine optimale Verteilung der Peaks über die zweidimensionale chromatografische Fläche zu erhalten [52]. Nach der Trennung in der zweiten Dimension gelangt das Eluat durch die Messzelle eines Diodenarray-Detektors und dann in die Ionenquelle (hier ESI) zur weiteren Analyse mittels IM-HRMS.

## **2.5.3 Ergebnisse und Diskussion**

### **2.5.3.1 Bestimmung der Peakkapazität mittels miniaturisierter LC x LC**

Auf der ersten Dimension der Methode mit Vorsäule konnte eine Peakkapazität von 17 generiert werden. Der geringe Wert resultiert aus den sehr breiten Signalen, die auf der ersten Trenndimension erzeugt wurden. Die breiten Signale sind zur Erfüllung des M-S-F-Kriterium notwendig, damit ein Peak der ersten Dimension mindestens drei Mal geschnitten wird. Für Ethinylestradiol wurde beispielsweise eine Basisbreite von circa 1,5 Minuten erreicht. Die Gesamtlauzeit von 30 s der zweiten Dimension ermöglicht damit eine dreifache Fragmentierung. Das M-S-F-Kriterium ist somit erfüllt.

Da die Signale der von der ersten Säule eluierenden Analyten mehrmals geschnitten wurden, wird in mehreren Läufen der zweiten Dimension die gleiche Komponente detektiert. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 34 das extrahierte Ionenchromatogramm (Extracted Ion Chromatogram, EIC) von Etoposid auf der zweiten Dimension dargestellt. Die Detektion erfolgt kontinuierlich, nach jeweils 0,5 Minuten beginnt ein neuer Zyklus der zweiten Dimension. In der Abbildung sind fünf aufeinanderfolgende 2D-Läufe von fünf Fraktionen zu sehen, in denen Etoposid enthalten ist. Anhand des Signalverlaufs kann auf die Peakform von Etoposid auf der ersten Trennsäule zurückgeschlossen werden.

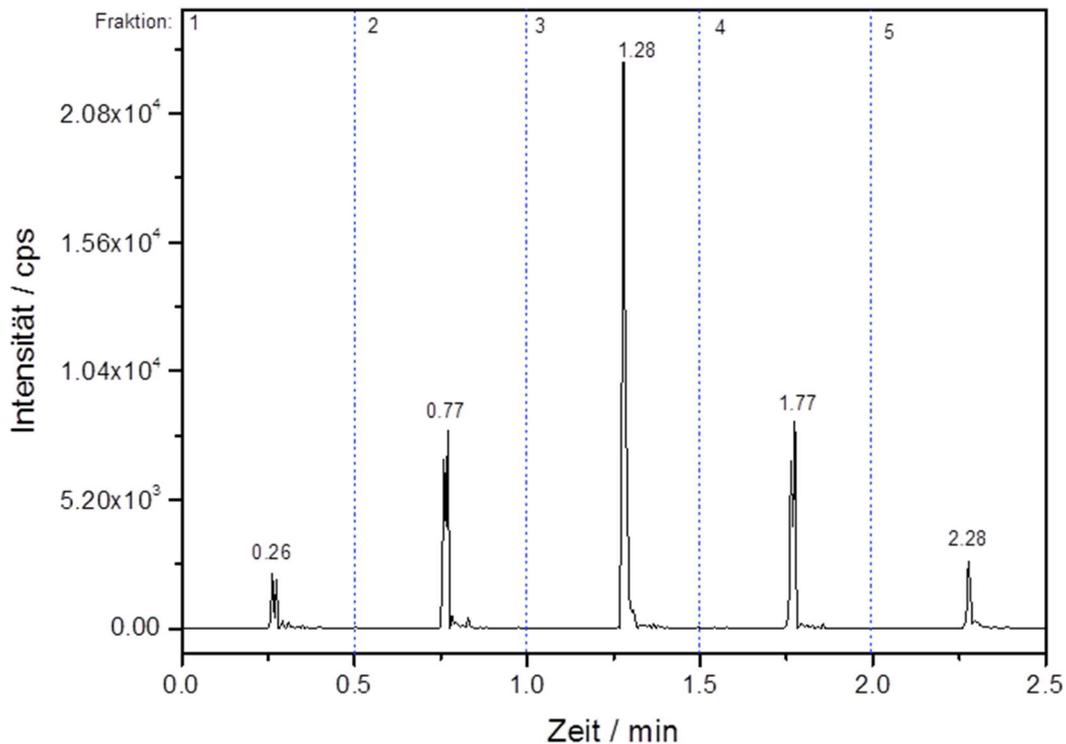


Abbildung 34: EIC von Etoposid in fünf aufeinanderfolgenden Fraktionen der zweiten Dimension.

Auf der zweiten Dimension konnte eine Peakkapazität von 10 erreicht werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die Signale von 5-Fluorouracil und Atenolol ein starkes Tailing aufwiesen. Für Etoposid und Fenofibrat wurden Verschleppungen beobachtet und die Signalintensitäten waren gering. Diese Effekte konnten auf die PGC-Vorsäule zurückgeführt werden, da die beiden Komponenten erst nach längerer Zeit vollständig von der Säule eluierten. Die Berechnung der gesamten Peakkapazität der zweiten Dimension erfolgte nach Gl. 14.

$$n_{c,2D}^* = \frac{{}^1n_c \cdot {}^2n_c}{\sqrt{1 + 3,35 \cdot \left(\frac{t_s \cdot {}^1n_c}{{}^1t_g}\right)^2}} = \frac{17 \cdot 10}{\sqrt{1 + 3,35 \cdot \left(\frac{0,5 \text{ min} \cdot 17}{12 \text{ min}}\right)^2}} = 104 \quad \text{Gl. 14}$$

Mit der miniaturisierten LC x LC unter Verwendung der Säulenkombination PGC + Cyano auf der ersten und CoreShell auf der zweiten Dimension konnte eine Peakkapazität von 104 erreicht werden.

Die Messungen wurden anschließend ohne Hypercarb Säule mit der RP x RP-Kopplung aus Cyano und Core-Shell Säule wiederholt. Die Peakkapazität steigt im Vergleich zu den Messungen mit Vorsäule durch Reduktion der Peakbreiten von 17 auf 19. Das M-S-F-Kriterium

wurde auch für die Methode ohne Vorsäule erfüllt. Zusätzlich eluierten die Komponenten früher als bei der vorherigen Methode.

Da die Methode der zweiten Trenndimension nicht verändert wurde, wurde analog zu den Messungen mit Vorsäule ebenfalls eine Peakkapazität von 10 erreicht. Auch die zuvor beschriebenen Probleme durch die Vorsäule ließen sich nicht beobachten. Die Gesamtpeakkapazität für das 2D-LC-System ohne Vorsäule wurde nach Gl. 15 berechnet.

$$n_{c,2D}^* = \frac{{}^1n_c * {}^2n_c}{\sqrt{1+3,35 * \left(\frac{t_s * {}^1n_c}{t_g}\right)^2}} = \frac{19 * 10}{\sqrt{1+3,35 * \left(\frac{0,5 \text{ min} * 19}{12}\right)^2}} = 107 \quad \text{Gl. 15}$$

In Abbildung 35 wird die Leistungsfähigkeit des miniaturisierten LC x LC-Verfahrens mit den in den Abschnitten 2.2.2.2 und 2.2.2.3 beschriebenen Verfahren verglichen.

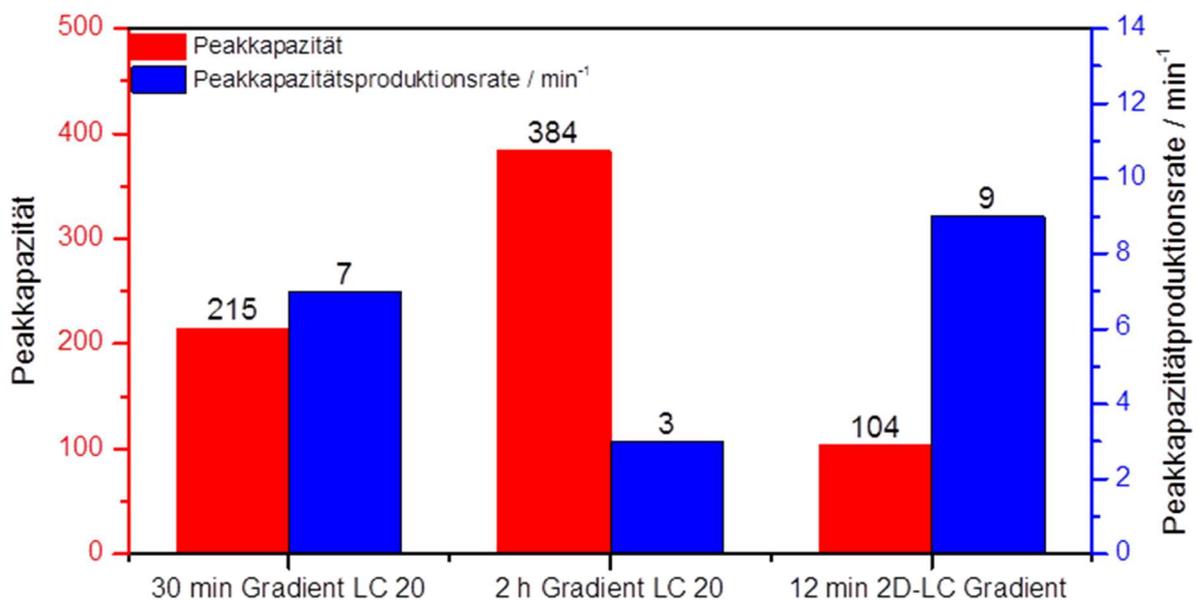


Abbildung 35: Vergleich der Peakkapazitäten und Peakkapazitätsproduktionsraten für 1D-LC-Verfahren und LC x LC-Verfahren.

Es ist zu erkennen, dass das LC x LC-Verfahren die höchste Peakkapazitätsproduktionsrate, jedoch die geringste absolute Peakkapazität aufweist. Aufgrund der in Kapitel 2.3.2 diskutierten Ergebnisse ist somit eine Auflösung der kritischen Peakpaare auf der zweiten Trennsäule nicht möglich, da die Peakkapazität zu gering ist und die Selektivität vergleichbar ist mit den verwendeten Umkehrphasen. Eine Trennung wäre demzufolge nur auf der ersten Trenndimension möglich, da im Vergleich zu klassischen Umkehrphasen durch die Kombination aus einer PGC- und Cyano-Phase eine signifikante Änderung der Selektivität zu erwarten ist. Die

experimentelle Überprüfung dieser Hypothese bildet die Grundlage für die im nachfolgenden Kapitel beschriebene Untersuchung zur Bestimmung der chromatografischen Auflösung.

## 2.5.4 Isobarentrennung mittels miniaturisierter LC x LC

In der 2D-LC war die Beurteilung der Isobarentrennung schwieriger, da zwei verschiedene Trenndimensionen zur Auftrennung benutzt wurden. Die erste Dimension wurde mittels FLD detektiert. Da ein Großteil der Analyten jedoch nicht fluoreszierend ist, wird über die einzelnen Signale einer Komponente auf der zweiten Dimension auf die Peakform der ersten Dimension zurück geschlossen. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 36 die extrahierten Ionenchromatogramme der Komponenten Estron und Trenbolon (Paar 5) bei Verwendung der RP x RP-Säulenkombination ohne Vorsäule aufgeführt. Die einzelnen Abbildungen zeigen jeweils fünf aufeinanderfolgende Fraktionen, die auf die zweite Dimension überführt und mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer detektiert wurden.

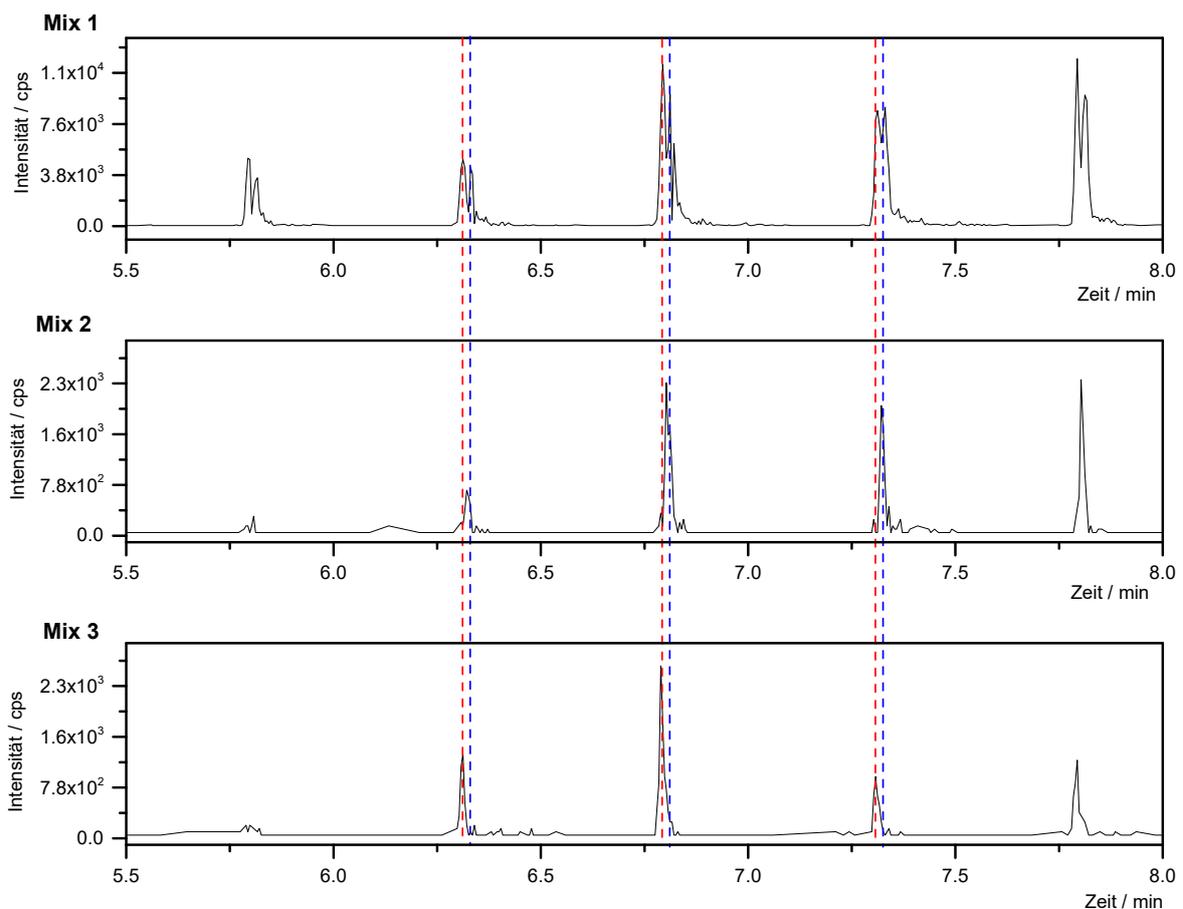


Abbildung 36: Extrahierte Ionenchromatogramme der Mixe 1-3 von Paar 5 ( $m/z$  115,0) für jeweils fünf aufeinanderfolgende Fraktionen aus der ersten Dimension. (Mix 1: Estron und Trenbolon; Mix 2: Estron; Mix 3: Trenbolon).

Der erste Mix enthielt sowohl Estron als auch Trenbolon. Würde auf der ersten Dimension eine Auftrennung der Komponenten stattfinden, so müssten im oberen Chromatogramm von Abbildung 36 zwei Peakmaxima zu sehen sein, analog zum Peakverlauf für Etoposid in Abbildung 34. Anhand der fünf unterschiedlich intensiven Signale war jedoch nicht ersichtlich, inwiefern eine Trennung auf der ersten Dimension stattgefunden hat. Werden die Signale einzeln betrachtet, so ist zu erkennen, dass es im Mix 1 zu einer Aufspaltung der Peaks kam, während die Signale in Mix 2 und 3 keine Aufspaltung aufwiesen. Mit Hilfe der gestrichelten Linien, die in Abbildung 36 eingetragen sind, werden die Maxima der aufgespaltenen Signale mit den Peaks in den Chromatogrammen von Mix 2 und Mix 3 verglichen. Der Vergleich zeigt, dass die in Mix 1 ersichtliche Aufspaltung auf eine Antrennung der beiden Komponenten Estron und Trenbolon zurückzuführen ist. Während die Analyten somit auf der ersten Dimension nicht getrennt wurden, fand auf der zweiten Dimension eine Antrennung statt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten in Tabelle 3. Das Peakpaar Estron und Trenbolon wurde unter Verwendung einer sub 2  $\mu\text{m}$  Phase und einer Gradientenzeit von 30 Sekunden mit einer Auflösung von 1,4 getrennt.

Ein Beispiel für eine resultierende 2D-LC-MS-Trennung für die Isomere Ifosfamid und Cyclophosphamid sowie für die Epimere Doxorubicin und Epirubicin ist in Abbildung 37 wiedergegeben. Für beide kritischen Peakpaare kann eine partielle Trennung auf der ersten Dimension erreicht werden, wie aus den rekonstruierten Peakformen der ersten Dimension in Abbildung 37 a) und b) ersichtlich wird. Es zeigt sich, dass die resultierende Auflösung bei den Epimeren Doxorubicin und Epirubicin (Abbildung 37 a) höher ist als bei den Isomeren Ifosfamid und Cyclophosphamid (Abbildung 37 b). Die vertikal gestrichelten roten Linien stellen die verschiedenen Fraktionen dar, die zur weiteren Trennung in die zweite Dimension übertragen werden, wie in Abbildung 37 c) und d) dargestellt.

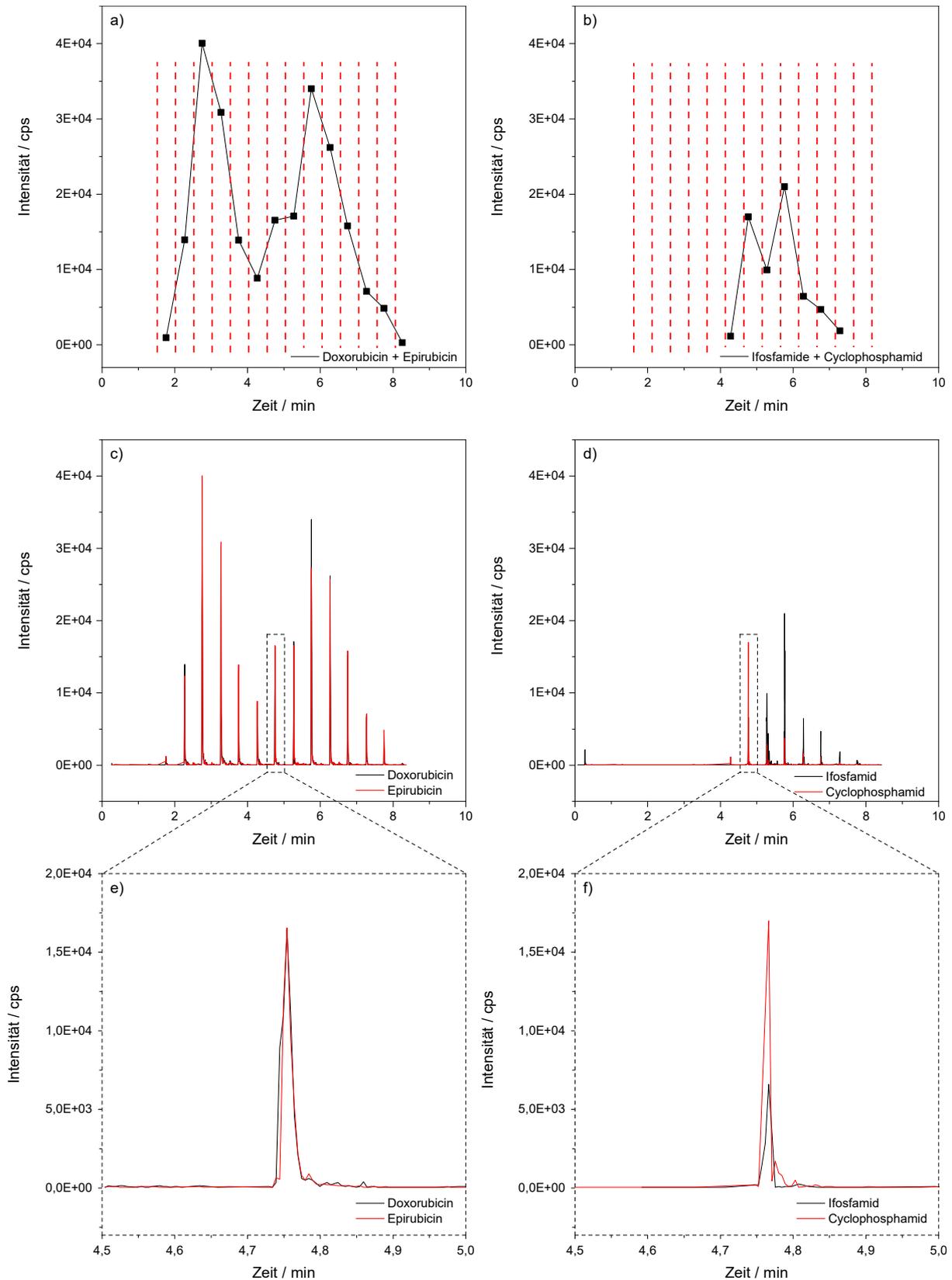


Abbildung 37: Resultierende zweidimensionale Trennung der rekonstruierten Peakformen der ersten Dimension für a) die Epimere Doxorubicin und Epirubicin und b) die Isomere Ifosfamid und Cyclophosphamid. Die vertikal gestrichelten roten Linien stellen die verschiedenen Fraktionen dar, die auf die zweite Trenndimension übertragen werden. Die resultierenden 2D-LC-Trennungen sind in c) und d) für die einzelnen kritischen Peakpaare dargestellt. Die entsprechende Trennung auf der zweiten Dimension für eine Fraktion ist in e) und f) dargestellt.

Allerdings kommt es in der zweiten Dimension zu einer Koelution der beiden kritischen Peakpaare, wie anhand der vergrößert dargestellten Chromatogrammausschnitte in Abbildung 37 e) und f) ersichtlich ist. Der Grund ist die verminderte Peakkapazität in der zweiten Dimension aufgrund einer Gradientenzeit von nur 17 s. Aufgrund dieser Koelution ist das Massenspektrometer nicht in der Lage, zwischen diesen Verbindungen zu unterscheiden. Daher ist trotz der erweiterten Selektivität der zweidimensionalen Trennung keine eindeutige Identifikation der jeweiligen Substanzen möglich. Dieses Beispiel steht stellvertretend für diejenigen Peakpaare in Tabelle 15, für die keine Trennung erzielt werden konnte.

Als Kriterium für eine Trennung wurden alle Substanzen, bei denen eine Aufspaltung des Signals in Mix 1 ersichtlich war und bei denen die relativen Standardabweichungen der Retentionszeiten der einzelnen Isobaren aus Mix 2 und 3 mehr als 1,5 % betrug als angetrennt bezeichnet.

Tabelle 15: Isobarentrennung auf der zweiten Dimension der 2D-LC mit und ohne Vorsäule auf der ersten Dimension. n. d.: nicht detektiert.

| Paar Nr. | Substanz   | mit Vorsäule            | ohne Vorsäule           |
|----------|--|-------------------------|-------------------------|
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol<br>4-Methyl-1H-Benzotriazol | Antrennung              | keine Trennung          |
| 2        | Cyclophosphamid<br>Ifosfamid                         | keine Trennung          | keine Trennung          |
| 3        | Tramadol<br>Desvenlafaxin                            | Antrennung              | keine Trennung          |
| 4        | Diethylstilbestrol<br>Equilin                        | Diethylstilbestrol n.d. | Diethylstilbestrol n.d. |
| 5        | Estron<br>Trenbolon                                  | Antrennung              | Antrennung              |
| 6        | Dehydroepiandrosteron<br>Testosteron                 | Antrennung              | keine Trennung          |
| 7        | Dihydrotestosteron<br>Etiocholanon<br>Androsteron    | Antrennung              | Antrennung              |
| 8        | Laktose<br>Saccharose                                | n.d.                    | Saccharose n.d.         |
| 9        | Ofloxacin<br>Levofloxacin                            | nicht auswertbar        | keine Trennung          |
| 10       | Doxorubicin<br>Epirubicin                            | n.d.                    | keine Trennung          |
| 11       | lomeprol<br>lopamidol                                | keine Trennung          | Antrennung              |
| 12       | Corticosteron<br>Cortexolon                          | Antrennung              | keine Trennung          |
| 13       | Cortison<br>Prednisolon                              | keine Trennung          | keine Trennung          |

Es ist ersichtlich, dass bei Verwendung der Säulenkombination Hypercarb + Cyano auf der ersten Dimension fünf Paare angetrennt werden konnten, während ohne die Vorsäule nur drei Konstitutionsisomere angetrennt werden. Dies bestätigt die Erkenntnisse aus Vorgängerarbeiten, in denen durch Verwendung der Kombination mit Vorsäule die höchste Selektivität erreicht wird. Nachteile gegenüber der Methode ohne Vorsäule traten für Doxorubicin und Epirubicin auf. Bei Verwendung der Hypercarb Vorsäule wurden die Substanzen nicht detektiert, da sie durch die Vorsäule vermutlich zu stark oder irreversibel retardiert wurden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass es mit den gewählten Verfahren nicht möglich ist, die kritischen Peakpaare aufzutrennen. Dies liegt daran, dass sowohl die Peakkapazität in der ersten als auch zweiten Trenndimension zu gering ist.

### **2.5.5 Limitierungen von LC x LC-Verfahren**

Aufgrund der in diesem Forschungsvorhaben erzielten Daten lassen sich folgende technische Limitierungen zweidimensionaler flüssigkeitschromatografischer Verfahren ableiten. Für den Modus der umfassenden LC x LC gibt das M-S-F-Kriterium vor, dass ein Peak aus der ersten Dimension mindestens dreimal geschnitten werden muss, um die höchste Peakkapazität zu erzielen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 38 visualisiert. Die roten Balken markieren die einzelnen Fraktionen eines Peaks, die auf die zweite Trennsäule übertragen werden. Der schwarze Peakverlauf entspricht dabei dem Signal das erhalten wird, wenn die farbig markierten Peaks als Summensignal erfasst würden.

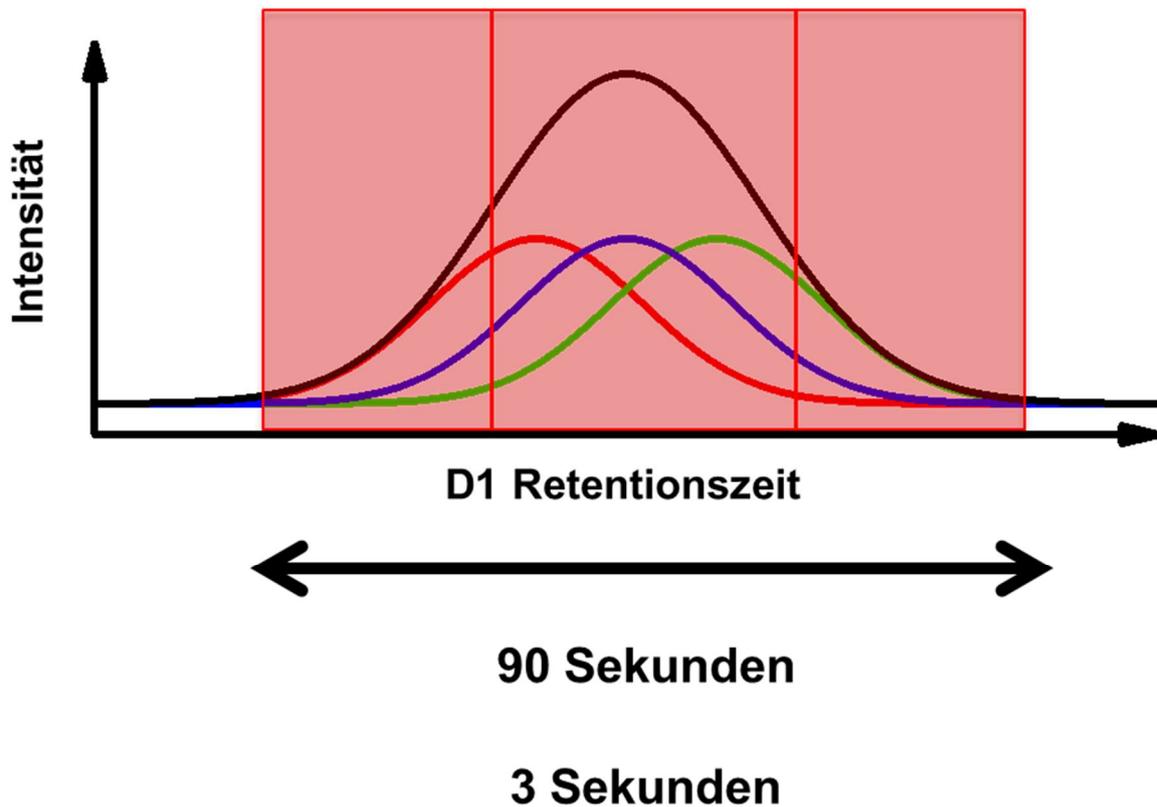


Abbildung 38: Visualisierung des M-S-F-Kriteriums das vorgibt, dass ein Signal bzw. Peak aus der ersten Trenndimension drei Mal geschnitten wird.

Wie bereits mehrfach dargelegt, ist eine Modulationszeit von 30 s als unterer Zeitwert für klassische LC x LC-Ansätze anzusehen, da ansonsten eine zu geringe Peakkapazität auf der zweiten Trenndimensional erzielt wird. Dies bedeutet, dass die mittleren Peakbreiten auf der ersten Trenndimension mindestens 90 s betragen, wenn das M-S-F-Kriterium eingehalten werden soll. Dies wiederum bedeutet, dass hochauflösende 1D-LC-Trennungen mit Peakbreiten von 3 s oder weniger nicht nutzbar sind. Die hohe Peakkapazität, die somit bei 1D-LC-Trennungen mit sub 2  $\mu\text{m}$  Partikeln erzielt werden kann (vergleiche hier die in Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse), ist somit irrelevant für den Bereich von klassischen LC x LC-Trennungen. In einer aktuellen Publikation von Patel et al. wird ein Verfahren beschrieben, die Geschwindigkeit von LC-Trennungen signifikant zu erhöhen [53]. Die Autoren haben ein Verfahren entwickelt, eine Peakkapazität von 10 innerhalb einer Sekunde zu erreichen. Dies wird möglich durch die Nutzung extrem kurzer Säulen mit einer Länge von 1 cm sowie einer Flussrate von 8  $\text{mL min}^{-1}$ . Zwar diskutieren die Autoren die Möglichkeit, dieses Verfahren für schnelle LC x LC Trennungen einzusetzen, jedoch weist das Konzept zwei gravierende Probleme auf, die in der Praxis auf Grund des aktuellen Stands der Technik nicht zu lösen sind. Zum einen ist die Flussrate nicht kompatibel mit der Elektrospray-Ionisation, da diese i. d. R. nur für Flussraten bis 1  $\text{mL min}^{-1}$  ausgelegt ist. Zum anderen haben die Autoren die Machbarkeit ihres Ansatzes mit UV-Detektion demonstriert. Eine Über-

tragung auf die massenspektrometrische Detektion ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, da die Datenaufnahmerate von MS-Systemen im Vergleich zu UV-Detektoren deutlich vermindert ist. Je nach Messmodus beträgt diese weniger als 50 Hz. Sollen MS/MS-Experimente durchgeführt werden, reduziert sich die Datenaufnahmerate noch weiter.

Für die quantitative Analyse werden in der Regel mindestens 12 Datenpunkte benötigt. Für die qualitative Analyse ist auch eine geringere Anzahl von Datenpunkten über einem chromatografischen Peak akzeptabel. Um eine ausreichende Anzahl von Datenpunkten zu erzeugen, muss die Zykluszeit sehr kurz sein. Diese hängt vom betrachteten  $m/z$ -Bereich und der Anzahl der MS/MS-Experimente ab. Ein MS/MS-Experiment beinhaltet die Auswahl eines bestimmten Vorläuferions und dessen anschließende Fragmentierung. Beispielsweise entsprechen vier MS/MS-Experimente der Fragmentierung der vier intensivsten Ionen, die über einen definierten  $m/z$ -Bereich detektiert wurden. Ein größerer  $m/z$ -Bereich hat nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Zykluszeit, während eine höhere Anzahl von MS/MS-Experimenten mit konstanter Verweilzeit die Zykluszeit deutlich erhöht und die Anzahl der Datenpunkte reduziert. Außerdem wird durch die Verkürzung der Verweilzeit in der Regel das Signal-zu-Rausch-Verhältnis reduziert.

Generell sollte die Anzahl der MS/MS-Experimente mit zunehmender Anzahl koeluierender Verbindungen erhöht werden. Dies hängt jedoch stark von den Peakbreiten ab. Tabelle 16 fasst die Daten für die Berechnung der Anzahl der Datenpunkte über einen chromatografischen Peak in Abhängigkeit von der Peakbreite und der Zykluszeit zusammen.

Tabelle 16: Vergleich der resultierenden Datenpunkte über einen chromatografischen Peak in Abhängigkeit von Peakbreite und Zykluszeit. Annahme: Verweilzeit für Scanexperiment beträgt 250 ms bei einer Peakbreite von 10 s und 20 ms bei einer Peakbreite von 1 s. Verweilzeit für MS/MS-Experimente beträgt 100 ms bei einer Peakbreite von 10 s und 20 ms bei einer Peakbreite von 1 s.

|                             | Peakbreite / s |   | Zykluszeit / ms |      | Datenpunkte |   |
|-----------------------------|----------------|---|-----------------|------|-------------|---|
| Scan + 2 MS/MS Experimente  | 10             | 1 | 500             | 110  | 20          | 9 |
| Scan + 4 MS/MS Experimente  | 10             | 1 | 700             | 150  | 14          | 7 |
| Scan + 8 MS/MS Experimente  | 10             | 1 | 1110            | 710  | 9           | 1 |
| Scan + 12 MS/MS Experimente | 10             | 1 | 1500            | 1110 | 7           | 1 |

Für die Diskussion werden zwei Szenarien betrachtet. Im ersten Fall beträgt die Peakbreite 10 s, im zweiten Fall beträgt diese nur 1 s. Wird die Anzahl der MS/MS-Experimente von zwei auf maximal 12 erhöht, so führt dies zu einer signifikanten Zunahme der Zykluszeit.

Dies bedeutet, dass bei einer Peakbreite von 1 s immer noch sieben Datenpunkte erhalten werden. Dies ist die untere Grenze für Screeningmethoden, da diese nur eine qualitative Aussage über die in einer Probe enthaltenen Verbindungen erlauben. Wird die Anzahl an MS/MS-Experimenten erhöht, so werden nicht ausreichend Datenpunkte generiert. Bei acht MS/MS-Experimenten wird nur ein Datenpunkt pro Peak erhalten.

Würde die Peakbreite nochmals um den Faktor 10 reduziert, so wie in der Publikation von Patel et al. experimentell umgesetzt, können keine MS/MS-Experimente durchgeführt werden. Die Reduzierung der Verweilzeiten auf 5 ms oder weniger ist zwar bei einigen MS-Systemen möglich, allerdings steigt das Rauschen und die Signalintensität wird durch den verringerten Stoffeintrag in den Detektor zusätzlich minimiert.

Vor diesem Hintergrund stellt das von Schmitz et al. entwickelte Multiple-Heart-Cut-Konzept (LC +LC) eine sinnvolle Verfahrensvariante dar, weil durch die Verlängerung der Modulationszeit für die zweite Trenndimension eine relativ hohe absolute Peakkapazität und gleichzeitig hohe Peakkapazitätsproduktionsrate erzielt wird. Dieses Konzept eignet sich daher ideal für Screenigläufe mit sehr hoher Zykluszeit (1 h und größer), weil die in den einzelnen Fraktionen gesammelten Teilproben durch die Modulation immer wieder refokussiert werden. Somit wird dem Verdünnungseffekt entgegengewirkt, gleichzeitig können zusätzliche Informationen über MS/MS-Experimente erhalten werden, die im Rahmen eines Suspected- oder Non-Target-Ansatzes wichtig sind, um eine eindeutige Zuordnung bzw. Identifizierung einer Verbindung vorzunehmen.

## **2.6 Untersuchung der Realproben**

### **2.6.1 Bestimmung der Retentionszeitstabilität**

Im weiteren Projektverlauf sollte die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss komplexe Matrices auf die Robustheit der Methode haben. Hierzu wurde zunächst die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten für die in den Realproben zudotierten Analyten für die in den Abschnitten 2.2.2.2 bis 2.2.2.4 beschriebenen Verfahren bestimmt. In Tabelle 17 sind die Retentionszeiten einer Dreifachmessung der Abwasser-Stichprobe aufgelistet. Weiterhin sind die relative Standardabweichung (RSD) der Retentionszeiten für die Wiederholmessungen und die Retentionszeit der Analyten im Standard ohne Matrix aufgeführt. Die Messungen wurden mit der in Abschnitt 2.2.2.2 aufgeführten Methode durchgeführt.

Tabelle 17: Retentionszeiten der Dreifachbestimmung der Abwasser-Stichprobe für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. Die Messungen erfolgten mit dem in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Verfahren (eindimensionale HPLC-MS-Kopplung mit einer Gradientenzeit von 30 Minuten).

| Paar Nr. | Substanz                 | Abwasser Stichprobe    |                        |                        |       | Mix 1                |
|----------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|----------------------|
|          |                          | t <sub>R,1</sub> / min | t <sub>R,2</sub> / min | t <sub>R,3</sub> / min | RSD % | t <sub>R</sub> / min |
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol | 16,79                  | 16,80                  | 16,80                  | 0,04  | 16,78                |
|          | 4-Methyl-1H-Benzotriazol | 16,60                  | 16,60                  | 16,61                  | 0,03  | 16,59                |
| 2        | Cyclophosphamid          | 17,49                  | 17,50                  | 17,50                  | 0,02  | 17,45                |
|          | Ifosfamid                | 17,16                  | 17,16                  | 17,16                  | 0,02  | 17,12                |
| 3        | Tramadol                 | 13,66                  | 13,67                  | 13,64                  | 0,12  | 13,67                |
|          | Desvenlafaxin            | 12,61                  | 12,61                  | 12,58                  | 0,12  | 12,67                |
| 4        | Diethylstilbestrol       | 25,61                  | 25,67                  | 25,65                  | 0,12  | 25,67                |
|          | Equilin                  | 25,24                  | 25,31                  | 25,14                  | 0,34  | 25,12                |
| 5        | Estron                   | 25,74                  | 25,74                  | 25,63                  | 0,26  | 25,59                |
|          | Trenbolon                | 24,12                  | 24,11                  | 24,05                  | 0,15  | 24,01                |
| 6        | Dehydroepiandrosteron    | 26,45                  | 26,46                  | 26,37                  | 0,18  | 26,36                |
|          | Testosteron              | 28,43                  | 28,47                  | 28,35                  | 0,20  | 28,31                |
| 7        | Dihydrotestosteron       | 29,09                  | 29,10                  | 28,98                  | 0,23  | 28,96                |
|          | Androsteron              | 29,80                  | 29,84                  | 29,70                  | 0,23  | 29,67                |
| 8        | Laktose                  | 4,54                   | 4,52                   | 4,58                   | 0,63  | 4,53                 |
|          | Saccharose               | 4,74                   | 4,74                   | 4,77                   | 0,42  | 4,74                 |
| 9        | Ofloxacin                | 11,92                  | 11,92                  | 11,90                  | 0,07  | 11,96                |
|          | Levofloxacin             | 15,04                  | 15,05                  | 15,04                  | 0,06  | 14,97                |
| 10       | Doxorubicin              | 15,39                  | 15,40                  | 15,39                  | 0,06  | 15,30                |
|          | Epirubicin               | 8,82                   | 8,81                   | 8,84                   | 0,17  | 8,83                 |
| 11       | lomeprol                 | 7,95                   | 7,94                   | 7,99                   | 0,38  | 7,95                 |
|          | Iopamidol                | 22,07                  | 22,09                  | 22,05                  | 0,10  | 21,99                |
| 12       | Corticosteron            | 22,60                  | 22,60                  | 22,56                  | 0,10  | 22,50                |
|          | Cortexolon               | 19,09                  | 19,12                  | 19,10                  | 0,06  | 19,01                |
| 13       | Cortison                 | 18,73                  | 18,75                  | 18,74                  | 0,04  | 18,67                |
|          | Prednisolon              |                        |                        |                        |       |                      |

Werden die RSD-Werte aus Tabelle 17 betrachtet, so ist ersichtlich, dass die Abweichungen weniger als < 1 % betragen. Auch die Retentionszeitunterschiede zwischen der Realprobe und dem Standard sind sehr gering. Die höchste Abweichung bei Vergleich der Retentions-

zeit des Standards mit dem Mittelwert der Retentionszeiten der Abwasserprobe ist bei Estron und Androsteron zu beobachten und beträgt 0,11 min, was in beiden Fällen einer Abweichung von lediglich 0,4 % entspricht. Weitere Daten für die übrigen Realproben sowie die verschiedenen Verfahrenskombinationen finden sich im Anhang in Kapitel 8.5.1. Für die 2D-LC wurde jede Umweltprobe nur einmal gemessen, so dass keine statistische Aussage möglich ist. Die Retentionszeit für das jeweilige Isobarenpaar in der 2D-LC wird durch Bestimmung der Retentionszeit auf der zweiten Dimension für die Fraktion mit dem intensivsten Signal festgelegt. Die Antrennung wird nicht weiter berücksichtigt, da sie in der komplexen Matrix nur schwer zu erkennen ist. Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Konstitutionsisomeren erfolgt lediglich bei Paar 2, 4, 12 und 13, da hierbei eine massenspektrometrische Unterscheidung der Komponenten möglich ist. Die in den Tabellen in Kapitel 8.5.1 angegebenen Ergebnisse für die relative Standardabweichung der Retentionszeiten belegen, dass die Abweichung in jedem Fall  $< 1,5 \%$  ist. Dies bedeutet, dass unabhängig von der verwendeten LC-Methode eine hohe Präzision in Bezug auf die Retentionszeitstabilität gegeben ist.

## **2.6.2 Abschätzung der Wiederfindung**

Des Weiteren wurde untersucht, wie hoch die Wiederfindung für die den Realproben zudozierten Targetanalyten ist. Da die Konzentration der Analyten im Reinststandard  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  betrug und die Realproben mit genau dieser Konzentration je Analyt dotiert wurden, erfolgte die Bestimmung der Wiederfindung über den Vergleich der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse von Probe und Standard. Hierfür wird der Mittelwert des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der jeweiligen Probe mit dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Standards verglichen. Tabelle 18 listet die Ergebnisse für die Wiederfindungsraten der verschiedenen Realproben auf. Die Messungen wurden mit der in Abschnitt 2.2.2.2 aufgeführten Methode durchgeführt.

Tabelle 18: Abgeschätzte Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Umweltproben über den Vergleich der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse von Probe und Standard.

| Paar Nr. | Substanz                 | Abgeschätzte Wiederfindungsrate / % |                     |                  |           |
|----------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|-----------|
|          |                          | Abwasser Stichprobe                 | Abwasser Mischprobe | Pflanzen-extrakt | HTC-Kohle |
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol | 24                                  | 26                  | 74               | 5         |
|          | 4-Methyl-1H-Benzotriazol | 42                                  | 40                  | 73               | 5         |
| 2        | Cyclophosphamid          | 117                                 | 133                 | 65               | 17        |
|          | Ifosfamid                | 45                                  | 45                  | 64               | 7         |
| 3        | Tramadol                 | 223                                 | 265                 | 205              | 38        |
|          | Desvenlafaxin            | 290                                 | 228                 | 115              | 50        |
| 4        | Diethylstilbestrol       | 47                                  | 56                  | 44               | 27        |
|          | Equilin                  | 40                                  | 56                  | 32               | 17        |
| 5        | Estron                   | 106                                 | 93                  | 26               | 35        |
|          | Trenbolon                | 109                                 | 103                 | 33               | 39        |
| 6        | Dehydroepiandrosteron    | 76                                  | 77                  | 87               | 52        |
|          | Testosteron              |                                     |                     |                  |           |
| 7        | Dihydrotestosteron       | 73                                  | 90                  | 59               | 47        |
|          | Etiocholanon             | 76                                  | 73                  | 53               | 52        |
|          | Androsteron              | 69                                  | 86                  | 51               | 48        |
| 8        | Laktose                  | 103                                 | 87                  | 171              | 33        |
|          | Saccharose               | 101                                 | 90                  | 576              | 61        |
| 9        | Ofloxacin                | 106                                 | 92                  | 42               | 17        |
|          | Levofloxacin             |                                     |                     |                  |           |
| 10       | Doxorubicin              | 117                                 | 125                 | 206              | 168       |
|          | Epirubicin               | 79                                  | 95                  | 141              | 85        |
| 11       | lomeprol                 | 94                                  | 80                  | 24               | 39        |
|          | Iopamidol                | 9                                   | 5                   | 29               | 44        |
| 12       | Corticosteron            | 57                                  | 63                  | 21               | 15        |
|          | Cortexolon               | 51                                  | 50                  | 31               | 14        |
| 13       | Cortison                 | 33                                  | 38                  | 32               | 5         |
|          | Prednisolon              | 73                                  | 80                  | 36               | 15        |

Zunächst ist anzumerken, dass die so ermittelten Werte nicht der tatsächlichen Wiederfindungsrate entsprechen. In diesem Fall hätten für alle Verbindungen die Intensitäten bzw. die Intensitätsverhältnisse unter Zuhilfenahme der entsprechenden isotoopenmarkierten Standards bestimmt werden müssen. Diese sind z. T. nicht kommerziell verfügbar bzw. sehr teuer. Zur Beantwortung der im Projektantrag definierten Fragestellung ist das vereinfachte Verfahren, wie in diesem Fall durchgeführt, ausreichend, denn die in Tabelle 18 aufgeführten Daten können dazu verwendet werden, eine Tendenz der unterschiedlich starken Matrixeinflüsse der Realproben zu erkennen. Mit wenigen Ausnahmen ist die Wiederfindungsrate der

zudotierten Isobaren in der HTC-Kohle am geringsten. Dies ist ein Indiz für die Ionensuppression und deutet darauf hin, dass der HTC-Extrakt im Vergleich zur Abwasserprobe und dem Pflanzenextrakt die meisten Verbindungen enthält. Dies bestätigt die bereits in Abschnitt 2.1.3 geäußerte Hypothese bez. der Komplexität des HTC-Extrakts.

Weitere Ergebnisse finden sich im Anhang in Kapitel 8.5.1. Werden die Wiederfindungsraten für die unterschiedlichen Verfahrensvarianten miteinander verglichen, so ist festzustellen dass die HTC-Kohle immer die stärksten Matrixeinflüsse zeigt. Aufgrund der starken Matrixeffekte kommt es zur Verringerung der Signalintensitäten der Targetanalyten, so dass nicht alle im Standard detektierbaren Analyten auch in den Realproben wiedergefunden werden. Eine Übersicht über die Substanzen, die in den Realproben nicht wiedergefunden werden, ist in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Auflistung der Substanzen die im Standard detektiert, in den Realproben jedoch nicht wiedergefunden werden konnten.

| <b>Verfahrensvariante</b>  | <b>Abwasser Stichprobe</b> | <b>Abwasser Mischprobe</b> | <b>Pflanzenextrakt</b> | <b>HTC-Kohle</b>                           |
|--|----------------------------|----------------------------|------------------------|--|
| HPLC-MS-Kopplung<br>30 min Gradient<br>Siehe Abschnitt 2.2.2.2             | -                          | -                          | -                      | -  |
| HPLC-MS-Kopplung<br>2 h Gradient<br>Siehe Abschnitt 2.2.2.3                | -                          | -                          | -                      | -  |
| HPLC-MS-Kopplung<br>30 min Gradient<br>Siehe Abschnitt 2.6.3.1             | -                          | -                          | Paar 9                 | Paar 8                                     |
| 2D-LC<br>1D: Hypercarb + Cyano<br>2D: CoreShell<br>Siehe Abschnitt 2.5.2.1 | -                          | -                          | Paar 5,<br>Paar 11     | Equilin,<br>Paar 5,<br>Paar 11,<br>Paar 13 |
| 2D-LC<br>1D: Cyano<br>2D: CoreShell<br>Siehe Abschnitt 2.5.2.1             | Equilin,<br>Laktose        | Equilin,<br>Laktose        | Laktose,<br>Paar 11    | Equilin,<br>Laktose,<br>Paar 11            |

Anhand der Daten lassen sich folgende Erkenntnisse ableiten. Die Ausdehnung des Gradientenfensters von 30 Minuten auf zwei Stunden hat keine Auswirkungen auf die Anzahl der detektierten Peakpaare. Diese Messungen wurden auf einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt, das eine im Vergleich zu den derzeit auf dem Markt erhältlichen Systemen mindestens um einen Faktor 10 geringere Sensitivität aufweist. Zwar wurde das Injektionsvolumen für die beiden Verfahrensvarianten konstant gehalten, jedoch hat der durch die serielle Säulenkopplung hervorgerufene Verdünnungseffekt keine Auswirkungen auf die Erfassung der Target-Analyten. Wird demgegenüber ein Flugzeitmassenspektrometer der aktuellen Geräteserie verwendet, so kann jeweils ein Isobarenpaar im Pflanzenextrakt (Paar 9) und der HTC-Kohle (Paar 8) nicht detektiert werden. Dies bestätigt zum einen erneut die o. a. Schlussfolgerung, dass der Pflanzenextrakt und die HTC-Kohle

eine wesentlich komplexere Matrix darstellen als die Abwasserprobe, zum anderen wird ersichtlich, dass Flugzeitmassenspektrometer immer noch eine geringere Sensitivität aufweisen als Triple-Quadrupol-Massenspektrometer.

Werden die Ergebnisse für die miniaturisierte 2D-LC mit den übrigen Ergebnissen verglichen, so bestätigt sich die Aussage hinsichtlich der Komplexität der verschiedenen Realproben, da auch in diesem Fall für den Extrakt der HTC-Kohle einige Substanzpaare nicht detektiert werden. Gleichzeitig wird ersichtlich, dass durch die Miniaturisierung weniger Target-Analyten erfasst werden, als wenn die Analyse mit konventionellen 1D-LC-Verfahren erfolgt. Allerdings beträgt das absolute Injektionsvolumen nur 450 nL und ist somit um den Faktor 11 geringer als bei den 1D-LC-Verfahren. Darüber hinaus erfolgt durch die Modulation in der umfassenden 2D-LC nochmals eine Verdünnung.

## 2.6.3 Durchführung einer Feature Analyse

### 2.6.3.1 Experimentelle Durchführung

Im Rahmen einer Feature-Analyse sollte ermittelt werden, wie viele potenzielle Verbindungen in den Realproben enthalten sind. Die Proben wurden hierzu mittels 1D-LC-HRMS-Kopplung gemessen. Die HPLC-Parameter können den in Abschnitt 2.2.2.2 aufgeführten Erläuterungen entnommen werden. Die massenspektrometrischen Parameter sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Parameter der MS-Methode für das Agilent Q-TOF 6545.

|                        |                                    |
|------------------------|------------------------------------|
| Ion Source             | Dual AJS ESI                       |
| Acquisition Mode       | Auto MS2                           |
| MS Range               | <i>m/z</i> 100 bis <i>m/z</i> 4000 |
| MS Scan Rate           | 5 spectra / sec                    |
| MS / MS Scan Rate      | 5 spectra / sec                    |
| Fixed Collision Energy | 20 V                               |
| Ion Polarity           | positiv                            |

Der große Massenbereich bis *m/z* 4000 wurde gewählt, um möglichst viele Informationen zu erhalten und somit eine retrospektive Datenauswertung zu ermöglichen, die auch nach Abschluss des Forschungsvorhabens jederzeit durchgeführt werden kann. In Abbildung 39 ist der Aufbau der HPLC-HRMS-Kopplung im Labor der Forschungseinrichtung 1 wiedergegeben.



Abbildung 39: HPLC-HRMS-Kopplung im Labor der Forschungseinrichtung 1. Linke Bildseite: LC 1260 der Firma Agilent; rechte Bildseite: 6545 QTOF der Firma Agilent.

### 2.6.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Komplexität der verschiedenen Matrizes ist in Abbildung 40 zu erkennen, in der die mittels Q-TOF aufgenommenen Totalionenstrom-Chromatogramme (TIC) der Abwasser Stichprobe, des Pflanzenextraktes und der HTC-Kohle wiedergegeben sind. Hierbei ist zu erkennen, dass die Abwasser-Probe einige markante Signale aufweist, die im TIC als chromatografischer Peak hervortreten (z. B. Signal bei einer Retentionszeit von etwa 18 Minuten). Ansonsten steigt der Signaluntergrund mit Zunahme der Retentionszeit kontinuierlich an. Im Gegensatz zur Abwasserprobe weisen sowohl der TIC des Pflanzenextraktes als auch der TIC der HTC-Kohle keine markanten und sich vom Untergrund heraushebenden Signale auf. Während die Komplexität der Abwasserprobe mit dem Pflanzenextrakt vergleichbar ist, wenn nur der TIC betrachtet wird, sticht der Extrakt der HTC-Kohle deutlich hervor. Dies ist an der ausgeprägten Zunahme des Signaluntergrundes in einem Retentionszeitbereich zwischen 5 und 25 Minuten gegenüber den anderen beiden Matrizes zu erkennen. Obwohl der TIC nur als rein qualitatives Merkmal für die Bewertung der Komplexität einer Matrix herangezogen werden kann, sind diese Beobachtungen voll mit den Ergebnissen der Tabelle 18 in Einklang.

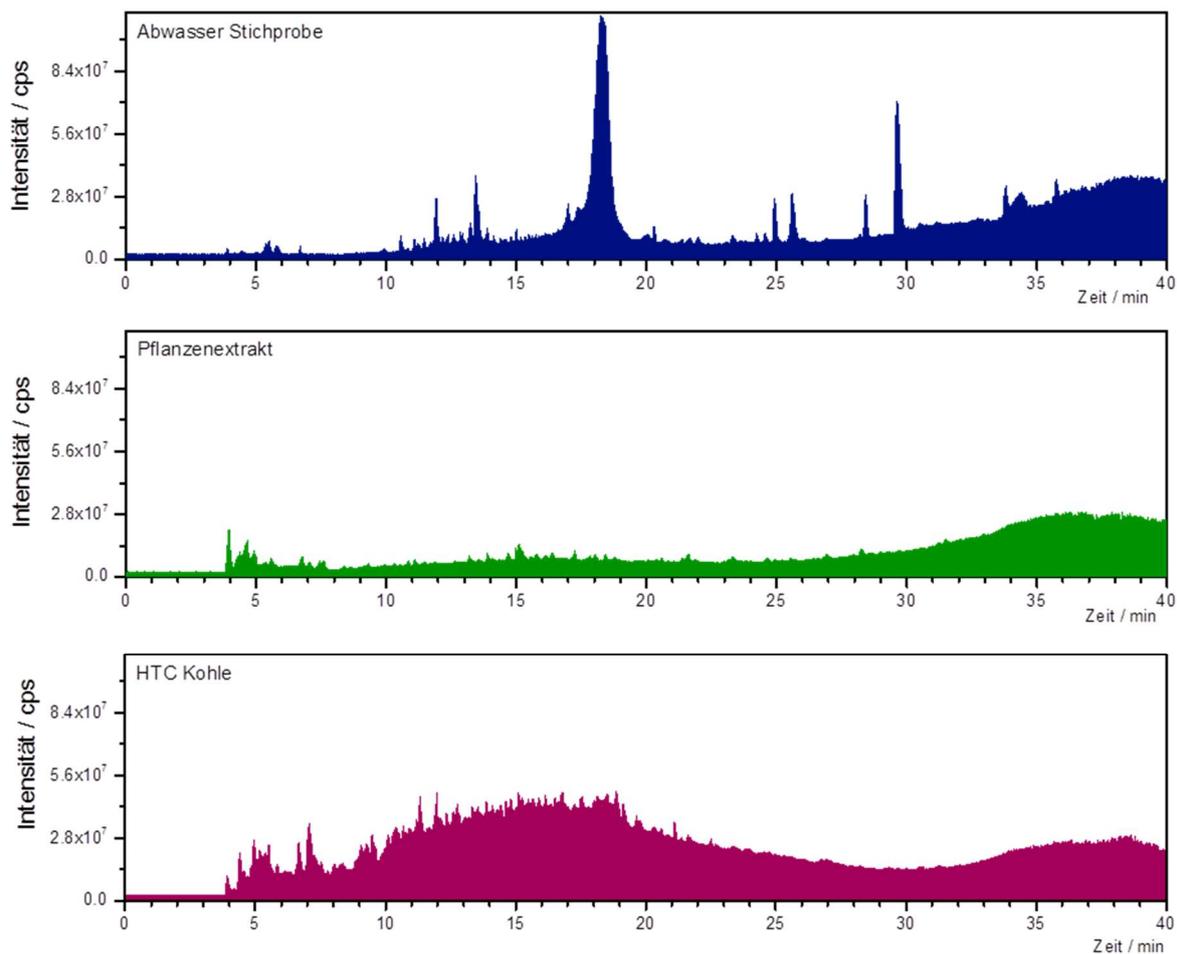


Abbildung 40: Darstellung der Totalionenstrom-Chromatogramme für die mit den Targetanalyten dotierten Realproben. Die Messungen erfolgten mit dem in Abschnitt 2.6.3.1 beschriebenen Verfahren.

Anhand einer Feature Analyse wurde bestimmt, wie viele potenzielle Verbindungen in den entsprechenden Proben enthalten sind. Hierzu wurden aus dem TIC alle Masse-zu-Ladungsverhältnisse extrahiert, die einem Peak entsprechen, dabei wurde kein Declustering bezüglich Isotopenpeaks und Adduktpeaks durchgeführt. Generell kann die Feature-Analyse auf drei verschiedene Arten durchgeführt werden: a) einfache Featureanalyse, hier wird bereits ab einem Datenpunkt von einem Feature gesprochen, die Bestimmung ist relativ unspezifisch; b) Die Bestimmung als Peaks, in der Regel werden mindestens drei Datenpunkte pro Feature verlangt; c) Die Bestimmung als Buckets, hier werden mehrere Features einer Substanz zugeordnet, es fließen weitere Nebeninformationen wie Isotopenpeaks und Addukte mit ein. Um die Zentruiden-Bestimmung der TICs durchzuführen, müssen im ersten Schritt die in MassHunter generierten Daten mittels MSConvert in das .mzxml-Format umgewandelt werden. Die Datenprozessierung wurde in MZmine 2.0 durchgeführt. Für das Peakpicking muss ein Schwellenwert für das Grundrauschen im TIC der Realproben festgelegt werden. Für alle Proben betrug dieser Wert 50 000 cps. Weitere Einstellungen für die Peakdetektion waren eine Filtereinstellung für MS 1 Daten im Zentruid-Modus, das Retentionszeitfenster

betrug 0,003 – 40 min und nur Peaks wurden bestimmt. Zur weitergehenden Analyse des Signals bei ca. 18 min der Abwasserstichprobe (Abbildung 40) wurde zudem der TIC normiert, um das Rauschen zu reduzieren. Dabei wird deutlich, dass es sich bei diesem Peak nicht um eine einzelne Substanz handelt, sondern um ein großes Cluster von verschiedenen Einzelstoffen. Das Hauptsignal hat dabei das Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) von 718,44. Eine Identifikation dieser Substanz durch einen Abgleich mit den Datenbanken FOR-IDENT und MetFrag (Massentoleranz  $\leq 5$  ppm) unter Verwendung des korrespondierenden MS2-Spektrums war nicht möglich.

In den Abbildung 41-43 sind die als chromatografische Peaks erkannten Signale in einer zweidimensionalen Auftragung von Masse-zu-Ladung gegen die Retentionszeit wiedergegeben. Insgesamt wurden für die Abwasserprobe 1957 Features, für den Pflanzenextrakt 597 Features und für die HTC-Kohle 2266 Features erkannt.

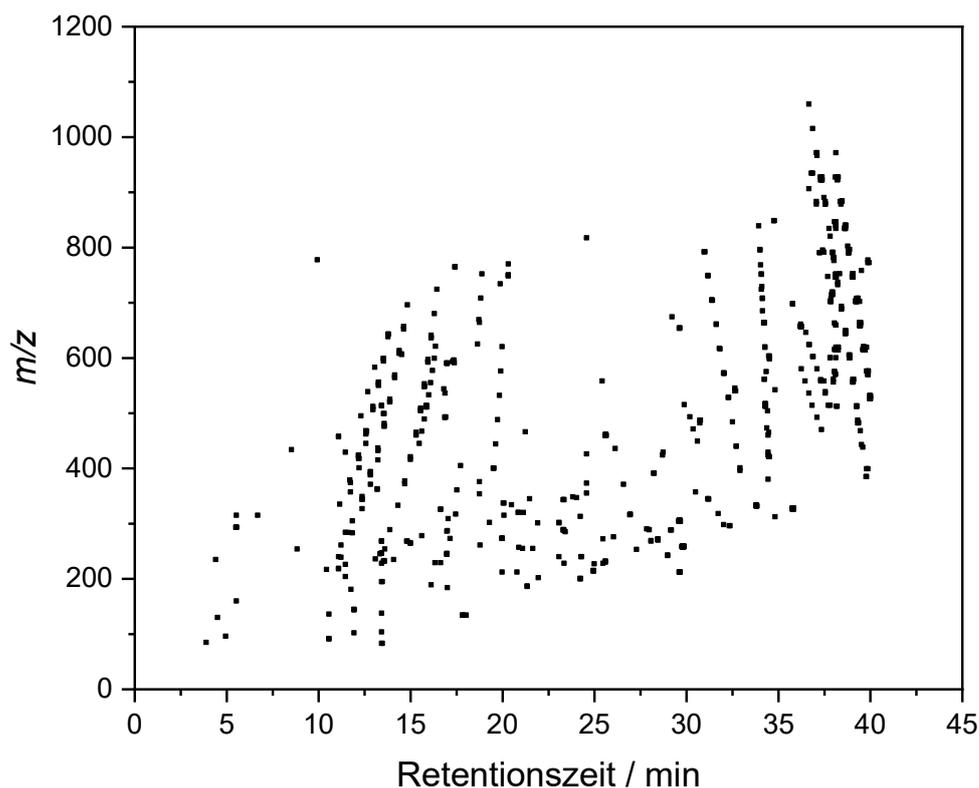


Abbildung 41: Feature-Analyse der Abwasserprobe. Dargestellt sind die aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm extrahierten Massenspuren, die eindeutig als chromatografische Peaks zugeordnet werden konnten. Für weitere Erläuterungen: siehe Text.

Es ist deutlich zu erkennen, dass im gesamten Retentionszeitfenster ein breiter Massenbereich detektiert wird, der sich von  $m/z$  100 bis  $m/z$  800 erstreckt. Zu Beginn des Gradienten bis zu einer Laufzeit von 10 Minuten werden nur vereinzelt Verbindungen detektiert. Dies

deutet darauf hin, dass nur wenige sehr polare Komponenten erfasst wurden. Da die Proben über eine Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) angereichert worden sind liegt die Vermutung nahe, dass polare Verbindungen gegenüber hydrophoben Komponenten diskriminiert wurden. Dies ist nach wie vor ein großes Problem bei der Bewertung von Abwasserreinigungstechnologien zur Entfernung von Spurenstoffen. Um Konzentrationen im unteren Nanogramm-pro-Liter Bereich bestimmen zu können, ist eine Direktinjektion der Probe ohne vorherige Anreicherung nicht möglich. Durch die vorgeschaltete Anreicherung mittels SPE kommt es zu Verlusten insbesondere der polaren Fraktion. Dies erfordert neue Strategien über eine Multiphasen-Anreicherung, bei der unterschiedliche Sorbentien verwendet werden, um sowohl polare, ionische als auch hydrophobe Verbindungen zu erfassen.

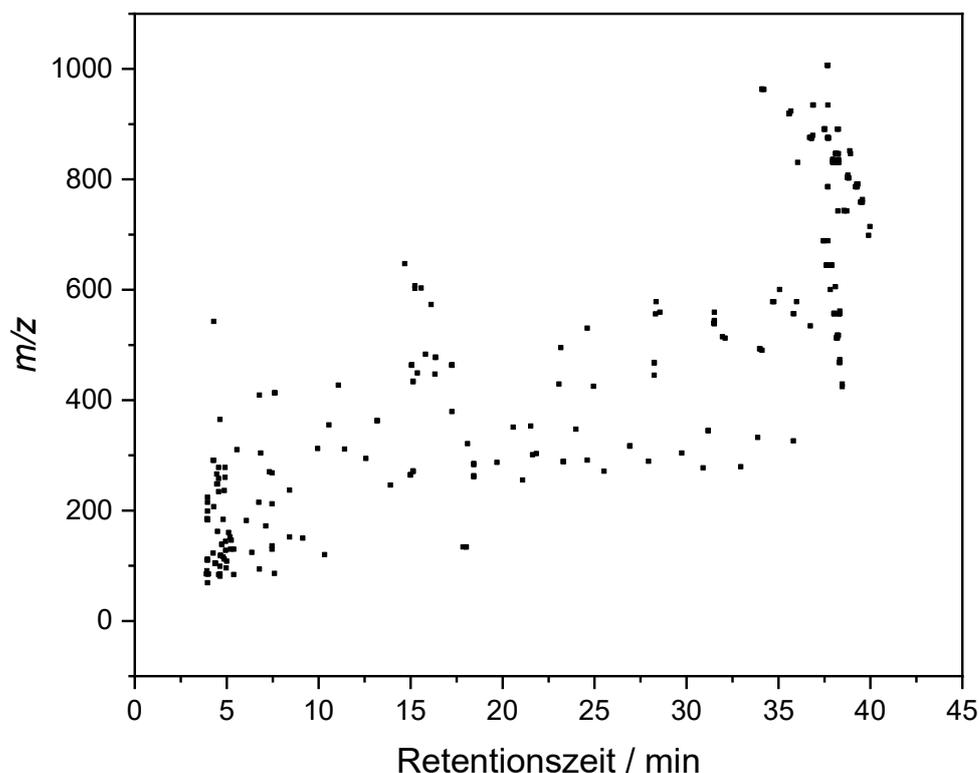


Abbildung 42: Feature-Analyse des Pflanzenextrakts. Dargestellt sind die aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm extrahierten Massenspuren, die eindeutig als chromatografische Peaks zugeordnet werden konnten. Für weitere Erläuterungen: siehe Text.

Im Gegensatz zur Abwasserprobe fällt bei Betrachtung der extrahierten Massenspuren für den Pflanzenextrakt in Abbildung 42 auf, dass eine deutlich größere Anzahl an polaren Verbindungen erfasst wird, da innerhalb des Retentionszeitfensters zwischen 4 und 10 Minuten ein Peakcluster beobachtet wird. Im anschließenden Elutionsbereich wird dann eine relativ gleichmäßige Verteilung an Peaks beobachtet. Darüber hinaus ist der detektierte Masse-zu-

Ladungsbereich im Vergleich zur Abwasserprobe deutlich kleiner, die meisten Verbindungen erstrecken sich über den Bereich  $m/z$  100 bis  $m/z$  500.

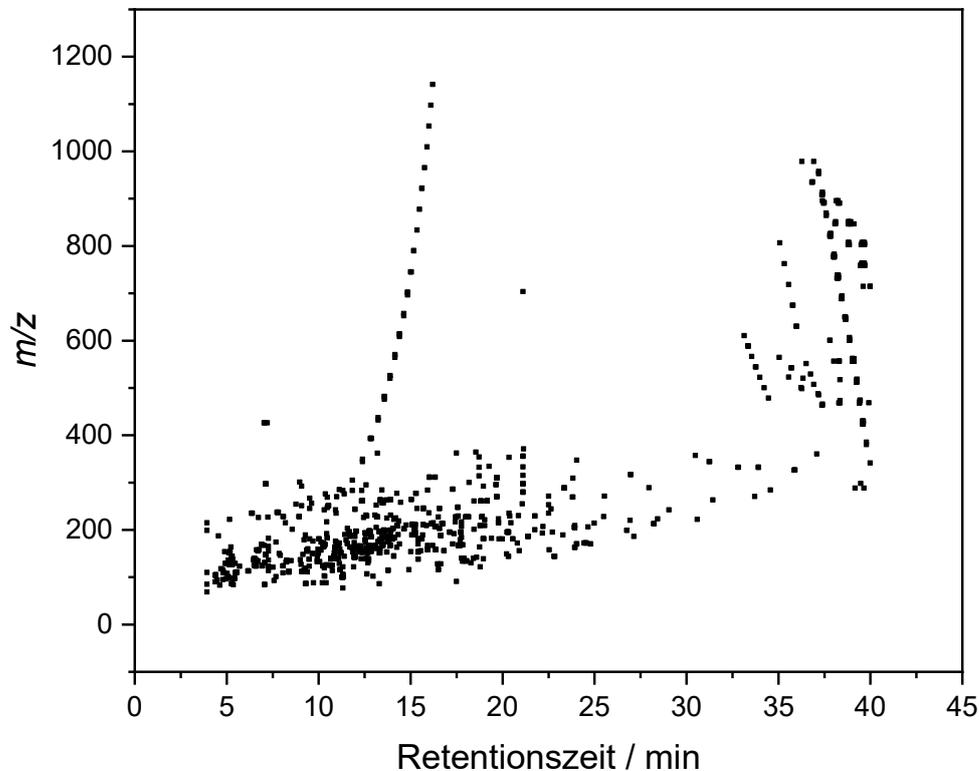


Abbildung 43: Feature-Analyse des Extrakts der HTC-Kohle. Dargestellt sind die aus dem Totalionenstrom-Chromatogramm extrahierten Massenspuren, die eindeutig als chromatografische Peaks zugeordnet werden konnten. Für weitere Erläuterungen: siehe Text.

Die in Abbildung 43 dargestellte Feature-Analyse für den Extrakt der HTC-Kohle zeigt, dass sich der detektierte Masse-zu-Ladungsbereich von etwa  $m/z$  75 bis  $m/z$  300 erstreckt. Darüber hinaus eluieren eine Vielzahl an Verbindungen zwischen 3 und 10 Minuten. Dies ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass durch die hohen Temperaturen des HTC-Prozesses niedermolekulare Abbauprodukte entstehen, die zudem relativ polar sind. Auffällig ist die homologe Reihe, die im Retentionszeitfenster zwischen 10 und 15 Minuten einen  $m/z$ -Bereich von ca. 300 bis 1.100 umfasst. Über einen Non-Target Ansatz wurde versucht, die homologe Reihe einer Substanzklasse zuzuordnen. Jeder Peak der homologen Reihe entspricht einem Massenverlust von  $m/z$  44. Dieser könnte durch eine mehrfache Decarboxylierung ( $\text{CO}_2$ -Abspaltung), den Verlust von  $\text{CH}_2\text{CHO}+\text{H}^+$ , wobei das  $\text{H}^+$  Ion durch eine Umlagerung gebildet wurde, die den Transfer eines Wasserstoffatoms von einem anderen Teil des Moleküls umfasst, oder der Abspaltung von  $\text{CH}_3\text{CH-NH}_2$  herrühren. Huminsäuren sind in der Lage, alle drei Abspaltungs- und Fragmentierungsreaktionen durchzuführen und dabei über eine ausreichende Größe zu verfügen, um die homologe Reihe erklären zu können. Abbildung 44

zeigt die Strukturformel einer typischen Huminsäure, welche vor allem in Torfböden, Humus und Braunkohlen vorkommt und beim Abbau organischer Materialien entstehen kann.

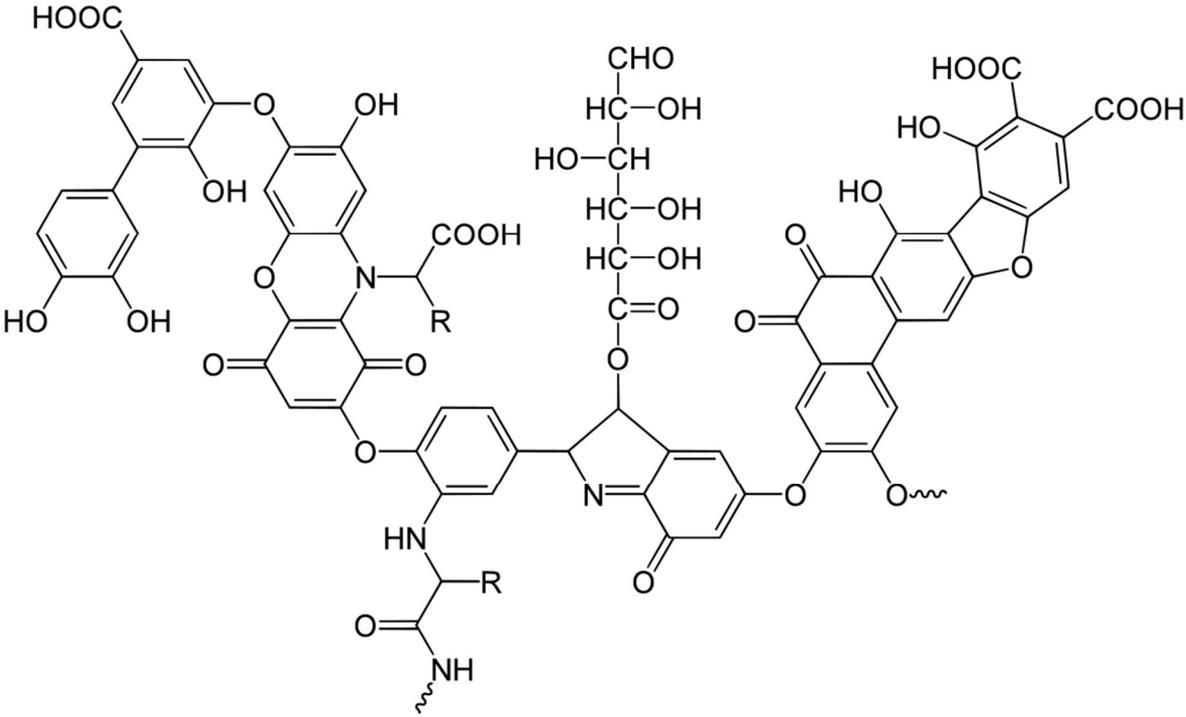


Abbildung 44: Beispiel einer Huminsäure.

## 2.7 Vergleich der Leistungsfähigkeit zwischen 1D-LC- und 2D-LC-IM-MS

### 2.7.1 Bestimmung der Ionensuppression

Um die Trennleistung des entwickelten LC + LC-ESI-IM-HRMS-Systems zu demonstrieren, wurden die in Abschnitt 2.1.2 aufgeführten Realproben, alle dotiert mit  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  Cyclophosphamid und Ifosfamid mit der gleichen analytischen Methode analysiert. In Abbildung 45 sind die Contourplots der LC + LC-Analysen aller drei Proben dargestellt.

Die x- und y-Achse zeigen jeweils die Trennung in der ersten (120 min) bzw. zweiten Dimension (240 s). Alle vier Minuten wird eine Fraktion der ersten Dimension zur Trennung auf die zweite Dimension injiziert. Dies führt zu den Contourplots, wie in Abbildung 45 gezeigt, in denen Verbindungen, die als Linien dargestellt sind, in der zweiten Dimension (y-Achse) in vier Minuten getrennt sind. Aus der Darstellung in Abbildung 45 geht hervor, dass Cyclophosphamid und Ifosfamid aus der ersten Dimension zwischen 16 und 20 Minuten eluiert wurden und zwischen 20 und 24 Minuten in der zweiten Dimension getrennt werden (Abbildung 45, oben, Mitte und unten). Jede Linie des Contourplots ist ebenfalls in der dritten Dimension getrennt (Ionenmobilitätsspektrometrie), was eine elektrophoretische Trennung in der Gasphase und somit eine echte orthogonale Trennung im Vergleich zur Chromatografie darstellt.

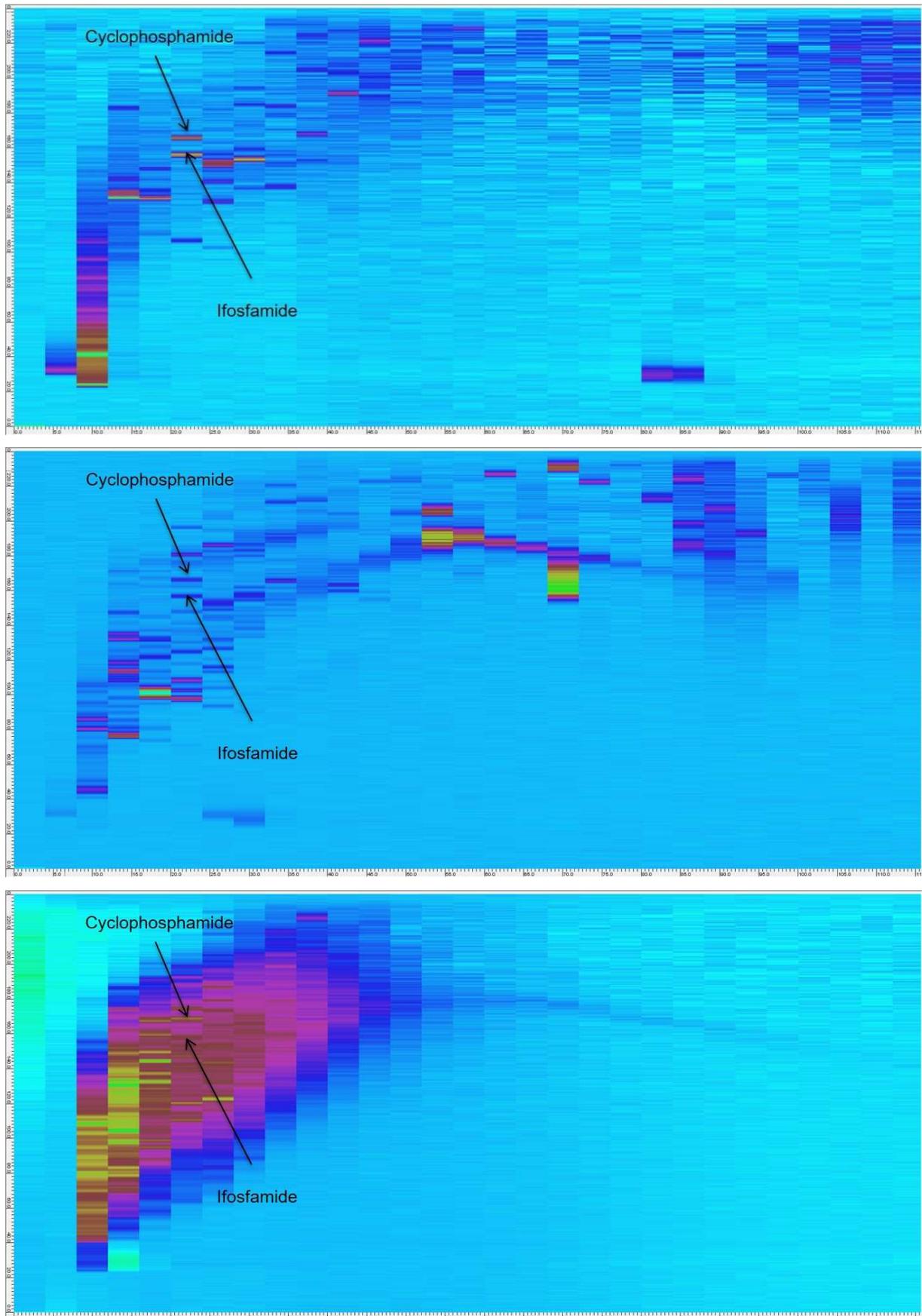


Abbildung 45: Contourplot der LC + LC Analyse des Extrakts einer chinesischen Heilpflanze (oben), eines Abwassers (Mitte) und einer Biokohle (unten), jeweils mit Cyclophosphamid und Ifosfamid dotiert.

Abbildung 46 zeigt die Trennung der Biokohleprobe von der Fraktion, die in der zweiten Dimension zwischen 16 und 20 min getrennt wurde (schwarzes Rechteck). Die Driftzeit wird in ms (x-Achse) und die Retentionszeit in der zweiten Dimension in min (y-Achse) angegeben.

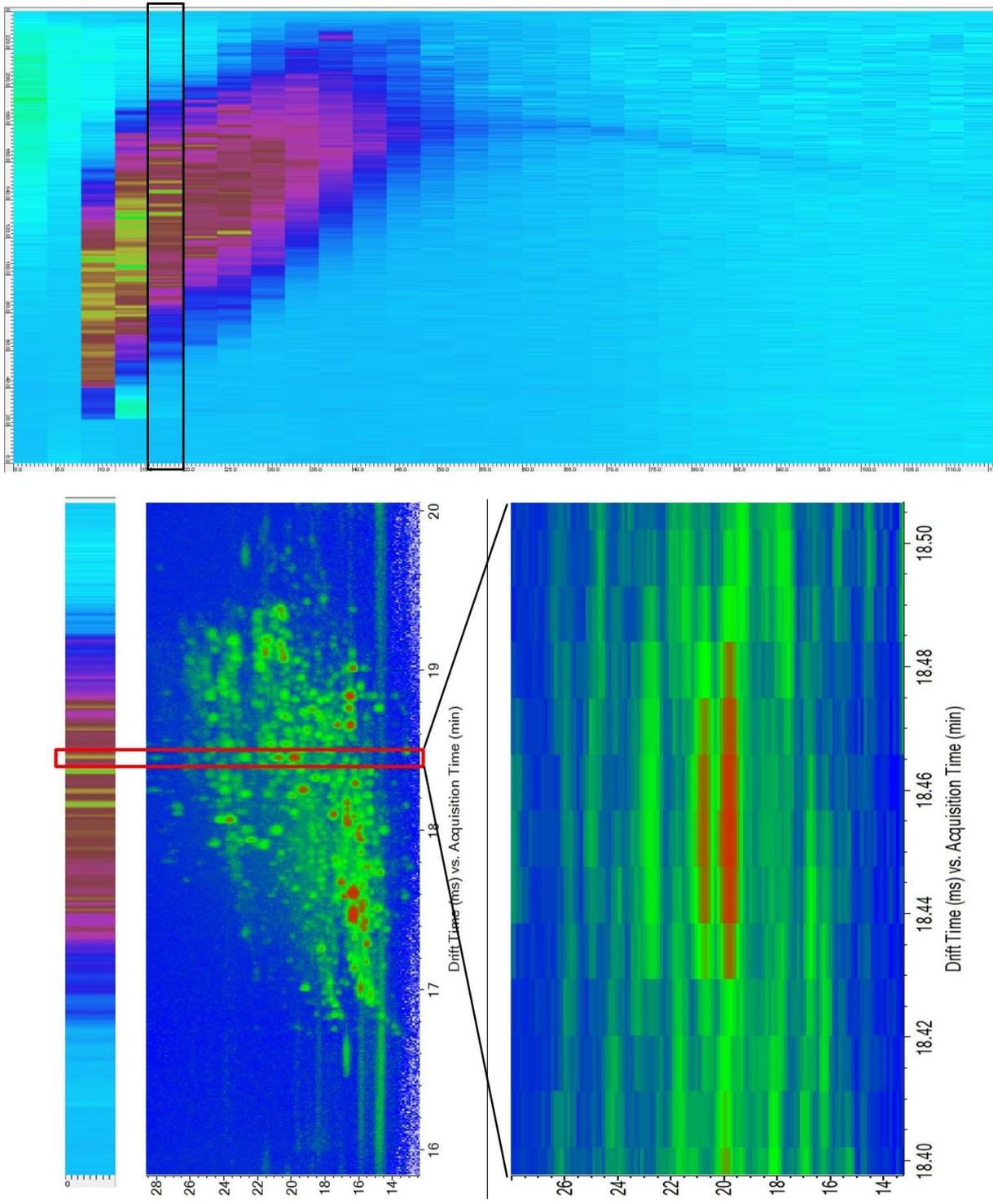


Abbildung 46: Teil des LC + LC-Contourplots (links), der Heatmap (Mitte) und des erweiterten Teils (rotes Rechteck) der Heatmap (rechts) der Biokohleanalyse mit LC + LC-ESI-IM-HRMS.

Zusätzlich zu der in Abbildung 46 gezeigten Trennung wird für jeden Punkt in der Heatmap eine weitere Trennung gemäß dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Analyten im Massenanalysator erhalten. Abbildung 47 zeigt die Massenspektren einiger Spots aus dem Ausschnitt der Heatmap in Abbildung 46 (rechts). Dargestellt ist ein Ausschnitt von 6 s (zwischen 18,40 und 18,50 min) einer 60-minütigen Analyse des HTC-Extrakts. In diesen 6 s sind mehr als 12 Signale in der Driftröhre getrennt und als Beispiel sind fünf resultierende reine Massenspektren dieser Verbindungen in Abbildung 47 gezeigt. Die reinen Spektren führen zu einer leichteren Identifizierung der Analyten und vereinfachen die automatische Merkmalsuche.

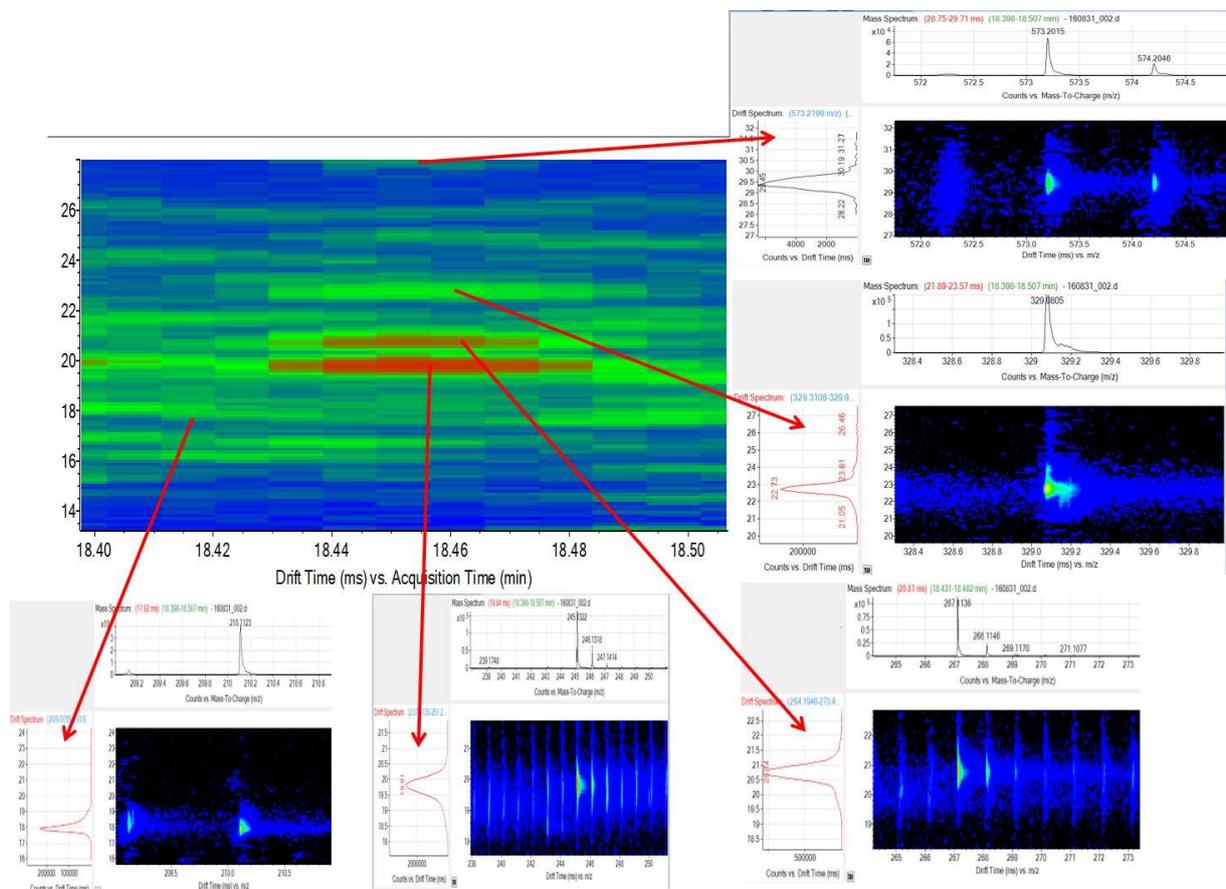


Abbildung 47: Fünf Massenspektren von insgesamt mehr als 12 Signalen in der erweiterten Heatmap des HTC-Extrakts mit LC + LC-ESI-IM-HRMS.

Jede dotierte Probe wurde dreimal analysiert und in Tabelle 21 sind die durchschnittliche Retentionszeit und die Peakflächen zusammen mit der relativen Standardabweichung (RSD) in % aufgeführt. Die letzte Retentionszeit, die in Tabelle 21 für jede Substanz angegeben ist, ist die Summe der Retentionszeiten der ersten Dimension (vier Minuten Modulationszeit multipliziert mit der Fraktionszahl) und der Retentionszeit in der zweiten Dimension. Die Retentionszeiten und auch die Flächen sind für mehrere Injektionen und von Tag zu Tag gut reproduzierbar.

Tabelle 21: Retentionszeit und Fläche mit RSD der beiden dotierten Standards in drei verschiedenen komplexen Proben nach Analyse mit LC + LC-IM-HRMS.

| Substanz        | Pflanze            |                | Abwasser           |                | Biokohle           |                |
|-----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|
|                 | RT (min) ± RSD (%) | Area ± RSD (%) | RT (min) ± RSD (%) | Area ± RSD (%) | RT (min) ± RSD (%) | Area ± RSD (%) |
| Cyclophosphamid | 22,82 ± 0,0        | 444319 ± 5,8   | 22,82 ± 0,0        | 4373973 ± 1,2  | 22,82 ± 0,0        | 2517088 ± 7,3  |
| Ifosfamid       | 22,66 ± 0,0        | 5417863 ± 5,5  | 22,67 ± 0,0        | 4365486 ± 3,4  | 22,66 ± 0,0        | 2594920 ± 7,7  |

Durch die bessere Abtrennung der Matrix von den Zielanalyten CP und IF mittels des LC + LC-Ansatzes sollte die Ionensuppression reduziert werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Peakflächen beider Referenzsubstanzen in allen drei Proben mit den Peakflächen der Referenzsubstanzen in reinem Wasser (jeweils 500 ng mL<sup>-1</sup>) verglichen. Um die Ionensuppression zu bestimmen, wurden die Flächen in der komplexen Probe durch die Flächen in reinem Wasser geteilt. Alle Werte unter 1 zeigen an, dass eine Ionensuppression vorliegt. Zusätzlich wurde eine eindimensionale HPLC-Methode mit einer Gradientenzeit von 30 Minuten sowie dem gleichen Detektor und der gleichen Ionenquelle durchgeführt, um alle Proben zu analysieren und die Ionensuppression zu bestimmen (Tabelle 22).

Tabelle 22: Vergleich der Ionensuppressionen unter Anwendung der 1D-LC versus LC + LC.

| Substanz        | LC      |          |          | LC + LC |          |          |
|-----------------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|
|                 | Pflanze | Abwasser | Biokohle | Pflanze | Abwasser | Biokohle |
| Cyclophosphamid | 0,58    | 0,60     | 0,16     | 0,96    | 0,95     | 0,55     |
| Ifosfamid       | 0,55    | 0,61     | 0,16     | 0,93    | 0,75     | 0,45     |

Die Daten belegen, dass die Ionensuppression durch Anwendung des LC + LC-Verfahrens drastisch reduziert ist. Außerdem kann beobachtet werden, dass der HTC-Extrakt zu der höchsten Ionensuppression führt. Für die Pflanzen- und Abwasserprobe zeigen die LC + LC-Ergebnisse, dass eine externe Kalibrierung aufgrund der höheren Trennleistung von LC + LC möglich wäre, verglichen mit 1D-LC. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Analyzeit der LC + LC im Vergleich zu 1D-LC ebenfalls höher ist.

## 2.7.2 Identifizierung von Inhaltsstoffen über die CCS-Datenbank

Nach der Analyse mit LC + LC-IM-HRMS kann eine Feature-Suche durchgeführt werden, bei der zu jedem Feature die Collision Cross Section aus der Driftzeit über die Single-Field Methode berechnet wird. Die in diesem Forschungsvorhaben aufgebaute CCS-Demonstrations-Datenbank bietet wie bereits gezeigt die Möglichkeit, Non-Target Analysen durchzuführen, in denen vorab keine Informationen zu den Inhaltsstoffen einer Probe bekannt sind. Dabei werden komplexe Proben mittels HPLC- oder LC + LC-IM-HRMS getrennt und Inhaltsstoffe über deren exakte Masse und den CCS-Wert identifiziert. Limitierend ist dabei die Größe der Datenbank, die nach und nach erweitert werden muss. Da bisher unter anderem eine große Zahl an abwasserrelevanten Substanzen wie Pharmazeutika und Pestizide darin enthalten ist, wird im Folgenden eine Non-Target Screening von Abwasser mit eindimensionaler HPLC-IM-HRMS und mit zweidimensionaler LC + LC-IM-HRMS beschrieben.

Anthropogene Substanzen wie Pharmazeutika, Pestizide und kosmetische Produkte werden in die Umwelt freigesetzt und gelangen so in den Wasserkreislauf. Verschiedene Wasserproben haben unterschiedlich komplexe Matrices und können tausende verschiedener Kontaminanten enthalten, die nach Möglichkeit mit einer analytischen Non-Target Methode [54] in kurzer Zeit umfassend identifiziert werden sollen [55]. Am häufigsten werden zurzeit LC-MS Systeme, oft mit hochauflösender Massenspektrometrie, für die Analyse dieser Kontaminanten und deren Metabolite [56]–[58] in Abwasser und natürlichen Gewässern [54], [59] eingesetzt.

Für die Untersuchungen wurde die in 2.1.2 beschriebene Abwasserprobe verwendet. Abbildung 48 zeigt die Heatmap einer Trennung dieser Probe mit HPLC-IM-HRMS.

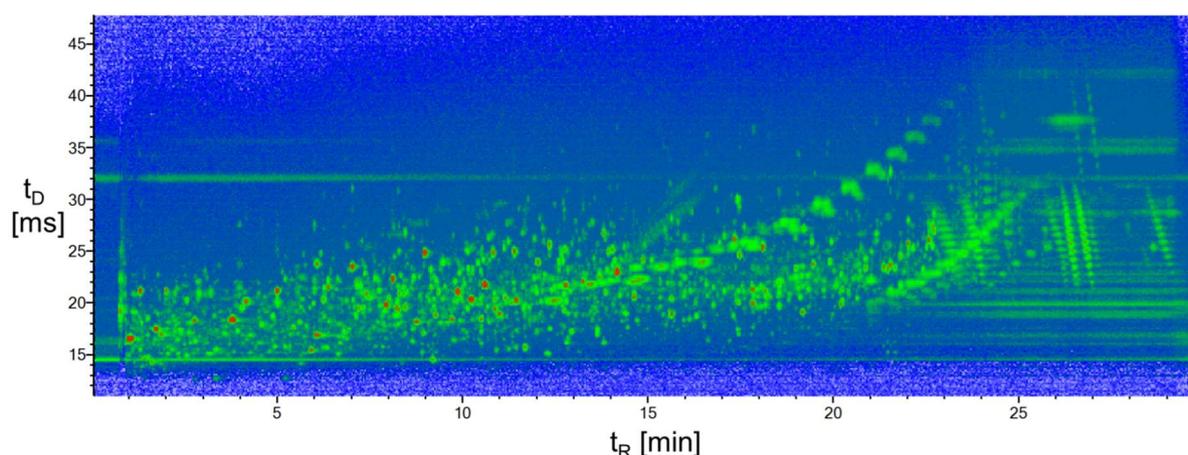


Abbildung 48: Heatmap der LC-IM-HRMS Analyse (ESI pos.) von Abwasser.

Eine Feature-Analyse mit anschließender Suche in der CCS-Datenbank ( $m/z \pm 5$  ppm und  $\Omega \pm 1$  %) ergab 22 verschiedene Komponenten, von denen 19 als  $[M+H]^+$ -Addukte und 3 als  $[M+Na]^+$ -Addukte identifiziert wurden (s. Tabelle 23). Alle Substanzen konnten Gruppen von

Pharmazeutika oder Pestiziden und bekannten Metaboliten davon zugeordnet werden. Als Beispiel für die Unterscheidung von Isobaren kann hier Tramadol genannt werden. Allein die exakte Masse (263,1885 Da) könnte sowohl Tramadol als auch der Substanz Desvenlafaxin, die die gleiche Summenformel besitzt, zugeordnet werden. Da dieses Substanzpaar aber anhand ihrer CCS-Werte unterschieden werden kann, ergab die Datenbanksuche hier eindeutig Tramadol. Dass hier drei Peaks als Tramadol erkannt wurden (6,82, 8,37 und 10,25 Minuten) könnte damit erklärt werden, dass die Probe noch weitere strukturell sehr ähnliche Substanzen enthält, die in der Datenbank bisher nicht bekannt sind. Für das Signal bei 18,56 Minuten ist eine Unterscheidung zwischen den beiden isobaren Substanzen Estron und Trenbolon (270,1620 Da) nicht möglich, da deren Stoßquerschnitte zu ähnlich sind. Auch wenn die Abweichung der CCS-Werte von Trenbolon mit 0,0 % besser ist als von Estron (0,5 %), kann hier keine sichere Aussage getroffen werden, da beide Treffer im Toleranzbereich von 1 % liegen.

Tabelle 23: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC-IM-HRMS Analyse von Abwasser mit  $\Delta m/z = \pm 5$  ppm und  $\Delta \Omega = \pm 1$  %; die angegebene exakte Masse und  $\Omega$  entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben, zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt.

| $t_R$<br>(min) | Exakte<br>Masse<br>(Da) | $\Delta m/z$<br>(ppm) | Addukt          | $\Omega$<br>(Å <sup>2</sup> ) | $\Delta \Omega$<br>(%) | Substanz                    | Gruppe               |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 2,81           | 164,0950                | 0,0                   | H <sup>+</sup>  | 133,6                         | 0,0                    | Fenuron                     | Herbizid             |
| 6,82           | 263,1885                | 0,8                   | H <sup>+</sup>  | 161,1                         | 0,4                    | Tramadol                    | Analgetikum          |
| 8,24           | 231,1008                | -3,4                  | H <sup>+</sup>  | 149,9                         | -0,2                   | 4-Formyl-<br>aminoantipyrin | Metabolit            |
| 8,37           | 263,1885                | 0,4                   | H <sup>+</sup>  | 161,1                         | 0,5                    | Tramadol                    | Analgetikum          |
| 8,67           | 290,1379                | 2,1                   | H <sup>+</sup>  | 174,0                         | -0,3                   | Trimethoprim                | Analgetikum          |
| 9,86           | 265,1579                | 3,0                   | H <sup>+</sup>  | 159,7                         | -0,1                   | Mirtazapin                  | Antidepressivum      |
| 10,25          | 263,1885                | -0,4                  | H <sup>+</sup>  | 161,1                         | -0,2                   | Tramadol                    | Analgetikum          |
| 10,62          | 267,1834                | -2,2                  | H <sup>+</sup>  | 172,2                         | -0,1                   | Metoprolol                  | Betablocker          |
| 11,21          | 278,0837                | 1,8                   | H <sup>+</sup>  | 163,5                         | 0,2                    | Sulfadimidin                | Antibiotikum         |
| 12,70          | 748,5085                | -2,7                  | H <sup>+</sup>  | 263,4                         | -0,5                   | Azithromycin                | Antibiotikum         |
| 12,73          | 325,2253                | 3,1                   | H <sup>+</sup>  | 187,8                         | -0,5                   | Bisoprolol                  | Betablocker          |
| 13,10          | 277,2042                | -0,4                  | H <sup>+</sup>  | 171,4                         | -0,1                   | Venlafaxin                  | Antidepressivum      |
| 13,86          | 424,1799                | 2,1                   | H <sup>+</sup>  | 202,7                         | -0,3                   | Clindamycin                 | Antibiotikum         |
| 15,57          | 292,0979                | 0,7                   | H <sup>+</sup>  | 173,2                         | 0,3                    | Climbazole                  | Antimykotikum        |
| 15,66          | 236,0950                | -0,4                  | Na <sup>+</sup> | 161,9                         | -0,2                   | Carbamazepin                | Analgetikum          |
| 16,14          | 198,1732                | 1,0                   | H <sup>+</sup>  | 148,9                         | 0,1                    | Cycluron                    | Herbizid             |
| 16,31          | 241,1361                | 1,2                   | H <sup>+</sup>  | 159,4                         | -0,3                   | Terbutryn                   | Herbizid             |
| 16,54          | 191,1310                | -4,7                  | H <sup>+</sup>  | 143,2                         | -0,5                   | DEET<br>(Diethyltoluamid)   | Insektenschutzmittel |

| $t_R$<br>(min) | Exakte<br>Masse<br>(Da) | $\Delta m/z$<br>(ppm) | Addukt          | $\Omega$<br>( $\text{\AA}^2$ ) | $\Delta \Omega$<br>(%) | Substanz      | Gruppe                        |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|
| 17,87          | 836,5246                | -1,0                  | Na <sup>+</sup> | 278,3                          | -0,7                   | Roxithromycin | Antibiotikum                  |
| 18,12          | 440,1597                | -2,3                  | H <sup>+</sup>  | 196,3                          | -0,3                   | Candesartan   | Herz-Kreislauf-<br>Medikament |
| 18,56          | 270,1620                | 0,4                   | H <sup>+</sup>  | 165,5                          | -0,5                   | Estron        | Östrogen                      |
|                | 270,1620                | 0,4                   | H <sup>+</sup>  | 166,3                          | 0,0                    | Trenbolon     | Anabolikum                    |
| 20,26          | 295,0167                | 2,4                   | H <sup>+</sup>  | 159,1                          | -0,2                   | Diclofenac    | Antiphlogistikum              |
| 20,49          | 290,0822                | 0,7                   | H <sup>+</sup>  | 175,2                          | 0,3                    | Chloroxuron   | Herbizid                      |

Die gleiche Abwasserprobe wurde mit LC + LC-IM-HRMS gemessen. Die Heatmap in Abbildung 49 a zeigt deutlich die Verteilung einer Vielzahl an Komponenten auf die Fraktionen der ersten Dimension, die in der zweiten Dimension eine weitere Auftrennung erfahren und im IMS nach Driftzeiten getrennt werden (s. Ausschnitt in Abbildung 49 b).

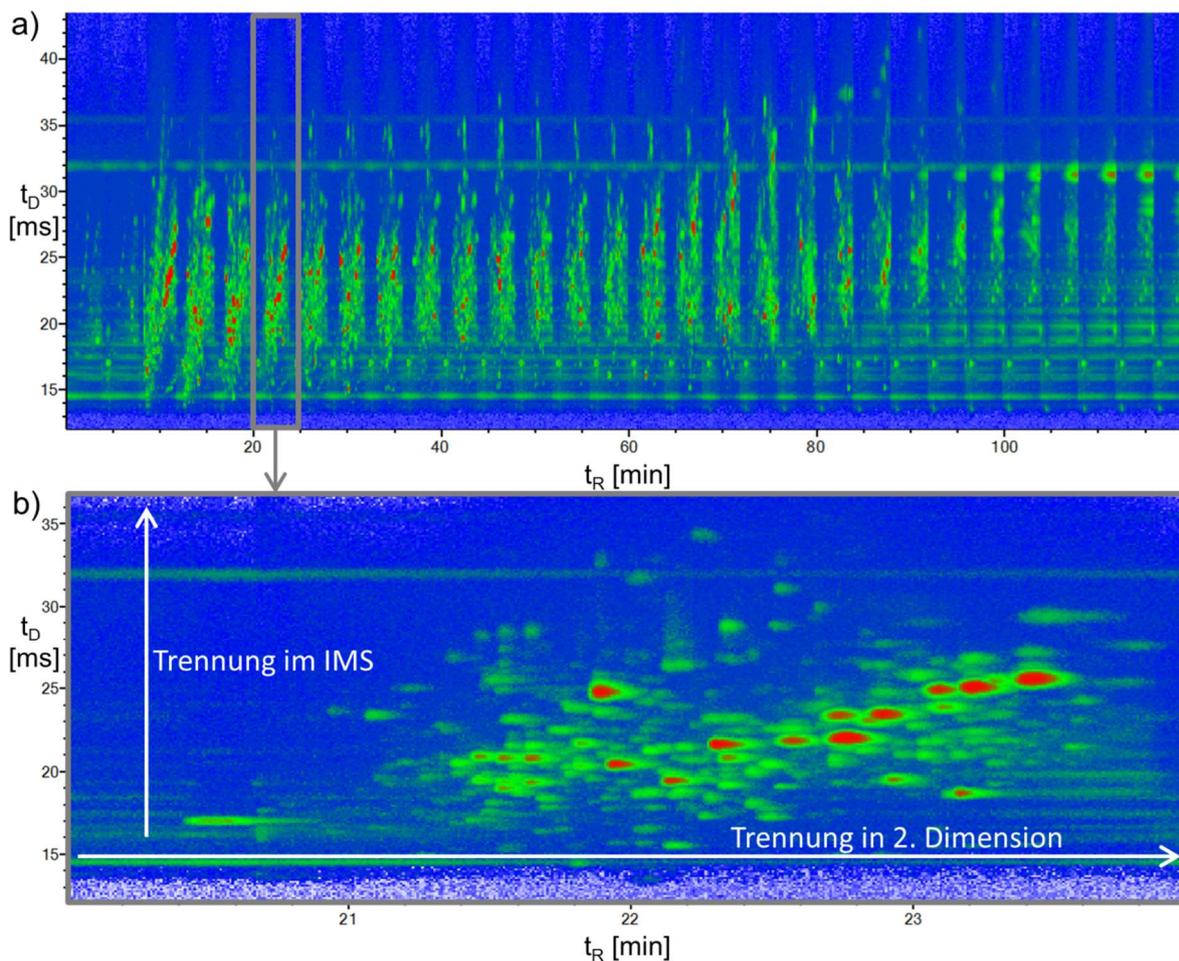


Abbildung 49: a) Heatmap der LC + LC-IM-HRMS Analyse (ESI pos.) von Abwasser; b) Ausschnitt der Heatmap mit Trennung einer Fraktion (gesammelt zwischen 16 und 20 Minuten) in der zweiten Dimension (Elution von der zweiten Säule zwischen 20 und 24 Minuten).

Über die Datenbanksuche konnten hier 53 Komponenten identifiziert werden (s. Tabelle 24), also mehr als doppelt so viele wie nach der eindimensionalen HPLC-IM-HRMS Analyse.

Tabelle 24: Ergebnisse der Datenbanksuche nach der LC + LC-IM-HRMS Analyse von Abwasser mit  $\Delta m/z = \pm 5$  ppm und  $\Delta \Omega = \pm 1$  %; die angegebene exakte Masse und  $\Omega$  entsprechen dem Datenbankwert. Zusätzlich ist angegeben, zu welcher Gruppe von Kontaminanten die Substanz zählt.

| $t_R$<br>(min) | Exakte<br>Masse<br>(Da) | $\Delta m/z$<br>(ppm) | Addukt          | $\Omega$<br>(Å <sup>2</sup> ) | $\Delta\Omega$<br>(%) | Substanz                       | Gruppe          |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------|
| 9,01           | 272,1195                | -1,1                  | H <sup>+</sup>  | 167,5                         | 0,4                   | Sotalol                        | Blutdrucksenker |
| 11,53          | 279,1471                | 1,4                   | H <sup>+</sup>  | 159,2                         | -0,3                  | Metalaxyl                      | Fungizid        |
| 11,53          | 279,1471                | 4,3                   | Na <sup>+</sup> | 173,6                         | 0,2                   | Metolachlor-<br>carbonsäure    | Metabolit       |
| 13,85          | 263,1885                | -1,0                  | Na <sup>+</sup> | 176,8                         | 0,2                   | Desvenlafaxin                  | Antidepressivum |
|                | 263,1885                | 0,0                   | H <sup>+</sup>  | 167,0                         | 0,1                   | Desvenlafaxin                  |                 |
| 17,33          | 249,0572                | -4,4                  | Na <sup>+</sup> | 164,4                         | 0,4                   | Sulfapyridin                   | Antibiotikum    |
| 17,47          | 290,1379                | 1,7                   | H <sup>+</sup>  | 174,0                         | 0,1                   | Trimethoprim                   | Antibiotikum    |
| 17,49          | 231,1008                | -1,7                  | H <sup>+</sup>  | 149,9                         | -0,1                  | 4-Formyl-<br>aminoantipyrin    | Metabolit       |
| 18,44          | 236,1161                | -2,3                  | Na <sup>+</sup> | 165,9                         | 0,8                   | Carbetamid                     | Herbizid        |
| 18,58          | 424,1799                | -0,9                  | Na <sup>+</sup> | 207,3                         | -0,5                  | Clindamycin                    | Antibiotikum    |
|                | 424,1799                | 2,6                   | H <sup>+</sup>  | 202,7                         | 0,0                   | Clindamycin                    |                 |
| 21,47          | 245,1164                | -0,8                  | H <sup>+</sup>  | 155,2                         | 0,0                   | 4-Acetamido-<br>antipyrin      | Metabolit       |
| 21,56          | 238,1106                | -3,3                  | H <sup>+</sup>  | 151,4                         | -0,1                  | 10,11-Dihydro-<br>carbamazepin | Metabolit       |
| 21,76          | 331,1332                | -1,2                  | H <sup>+</sup>  | 177,1                         | 0,5                   | Ciprofloxacin                  | Antibiotikum    |
| 21,98          | 278,0837                | -0,4                  | H <sup>+</sup>  | 163,5                         | 0,4                   | Sulfadimidine                  | Antibiotikum    |
| 22,32          | 260,0248                | 2,5                   | Na <sup>+</sup> | 158,7                         | 0,1                   | Ifosfamid                      | Zytostatikum    |
|                | 260,0248                | -1,5                  | H <sup>+</sup>  | 147,3                         | -0,5                  | Cyclophosphamid                | Zytostatikum    |
|                | 260,0248                | -1,5                  | H <sup>+</sup>  | 147,7                         | -0,3                  | Ifosfamid                      |                 |
| 22,45          | 260,0248                | 3,2                   | Na <sup>+</sup> | 155,2                         | 0,0                   | Cyclophosphamid                |                 |
| 22,50          | 164,0950                | -1,2                  | H <sup>+</sup>  | 133,6                         | 0,1                   | Fenuron                        | Herbizid        |
| 25,72          | 263,1885                | 0,8                   | H <sup>+</sup>  | 161,1                         | 0,1                   | Tramadol                       | Analgetikum     |
| 26,19          | 748,5085                | -0,8                  | H <sup>+</sup>  | 263,4                         | 0,1                   | Azithromycin                   | Antibiotikum    |
| 26,21          | 325,2253                | -1,4                  | Na <sup>+</sup> | 178,8                         | 0,1                   | Bisoprolol                     | Betablocker     |
|                | 325,2253                | 1,8                   | H <sup>+</sup>  | 187,8                         | -0,2                  | Bisoprolol                     |                 |
| 29,71          | 265,1579                | 1,9                   | H <sup>+</sup>  | 159,7                         | 0,0                   | Mirtazapin                     | Antidepressivum |
|                | 253,0521                | -3,9                  | H <sup>+</sup>  | 155,1                         | 0,2                   | Sulfamethoxazol                | Antibiotikum    |
| 29,72          | 188,0950                | -1,9                  | Na <sup>+</sup> | 154,8                         | -0,1                  | Phenazon                       | Analgetikum     |
|                | 188,0950                | -2,6                  | H <sup>+</sup>  | 138,8                         | 0,1                   | Phenazon                       |                 |

| <b>t<sub>R</sub></b><br><b>(min)</b> | <b>Exakte</b><br><b>Masse</b><br><b>(Da)</b> | <b>Δ m/z</b><br><b>(ppm)</b> | <b>Addukt</b>   | <b>Ω</b><br><b>(Å<sup>2</sup>)</b> | <b>ΔΩ</b><br><b>(%)</b> | <b>Substanz</b>           | <b>Gruppe</b>             |
|--------------------------------------|--|------------------------------|-----------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 30,21                                | 311,1092                                     | 2,2                          | H <sup>+</sup>  | 172,1                              | 0,9                     | Fenamidon                 | Fungizid                  |
| 30,25                                | 133,0640                                     | 2,2                          | H <sup>+</sup>  | 125,1                              | -0,5                    | 4-MBTZ                    | Korrosionsschutzmittel    |
|                                      | 133,0640                                     | 2,2                          | H <sup>+</sup>  | 125,6                              | -0,1                    | 5-MBTZ                    | Korrosionsschutzmittel    |
| 37,60                                | 252,0899                                     | -0,8                         | H <sup>+</sup>  | 161,3                              | -0,1                    | Carbamazpin-10,11-Epoxid  | Metabolit                 |
| 37,63                                | 119,0483                                     | 2,5                          | H <sup>+</sup>  | 122,1                              | 0,2                     | BTA                       | Korrosionsschutzmittel    |
| 38,08                                | 277,2042                                     | 1,8                          | H <sup>+</sup>  | 171,4                              | 0,3                     | Venlafaxin                | Antidepressivum           |
| 46,74                                | 250,1569                                     | -2,2                         | Na <sup>+</sup> | 166,9                              | -0,7                    | Gemfibrozil               | Lipidsenker               |
| 46,81                                | 241,1361                                     | 2,9                          | H <sup>+</sup>  | 159,4                              | -0,1                    | Terbutryn                 | Herbizid                  |
| 54,28                                | 295,0627                                     | -2,7                         | H <sup>+</sup>  | 170,8                              | -1,0                    | N4-Acetyl-Sulfamethoxazol | Metabolit                 |
| 58,58                                | 198,1732                                     | -1,5                         | H <sup>+</sup>  | 148,9                              | 0,2                     | Cycluron                  | Herbizid                  |
| 58,65                                | 191,1310                                     | 1,6                          | H <sup>+</sup>  | 143,2                              | -0,3                    | DEET                      | Insektenschutzmittel      |
| 61,25                                | 267,1834                                     | 2,2                          | H <sup>+</sup>  | 172,2                              | 0,5                     | Metoprolol                | Betablocker               |
| 61,84                                | 269,1416                                     | -1,1                         | H <sup>+</sup>  | 168,7                              | -0,4                    | Mepronil                  | Fungizid                  |
| 66,23                                | 292,0979                                     | 0,7                          | H <sup>+</sup>  | 173,2                              | 0,8                     | Climbazol                 | Antimykotikum             |
| 66,57                                | 206,1419                                     | 0,0                          | Na <sup>+</sup> | 159,4                              | 0,1                     | Isoproturon               | Herbizid                  |
| 66,59                                | 733,4612                                     | 0,7                          | H <sup>+</sup>  | 257,8                              | 0,6                     | Erythromycin              | Antibiotikum              |
| 70,53                                | 747,4769                                     | 0,3                          | H <sup>+</sup>  | 266,1                              | 0,2                     | Clarithromycin            | Antibiotikum              |
| 74,54                                | 836,5246                                     | -2,6                         | H <sup>+</sup>  | 276,2                              | 0,2                     | Roxithromycin             | Antibiotikum              |
|                                      | 836,5246                                     | -1,4                         | Na <sup>+</sup> | 278,3                              | -0,1                    | Roxithromycin             |                           |
| 74,75                                | 230,0943                                     | 1,6                          | Na <sup>+</sup> | 161,3                              | 0,6                     | Naproxen                  | Antiphlogistikum          |
| 78,15                                | 277,1830                                     | -4,7                         | H <sup>+</sup>  | 167,6                              | 0,9                     | Amitriptylin              | Antidepressivum           |
| 78,44                                | 422,1622                                     | 2,6                          | H <sup>+</sup>  | 200,8                              | 0,8                     | Losartan                  | Blutdrucksenker           |
| 78,60                                | 278,0861                                     | -4,7                         | H <sup>+</sup>  | 163,3                              | 0,8                     | Triphenylphosphanoxid     |                           |
| 79,24                                | 270,1620                                     | -2,6                         | H <sup>+</sup>  | 165,5                              | -0,5                    | Estron                    | Östrogen                  |
|                                      | 270,1620                                     | -2,6                         | H <sup>+</sup>  | 166,3                              | -0,1                    | Trenbolon                 | Anabolikum                |
| 81,56                                | 324,1638                                     | -0,6                         | H <sup>+</sup>  | 181,8                              | 0,7                     | Citalopram                |                           |
| 82,54                                | 440,1597                                     | 1,1                          | H <sup>+</sup>  | 196,3                              | 0,5                     | Candesartan               | Herz-Kreislauf-Medikament |
| 82,58                                | 403,1168                                     | 1,2                          | Na <sup>+</sup> | 196,9                              | 0,2                     | Azoxystrobin              | Fungizid                  |
| 83,01                                | 435,9387                                     | 0,7                          | Na <sup>+</sup> | 195,1                              | 0,3                     | Fipronil                  | Insektizid                |
| 83,12                                | 295,0167                                     | 2,0                          | H <sup>+</sup>  | 159,1                              | 0,6                     | Diclofenac                | Antiphlogistikum          |
|                                      | 295,0167                                     | -2,5                         | Na <sup>+</sup> | 167,5                              | 0,6                     | Diclofenac                |                           |

| $t_R$<br>(min) | Exakte<br>Masse<br>(Da) | $\Delta m/z$<br>(ppm) | Addukt          | $\Omega$<br>(Å <sup>2</sup> ) | $\Delta\Omega$<br>(%) | Substanz     | Gruppe          |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------|--------------|-----------------|
| 83,53          | 376,2000                | 0,3                   | H <sup>+</sup>  | 187,6                         | -0,3                  | Enalapril    | Blutdrucksenker |
| 93,83          | 236,0950                | 0,0                   | Na <sup>+</sup> | 161,9                         | 0,4                   | Carbamazepin | Analgetikum     |

Zudem wurden hier mehr Substanzen sowohl über ihr  $[M+H]^+$ -Ion als auch ihr Natriumaddukt gefunden. Es wurden, bis auf eine Ausnahme (Chloroxuron), alle Analyten aus Tabelle 23 gefunden. Außerdem taucht hier Tramadol nur noch einmal auf. Diese Abweichungen sind möglicherweise damit zu erklären, dass durch die Verdünnung (*dilute-and-split*) in der LC + LC eine geringere Sensitivität resultiert. Insgesamt kann aber eine deutlich größere Anzahl an Peaks detektiert und zugeordnet werden, da durch die zweidimensionale Trennung die Ionensuppression reduziert wird. Zudem werden durch eine verbesserte Vortrennung auch reinere MS-Spektren erhalten, die die Feature-Analyse begünstigen.

Allerdings kann auch hier bei dem Peak bei 79,24 Minuten nicht eindeutig zwischen Estron und Trenbolon unterschieden werden. Die beiden Isobare 4-Methylbenzotriazol (4-MBTZ) und 5-MBTZ sind ebenfalls strukturell zu ähnlich, sodass der Peak bei 30,25 Minuten nicht eindeutig zugeordnet werden kann. Das bereits oben diskutierte Isobarenpaar Tramadol und Desvenlafaxin wurde hier chromatografisch getrennt und beide Substanzen wurden über ihre CCS-Werte eindeutig identifiziert (13,85 und 25,72 Minuten). Die Retentionszeit von Tramadol bei 25,7 Minuten wurde zusätzlich durch die Injektion eines Standards bestätigt. Als weiteres Substanzpaar sind hier Ifosfamid und Cyclophosphamid interessant. Diese weisen in Form von  $[M+H]^+$ -Addukten sehr ähnliche Stoßquerschnitte auf, können aber anhand der CCS-Werte ihrer  $[M+Na]^+$ -Addukte unterschieden werden. Somit ist eine Identifizierung von Ifosfamid bei 22,32 Minuten und von Cyclophosphamid bei 22,45 Minuten möglich. Es sollten daher grundsätzlich alle gebildeten Adduktionen betrachtet werden.

Hier wurden bewusst zwei Methoden ausgewählt, die als gebräuchliche Standardmethoden die Anwendung der Non-Target Analyse mithilfe der CCS-Datenbank demonstrieren sollten. Auch wenn aufgrund der unterschiedlichen Laufzeiten (30 Minuten HPLC-IM-HRMS und 120 Minuten LC+LC-IM-HRMS) ein direkter Vergleich der beiden Methoden nicht möglich ist, kann über die Anzahl der detektierten Signale in Anlehnung an [60] eine Aussage über die Trennleistung beider Methoden getroffen werden. Durch die bessere Trennung in zwei LC-Dimensionen, die zu weniger Ionensuppression und insgesamt saubereren MS-Spektren führt, konnten mit der LC + LC-Methode mehr Features gefunden und identifiziert werden als mit der eindimensionalen HPLC. Dafür ist zwar mehr Analysenzeit erforderlich, es können aber in dieser Zeit auch mehr Informationen über die Probe gewonnen werden.

## 2.8 Vergleich der Anschaffungskosten der verschiedenen Systeme

Für die Anschaffung eines Systems spielen neben der erforderlichen Eignung für bestimmte Aufgaben auch die Kosten eine wichtige Rolle. In diesem Kapitel wird eine Abschätzung über die Anschaffungskosten der einzelnen Systeme und Systemkonfigurationen gegeben. Grundlage sind die Preisinformationen der Hersteller aus den Jahren 2017 und 2018. Es wird kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben. Ebenso werden die Preisangaben nicht den Herstellern zugeordnet.

Die technisch einfachste und kostengünstigste Variante für die Analyse komplexer Proben ist die serielle Kopplung mehrerer HPLC-Säulen. Die Preise für HPLC-Säulen liegen in etwa in einem Bereich zwischen 300 € und 800 €. Dabei gibt es keinen Unterschied zwischen miniaturisierten Säulen (Innendurchmesser < 1,0 mm) und klassischen Säulenformaten (Innendurchmesser zwischen 2,1 mm und 4,6 mm). Die serielle Säulenkopplung lässt sich somit mit dem geringsten Investitionsaufwand an jedem in einem Labor verfügbaren HPLC-System realisieren. Der in 2.2.2.3 beschriebene experimentelle Ansatz basiert auf klassischen HPLC-Verfahren mit einem Drucklimit von 400 bar. Wie anhand der Ausführungen in Abschnitt 2.3.2 deutlich wird, lässt sich die chromatografische Auflösung durch Erhöhung der absoluten Peakkapazität maximieren. Dieser Ansatz ist in besonderem Maße geeignet, den Anteil gleichzeitig in das Massenspektrometer geleiteter Komponenten zu minimieren. Dies führt auch zu einer Reduktion der Ionensuppression. Es ist jedoch kritisch anzumerken, dass aufgrund der langen Analysenzeiten von teilweise mehreren Stunden kein hoher Probenumsatz erzielt wird. Sollen nur wenige Proben umfassend charakterisiert werden, ist die serielle Säulenkopplung die beste Verfahrensvariante. Aufgrund der breiten Peaks (Basisbreite > 10 s) kann eine hohe Anzahl an MS/MS-Experimenten durchgeführt werden, sodass insgesamt eine hohe Informationsdichte erhalten wird (siehe hierzu auch die Ausführungen in Abschnitt 2.5.5).

Die zweite Verfahrensvariante bildet die Aufrüstung bestehender 1D-LC-Systeme zu einem vollwertigen 2D-LC-System bzw. die Anschaffung eines 2D-LC-Komplettsystems. Zwar ist es prinzipiell möglich, bestehende 1D-LC-Systeme technisch zu einem 2D-LC-System aufzurüsten, jedoch sollte aufgrund von Inkompatibilitäten bez. der Treiber und Steuersoftware unbedingt davon abgesehen werden. Vor diesem Hintergrund wird nur die Anschaffung eines 2D-LC-Komplettsystems diskutiert. Die Kosten belaufen sich etwa auf 100.000 € bis 150.000 €. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es keinen einheitlichen technischen Standard gibt. Nur wenige Hersteller bieten Systeme an, die als umfassendes LC x LC-System genutzt werden können. Wie anhand der Ausführungen in Kapitel 2.5 diskutiert, muss dieser Anwendungsfall bis auf wenige Ausnahmen jedoch als für die Praxis nicht tauglich angesehen werden. Zum einen sind die Funktionalitäten bez. der Auswertesoftware stark limitiert, zum anderen existieren fundamentale Limitierungen in Bezug auf die Kopplung mit der Massenspektrometrie,

die es in Zukunft zu überwinden gilt. 2D-LC-Systeme, die den Multiple-Heart-Cut-Modus unterstützen, zeichnen sich durch eine sehr hohe Anwendungs- und Nutzungsmöglichkeit aus. Für viele pharmazeutische Fragestellungen ist es ausreichend, eine einzelne Peakfraktion zu analysieren, um beispielsweise Koelutionen zu detektieren bzw. die Peakreinheit zu überprüfen. Wenn in einem chromatografischen Lauf mehrere Fraktionen geschnitten und z. B. über Loop-Systeme zwischengespeichert werden können, bietet dies die größtmögliche Flexibilität hinsichtlich der konkreten analytischen Fragestellung. Gleichzeitig ist es möglich, eine Quantifizierung durchzuführen, da die einzelnen chromatografischen Läufe als eindimensionale Datenfiles ausgewertet werden können, denn ein auf der ersten HPLC-Säule fraktionierter Peak wird dann nicht mehr, wie bei LC x LC-Verfahren üblich, in mehreren Fraktionen erfasst.

Die dritte Verfahrensvariante besteht in der Aufrüstung eines HPLC-MS-Systems mit einer speziellen ESI-Quelle, die eine vorgeschaltete Trennung der ionisierten und in die Gasphase überführten Analytionen auf Basis der Ionenmobilität erlaubt. Hierbei handelt es sich prinzipiell um Ionenfilter, denn, anders als bei den klassischen Driftröhren-IMS-Systemen, gelangen nur diejenigen Ionen zum Massenanalysator, die auf stabilen Trajektorien durch den Driftbereich geleitet werden. Die Kosten für diese Systeme belaufen sich auf etwa 50.000 € bis 80.000 €. Ein wichtiges Applikationsfeld sind sog. Hochdurchsatz-Anwendungen, bei denen z. B. mehrere Hundert Proben pro Tag analysiert werden müssen. Der Vorteil einer IM-MS-Kopplung ohne vorgeschaltete chromatografische Trennung liegt in der unerreichten Analysegeschwindigkeit von wenigen Millisekunden. Der Nachteil dieses Ansatzes ist, dass die gesamte Probe gleichzeitig in die Ionisationsquelle des Massenspektrometers eingeführt wird. Es ist deshalb mit gravierender Signalunterdrückung durch Ionensuppression zu rechnen, insbesondere dann, wenn die Elektrosprayionisation angewendet wird. Um diese Effekte zu kompensieren, sollte die Probe immer mit einem internen Standard versetzt werden. Dieser kann Fehler in der Quantifizierung berücksichtigen, nicht jedoch die Signalunterdrückung kompensieren.

Die vierte Verfahrensvariante besteht in der Anschaffung eines IM-MS-Komplettsystems. Die Kosten betragen im Durchschnitt etwa 650.000 €. Eine Investition in dieser Größenordnung ist nur dann zu empfehlen, wenn komplexe Proben mittels eines Suspect- und Non-Target-Ansatzes untersucht werden sollen. Die IMS-Technologie ist im Zusammenspiel mit 1D-LC-Verfahren geeignet, eine hohe Peakkapazität zu erzielen, weil die Trennung in der IMS-Driftröhre nur wenige Millisekunden beträgt. Das Konzept der LC x IMS-Kopplung überkommt somit auf einfache Weise die aktuell bestehenden und in Abschnitt 2.5.5 diskutierten technischen Systemlimitierungen bei der Kopplung von LC x LC-Systemen mit der Massenspektrometrie. Auch hier gilt, dass die Ionensuppression prinzipiell nur durch chromatografische Verfahren mit hoher Peakkapazität kompensiert werden kann. Verbindungen, die nicht

ionisiert werden, entweder, weil deren Ionisationseffizienz zu gering ist oder weil aufgrund von konkurrierenden Reaktionen in der Gasphase kein Ladungsübertrag zustande kommt, werden nicht in den Massenanalysator bzw. die vorgeschaltete Driftröhre des IMS überführt. Wie anhand der Ergebnisse in Abschnitt 2.4.3.5 gezeigt, kann der CCS-Wert als zusätzlicher Identifizierungspunkt im Rahmen eines Suspect- oder Non-Target-Screenings verwendet werden. Dadurch wird eine noch höhere Absicherung in Bezug auf die korrekte Identifizierung einer potenziell erwarteten bzw. potenziell unbekanntem Verbindung erzielt. Dies ist insbesondere im Bereich der forensischen oder Dopinganalytik von besonderer Bedeutung, da die Analyseergebnisse gerichtsfest sein müssen. Auch wenn die IMS keine generische Methode zur Trennung von Isobaren bzw. Isomeren mit identischer akkurater Masse ist, so lassen sich, ähnlich der Optimierungsstrategie in der Chromatografie, Trennungen für einzelne Isobarenpaare durch Zugabe von speziellen Dopantgasen realisieren. Darüber hinaus kann die IMS-Trennung als orthogonale Trenndimension zu chromatografischen Techniken angesehen werden, wie dies anhand der Ausführungen in Abschnitt 2.7.2 gezeigt wurde. In Abbildung 50 sind die durchschnittlichen Investitionskosten vergleichend gegenübergestellt.

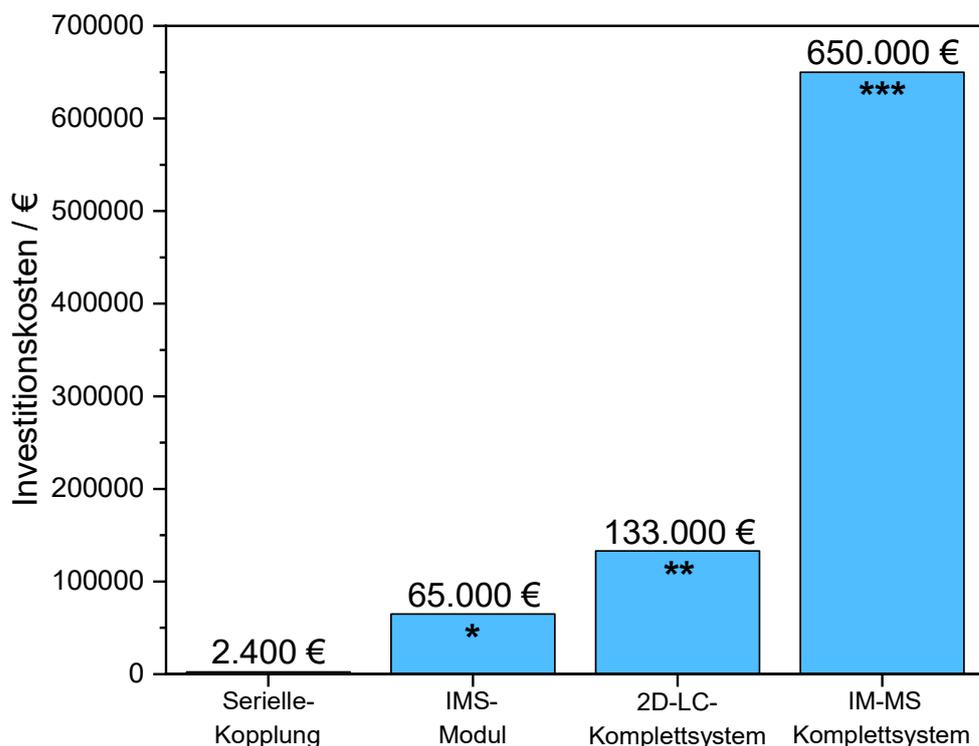


Abbildung 50: Vergleich der Anschaffungskosten der unterschiedlichen Verfahrensvarianten. \* Mittelwert aus zwei Angeboten. \*\* Mittelwert aus fünf Angeboten. \*\*\* Mittelwert aus drei Angeboten.

### **3 Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele**

#### **3.1 Technische Realisierung des vierdimensionalen Trenn- und Detektionssystems**

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde die Kopplung eines zweidimensionalen HPLC-Systems mit der Ionenmobilitätsspektrometrie und der hochauflösenden Massenspektrometrie erfolgreich realisiert. Erstmals wurde somit die Kopplung eines vierdimensionalen Trenn- und Detektionsverfahrens experimentell umgesetzt. Darüber hinaus wurde eine neue Verfahrensvariante für die zweidimensionale HPLC entwickelt, die als LC + LC bzw. Multiple-Heart-Cut-Modus (LC + LC) mit erweiterter konstanter Modulationszeit beschrieben wurde. Der Vorteil des LC + LC-Verfahrens im Gegensatz zur umfassenden LC x LC-Kopplung besteht darin, dass der zweidimensionale chromatografische Datensatz als pseudo-eindimensionale Trennung dargestellt werden kann. Somit ist keine Spezialsoftware für die Auswertung notwendig.

#### **3.2 Nutzung der Ionenmobilitätsspektrometrie zur Trennung von Isomeren und Isobaren**

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens haben eindeutig belegt, dass die Ionenmobilitätsspektrometrie keine generische Methode zur Trennung kleiner (< 800 Da) isomerer bzw. isobarer Moleküle darstellt. Dieser häufig in der wissenschaftlichen Literatur als auch in den Produktbroschüren der Hersteller genannte Vorteil der IMS kann auf Basis der in diesem Projekt erzielten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Zwar ist es mit Hilfe der IMS möglich, einzelne Isobarenpaare zu trennen, allerdings müssen die Parameter und Einstellungen in einem aufwendigen und komplexen Optimierungsverfahren ermittelt werden. Im Vergleich zu den schnellsten chromatografischen Verfahren führt dies zu einer Zykluszeit von wenigen Millisekunden anstelle von Minuten. Im Gegensatz dazu ist die Umkehrphasen-Chromatografie eine generische Methode für die Trennung der o. g. Verbindungen, allerdings wird hierzu einer Mindestpeakkapazität und dementsprechend eine deutlich längere Analysenzeit von 10 bis 30 Minuten für einen einzelnen chromatografischen Lauf benötigt. Für Hochdurchsatz-Anwendungen, bei denen nur einzelne Verbindungen aufgetrennt werden müssen, bietet die IMS somit die Möglichkeit, auf eine vorhergehende chromatografische Trennung zu verzichten. Allerdings ist es für eine präzise Quantifizierung dann notwendig, die aufgrund von Ionensuppression resultierenden Effekte durch die Zugabe interner Standards zu kompensieren.

### **3.3 Nutzung der Ionenmobilitätsspektrometrie für die Probenvorbereitung**

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens zeigen ebenfalls auf, dass die IMS nicht geeignet ist, die Probenvorbereitung zu ersetzen. Häufig wird in der Literatur oder den Produktbroschüren der Hersteller darauf hingewiesen, dass der Signaluntergrund bzw. das Rauschen verringert wird, wenn die IMS als zusätzliche Trenndimension eingesetzt wird. Dabei wird außer Acht gelassen, dass das Eluat von der Trennsäule immer erst ionisiert werden muss. Wird die Probenvorbereitung vereinfacht bzw. Clean-up-Schritte nicht durchgeführt, so ist insgesamt mit einem erhöhten Eintrag von Matrixkomponenten in die Ionenquelle des Massenspektrometers zu rechnen. Eine hierbei auftretende Signalunterdrückung lässt sich deshalb nicht durch die nachgelagerte IMS-Trennung kompensieren. Den Autoren dieses Forschungsvorhabens sind keine Studien aus z. B. dem Umweltbereich bekannt, in denen die IMS zur Vereinfachung der Probenvorbereitung eingesetzt wird.

### **3.4 Ultimative Limitierung zweidimensionaler umfassender HPLC-Verfahren (LC x LC)**

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens belegen, dass die umfassende zweidimensionale HPLC entgegen der Schlussfolgerungen vieler Publikationen aus der wissenschaftlichen Literatur nur eine unzureichende absolute Peakkapazität aufweist. Aufgrund der Tatsache, dass ein Peak der ersten Trenndimension in mindestens drei Fraktionen auf die zweite Trennsäule übertragen werden muss, um die Peakkapazität zu maximieren, muss demzufolge die Zykluszeit der zweiten Dimension so weit reduziert werden, dass die absolute Peakkapazität zu gering ist, um koeluiierende Verbindungen der ersten Trenndimension aufzutrennen. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Anzahl an Datenpunkten über einen chromatografischen Peak nicht ausreicht, um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wenn MS/MS-Experimente zur Akquisition von Strukturinformationen durchgeführt werden. Vor diesem Hintergrund eignen sich umfassende 2D-LC-Verfahren nur dann, wenn ein Detektor mit einer entsprechend hohen Datenaufnahmerate von mindestens 100 Hz verwendet wird. Diese Forderung wird von UV-Dektoren erfüllt, jedoch eignen sich diese nicht, um eine Identifizierung unbekannter Verbindungen in einer komplexen Probe vorzunehmen.

### **3.5 Aufbau einer CCS-Demonstrations-Datenbank**

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde anhand des Aufbaus einer CCS-Demonstrations-Datenbank gezeigt, dass die IMS in Kombination mit der hochauflösenden Massenspektrometrie dazu genutzt werden kann, potenziell unbekannte Verbindungen in

einer Probe mit einer höheren Sicherheit zu identifizieren. Aufgrund der Tatsache, dass eine IMS-Trennung nur wenige Millisekunden benötigt, wird zu jedem Datenpunkt über einen chromatografischen Peak eine IMS-Trennung erhalten. Die Kombination aus Chromatografie und Ionenmobilität liefert somit eine wesentlich höhere Peakkapazität als die umfassende 2D-LC. Darüber hinaus kann der so erzeugte Datensatz als quasi-eindimensionaler Datensatz verarbeitet werden.

### **3.6 Software**

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens belegen, dass eine effiziente Datenauswertung und Prozessierung der Rohdaten nur mit Hilfe einer leistungsstarken Workstation zu realisieren ist. Ein Datenfile weist dabei eine Größe von mehreren Gigabyte auf. Dies bedeutet auch, dass entsprechend große Datenspeicher notwendig sind, um eine dauerhafte Archivierung der Rohdaten über mehrere Jahre sicherzustellen.

Darüber hinaus existiert bislang keine herstellerübergreifende Softwareplattform, die eine Auswertung eines vierdimensionalen Datensatzes ermöglicht. Eine entsprechende technologische Weiterentwicklung insbesondere von Software-Algorithmen ist deshalb zwingend notwendig. Dies soll in weiterführenden FuE-Kooperationen u. a. über das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand realisiert werden. Die Forschungseinrichtung 1 ist Mitglied im ZIM-Netzwerk SmartLab. Diesem Netzwerk gehören viele KMU aus den Bereichen Software und Datenverarbeitung an. Neben der Entwicklung einer herstellerübergreifenden Datenauswertungs-Software ist es notwendig, frei verfügbare Meta-Informationen zu nutzen, um eine Identifizierung potenziell unbekannter Verbindungen auf Basis eines Non-Target-Ansatzes zu realisieren.

#### **4 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten**

Die in diesem Vorhaben entwickelte technische Plattform der Kopplung von zweidimensionaler Chromatografie, Ionenmobilitätsspektrometrie und massenspektrometrischer Detektion bildet die Grundlage für eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in allen Bereichen der Life Sciences. KMU aus den Bereichen der wissenschaftlichen Gerätehersteller haben einen unmittelbaren Nutzen von den erzielten Forschungsergebnissen. Dieser leitet sich aus der Verfügbarkeit der Forschungsergebnisse ab, die die Grundlage für weitere Produktentwicklungen im Bereich Hard- und Software bilden.

Laut aktueller Angaben des Fachverbands Spectaris erzielten die 330 deutschen Hersteller von Analysen-, Bio- und Labortechnik 2017 einen Umsatz von 8,71 Milliarden Euro. Das entspricht einem Zuwachs von 11,0 Prozent gegenüber dem Vorjahr. Positive Impulse kamen dabei sowohl aus dem Inland als auch aus dem internationalen Geschäft. Die Beschäftigtenzahl stieg um 2,6 Prozent auf rund 44.000 Mitarbeiter. Für das laufende Jahr wird mit einem Umsatzplus gerechnet. Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse können von einer Vielzahl von Unternehmen aus der Branche der Analysen-, Bio- und Labortechnik genutzt werden, um kundenspezifische Lösungen rund um die Aufarbeitung und Analytik komplexer Proben zu entwickeln. Multidimensionale Trenn- und Detektionstechniken werden zusehends in den Bereichen pharmazeutisch-klinische Analytik, Umweltanalytik sowie Bioanalytik eingesetzt. Das in diesem Projekt entwickelte Verfahren kann dazu genutzt werden, die Suche nach neuen Medikamenten und Wirkstoffen zu beschleunigen, indem neue Möglichkeiten der Aufreinigung, Analytik und Detektion in einem Verfahren kombiniert werden können. Die größte Herausforderung der kommenden Jahre wird es sein, die Analysen-, Bio- und Labortechnik für das IoT-basierte „Labor 4.0“ mit den Maximen Workflow-Integration, Konnektivität und Datenintegrität fit zu machen. Die durch immer leistungsfähigere Analysensysteme generierten Daten haben ein enormes Informationspotenzial, wenn diese Datenmengen durch den Einsatz optimierter Softwaresysteme und Methoden des Machine Learning intelligent ausgewertet werden können, um Big Data zu Smart Data zu transformieren.

## 5 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

### 5.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Mehrheit der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Mitglieder entstammen vorwiegend den Branchen der Analysen- und Labortechnik. Während der Projektlaufzeit wurden drei Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt.

### 5.2 Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA

Sowohl während der Projektlaufzeit als auch nach Abschluss des Projektes wurden bzw. werden wichtige Fachtagungen und Messen in Deutschland dazu genutzt, weitere potenziell interessierte Unternehmen über die Projektinhalte und das Projektergebnis zu informieren. Diese Maßnahme wurde ebenfalls über zahlreiche Beratungsgespräche innerhalb der Projektlaufzeit an den beteiligten Forschungseinrichtungen umgesetzt.

### 5.3 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. Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen können der in Tabelle 25 aufgeführten Auflistung entnommen werden.

### 5.4 Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Tabelle 25: Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.

| Datum/Zeitraum | Bereits umgesetzte Maßnahmen  | Erläuterung   |
|----------------|---|---|
| 04.11.2015     | Erster Projektbegleitender Ausschuss, Duisburg                      | Vorstellung des Projektes sowie bisheriger Arbeiten auf dem Gebiet der Trenn- und Detektionstechnik mit Gastvorträgen zum Stand der Technik. Vorstellung der bislang erzielten Ergebnisse und Diskussion der weiteren Arbeiten. |
| 10.-12.01.2016 | Vortrag, 26. Doktorandenseminar Hohenroda des AK Separation Science | Das Seminar bietet Doktoranden/innen, die auf dem Gebiet der analytischen Trenntechniken tätig sind, die Gelegenheit, ihre Forschungsergebnisse zu präsentieren.  |

|                   |   |   |
|-------------------|---|---|
|                   | der GDCh.   | Darüber hinaus dient das Seminar dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.  |
| 10.03.2016        | Vortrag/Workshop, Helmholtz-Zentrum, Dresden-Rossendorf.  | Vorstellung des Projektes sowie erster Projektergebnisse im Rahmen des Praxisworkshops „Möglichkeiten und Grenzen der HPLC in den Lebenswissenschaften“.  |
| 05.-07.04.2016    | Vortrag, Analytical Forum Water Contaminants, AFWC Symposium 2016, Langenau   | Vorstellung der erzielten Ergebnisse. Das AFWC Symposium ist eine internationale Veranstaltung, die sich im Wesentlichen mit Workflows und Ansätzen zur Analyse wasserunreinigender Stoffen beschäftigt.                              |
| 10.-13.05.2016    | Vorträge, Analytica Conference 2016, München  | Vorstellung erster Projektergebnisse im Rahmen der Analytica Conference. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle.   |
| 29.05.-03.06.2016 | Vortrag, NonTarget Conference 2016, Monte Verità, Ascona, Schweiz   | Vorstellung der erzielten Ergebnisse. Die NonTarget Conference ist eine internationale Veranstaltung die sich im Wesentlichen mit Workflows und Ansätzen zur Analyse unbekannter Proben beschäftigt.                                  |
| 01.06.2016        | Agilent Lunch seminar at 40 <sup>th</sup> International Symposium on Capillary Chromatography and 13 <sup>th</sup> GCxGC Symposium, Riva del Garda, Italy, June 2016        | Vorstellung erster Projektergebnisse einem internationalen Publikum im Rahmen eine Agilent-Lunch Seminars auf der 40 <sup>th</sup> ISCC.  |
| 03.07. 2016       | 18 <sup>th</sup> International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22 <sup>nd</sup> International Symposium on Separation Sciences, Torun, Poland, July 2016 | Vorstellung erster Projektergebnisse einem internationalen Publikum im Rahmen einer Plenary Lecture.  |
| 06.08.2016        | 1. Publikation  | S. Stephan, J. Hippler, T. Köhler, A. Deep, T. Schmidt, O. J. Schmitz* Contaminant screening of wastewater with HPLC-IM-qTOF-MS and LC+LCIM-qTOF-MS using a CCS database, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) 408:6545-6555 |
| 13.09.2016        | Zweiter Projektbegleitender Ausschuss, Essen  | Vorstellung der bislang erzielten Ergebnisse und Diskussion der weiteren Arbeiten.  |
| 10.10.2016        | Vortrag, 8 <sup>th</sup> Shanghai International Symposium on analytical Chemistry in Shanghai, China, October 2016  | Vorstellung der erzielten Ergebnisse. Die analytica conference in Shanghai begleitet die weltweit zweitgrößte Ausstellermesse für Analytische Geräte.   |
| 22.-24.11.2016    | Vortrag/Workshop, NOVIA-Analytiktage 2016, Bad Soden  | Vorstellung der erzielten Ergebnisse. Die von der Novia GmbH durchgeführten Seminare richten sich im Wesentlichen an Anwender der HPLC aus der pharmazeutischen Industrie.  |
| 03.01.2017        | 2. Publikation  | S. Stephan, J. Hippler, T. Köhler, D. Brecht, O. J. Schmitz* A powerful four-dimensional separation method for complex samples, Journal of Analysis and Testing (2017) 1:1-9  |
| 29.03.2017        | Vortrag, 5 <sup>th</sup> Analytica conference Vietnam   | Vorstellung der Projektergebnisse im Rahmen der Analytica Conference.   |
| 06.04.2017        | Keynote Vortrag auf der Anakon in Tübingen  | Größte analytische Fachtagung im deutschsprachigen Raum.  |
| 08.05.2017        | Keynote Vortrag auf dem International Congress on Analytical Science (Organisator IUPAC und CCS) in Hainan, China   | Vorstellung der wichtigsten erzielten Ergebnisse vor einem internationalen Publikum.  |

|                       |  |   |
|-----------------------|--|---|
| 18.-23.06.2017        | Vortrag und Poster, HPLC 2017, Prag  | Präsentation des Projekts auf der HPLC mit begleitender Industrieausstellung, in der auch zahlreiche deutsche Unternehmen vertreten sind.   |
| 11.10. 2017           | Vortrag, 17 <sup>th</sup> Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (BCEIA) | Vorstellung der wichtigsten erzielten Ergebnisse einem internationalen Publikum.  |
| 06.12.2017            | Vortrag NOVIA-Analytiktag 2017, Bad Soden  | Vorstellung von Teilergebnissen während der NOVIA-Analytiktag 2017  |
| 07.03.2018            | Dritter Projektbegleitender Ausschuss, Duisburg oder Essen                                   | Innerhalb des vierten Projektbegleitenden Ausschusses erfolgt die Abschlusspräsentation und Diskussion aller erzielten Ergebnisse   |
| Kontinuierlich        | Beratung von KMU   | Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend über die gesamte Projektdauer durchgeführt.  |
| Kontinuierlich        | Studienarbeiten zur Problematik des Forschungsvorhabens                                      | Kennen lernen und Vermitteln von wissenschaftlichen Erkenntnissen und Methoden, Heranführen von Studierenden an selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten.  |
| <b>Datum/Zeitraum</b> | <b>Maßnahmen nach Projektende</b>  | <b>Erläuterung</b>  |
| 10.04.2018            | Vorträge, Analytica Conference 2018, München   | Vorstellung der Projektergebnisse im Rahmen der Analytica Conference. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle.  |
| Ab April 2018         | Veröffentlichung in Fachzeitschriften  | GIT; Chromatographia  |
| Ab April 2018         | Aus- und Weiterbildung   | Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projektes erzielten Forschungsergebnisse über Seminare und Fortbildungsveranstaltungen. Die Seminare verbinden theoretische Grundkenntnisse mit der praktischen Tätigkeit im Labor und richten sich an HPLC-Anwender. |
| Ab April 2018         | Akademische Ausbildung   | Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projektes erzielten Forschungsergebnisse in die Lehrveranstaltungen zur Analytischen Chemie an den Universität Duisburg-Essen.  |

## 5.5 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurden die Transfermaßnahmen benannt. Hieraus geht hervor, dass seitens der Forschungseinrichtungen zahlreiche Maßnahmen unternommen wurden und auch zukünftig unternommen werden, um eine breite Öffentlichkeit zu erreichen. Die beteiligten Forschungseinrichtungen verfügen über ein großes interdisziplinäres wissenschaftliches Netzwerk und arbeiten im Rahmen von Innovationsprogrammen eng mit kleinen und mittleren Unternehmen zusammen. Aufgrund der teils langjährigen Erfahrungen und Arbeiten in Kooperation mit KMU besteht auch hier ein ausgezeichnetes Netzwerk, das

einen optimalen Wissenstransfer in die Wirtschaft ermöglicht. Wie bereits im ursprünglichen Forschungsantrag dargelegt, können die Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens unmittelbar von allen Unternehmen genutzt werden, die entsprechende analytische Trenn- und Detektionstechniken einsetzen. Insbesondere KMU haben auf Basis der hier erzielten Ergebnisse eine sichere Entscheidungsgrundlage, um in eine bestimmte Technologie zu investieren.

Wie bereits in Abschnitt 3.6 dargelegt, soll über weitergehende FuE-Maßnahmen über das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand die Entwicklung von Software-Tools vorangetrieben werden, die sowohl eine herstellerübergreifende Datenauswertung als auch die Einbindung von Meta-Informationen zur zielgerichteten Non-Target-Analyse komplexer Datensätze erlaubt.

## **6 Verwendung der Zuwendung**

### **6.1 Forschungsstelle 1 (IUTA e. V.)**

#### **6.1.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)**

Es wurden im Wesentlichen die im Antrag vorgesehenen Einsatzzeiten erbracht. Im Einzelnen erfolgten die Arbeiten der Angestellten mit wiss. Ausbildung (A) über 33,4 Personenmonate (geplant 35 Personenmonate).

#### **6.1.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)**

IUTA hat im Rahmen des Projektes einen Hochleistungsrechner erworben. Dieser wurde für die Speicherung und Auswertung der komplexen Datensätze verwendet.

#### **6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)**

Entfällt

### **6.2 Forschungsstelle 2 (AAC)**

#### **6.2.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)**

Es wurden die im Antrag vorgesehenen Einsatzzeiten erbracht. Die Arbeiten der Angestellten mit wiss. Ausbildung (A) erfolgte über 30 Personenmonate.

#### **6.2.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)**

AAC hat im Rahmen des Projektes einen Hochleistungsrechner erworben. Dieser wurde für die Speicherung und Auswertung der komplexen Datensätze verwendet.

#### **6.2.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)**

Entfällt

## **7 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag, d. h. die geleisteten Arbeiten waren notwendig und angemessen.

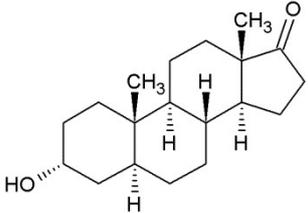
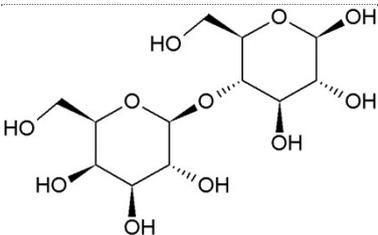
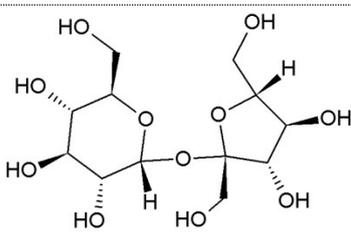
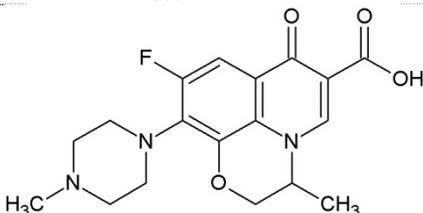
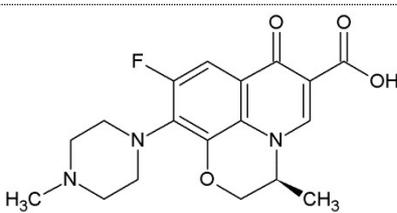
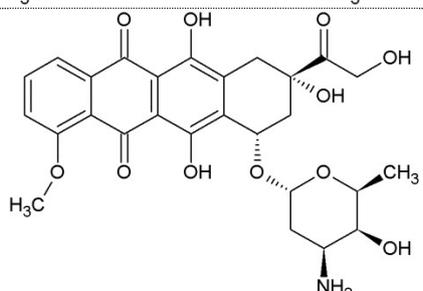
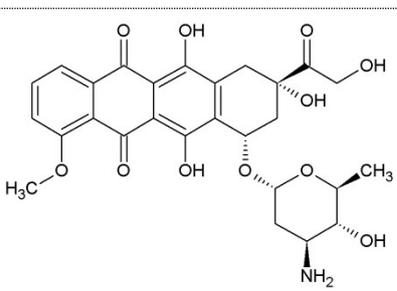
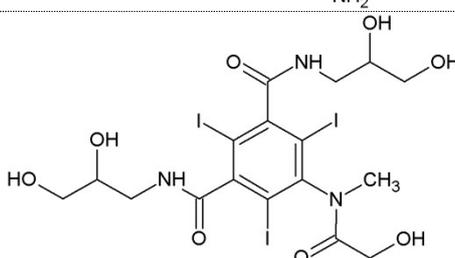
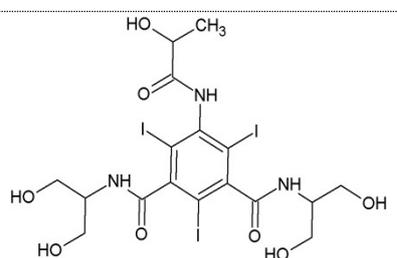
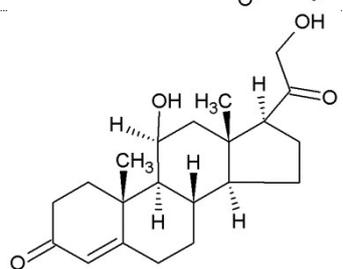
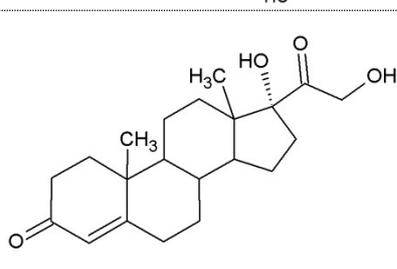
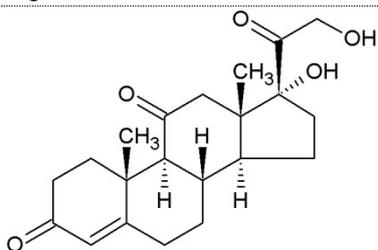
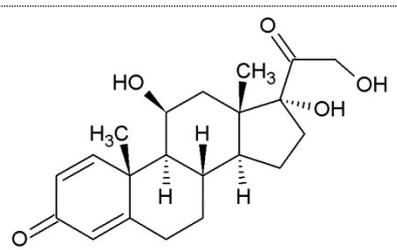
## 8 Anhang

### 8.1 Weitere Substanzinformationen

#### 8.1.1 Strukturformeln der verwendeten Isobaren bzw. Isomeren

Tabelle 26: Strukturformeln der verwendeten Isobaren bzw. Isomeren.

| Substanzname             | Strukturformel | Substanzname             | Strukturformel |
|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| 5-Methyl-1H-Benzotriazol |                | 4-Methyl-1H-Benzotriazol |                |
| Cyclophosphamid          |                | Ifosfamid                |                |
| Tramadol                 |                | Des-venlafaxin           |                |
| Diethylstilbestrol       |                | Equilin                  |                |
| Estron                   |                | Trenbolon                |                |
| Dehydroepiandrosteron    |                | Testosteron              |                |
| Dihydrotestosteron       |                | Etiocholanon             |                |

|  |  |
|--|--|
| <p>Androsteron</p>      |  |
| <p>Laktose</p>          | <p>Saccharose</p>     |
| <p>Ofloxacin</p>        | <p>Levofloxacin</p>   |
| <p>Doxorubicin</p>     | <p>Epirubicin</p>    |
| <p>Iomeprol</p>       | <p>Iopamidol</p>    |
| <p>Corticosteron</p>  | <p>Cortexolon</p>   |
| <p>Cortison</p>       | <p>Prednisolon</p>  |

## 8.1.2 Substanzspezifische Angaben

Tabelle 27: Substanzspezifische Angaben.

| Substanzname                    | Hersteller       | CAS-Nr.     | Bemerkung             |
|---------------------------------|------------------|-------------|-----------------------|
| <b>5-Methyl-1H-Benzotriazol</b> | Sigma Aldrich    | 136-85-6    | ≥ 97,5 %              |
| <b>4-Methyl-1H-Benzotriazol</b> | Sigma Aldrich    | 29878-31-7  | ≥ 90,0 %              |
| <b>Cyclophosphamid</b>          | Sigma Aldrich    | 50-18-0     | Monohydrat            |
| <b>Ifosfamid</b>                | Sigma Aldrich    | 3778-73-2   | ≥ 98,0 %              |
| <b>Tramadol</b>                 | Heumann PCS      | 123134-25-8 | Salz (Hydrochlorid)   |
| <b>Desvenlafaxin</b>            | Sigma Aldrich    | 93413-62-8  | Reinstoff             |
| <b>Diethylstilbestrol</b>       | Sigma Aldrich    | 56-53-1     | ≥ 99,0 %              |
| <b>Equilin</b>                  | Sigma Aldrich    | 474-86-2    | ≥ 98,0 %              |
| <b>Estron</b>                   | Sigma Aldrich    | 53-16-7     | ≥ 99,0 %              |
| <b>Trenbolon</b>                | Dr. Ehrenstorfer | 10161-33-8  | Reinstoff             |
| <b>Dehydroepiandrosteron</b>    | Sigma Aldrich    | 53-43-0     | ≥ 98,0 %              |
| <b>Testosteron</b>              | Sigma Aldrich    | 58-22-0     | ≥ 99,0 %              |
| <b>Dihydrotestosteron</b>       | Sigma Aldrich    | 521-18-6    | ≥ 99,0 %              |
| <b>Etiocholanon</b>             | Sigma Aldrich    | 53-42-9     | ≥ 98,0 %              |
| <b>Androsteron</b>              | Sigma Aldrich    | 53-41-8     | Reinstoff             |
| <b>Laktose</b>                  | Sigma Aldrich    | 63-42-3     | ≥ 99,5 %              |
| <b>Saccharose</b>               | Sigma Aldrich    | 57-50-1     | ≥ 99,5 %              |
| <b>Ofloxacin</b>                | Sigma Aldrich    | 82419-36-1  | ≥ 99,0 %              |
| <b>Levofloxacin</b>             | Sigma Aldrich    | 100986-85-4 | ≥ 98,0 %              |
| <b>Doxorubicin</b>              | Sigma Aldrich    | 23214-92-8  | Hydrochlorid 98-102 % |
| <b>Epirubicin</b>               | Sigma Aldrich    | 56420-45-2  | Hydrochlorid ≥ 90,0 % |
| <b>Iomeprol</b>                 | Dr. Ehrenstorfer | 78649-41-9  | Reinstoff             |
| <b>Iopamidol</b>                | Dr. Ehrenstorfer | 60166-93-0  | Reinstoff             |
| <b>Corticosteron</b>            | Sigma Aldrich    | 50-22-6     | ≥ 98,5 %              |
| <b>Cortexolon</b>               | Sigma Aldrich    | 152-58-9    | ≥ 98,0 %              |
| <b>Cortison</b>                 | Sigma Aldrich    | 53-06-5     | ≥ 98,0 %              |
| <b>Prednisolon</b>              | Sigma Aldrich    | 50-24-8     | ≥ 99,0 %              |

## 8.2 Probenvorbereitung der Realproben

### 8.2.1 Probenvorbereitung Abwasserproben

- Druckfiltration über 1  $\mu\text{m}$  Filter
- Anreicherung über SPE mit Oasis HLB-Kartuschen
  - Konditionierung mit 2 x 5 mL Methanol; Equilibrierung mit 2 x 5 mL Wasser
  - Anreicherung von je 200 mL Stich- bzw. Mischprobe
- Luftstromtrocknung der Kartuschen
- Einwicklung der Kartuschen in Alufolie und Verschweißung in Folie
- Lagerung der Proben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Bei Bedarf: Auftauen der Kartuschen und Extraktion mit 1 mL Methanol
- 1/10 Verdünnung des Extrakts mit Wasser
- Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  der  $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  Stammlösung des Isobarenmix 1
- Resultierende Probelösung enthält je  $500\text{ ng mL}^{-1}$  der 27 Komponenten und einen Methanolgehalt von 10 %.

### 8.2.2 Probenvorbereitung Pflanzenextrakt

- Auftauen der bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kräuter
- Mischung von 0,5005 g *Scutellaria barbata* und 0,5009 g *Hedyotis diffusa*
- Mischung mit 40 mL Wasser 30 min quellen lassen
- Gemisch aufkochen und 1 h kochen
- Flüssigkeit abdekantieren
- erneut 30 mL Wasser zu den Kräutern geben
- weitere 30 min kochen
- Flüssigkeit wieder abdekantieren und beide Extrakte zusammenführen
- Zentrifugation bei 4000 rpm; 15 min
- Membranfiltration (Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ )
- Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  des  $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  Isobarenmixes zu 5 mL Kräuterextrakt

### 8.2.3 Probenvorbereitung HTC-Kohle mittels ASE

In das ASE Röhrchen wurde zunächst ein Filter gegeben und der Filter mit Sand bedeckt. Anschließend wurde 1 g Probe darauf eingewogen. Das restliche Volumen des Röhrchens wurde mit Sand aufgefüllt und mit einem weiteren Filter bedeckt. Anschließend wurde das Röhrchen verschlossen und das unten aufgeführte Programm gefahren:

- Pre-Heat: 5 min
- Heat: 5 min
- Static: 15 min
- Flush: 10 vol %
- Purge: 150 sec
- Cycles: 1
- Pressure: 100 bar
- Temperature: 100 °C
- Solvent: 100 % Methanol

Der aus der ASE resultierende Methanolextrakt mit einem Volumen von 11 mL wurde mit Stickstoffgas auf 1 mL eingeeengt und anschließend mit Wasser auf 10 mL aufgefüllt, sodass der Organikanteil auf 10 % reduziert wurde.

### 8.3 Auswahl der Massenübergänge für Isobare mittels Triple-Quadrupol-MS

Tabelle 28: Massenübergänge des Isobarenmix im MRM-Modus der QTrap 3200.

| Massenübergang | Q1 Masse / Da | Q3 Masse / Da | Expected t <sub>R</sub> / min |
|----------------|---------------|---------------|-------------------------------|
| Paar 1_1       | 134,0         | 79,1          | 16,6                          |
| Paar 1_2       | 134,0         | 76,8          | 16,6                          |
| Paar 2_1       | 261,0         | 140,1         | 17,5                          |
| Paar 2_2       | 261,0         | 92,1          | 17,5                          |
| Paar 3_1       | 264,0         | 58,0          | 13,1                          |
| Paar 4_1_pos   | 269,0         | 251,1         | 25,5                          |
| Paar 4_1_neg   | 267,1         | 236,9         | (kein sMRM)                   |
| Paar 5_1       | 271,2         | 115,0         | 25,6                          |
| Paar 5_2       | 271,2         | 165,0         | 25,6                          |
| Paar 6_1       | 289,2         | 253,4         | 26,5                          |
| Paar 6_2       | 289,2         | 97,1          | 26,5                          |
| Paar 7_1       | 291,2         | 255,3         | 29,2                          |
| Paar 7_2       | 291,2         | 215,3         | 29,2                          |
| Paar 8_1       | 343,1         | 163,2         | 4,6                           |
| Paar 8_2       | 343,1         | 85,0          | 4,6                           |
| Paar 9_1       | 362,2         | 318,3         | 11,9                          |
| Paar 9_2       | 362,2         | 261,3         | 11,9                          |
| Massenübergang | Q1 Masse / Da | Q3 Masse / Da | Expected t <sub>R</sub> / min |
| Paar 10_1      | 544,1         | 396,9         | 15,2                          |
| Paar 10_2      | 544,1         | 361,1         | 15,2                          |
| Paar 11_1      | 777,9         | 558,9         | 8,4                           |
| Paar 11_2      | 777,9         | 387,1         | 8,4                           |
| Paar 12_1      | 347,3         | 329,3         | 22,3                          |
| Paar 12_2      | 347,3         | 109,3         | 22,3                          |
| Paar 13_1      | 361,2         | 163,3         | 18,7                          |
| Paar 13_2      | 361,2         | 147,3         | 18,7                          |

## 8.4 Weitere Parameter der IMS-MS-Methoden

### 8.4.1 TWIMS-MS

Tabelle 29: Weitere Parameter des TWIMS Systems.

| <b>Parameter</b>            | <b>Wert</b> |
|-----------------------------|-------------|
| Scan Frequency              | 60 sec      |
| Cone Voltage                | 30 V        |
| Trap Collision Energy       | 3 V         |
| Auflösung                   | 20.000      |
| Min. Peakpunkte             | 2           |
| Desolvatisierungstemperatur | 550 °C      |
| IMS Gasfluss                | 90 mL/min   |
| Flighttube Spannung         | 10 kV       |
| Reflectron                  | 3,78 kV     |
| Start Masse                 | 90,984      |
| End Masse                   | 1178,756    |

### 8.4.2 DMS-MS

Tabelle 30: Q1-Scan der QTrap 6500 nach Auftrennung in der DMS-Zelle.

| <b>Stop / Da</b> | <b>Start / Da</b> | <b>Dwell Time / sec</b> |
|------------------|-------------------|-------------------------|
| 130,0            | 140,0             | 0,0101                  |
| 255,0            | 300,0             | 0,0451                  |
| 340,0            | 350,0             | 0,0101                  |
| 355,0            | 375,0             | 0,0201                  |
| 540,0            | 550,0             | 0,0101                  |
| 770,0            | 782,0             | 0,0121                  |

Tabelle 31: Weitere Parameter der MS-Methode (QTrap 6500).

| <b>Parameter</b>       | <b>Wert</b> |
|------------------------|-------------|
| Total Scan Time        | 0,23 sec    |
| Dauer MS-Methode       | 7,59 min    |
| Cycles                 | 2000        |
| Declustering Potential | 100 V       |
| Entrance Potential     | 10 V        |
| Curtain Gas            | 20 V        |

|                  |          |
|------------------|----------|
| IonSpray Voltage | 5500 V   |
| Temperature      | Off      |
| Ion Source Gas 1 | 17,0 psi |
| Ion Source Gas 2 | 0 psi    |

---

## 8.5 Untersuchung der Realproben mittels 1D-LC-MS-Kopplung

### 8.5.1 Bestimmung der Retentionszeitstabilität

Tabelle 32: Retentionszeiten der Dreifachbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. (Methode: LC 20 – QTrap 3200; 30 Minuten Gradient).

| Paar Nr. | Mix 1<br>$t_R$ / min | Abwasser Stichprobe |       | Abwasser Mischprobe |       | Pflanzenextrakt   |       | HTC-Kohle         |       |
|----------|----------------------|---------------------|-------|---------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
|          |                      | $\bar{t}_R$ / min   | RSD % | $\bar{t}_R$ / min   | RSD % | $\bar{t}_R$ / min | RSD % | $\bar{t}_R$ / min | RSD % |
| 1        | 16,78                | 16,80               | 0,04  | 16,79               | 0,04  | 16,78             | 0,03  | 16,77             | 0,03  |
|          | 16,59                | 16,61               | 0,03  | 16,60               | 0,08  | 16,60             | 0,05  | 16,58             | 0,02  |
| 2        | 17,45                | 17,49               | 0,02  | 17,49               | 0,08  | 17,49             | 0,15  | 17,47             | 0,02  |
|          | 17,12                | 17,16               | 0,02  | 17,15               | 0,07  | 17,16             | 0,13  | 17,14             | 0,03  |
| 3        | 13,67                | 13,66               | 0,12  | 13,68               | 0,13  | 13,82             | 0,92  | 13,84             | 0,04  |
|          | 12,67                | 12,60               | 0,12  | 12,61               | 0,17  | 12,74             | 0,91  | 12,76             | 0,05  |
| 4        | 25,67                | 25,64               | 0,12  | 25,62               | 0,14  | 25,62             | 0,05  | 25,63             | 0,13  |
|          | 25,12                | 25,23               | 0,34  | 25,26               | 0,13  | 25,25             | 0,09  | 25,19             | 0,03  |
| 5        | 25,59                | 25,70               | 0,26  | 25,74               | 0,05  | 25,74             | 0,14  | 25,68             | 0,11  |
|          | 24,01                | 24,09               | 0,15  | 24,11               | 0,04  | 24,10             | 0,18  | 24,06             | 0,03  |
| 6        | 26,358               | 26,43               | 0,18  | 26,45               | 0,04  | 26,44             | 0,22  | 26,41             | 0,03  |
| 7        | 28,31                | 28,42               | 0,20  | 28,45               | 0,02  | 28,43             | 0,17  | 28,38             | 0,04  |
|          | 28,96                | 29,05               | 0,23  | 29,10               | 0,03  | 29,08             | 0,12  | 29,03             | 0,03  |
|          | 29,67                | 29,78               | 0,23  | 29,81               | 0,04  | 29,79             | 0,17  | 29,73             | 0,04  |
| 8        | 4,53                 | 4,55                | 0,63  | 4,54                | 0,12  | 4,58              | 0,14  | 4,56              | 0,15  |
|          | 4,74                 | 4,75                | 0,42  | 4,73                | 0,34  | 4,73              | 0,41  | 4,81              | 0,01  |
| 9        | 11,96                | 11,91               | 0,07  | 11,92               | 0,10  | 12,02             | 0,79  | 12,04             | 0,08  |
| 10       | 14,97                | 15,04               | 0,06  | 15,05               | 0,06  | 15,15             | 0,74  | 15,16             | 0,04  |
|          | 15,30                | 15,39               | 0,06  | 15,39               | 0,08  | 15,51             | 0,81  | 15,52             | 0,02  |
| 11       | 8,83                 | 8,83                | 0,17  | 8,81                | 0,14  | 8,80              | 0,24  | 8,82              | 0,23  |
|          | 7,95                 | 7,96                | 0,38  | 7,94                | 0,12  | 7,94              | 0,39  | 7,96              | 0,11  |
| 12       | 21,99                | 22,07               | 0,10  | 22,07               | 0,11  | 22,07             | 0,13  | 22,03             | 0,03  |
|          | 22,50                | 22,59               | 0,10  | 22,59               | 0,05  | 22,58             | 0,10  | 22,56             | 0,03  |

|    |       |       |      |       |      |       |      |       |      |
|----|-------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 13 | 19,01 | 19,10 | 0,06 | 19,10 | 0,07 | 19,10 | 0,12 | 19,06 | 0,03 |
|    | 18,67 | 18,74 | 0,04 | 18,74 | 0,11 | 18,73 | 0,10 | 18,71 | 0,02 |

Tabelle 33: Retentionszeiten der Doppelbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. (Methode: LC 20 – QTrap 3200; 120 Minuten Gradient).

| Paa<br>r Nr. | Mix 1<br>$t_R$ / min | Abwasser<br>Stichprobe |          | Abwasser<br>Mischprobe |          | Pflanzenex-<br>trakt |          | HTC-Kohle          |          |
|--------------|----------------------|------------------------|----------|------------------------|----------|----------------------|----------|--------------------|----------|
|              |                      | $\bar{t}_R$<br>min     | RSD<br>% | $\bar{t}_R$<br>min     | RSD<br>% | $\bar{t}_R$<br>min   | RSD<br>% | $\bar{t}_R$<br>min | RSD<br>% |
| 1            | 65,78                | 65,73                  | 0,02     | 65,64                  | 0,15     | 65,71                | 0,02     | 65,79              | -        |
|              | 65,04                | 64,99                  | 0,03     | 64,90                  | 0,12     | 64,93                | 0,04     | 64,94              | -        |
| 2            | 68,62                | 68,57                  | 0,11     | 68,39                  | 0,22     | 68,56                | 0,06     | 68,42              | -        |
|              | 67,27                | 67,22                  | 0,09     | 67,08                  | 0,22     | 67,16                | 0,05     | 67,06              | 0,04     |
| 3            | 53,70                | 53,56                  | 0,35     | 53,45                  | 0,14     | 53,29                | 0,06     | 53,07              | 0,15     |
|              | 49,41                | 49,24                  | 0,15     | 49,15                  | 0,04     | 49,05                | 0,04     | 48,86              | 0,10     |
| 4            | -                    | -                      | -        | -                      | -        | -                    | -        | -                  | -        |
|              | -                    | -                      | -        | -                      | -        | -                    | -        | -                  | -        |
| 5            | -                    | -                      | -        | -                      | -        | -                    | -        | -                  | -        |
|              | 94,94                | 94,96                  | 0,06     | 95,00                  | 0,01     | 95,12                | 0,03     | 95,05              | 0        |
| 6            | 104,2                | 104,3                  | 0,05     | 104,4                  | 0        | 104,4                | 0,07     | 104,4              | 0,02     |
| 7            | 111,9                | 112,0                  | 0,16     | 112,2                  | 0,02     | 112,1                | 0,11     | 112,2              | 0,03     |
|              | 114,5                | 114,6                  | 0,17     | 114,8                  | 0,01     | 114,7                | 0,21     | 114,7              | 0,02     |
|              | 117,1                | 117,3                  | 0,22     | 117,5                  | 0,04     | 117,4                | 0,17     | 117,3              | -        |
| 8            | 18,48                | 18,49                  | 0,08     | 18,40                  | 0,02     | 18,58                | 0,02     | 17,94              | 0,27     |
|              | -                    | -                      | -        | -                      | -        | -                    | -        | -                  | -        |
| 9            | 46,61                | 46,46                  | 0,13     | 46,38                  | 0,05     | 46,27                | 0,06     | 46,12              | 0,06     |
| 10           | 59,23                | 59,02                  | 0,07     | 58,98                  | 0,14     | 58,88                | 0,03     | 58,63              | 0,24     |
|              | 60,66                | 60,48                  | 0,08     | 60,38                  | 0,24     | 60,29                | 0,12     | 60,11              | 0,19     |
| 11           | 33,46                | 33,54                  | 0,26     | 33,59                  | 0,18     | 33,59                | 0,15     | 33,61              | 0,07     |
|              | 30,22                | 30,42                  | 0,23     | 30,49                  | 0,19     | 30,46                | 0,10     | 30,47              | 0,13     |
| 12           | 86,88                | 86,91                  | 0,14     | 86,92                  | 0,06     | 87,00                | 0,02     | 86,93              | 0,02     |
|              | 88,94                | 88,97                  | 0,11     | 89,00                  | 0,05     | 89,12                | 0,05     | 89,02              | 0,05     |
| 13           | 75,06                | 75,12                  | 0,24     | 74,95                  | 0,17     | 75,07                | 0,12     | 74,98              | 0,03     |
|              | 73,74                | 73,77                  | 0,25     | 73,57                  | 0,19     | 73,67                | 0,08     | 73,57              | 0,06     |

Tabelle 34: Retentionszeiten der Doppelbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. (Methode: LC 1260 / 1290 Infinity – QToF 6545; 120 Minuten Gradient).

| Paar Nr. | Mix 1<br>$t_R$ / min | Abwasser Stichprobe |       | Abwasser Mischprobe |       | Pflanzenextrakt   |       | HTC-Kohle         |       |
|----------|----------------------|---------------------|-------|---------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
|          |                      | $\bar{t}_R$ / min   | RSD % | $\bar{t}_R$ / min   | RSD % | $\bar{t}_R$ / min | RSD % | $\bar{t}_R$ / min | RSD % |
| 1        | 18,01                | 18,01               | 0,04  | 18,01               | 0,08  | 18,02             | 0,09  | 18,03             | 0,06  |
|          | 17,84                | 17,84               | 0,03  | 17,82               | 0,04  | 17,83             | 0,04  | 17,85             | 0,05  |
| 2        | 18,79                | 18,79               | 0,03  | 18,78               | 0,04  | 18,77             | 0,09  | 18,78             | 0,05  |
|          | 18,45                | 18,44               | 0,07  | 18,43               | 0,04  | 18,43             | 0,09  | 18,44             | 0,06  |
| 3        | 14,98                | 14,97               | 0,04  | 14,99               | 0,05  | 14,99             | 0,10  | 15,00             | 0,12  |
|          | 13,90                | 13,91               | 0,10  | 13,90               | 0,05  | 13,89             | 0,06  | 13,90             | 0,08  |
| 4        | -                    | -                   | -     | -                   | -     | -                 | -     | -                 | -     |
|          | -                    | -                   | -     | -                   | -     | -                 | -     | -                 | -     |
| 5        | -                    | -                   | -     | -                   | -     | -                 | -     | -                 | -     |
|          | 25,53                | 25,50               | 0,05  | 25,51               | 0,05  | 25,53             | 0,03  | 25,54             | 0,06  |
| 6        | -                    | -                   | -     | -                   | -     | -                 | -     | -                 | -     |
|          | 27,95                | 27,93               | 0,05  | 27,95               | 0,08  | 27,95             | 0,03  | 27,94             | 0,04  |
| 7        | -                    | -                   | -     | -                   | -     | -                 | -     | -                 | -     |
|          | -                    | -                   | -     | -                   | -     | -                 | -     | -                 | -     |
|          | -                    | -                   | -     | -                   | -     | -                 | -     | -                 | -     |
| 8        | 4,57                 | 4,57                | 0,03  | 4,57                | 0,03  | 4,62              | 0,18  | 4,51              | 1,40  |
|          | 4,77                 | 4,75                | 0,38  | 4,76                | 0,41  | -                 |       | 4,75              | -     |
| 9        | 13,19                | 13,17               | 0,05  | 13,19               | 0,05  | 13,19             | 0,11  | 13,19             | 0,08  |
| 10       | 16,44                | 16,44               | 0,04  | 16,46               | 0,04  | 16,46             | 0,10  | 16,46             | 0,07  |
|          | 16,82                | 16,81               | 0,04  | 16,81               | 0,08  | 16,83             | 0,10  | 16,83             | 0,06  |
| 11       | 9,92                 | 9,92                | 0,01  | 9,92                | 0,01  | 9,91              | 0,08  | 9,90              | 0,10  |
|          | 8,66                 | 8,69                | 0,02  | 8,67                | 0,23  | 8,68              | 0,10  | 8,67              | 0,18  |
| 12       | 23,45                | 23,46               | 0,03  | 23,47               | 0,06  | 23,45             | 0,03  | 23,47             | 0,04  |
|          | 24,00                | 24,00               | 0,03  | 24,01               | 0,06  | 24,00             | 0,03  | 24,02             | 0,04  |
| 13       | 20,46                | 20,43               | 0,03  | 20,43               | 0,07  | 20,43             | 0,06  | 20,45             | 0,05  |
|          | 20,09                | 20,07               | 0,07  | 20,07               | 0,04  | 20,08             | 0,04  | 20,09             | 0,05  |

Tabelle 35: Retentionszeiten der Dreifachbestimmung der Realproben für die verschiedenen Isobarenpaare und Vergleich mit der Retentionszeit des Standards. auf der zweiten Dimension mittels miniaturisierter 2D-LC mit Vorsäule und ohne Vorsäule auf der ersten Dimension.(a: Abwasser Stichprobe; b: Abwasser Mischprobe; c: Pflanzenextrakt; d: HTC-Kohle).

| Paar Nr. | mit Vorsäule                  |                             |                             |                             |                             | ohne Vorsäule                 |                             |                             |                             |                             |
|----------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|          | Mix 1<br>t <sub>R</sub> / min | (a)<br>t <sub>R</sub> / min | (b)<br>t <sub>R</sub> / min | (c)<br>t <sub>R</sub> / min | (d)<br>t <sub>R</sub> / min | Mix 1<br>t <sub>R</sub> / min | (a)<br>t <sub>R</sub> / min | (b)<br>t <sub>R</sub> / min | (c)<br>t <sub>R</sub> / min | (d)<br>t <sub>R</sub> / min |
| 1        | 0,261                         | 0,260                       | 0,238                       | 0,254                       | 0,272                       | 0,256                         | 0,253                       | 0,255                       | 0,252                       | 0,251                       |
| 2        | 0,266                         | 0,266                       | 0,249                       | 0,269                       | 0,266                       | 0,264                         | 0,261                       | 0,262                       | 0,258                       | 0,260                       |
|          | 0,271                         | 0,283                       | 0,253                       | 0,266                       | 0,279                       | 0,261                         | 0,258                       | 0,258                       | 0,256                       | 0,257                       |
| 3        | 0,245                         | 0,240                       | 0,239                       | 0,236                       | 0,253                       | 0,241                         | 0,233                       | 0,233                       | 0,230                       | 0,230                       |
| 4        | -                             | -                           | -                           | -                           | -                           | -                             | -                           | -                           | -                           | -                           |
|          | 0,323                         | 0,312                       | 0,334                       | 0,317                       | -                           | 0,308                         | -                           | -                           | 0,307                       | -                           |
| 5        | 0,298                         | 0,296                       | 0,296                       | -                           | -                           | 0,295                         | 0,293                       | 0,291                       | 0,235                       | 0,248                       |
| 6        | 0,321                         | 0,325                       | 0,309                       | 0,319                       | 0,325                       | 0,307                         | 0,306                       | 0,307                       | 0,303                       | 0,305                       |
| 7        | 0,329                         | 0,329                       | 0,330                       | 0,320                       | 0,327                       | 0,331                         | 0,327                       | 0,344                       | 0,323                       | 0,326                       |
| 8        | -                             | -                           | -                           | -                           | -                           | 0,282                         | -                           | -                           | -                           | -                           |
| 9        | -                             | -                           | -                           | -                           | -                           | 0,216                         | 0,236                       | 0,236                       | 0,220                       | 0,219                       |
| 10       | -                             | -                           | -                           | -                           | -                           | 0,253                         | 0,253                       | 0,248                       | 0,248                       | 0,250                       |
| 11       | 0,188                         | 0,183                       | 0,188                       | -                           | -                           | 0,181                         | 0,186                       | 0,182                       | -                           | -                           |
| 12       | 0,302                         | 0,293                       | 0,296                       | 0,308                       | 0,307                       | 0,296                         | 0,292                       | 0,287                       | 0,287                       | 0,306                       |
|          | 0,314                         | 0,315                       | 0,312                       | 0,311                       | 0,310                       | 0,292                         | 0,293                       | 0,288                       | 0,289                       | 0,291                       |
| 13       | 0,293                         | 0,289                       | 0,291                       | 0,290                       | -                           | 0,278                         | 0,274                       | 0,283                       | 0,271                       | 0,271                       |
|          | 0,291                         | 0,290                       | 0,290                       | 0,290                       | -                           | 0,280                         | 0,271                       | 0,284                       | 0,270                       | 0,286                       |

## 8.5.2 Abschätzung der Wiederfindungsrate

Tabelle 36: Auflistung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den Realproben für das System LC 20–QTrap 3200 mittels 2 h Gradient.

| Paar Nr. | Substanz                 | Wiederfindungsrate S/N / % |                     |                  |           |
|----------|--------------------------|----------------------------|---------------------|------------------|-----------|
|          |                          | Abwasser Stichprobe        | Abwasser Mischprobe | Pflanzen-extrakt | HTC-Kohle |
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol | 66                         | 90                  | 29               | 6         |
|          | 4-Methyl-1H-Benzotriazol | 88                         | 138                 | 83               | 32        |
| 2        | Cyclophosphamid          | 97                         | 60                  | 8                | 9         |
|          | Ifosfamid                | 217                        | 163                 | 230              | 84        |
| 3        | Tramadol                 | 105                        | 128                 | 127              | 97        |
|          | Desvenlafaxin            | 95                         | 115                 | 135              | 76        |
| 4        | Diethylstilbestrol       | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Equilin                  | -                          | -                   | -                | -         |
| 5        | Estron                   | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Trenbolon                | 104                        | 88                  | 164              | 47        |
| 6        | Dehydroepiandrosteron    | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Testosteron              | 70                         | 69                  | 17               | 15        |
| 7        | Dihydrotestosteron       | 143                        | 99                  | 56               | 23        |
|          | Etiocholanon             | 87                         | 65                  | 134              | 50        |
|          | Androsteron              | 61                         | 58                  | 100              | 19        |
| 8        | Laktose                  | 85                         | 65                  | 223              | 161       |
|          | Saccharose               | -                          | -                   | -                | -         |
| 9        | Ofloxacin                | 146                        | 152                 | 93               | 30        |
|          | Levofloxacin             |                            |                     |                  |           |
| 10       | Doxorubicin              | 1078                       | 1129                | 354              | 219       |
|          | Epirubicin               | 1865                       | 1663                | 1069             | 421       |
| 11       | lomeprol                 | 1470                       | 1158                | 119              | 36        |
|          | lopamidol                | 71                         | 13                  | 108              | 24        |
| 12       | Corticosteron            | 89                         | 129                 | 112              | 38        |
|          | Cortexolon               | 56                         | 62                  | 91               | 46        |
| 13       | Cortison                 | 73                         | 117                 | 133              | 52        |
|          | Prednisolon              | 53                         | 55                  | 15               | 13        |

Tabelle 37: Bestimmung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Realproben für das System LC 1260 / 1290 Infinity – QToF 6545; 30 Minuten Gradient.

| Paar Nr. | Substanz                 | Wiederfindungsrate S/N / % |                     |                  |           |
|----------|--------------------------|----------------------------|---------------------|------------------|-----------|
|          |                          | Abwasser Stichprobe        | Abwasser Mischprobe | Pflanzen-extrakt | HTC-Kohle |
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol | 13                         | 10                  | 88               | 27        |
|          | 4-Methyl-1H-Benzotriazol | 22                         | 14                  | 87               | 18        |
| 2        | Cyclophosphamid          | 29                         | 34                  | 32               | 19        |
|          | Ifosfamid                | 5                          | 9                   | 38               | 24        |
| 3        | Tramadol                 | 92                         | 94                  | 108              | 4         |
|          | Desvenlafaxin            | 80                         | 89                  | 122              | 3         |
| 4        | Diethylstilbestrol       | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Equilin                  | -                          | -                   | -                | -         |
| 5        | Estron                   | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Trenbolon                | 77                         | 31                  | 63               | 13        |
| 6        | Dehydroepiandrosteron    | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Testosteron              | 55                         | 26                  | 77               | 27        |
| 7        | Dihydrotestosteron       | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Etiocholanon             | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Androsteron              | -                          | -                   | -                | -         |
| 8        | Laktose                  | 91                         | 109                 | -                | -         |
|          | Saccharose               | 94                         | 119                 | -                | -         |
| 9        | Ofloxacin                | 80                         | 104                 | 50               | 16        |
|          | Levofloxacin             |                            |                     |                  |           |
| 10       | Doxorubicin              | 31                         | 26                  | 7                | 5         |
|          | Epirubicin               | 31                         | 26                  | 8                | 4         |
| 11       | lomeprol                 | 730                        | 1326                | 115              | 32        |
|          | lopamidol                | 49                         | 57                  | 179              | 48        |
| 12       | Corticosteron            | 80                         | 74                  | 75               | 12        |
|          | Cortexolon               | 82                         | 78                  | 80               | 14        |
| 13       | Cortison                 | 45                         | 60                  | 51               | 13        |
|          | Prednisolon              | 38                         | 49                  | 38               | 9         |

Tabelle 38: Bestimmung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Realproben für die 2D-LC mit Vorsäule auf der ersten Dimension.

| Paar Nr. | Substanz                 | Wiederfindungsrate S/N / % |                     |                  |           |
|----------|--------------------------|----------------------------|---------------------|------------------|-----------|
|          |                          | Abwasser Stichprobe        | Abwasser Mischprobe | Pflanzen-extrakt | HTC-Kohle |
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol | 211                        | 75                  | 15               | 44        |
|          | 4-Methyl-1H-Benzotriazol |                            |                     |                  |           |
| 2        | Cyclophosphamid          | 617                        | 117                 | 129              | 17        |
|          | Ifosfamid                |                            |                     |                  |           |
| 3        | Tramadol                 | 66                         | 24                  | 2                | 1         |
|          | Desvenlafaxin            |                            |                     |                  |           |
| 4        | Diethylstilbestrol       | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Equilin                  |                            |                     |                  |           |
| 5        | Estron                   | 8                          | 5                   | -                | -         |
|          | Trenbolon                |                            |                     |                  |           |
| 6        | Dehydroepiandrosteron    | 80                         | 5                   | 9                | 14        |
|          | Testosteron              |                            |                     |                  |           |
| 7        | Dihydrotestosteron       | 519                        | 260                 | 200              | 426       |
|          | Etiocholanon             |                            |                     |                  |           |
| 8        | Androsteron              | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Laktose                  |                            |                     |                  |           |
| 9        | Saccharose               | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Ofloxacin                |                            |                     |                  |           |
| 10       | Levofloxacin             | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Doxorubicin              |                            |                     |                  |           |
| 11       | Epirubicin               | -                          | -                   | -                | -         |
|          | Iomeprol                 |                            |                     |                  |           |
| 12       | Iopamidol                | 419                        | 124                 | -                | -         |
|          | Corticosteron            |                            |                     |                  |           |
| 13       | Cortexolon               | 130                        | 83                  | 346              | 125       |
|          | Cortison                 |                            |                     |                  |           |
| 13       | Prednisolon              | 8                          | 5                   | 4                | -         |
|          |                          |                            |                     |                  |           |

Tabelle 39: Bestimmung der Wiederfindungsraten des zudotierten Isobarenmixes zu den einzelnen Realproben für die 2D-LC ohne Vorsäule auf der ersten Dimension.

| Paar Nr. | Substanz                 | Wiederfindungsrate S/N / % |                     |                 |           |
|----------|--------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------|-----------|
|          |                          | Abwasser Stichprobe        | Abwasser Mischprobe | Pflanzenextrakt | HTC-Kohle |
| 1        | 5-Methyl-1H-Benzotriazol | 45                         | 24                  | 40              | 17        |
|          | 4-Methyl-1H-Benzotriazol |                            |                     |                 |           |
| 2        | Cyclophosphamid          | 36                         | 9                   | 57              | 10        |
|          | Ifosfamid                |                            |                     |                 |           |
| 3        | Tramadol                 | 66                         | 57                  | 442             | 7         |
|          | Desvenlafaxin            |                            |                     |                 |           |
| 4        | Diethylstilbestrol       | -                          | -                   | -               | -         |
|          | Equilin                  |                            |                     |                 |           |
| 5        | Estron                   | 13                         | 60                  | 86              | 115       |
|          | Trenbolon                |                            |                     |                 |           |
| 6        | Dehydroepiandrosteron    | 21                         | 14                  | 9               | 14        |
|          | Testosteron              |                            |                     |                 |           |
| 7        | Dihydrotestosteron       | 4                          | 67                  | 5               | 15        |
|          | Etiocholanon             |                            |                     |                 |           |
| 8        | Androsteron              | -                          | -                   | -               | -         |
|          | Laktose                  |                            |                     |                 |           |
| 9        | Saccharose               | 15                         | 40                  | 11              | 4         |
|          | Ofloxacin                |                            |                     |                 |           |
| 10       | Levofloxacin             | 74                         | 144                 | 235             | 116       |
|          | Doxorubicin              |                            |                     |                 |           |
| 11       | Epirubicin               | 294                        | 94                  | -               | -         |
|          | Iomeprol                 |                            |                     |                 |           |
| 12       | Iopamidol                | 50                         | 66                  | 56              | 51        |
|          | Corticosteron            |                            |                     |                 |           |
| 13       | Cortexolon               | 14                         | 19                  | 55              | 2         |
|          | Cortison                 |                            |                     |                 |           |
| 13       | Prednisolon              | 42                         | 55                  | 47              | 12        |
|          |                          |                            |                     |                 |           |
|          |                          | 158                        | 263                 | 152             | 45        |

## 8.6 Methodenparameter für LC x LC-MS-Kopplung

### 8.6.1 Methodenparameter für miniaturisierte LC x LC-Trennung

Tabelle 40: LC-Parameter der ersten und zweiten Dimension. Säulenparameter siehe Tabelle 12.

| <b>Parameter</b>      | <b>1. Dimension</b>      | <b>2. Dimension</b>         |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Säule                 | Hypercarb + BioBasic CN  | SunShell RP-Aqua            |
| Laufmittel A          | Wasser + 0,1% FA         | Wasser + 0,1% FA            |
| Laufmittel B          | Methanol + 0,1% FA       | ACN + 0,1% FA               |
| Laufzeit              | 34 min                   | 30 sec / 0,5 min            |
| Gradientendauer       | 12 min                   | 17 sec / 0,28 min           |
| Injektionsvolumen     | 450 nL                   | Fullloop-Injektion (225 nL) |
| Flussrate             | 450 nL min <sup>-1</sup> | 35 µL min <sup>-1</sup>     |
| Temperatur Säulenofen | 30 °C                    | 50 °C                       |

## 9 Literatur

- [1] "Grünenthal GmbH." [Online]. Available: [http://www.contergan.grunenthal.info/thalidomid/Home\\_/de\\_DE/328800285.jsp](http://www.contergan.grunenthal.info/thalidomid/Home_/de_DE/328800285.jsp). Zugriff: 15.07.18 12:00 Uhr
- [2] K. Imatani and D. Wong, "Add a New Dimension To Your Research With the Agilent 6560 Ion Mobility Q-ToF Lc / Ms," *Agil. Technol. Appl. Highlights*, pp. 1–28, 2015.
- [3] C. Bylda, R. Thiele, U. Kobold, A. Bujotzek, and D. A. Volmer, "Rapid quantification of digitoxin and its metabolites using differential ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 4, pp. 2121–2128, 2015.
- [4] "Agilent Technologies." [Online]. Available: <http://www.agilent.com/home>. Zugriff: 15.07.18 12:10 Uhr
- [5] "Thermo Scientific." [Online]. Available: <http://www.thermoscientific.de/home.html>. Zugriff: 15.07.18 12:10 Uhr
- [6] "Shimadzu Deutschland GmbH." [Online]. Available: <http://www.shimadzu.de/>.
- [7] S. Kromidas, *Das HPLC-MS-Buch für Anwender*. Weinheim: Wiley VCH Verlag GmbH, 2017.
- [8] J. M. Davis and J. C. Giddings, "Statistical Theory of Component Overlap in Multicomponent Chromatograms," *Anal. Chem.*, vol. 55, no. 3, pp. 418–424, 1983.
- [9] PharmaWiki, "Epirubicin," 2018. [Online]. Available: <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Epirubicin>. Zugriff: 14.07.18 11:00 Uhr
- [10] PharmaWiki, "Doxorubicin," 2018. [Online]. Available: <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Doxorubicin&Spez=True#bottom>. Zugriff: 14.07.18 11:00 Uhr
- [11] V. H. Bramwell *et al.*, "Cyclophosphamide versus ifosfamide: final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas.," *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 3, p. 311, 1987.
- [12] C. M. Camaggi, R. Compari, E. Strocchi, F. Testoni, and F. Pannuti, "HPLC analysis of doxorubicin, epirubicin and fluorescent metabolites in biological fluids," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 21, no. 3, pp. 216–220, 1988.
- [13] V. G. Kaklamani and W. J. Gradishar, "Epirubicin versus doxorubicin: which is the anthracycline of choice for the treatment of breast cancer?," *Clin. Breast Cancer*, vol. 4 Suppl 1, no. April, pp. S26–S33, 2003.
- [14] Q. Cao, Q. Yu, and D. W. Connell, "Fate simulation and risk assessment of endocrine disrupting chemicals in a reservoir receiving recycled wastewater," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 24, pp. 6243–6250, 2010.
- [15] F. Hoffmann and W. Kloas, "Estrogens can disrupt amphibian mating behavior," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. 1–8, 2012.
- [16] M. Rolland, J. Le Moal, V. Wagner, D. Royère, and J. De Mouzon, "Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France," *Hum. Reprod.*, vol. 28, no. 0, pp. 462–470, 2013.
- [17] T. E. Hormones, B. Cancer, and C. Group, "Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women : Reanalysis of," vol. 94, no. 8, 2002.
- [18] C. Desbrow, E. J. Routledge, G. C. Brighty, J. P. Sumpter, and M. Waldock, "Identification of estrogenic chemical in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening," *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549 Á / 1558, no. 97, pp. 1549–1558, 1998.
- [19] Ökozentrum, "<http://www.oekotoxzentrum.ch/expertenservice/qualitaetskriterien/qualitaetskriterienverschlaege-oekotoxzentrum/>," 2018. Zugriff: 28.07.18 14:00 Uhr.
- [20] Das Europäische Parlament und der Rat der europäischen Union, "Richtlinie 2013/39/EU des europäischen Parlaments und des Rates," *Amtsblatt der Eur. Union*, vol. L 226/1, pp. 1–17, 2013.
- [21] The European Parliament and the Council of the European Union, "Richtlinie

- 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Umweltqualitätsnormen im Bereich der Wasserpolitik," *J. Eur. Public Policy*, p. 14, 2008.
- [22] EUROPÄISCHE KOMMISSION, *amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy*, vol. 0429, no. 2011. 2012.
- [23] E. Kommission, "DURCHFÜHRUNGSBESCHLUSS (EU) 2015/495 DER KOMMISSION vom 20. März 2015 zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß der Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rat," vol. L78, no. 40, p. 3, 2015.
- [24] C. J. Gray *et al.*, "Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1860, no. 8, pp. 1688–1709, 2016.
- [25] M. Romm and V. P. Miller, "Ultrafast Analysis of THCCOOH in Urine Using the Agilent RapidFire High-Throughput Mass Spectrometry System," pp. 1–4.
- [26] B. Patwardhan, "Ethnopharmacology and drug discovery," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 100, no. 1–2, pp. 50–52, 2005.
- [27] C. vom Eyser, K. Palmu, T. C. Schmidt, and J. Tuerk, "Pharmaceutical load in sewage sludge and biochar produced by hydrothermal carbonization," *Sci. Total Environ.*, vol. 537, pp. 180–186, 2015.
- [28] C. Vom Eyser, K. Palmu, R. Otterpohl, T. C. Schmidt, and J. Tuerk, "Determination of pharmaceuticals in sewage sludge and biochar from hydrothermal carbonization using different quantification approaches and matrix effect studies," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 3, pp. 821–830, 2015.
- [29] E. U. Grushka, "Chromatographic peak shapes. Their origin and dependence on the experimental parameters," *J. Phys. Chem.*, vol. 76, no. 18, pp. 2586–2593, 1972.
- [30] A. P. Schellinger and P. W. Carr, "Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1109, no. 2, pp. 253–266, 2006.
- [31] F. Lestremay, A. Cooper, R. Szucs, F. David, and P. Sandra, "High-efficiency liquid chromatography on conventional columns and instrumentation by using temperature as a variable: I. Experiments with 25 cm x 4.6 mm I.D., 5 µm ODS columns," *J. Chromatogr. A*, vol. 1109, no. 2, pp. 191–196, 2006.
- [32] T. Hetzel, C. Blaesing, M. Jaeger, T. Teutenberg, and T. C. Schmidt, "Characterization of peak capacity of microbore liquid chromatography columns using gradient kinetic plots," *J. Chromatogr. A*, vol. 1485, pp. 62–69, 2017.
- [33] J. C. May *et al.*, "Conformational ordering of biomolecules in the gas phase: Nitrogen collision cross sections measured on a prototype high resolution drift tube ion mobility-mass spectrometer," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 4, pp. 2107–2116, 2014.
- [34] I. Campuzano *et al.*, "Structural characterization of drug-like compounds by ion mobility mass spectrometry: Comparison of theoretical and experimentally derived nitrogen collision cross sections," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 2, pp. 1026–1033, 2012.
- [35] R. Kurulugama and K. Imatani, "The Agilent Ion Mobility Q-TOF Mass Spectrometer System, Technical overview by Agilent Technologies." Agilent Technologies, 2013.
- [36] J. C. May and J. A. McLean, "Ion mobility-mass spectrometry: Time-dispersive instrumentation," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 3, pp. 1422–1436, 2015.
- [37] R. T. Kurulugama, E. Darland, F. Kuhlmann, G. Stafford, and J. Fjeldsted, "Evaluation of drift gas selection in complex sample analyses using a high performance drift tube ion mobility-QTOF mass spectrometer," *Analyst*, vol. 140, no. 20, pp. 6834–6844, 2015.
- [38] E. Jazan and M. Tabrizchi, "Kinetic study of proton-bound dimer formation using ion mobility spectrometry," *Chem. Phys.*, vol. 355, no. 1, pp. 37–42, 2009.
- [39] P. Dwivedi, C. Wu, L. M. Matz, B. H. Clowers, W. F. Siems, and H. H. Hill, "Gas-phase chiral separations by ion mobility spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 8200–8206, 2006.
- [40] C. Lee *et al.*, "Application of Heart-Cutting 2D-LC for the Determination of Peak Purity for a Chiral Pharmaceutical Compound by HPLC," *Chromatographia*, vol. 76, no. 1–2,

- pp. 5–11, 2013.
- [41] R. E. Murphy, M. R. Schure, and J. P. Foley, "Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 8, pp. 1585–1594, 1998.
- [42] M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, and J. C. Gebler, "Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 19, pp. 6426–6434, 2005.
- [43] L. W. Potts, D. R. Stoll, X. Li, and P. W. Carr, "The impact of sampling time on peak capacity and analysis speed in on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 36, pp. 5700–5709, 2010.
- [44] F. Erni and R. W. Frei, "Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures," *J. Chromatogr. A*, vol. 149, no. C, pp. 561–569, 1978.
- [45] P. J. Marriott, Z. Wu, and P. Schoenmakers, "Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - an update," *LCGC Eur.*, vol. 25, no. 5, 2012.
- [46] S. Stephan, C. Jakob, J. Hippler, and O. J. Schmitz, "A novel four-dimensional analytical approach for analysis of complex samples," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 14, pp. 3751–3759, 2016.
- [47] T. Teutenberg, S. Wiese, P. Wagner, and J. Gmehling, "High-temperature liquid chromatography. Part II: Determination of the viscosities of binary solvent mixtures-Implications for liquid chromatographic separations," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 48, pp. 8470–8479, 2009.
- [48] P. J. Schoenmakers, G. Vivó-Truyols, and W. M. C. Decrop, "A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems," *J. Chromatogr. A*, vol. 1120, no. 1–2, pp. 282–290, 2006.
- [49] R. A. Shellie and P. R. Haddad, "Comprehensive two-dimensional liquid chromatography," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, no. 3, pp. 405–415, 2006.
- [50] D. R. Stoll, E. S. Talus, D. C. Harmes, and K. Zhang, "Evaluation of detection sensitivity in comprehensive two-dimensional liquid chromatography separations of an active pharmaceutical ingredient and its degradants," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 1, pp. 265–277, 2015.
- [51] M. Filgueira, Y. Huang, K. Witt, C. Castells, and P. W. Carr, "Improving peak capacity in fast on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography with post first dimension flow-splitting," *Anal. Chem.*, vol. 83, pp. 9531–9539, 2011.
- [52] D. Li and O. J. Schmitz, "Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 20, pp. 6511–6517, 2013.
- [53] D. C. Patel, M. F. Wahab, T. C. O'Haver, and D. W. Armstrong, "Separations at the Speed of Sensors," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 5, pp. 3349–3356, 2018.
- [54] M. Ruff, M. S. Mueller, M. Loos, and H. P. Singer, "Quantitative target and systematic non-target analysis of polar organic micro-pollutants along the river Rhine using high-resolution mass-spectrometry - Identification of unknown sources and compounds," *Water Res.*, vol. 87, pp. 145–154, 2015.
- [55] F. Hernández, M. Ibáñez, R. Bade, L. Bijlsma, and J. V. Sancho, "Trends in Analytical Chemistry Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry," *Trends Anal. Chem.*, vol. 63, pp. 140–157, 2014.
- [56] E. Gracia-Lor, J. V. Sancho, R. Serrano, and F. Hernández, "Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia," *Chemosphere*, vol. 87, no. 5, pp. 453–462, 2012.
- [57] A. Mendoza *et al.*, "Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard," *Environ. Res.*, vol. 140, pp. 225–241, 2015.
- [58] J. Nurmi and J. Pellinen, "Multiresidue method for the analysis of emerging contaminants in wastewater by ultra performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 38, pp. 6712–6719, 2011.

- [59] R. Loos, B. M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, and G. Bidoglio, "EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters," *Environ. Pollut.*, vol. 157, no. 2, pp. 561–568, 2009.
- [60] J. Leonhardt, T. Teutenberg, J. Tuerk, M. P. Schlüsener, T. A. Ternes, and T. C. Schmidt, "A comparison of one-dimensional and microscale two-dimensional liquid chromatographic approaches coupled to high resolution mass spectrometry for the analysis of complex samples," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 18, pp. 7697–7706, 2015.